

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2003.06.09**

(30) Prioridade(s): **2002.06.07 US 165250**

(43) Data de publicação do pedido: **2009.05.20**

(45) Data e BPI da concessão: **2013.10.09**
227/2013

(73) Titular(es):

XIGEN INFLAMMATION LTD.

ARCH. MAKARIOU III 195 NEOCLEOUS HOUSE
3030 LIMASSOL **CY**

(72) Inventor(es):

CHRISTOPHE BONNY

CH

(74) Mandatário:

ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO
RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **INIBIDORES PEPTÍDICOS DA VIA DE TRANSDUÇÃO DE SINAL DA JNK, PERMEÁVEIS EM CÉLULAS**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO PROPORCIONA PÉPTIDOS PERMEÁVEIS EM CÉLULAS QUE SE LIGAM A PROTEÍNAS JNK E INIBEM OS EFEITOS MEDIADOS POR JNK, EM CÉLULAS EXPRESSANDO A JNK.

RESUMO

"INIBIDORES PEPTÍDICOS DA VIA DE TRANSDUÇÃO DE SINAL DA JNK, PERMEÁVEIS EM CÉLULAS"

A invenção proporciona péptidos permeáveis em células que se ligam a proteínas JNK e inibem os efeitos mediados por JNK, em células expressando a JNK.

DESCRIÇÃO

"INIBIDORES PEPTÍDICOS DA VIA DE TRANSDUÇÃO DE SINAL DA JNK, PERMEÁVEIS EM CÉLULAS"

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se, de um modo geral, a inibidores de proteína cinases e, mais especificamente, a inibidores da proteína cinase, cinase do terminal amina de c-Jun.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A cinase do terminal amina de c-Jun (JNK) é um membro do grupo activado pelo stress das proteína cinases activadas pelo mitogénio (MAP). Estas cinases têm sido associadas ao controlo do crescimento e à diferenciação celular e, de um modo mais geral, à resposta de células a estímulos ambientais. A via de transdução de sinal da JNK é activada em resposta a stress ambiental e pelo envolvimento de várias classes de receptores da superfície celular. Estes receptores podem incluir receptores de citocinas, receptores serpentina e receptores de tirosina cinases. Em células de mamífero, a JNK foi associada a processos biológicos, tais como a transformação oncogénica e à mediação de respostas adaptativas a stress ambiental. A JNK tem sido, também, associada à modulação de respostas imunitárias, incluindo maturação e diferenciação de células imunitárias,

assim como efectivação da morte celular programada, em células identificadas para a destruição pelo sistema imunitário.

O documento WO 98/44106 divulga a identificação e a caracterização de *Islet-Brain I* humano e de rato (IB 1), um activador transcricional que está envolvido no controlo dos genes GLUT2 e a insulina por interacção com os elementos reguladores em cis homólogos dos promotores de GLUT2 e a insulina. O ADNc de IB1 de rato codifica uma proteína com 714 aminoácidos e o ADNc IB1 humano uma proteína com 711 aminoácidos. É divulgada a utilização de polipéptidos, ácidos nucleicos, agonistas e antagonistas de IB1 no tratamento ou no diagnóstico de diabetes, doenças neurológicas, tais como demência e/ou parkinsonismo, inibição/promoção da apoptose e cancro.

O documento WO 98/49188 descreve a proteína I de interacção com JNK (JIP-I), um inibidor da proteína JNKI e métodos de tratamento de um estado patológico ou de prevenção da ocorrência de um estado patológico num doente pela administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de polipéptidos, péptidos, miméticos de peptidos ou ácidos nucleicos JIP-I.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção é parcialmente baseada na identificação de péptidos que são inibidores eficazes de proteínas JNK. Os péptidos, aqui designados como inibidores de péptidos JNK, reduzem os efeitos de proliferação celular da cinase do terminal amina de c-Jun (JNK), a jusante.

Consequentemente, a invenção inclui péptidos inibidores da JNK ("péptidos JNKI"), assim como péptidos quiméricos que incluem um péptido inibidor da JNK ligado a um péptido transportador, o qual pode ser utilizado para direccionar um péptido no qual esteja presente para uma localização celular pretendida. A sequência de transporte pode ser utilizada para direccionar o transporte do péptido através da membrana plasmática. Alternativamente ou adicionalmente, o péptido transportador pode ser utilizado para direccionar o péptido para uma localização intracelular pretendida, tal como o núcleo.

Os péptidos inibidores da JNK podem estar presentes como como polímeros de D-aminoácidos.

A invenção proporciona ainda péptidos para utilização num método para prevenir ou tratar morte neuronal ou lesões cerebrais num indivíduo. O método inclui a administração ao indivíduo de um péptido bioactivo permeável em células que previna danos aos neurónios ou a apoptose neuronal. Um péptido bioactivo permeável em células é, por exemplo, um péptido inibidor de JNK ("JNKI"). De um modo preferido, o péptido bioactivo permeável em células é SEQ ID N°: 3, 4, 6, ou 22.

A morte neuronal ou as lesões cerebrais são causadas por isquemia cerebral. Assim, num aspecto, o péptido é administrado antes do indivíduo sofrer um evento isquémico. Num outro aspecto, o péptido é administrado após o indivíduo sofrer um evento isquémico. O evento isquémico é, e. g., crónico ou agudo.

A morte neuronal ou as lesões cerebrais são causadas por outros mecanismos excitotóxicos. Deste modo, num aspecto, o péptido é administrado antes do indivíduo sofrer um mecanismo

excitotóxico. Num outro aspecto, o péptido é administrado após o indivíduo sofrer um mecanismo excitotóxico. O mecanismo excitotóxico pode ser, e. g., danos cerebrais hipóxicos/isquémicos, danos cerebrais traumáticos, morte neuronal resultante de episódios epilépticos e vários distúrbios neurodegenerativos, tal como a doença de Alzheimer.

Em alguns aspectos, a administração dos péptidos pode ocorrer por qualquer via de administração seleccionada de: intrauricular, intraperitoneal, nasal, intravenosa, oral e distribuição por emplastro.

De entre as vantagens proporcionadas pela invenção está o facto dos péptidos inibidores da JNK serem pequenos e poderem ser produzidos facilmente, em grandes quantidades e com pureza elevada. Os péptidos inibidores são, também, resistentes à degradação intracelular e são fracamente imunogénicos. Consequentemente, os péptidos estão bem adequados para aplicações *in vitro* e *in vivo*, em que é pretendida a inibição da expressão da JNK.

A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos utilizados aqui têm o mesmo significado que o normalmente entendido por um especialista na técnica à qual esta invenção pertence. Embora na realização ou no teste da presente invenção possam ser utilizados métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos aqui descritos, são descritos abaixo métodos e materiais adequados. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são apenas ilustrativos e não pretendem ser limitativos.

Outras características e vantagens da invenção serão evidentes a partir da descrição detalhada e das reivindicações seguintes.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As FIG. 1A-C são diagramas mostrando alinhamentos das regiões conservadas do domínio JBD nos factores de transcrição indicados.

A FIG. 2 é um diagrama mostrando alinhamentos dos péptidos de fusão TAT-IB genéricos.

A FIG. 3 é um histograma representando a inibição da morte de células β pelo domínio JBD mínimo do IB1, com 23 aminoácidos de comprimento, em comparação com o domínio JBD completo, com 280 aminoácidos.

A FIG. 4 é uma ilustração mostrando os efeitos dos péptidos TAT, TAT-IB1 e TAT-IB2 sobre a fosforilação de JNK recombinantes. O painel A mostra a inibição da fosforilação de c-Jun, ATF2 e Elk1 por JNK recombinantes, *in vitro*. O painel B mostra experiências de resposta à dose, semelhantes às do painel A.

A FIG. 5 é um histograma representando a inibição da fosforilação de L-TAT-IB por JNK recombinantes. O painel A mostra a inibição da fosforilação de c-Jun, ATF2 e Elk1 por JNK recombinantes, por L-TAT-IB, *in vitro*, na presença de MKK4. O painel B mostra experiências de resposta à dose semelhantes, com MKK7.

A FIG. 6 é uma ilustração mostrando a inibição da fosforilação de c-Jun por JNK activadas.

A FIG. 7 é um histograma representando a inibição a curto prazo da morte de células β pancreáticas, induzida pela IL-1 β , pelos péptidos I-TAT-IB.

A FIG. 8 é um histograma representando inibição a curto prazo da morte de células β pancreáticas, induzida pela IL-1 β , pelos péptidos D-TAT-IB.

A FIG. 9 é um histograma representando inibição a longo prazo da morte de células β pancreáticas, induzida pela IL-1 β , pelos péptidos L-TAT-IB1 e D-TAT-IB1.

A Fig. 10 é um histograma representando a inibição da morte de células WiDr do cancro do cólon humano, induzida por irradiação, pelos péptidos L-TAT-IB1 e D-TAT-IB1.

A Fig. 11 é uma ilustração mostrando a modulação da actividade da cinase JMK pelos péptidos L-TAT, TAT-IB1 e D-TAT-IB1.

A Fig. 12 são gráficos representando os efeitos protectores dos péptidos TAT-IB1 em murganhos. O painel A mostra o efeito da irradiação sobre o peso. O painel B mostra o efeito da irradiação sobre os estados de edema e eritema.

A Fig. 13 é uma figura representando o efeito protector de D-JNK1 na perda de audição induzida por ruído. O painel A mostra uma representação esquemática da experiência, o painel B mostra

um gráfico da perda de audição, os painéis C e D representam, respectivamente, o exame histológico do ouvido contralateral (controlo) e injectado com D-JNK1.

As FIG. 14 A e B são figuras representando o efeito protector de D-JNK1 na perda de audição induzida por antibiótico.

A Fig. 15 é um gráfico de barras representando a recuperação aumentada de ilhéus pancreáticos submetidos ao tratamento com D-JNK1 durante o processo de isolamento.

A FIG. 16A é uma ilustração mostrando a sensibilidade e a especificidade dos péptidos inibidores da JNK (JNKI) da presente invenção contra a activação e a acção da JNK. A FIG. 16A mostra o efeito inibidor de L-JNKI1 e D-JNKI1 sobre a activação e acção da JNK em ensaios de cinase com, respectivamente, JNK1 α 1 recombinante e GST-Jun e substratos GST-Elk1.

A FIG. 16B é uma ilustração mostrando a sensibilidade e especificidade dos péptidos inibidores da JNK (JNKI) da presente invenção contra a activação e acção da JNK. A FIG. 16B mostra o efeito inibidor da sequência mínima de JIP-IB1, inibidora da JNK, com 20 aminoácidos (forma L de JBD₂₀) em experiências de resposta à dose, utilizando condições semelhantes às da FIG. 16A e com quantidades decrescentes de L-JBD₂₀.

A FIG. 16C é uma ilustração mostrando a sensibilidade e especificidade dos péptidos inibidores da JNK (JNKI) da presente invenção contra a activação e acção da JNK. A FIG. 16C mostra a especificidade dos péptidos JNKI da presente invenção no

bloqueio de activação da JNK, utilizando ensaios de cinase com diferentes cinases recombinantes.

A Fig. 17A é uma ilustração mostrando a activação da JNK induzida por N-metil-D-aspartato ("NMDA"), em neurónios não tratados (0) e em neurónios expostos a 100 μ M de NMDA, durante 10 minutos (10') ou durante 30 minutos (30').

A Fig. 17B é uma ilustração que mostra os efeitos dos péptidos JNKI da presente invenção sobre o nível da fosforilação de c-Jun e a quantidade da JNK após exposição a NMDA. Na FIG. 17B, foi aplicada 4 vezes mais proteína nos extractos nucleares (Nucl), do que nos citoplasmáticos (Cyt) e as abreviaturas utilizadas são: C: Controlo; N: NMDA; L: L-JNKI1 + NMDA; D: D-JNKI1 + NMDA.

A Fig. 17C é um histograma que representa a quantificação da expressão de c-fos por PCR em tempo real, utilizando ARN extraído. A FIG. 17C ilustra a expressão de c-fos em relação à actina.

A Fig. 18 são ilustrações e um histograma representando a evolução ao longo do tempo da neurotoxicidade de NMDA e da neuroprotecção por L-JNKI1, D-JNKI1 e dois péptidos de controlo, TAT-vazia (apenas a sequência TAT, sem JBD₂₀) e L-JNKI1-mut (em que 6 aminoácidos foram transformados em alanina).

As FIG. 18A-18E são uma série de micrografias representando neurónios corados com Hoechst, às 24 horas após o tratamento com NMDA.

A FIG. 18F é um histograma representando a morte neuronal às 12 h, 24 h e 48 h após a exposição a NMDA (100 μ M de NMDA), como indicado pela actividade de LDH.

A Fig. 19 são ilustrações e um histograma representando a isquemia transiente em murganhos.

A Fig. 19A mostra o efeito sobre o volume do enfarte de um pré-tratamento, no qual foi administrada uma injeção intracerebroventricular (icv) de D-JNKI1 (15,7 ng em 2 μ L de solução de tampão de fosfato (PBS)), a um indivíduo, 1 hora antes da oclusão.

A FIG. 19B mostra o efeito sobre o volume do enfarte, quando a injeção icv de D-JNKI1 foi administrada 1 hora antes da oclusão ou 3 horas, 6 horas e 12 horas após a oclusão.

A FIG. 20 são ilustrações e um histograma mostrando a protecção por D-JNKI1 contra isquemia focal permanente em ratos jovens (P14) que tinham sido perfundidos 24 horas após a oclusão.

A FIG. 20A é uma série de ilustrações que representam exemplos de lesões de um rato de controlo (painel esquerdo) e de um rato tratado com D-JNKI1, 6 horas após a oclusão (painel direito).

A FIG. 20B é um histograma representando os volumes de enfarte, expressos como % do volume hemisférico, após a injeção intraperitoneal (i. p.) de D-JNKI1 a -0,5 h antes ou +6 h ou +12 h após a oclusão.

A FIG. 20C é uma série de ilustrações representando os resultados de imuno-histoquímica para P-c-Jun, em que c-Jun estava fosforilado em muitos neurónios no córtex peri-enfarte.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção é baseada, em parte, na identificação de péptidos permeáveis em células que inibem a via sinalizadora activada da cinase do terminal amina de c-Jun (JNK). Estes péptidos são aqui designados como péptidos inibidores da JNK. Adicionalmente, a identificação proporciona métodos e composições farmacêuticas para o tratamento de patofisiologias associadas a sinalização com JNK.

Foram identificados péptidos inibidores da JNK pela inspecção de alinhamentos de sequências entre os Domínios de Ligação a kJNK em várias proteínas de ligação à insulina (IB). Os resultados deste alinhamento são mostrados nas FIG. 1A-1C. A FIG. 1A representa a região com homologia mais elevada entre as JBD de IB1, IB2, c-Jun e ATF2. O painel B representa o alinhamento da sequência de aminoácidos de JBD de IB1 e IB2. Os resíduos totalmente conservados são indicados por asteriscos, enquanto que os resíduos modificados para Ala no vector GFP-JBD_{23Mut} são indicados por círculos não preenchidos. A FIG. 1C mostra as sequências de aminoácidos de proteínas quiméricas que incluem um domínio peptídico inibidor de JNK e um domínio de transporte. No exemplo mostrado, o domínio de transporte é derivado do polipéptido TAT do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o péptido inibidor da JNK é derivado de um polipéptido IB1. As sequências humana, de murganho e rato, nos Painéis B e C, são idênticas.

A comparação entre as sequências dos domínios de ligação a JNK de IB1 [SEQ ID N°: 17], IB2 [SEQ ID N°: 18], c-Jun [SEQ ID N°: 19] e ATF2 [SEQ ID N°: 20] revelou uma sequência de 8 aminoácidos parcialmente conservada (FIG. 1A). Uma comparação entre os JBD de IB1 e IB2 revelou, adicionalmente, dois blocos de sete e três aminoácidos que são altamente conservados entre as duas sequências. Estes dois blocos estão contidos dentro de uma sequência peptídica de 23 aminoácidos em IB1 [SEQ ID N°: 1] e de 21 aminoácidos em IB2 [SEQ ID N°: 2]. Na FIG. 1C é mostrada a sequência mínima de JIP-IB1, inibidora da JNK, com 20 aminoácidos (forma L de JBD₂₀ (SEQ ID N°: 21)).

Os péptidos inibidores da JNK da invenção podem ser utilizados em qualquer situação em que seja pretendida a inibição da actividade de JNK. Isto pode incluir aplicações *in vitro*, *ex vivo* e aplicações *in vivo*. Dado que a JNK e todas as suas isoformas participam no desenvolvimento e no estabelecimento de estados patológicos ou em vias, os péptidos JNK podem ser utilizados para prevenir ou inibir a ocorrência desses estados patológicos. Isto inclui a prevenção e o tratamento de doenças e a prevenção e o tratamento de patologias secundárias às acções terapêuticas. Por exemplo, os péptidos da presente invenção podem ser utilizados para tratar ou prevenir, e. g., diabetes, radiação ionizante, respostas imunitárias (incluindo doenças autoimunitárias), lesões de isquemia/reperfusão, hipertrofias cardíacas e cardiovasculares e alguns cancros (e. g., transformação *Bcr-Abl*).

Os péptidos podem também ser utilizados para inibir a expressão de genes cuja a expressão aumenta na presença de um polipéptido JNK ativo. Estes genes e produtos génicos incluem,

e. g., citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas são encontradas em todas as formas de doenças inflamatórias, auto-inflamatórias, imunitárias e autoimunitárias, doenças degenerativas, miopatias, cardiomiopatias e rejeição de enxertos.

Os péptidos inibidores da JNK aqui descritos podem ser também utilizados para tratar ou prevenir os efeitos associados com o stress de tensão de corte celular, como nos estados patológicos induzidos pelo hipertensão arterial, incluindo hipertrofia cardíaca e lesões arterioscleróticas e em ramificações de vasos sanguíneos e semelhantes; radiação ionizante, como utilizada em radioterapia e luz UV; radicais livres; agentes lesivos para o ADN, incluindo fármacos quimioterapêuticos; transformação oncogénica; danos nas células pancreáticas e neuronais, perda de audição, isquemia e reperfusão; hipóxia; e hipo- e hipertermia.

Os péptidos inibidores da JNK, aqui divulgados, são apresentados na Tabela 1. A tabela apresenta o nome do péptido inibidor da JNK, assim como o seu número identificador da sequência, comprimento e sequência de aminoácido.

TABELA 1

NOME DO PÉPTIDO	SEQ ID	AA	Sequência
L-IB1	1	23	DTYRPKRPTT LNLFPQVPRS QDT
L-IB2	2	21	EEPHKHRPTT LRLTTLGAQD S
D-IB1	3	23	TDQSRPVQPF LNLTPRKPR YTD

(continuação)

NOME DO PÉPTIDO	SEQ ID	AA	Sequência
D-IB2	4	21	SDQAGLTTLR LTTPRHKHPE E
L-IB (genérico)	5	19	XRPTTLXLXX XXXXXQDS/TX
D-IB (genérico)	6	19	XS/TDQXXXXXX XLXLTTPRX
L-TAT	7	10	GRKKRRQRRR
D-TAT	8	10	RRRQRRKKRG
L-genérico-TAT	9	17	XXXXRKKRRQ RRRXXXX
D-genérico-TAT	10	17	XXXXRRRQRR KKRXXXX
L-TAT-IB1	11	35	GRKKRRQRRR PPDYRPKRP TTLNLFQVP RSQDT
L-TAT-IB2	12	33	GRKKRRQRRR PPEEPHKHRP TTLRLTTLGA QDS
L-TAT-IB (genérico)	13	42	XXXXXXXXRKK RRQRRRXXXX XXXXRPTTLX LXXXXXXXXQD S/TX
D-TAT-IB1	14	35	TDQSRPVQPF LNLTPRKPR YDPPRRRQR RKKRG
D-TAT-IB2	15	33	SDQAGLTTLR LTTPRHKHPE EPPRRRQRRK KRG
D-TAT-IB (genérico)	16	42	XT/SDQXXXXXX XLXLTTPRXX XXXXXRRRQ RRKKRXXXXX XX
EB1-longo	17	29	PGTGCGDTYR PKRPTTLNLF PQVPRSQDT
IB2-longo	18	27	IPSPSVEEPH KHRPTTLRLT TLGAQDS
c-Jun	19	29	GAYGYSNPKI LKQSMTLNLA DPVGNLKPH
ATF2	20	29	TNEDHLAVHK HKHBM TLKFG PARND SVIV
L-JBD ₂₀	21	20	RPKRPTTLNL FPQVPRSQDT
D-JBD ₂₀	22	20	TDQSRPVQPF LNLTPRKPR
L-TAT-JNKI1 (i. e., L-TAT- JBD ₂₀)	23	32	GRKKRRQRRR PPRPKRPTTL NLFQVPRSQ DT
D-TAT-JNKI1	24	32	TDQSRPVQPF LNLTPRKPR PPRRRQR RKKRG

(continuação)

NOME DO PÉPTIDO	SEQ ID	AA	Sequência
(i. e., D-TAT-JBD ₂₀)			
L-TAT-JNKI1 (genérico)	25	34	XXXXRKKRRQ RRRXXXXRPT TLXLXXXXXX XQDS/T
D-TAT-JNKI1 (genérico)	26	34	S/TDQXXXXXXXX LXLTTPRXXX XRRRQRRKKR XXXX
L-JBD ₂₀ -mut	27	20	RPKRPTAANA FPQVPRSQDT
D-JBD ₂₀ -mut	28	20	TDQSRPVAPF ANAATPRKPR

PÉPTIDOS INIBIDORES DA JNK

Num aspecto, a invenção utiliza péptidos inibidores da JNK. No termo “péptido” não está implícito qualquer comprimento em particular. Em algumas formas de realização, o péptido inibidor da JNK tem menos de 280 aminoácidos de comprimento, e. g., menos ou igual a 150, 100, 75, 50, 35 ou 25 aminoácidos de comprimento. Em várias formas de realização, o péptido inibidor da ligação à JNK inclui a sequência de aminoácidos de uma ou mais das SEQ ID N°: 3, 4, 6 e 22. Numa forma de realização, os péptidos inibidores da JNK ligam-se à JNK. Numa outra forma de realização os péptidos inibem a activação de, pelo menos, um factor de transcrição activado da JNK, e. g. c-Jun, ATF2 ou Elk1.

Os péptidos inibidores da JNK podem ser polímeros de D-aminoácidos. Por exemplo, em várias formas de realização os péptidos são péptidos D retro-inversos. A expressão “isómero

retro-inverso" refere-se a um isómero de um péptido linear, no qual a direcção da sequência é invertida, a expressão "isómero D-retro-inverso" refere-se a um isómero de um péptido linear no qual a direcção da sequência é invertida e a quiralidade de cada resíduo de aminoácido é invertida. Ver, e. g., Jameson et al., *Nature*, **368**, 744-746 (1994); Brady et al., *Nature*, **368**, 692-693 (1994). O resultado final da combinação de D-enantiómeros e da síntese inversa consiste nas posições dos grupos carbonilo e amina em cada ligação amida serem permutadas, enquanto que a posição dos grupos da cadeia lateral em cada carbono alfa é preservada. A menos que indicado, especificamente, de outra forma, é presumido que qualquer sequência determinada de L-aminoácidos da invenção pode ser transformada num péptido D retro-inverso, pela síntese de um reverso da sequência, para a sequência de L-aminoácidos nativa, correspondente.

Por exemplo, um péptido D retro-inverso tem a sequência NH₂-TDQSRPVQPFLNLTPRKPRYTD-COOH [SEQ ID N°: 3] ou NH₂-SDQAGLTILRLTPRHKHPPEE-COOH [SEQ ID N°: 4]. Alternativamente, um péptido D retro-inverso inclui a sequência NH₂-TDQSRPVQPFLNLTPRKPR-COOH [SEQ ID N°: 22]. Foi, inesperadamente, verificado que os péptidos D-retro-inversos têm várias propriedades úteis. Por exemplo, os péptidos D-TAT e D-TAT-IB e D-TAT-JNKI entram nas células tão eficientemente quanto os péptidos L-TAT e L-TAT-IB e D-TAT-JNKI e os péptidos D-TAT e D-TAT-IB e D-TAT-JNKI são mais estáveis do que os L-péptidos correspondentes. Além disso, embora os D-TAT-IB1 sejam ~10-20 vezes menos eficiente na inibição da JNK do que L-TAT-IB e L-TAT-JNKI, estes são ~50 vezes mais estáveis *in vivo*. Além disso, os péptidos JNKI D-retro-inversos são resistentes a proteases. Finalmente, como é adicionalmente discutido abaixo, os péptidos D-TAT-IB e D-TAT-JNKI protegem da

apoptose as células tratadas com interleucina 1 e submetidas a radiação ionizante e estes péptidos são úteis no tratamento de neurónios, uma vez que a sequência TAT contém seis pares de aminoácidos que tornam a sequência TAT extremamente sensível às proteases neuronais que estão envolvidas no processamento de péptidos no sistema nervoso. Ver e. g., Steiner et al., *J. Biol. Chem.* **267**:23435-23438 (1992); Brugidou et al. *Biochem. & Biophys. Res. Comm.* **214**:685-693 (1995).

Um péptido inibidor da JNK inclui a sequência de aminoácidos $\text{NH}_2\text{-X}_n\text{-RPTTLXLXXXXXXXXXQDS/T-X}_n\text{-COOH}$ [SEQ ID N°: 5 e os resíduos 17-42 de L-TAT-IB, SEQ ID N°: 13, como mostrado na FIG. 2]. Como aqui utilizado, X_n pode ter zero resíduos de comprimento ou pode ser uma porção contígua de resíduos de péptido derivados das SEQ ID N°: 1 e 21, de um modo preferido, uma porção com entre 1 a 7 aminoácidos de comprimento ou ter 10, 20, 30 ou mais aminoácidos de comprimento. O resíduo único representado por S/T pode ser Ser ou Thr na sequência genérica. Numa forma de realização adicional, um péptido inibidor da JNK da invenção pode ser um péptido D retro-inverso, tendo a sequência $\text{NH}_2\text{-X}_n\text{-S/TDQXXXXXXXXLXLTPR-X}_n\text{-COOH}$ [SEQ ID N°: 6] e os resíduos 17-42 de L-TAT-IB, SEQ ID N°: 16, como mostrado na FIG. 2].

Os péptidos inibidores da JNK são obtidos ou produzidos por métodos bem conhecidos na técnica, e. g., síntese química, métodos de engenharia genética, como discutidos abaixo. Por exemplo, pode ser sintetizado um péptido correspondente a uma porção de um péptido inibidor da JNK, incluindo uma região ou domínio pretendido ou que medeia a actividade pretendida *in vitro*, pela utilização de um sintetizador de péptidos.

Um péptido inibidor da JNK candidato é analisado por análise da hidrofílicidade (ver, e. g., Hopp e Woods, 1981. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 3824-3828) que pode ser utilizada para identificar as regiões hidrofóbicas e hidrofílicas dos péptidos, auxiliando, deste modo, na concepção de substratos de manipulação experimental, tais como em experiências de ligação, síntese de anticorpos. Pode ser, também, realizada análise estrutural secundária, para identificar regiões de um péptido inibidor da JNK que assumem motivos estruturais específicos. Ver e. g., Chou e Fasman, 1974. *Biochem* **13**: 222-223. A manipulação, a tradução, a previsão da estrutura secundária, os perfis hidrofílicidade e hidrofobicidade, a previsão e o delineamento da grelha de leitura aberta e a determinação das homologias de sequência podem ser realizados, utilizando programas informáticos para computador, disponíveis na técnica. Podem ser, também, utilizados outros métodos de análise estrutural, incluindo, e. g., cristalografia de raios X (Ver, e. g. Engstrom, 1974. *Biochem Exp Biol* **11**: 7-13); espectroscopia de massa e cromatografia gasosa (ver. e. g., *METHODS IN PROTEIN SCIENCE*, 1997. J. Wiley and Sons, Nova Iorque, NI) e modelação computacional (Ver, e. g., Fletterick e Zoller, eds., 1986. *Computer Graphics and Molecular Modeling*, Em: *CURRENT COMMUNICATIONS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NI).

São também incluídos na invenção derivados, fragmentos, homólogos, análogos e variantes de péptidos inibidores da JNK.

Os derivados ou os análogos dos péptidos inibidores da JNK incluem moléculas incluindo regiões que são substancialmente homólogas aos péptidos, em várias formas de realização, com, pelo menos, 95%, 98% ou, mesmo, 99% de identidade com uma

sequência de aminoácidos de tamanho idêntico ou quando em comparação com uma sequência alinhada, em que o alinhamento é realizado por um programa informático de homologia, conhecido na técnica. Por exemplo, a identidade de sequência pode ser medida, utilizando software de análise de sequências (Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center. 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705), com os seus parâmetros por omissão.

No caso de sequências polipeptídicas, as quais sejam menos de 100% idênticas a uma sequência de referência, as posições não-idênticas são, de um modo preferido, mas não necessariamente, substituições conservadoras da sequência de referência. As substituições conservadoras incluem, tipicamente, substituições dentro dos grupos seguintes: glicina e alanina; valina, isoleucina e leucina; ácido aspártico e ácido glutâmico; asparagina e glutamina; serina e treonina; lisina e arginina; e fenilalanina e tirosina. Deste modo, são incluídos na invenção péptidos tendo sequências mutadas, de forma a que estas permaneçam homólogas, *e. g.*, em termos de sequência, de função e de carácter antigénico ou de outra função, com uma proteína tendo a sequência parental correspondente. Essas mutações podem ser, por exemplo, mutações envolvendo alterações de aminoácido conservadoras, *e. g.*, alterações entre aminoácidos com propriedades moleculares, de um modo geral, semelhantes. Por exemplo, as permutas dentro do grupo alifático alanina, valina, leucina e isoleucina podem ser consideradas como conservadoras. Por vezes, a substituição da glicina por um destes pode ser, também, considerada conservadora. Outras permutas conservadoras incluem as dentro do grupo alifático do aspartato e glutamato; dentro do grupo amida da asparagina e glutamina; dentro do grupo hidroxilo da serina e treonina; dentro do grupo aromático da

fenilalanina, tirosina e triptofano; dentro do grupo básico da lisina, arginina e histidina; e dentro do grupo contendo enxofre metionina e cisteína. Por vezes, a substituição dentro do grupo da metionina e da leucina pode ser, também, considerada como conservadora. Os grupos de substituição conservados preferidos são aspartato-glutamato; asparagina-glutamina; valina-leucina-isoleucina; alanina-valina; fenilalanina-tirosina; e lisina-arginina.

Quando é referido que um polipéptido em particular tem uma identidade percentual específica em relação a um polipéptido de referência com um comprimento definido, a identidade percentual é relativa ao péptido de referência. Deste modo, um péptido que é 50% idêntico a um polipéptido de referência que tem 100 aminoácidos de comprimento, pode ser um polipéptido com 50 aminoácidos, que é completamente idêntico a uma porção com um comprimento de 50 aminoácidos do polipéptido de referência. Este poderá ser, também, um polipéptido com 100 aminoácidos de comprimento, o qual é 50% idêntico ao polipéptido de referência ao longo da totalidade do seu comprimento. Obviamente, outros polipéptidos irão estar de acordo com os mesmos critérios.

São também proporcionados pela presente invenção, homólogos de espécie dos péptidos divulgados. "Variante" refere-se a um polipéptido que difere do polipéptido da presente invenção, mas que conserva as suas propriedades essenciais. De um modo geral, as variantes são, na sua globalidade, muito semelhantes e, em muitas regiões, idênticas ao polipéptido da presente invenção.

Em algumas formas de realização, as sequências alteradas incluem inserções de forma a que a sequência de aminoácidos global seja alongada, enquanto a proteína conserva as

propriedades de transporte. Adicionalmente, as sequências alteradas podem incluir eliminações internas aleatórias ou planeadas que encurtam a sequência de aminoácidos global, enquanto que a proteína conserva as propriedades de transporte.

Péptidos Quiméricos Incluindo um Domínio Inibidor da JNK e um Domínio de Transporte

Num outro aspecto, a invenção utiliza um péptido quimérico que inclui um primeiro e segundo domínio. O primeiro domínio inclui uma sequência de transporte, enquanto que o segundo domínio inclui uma sequência inibidora da JNK, ligada por uma ligação covalente, *e. g.*, uma ligação peptídica, ao primeiro domínio. Os primeiro e segundo domínios podem ocorrer em qualquer ordem no péptido e o péptido pode incluir um ou mais de cada domínio.

Uma sequência de transporte é qualquer sequência de aminoácidos que direcciona um péptido no qual está presente para um destino celular pretendido. Deste modo, a sequência de transporte pode direccionar o péptido através da membrana plasmática, *e. g.*, desde o exterior da célula, através da membrana plasmática e para o interior do citoplasma. Alternativamente ou adicionalmente, a sequência de transporte pode direccionar o péptido para uma localização pretendida dentro da célula, *e. g.*, núcleo, ribossoma, ER, lisossoma ou peroxissoma.

Em algumas formas de realização, o péptido transportador é derivado de uma sequência de translocação membranar conhecida. Por exemplo, o péptido transportador pode incluir sequências da

a proteína TAT do vírus da imunodeficiência humana (HIV) 1. Esta proteína é descrita, e. g., nas Patentes US N° 5804604 e 5674980. O péptido inibidor da JNK está ligado a alguns ou a todos aminoácidos da totalidade dos 86 aminoácidos que constituem a proteína TAT. Por exemplo, pode ser utilizado um fragmento ou uma porção funcionalmente eficaz de uma proteína TAT que tem menos de 86 aminoácidos, a qual apresenta incorporação em células e a qual, opcionalmente, se incorpora no núcleo de célula. Ver e. g., Vives et al., *J. Biol. Chem.*, **272** (25):16010-17 (1997). Numa forma de realização, o fragmento inclui um péptido contendo os resíduos 48-57 da TAT, e. g. $\text{NH}_2\text{-GRKKRRQRRR-COOH}$ [SEQ ID N°: 7] ou uma sequência TAT genérica $\text{NH}_2\text{-X}_n\text{-RKKRRQRRR-X}_n\text{-COOH}$ [SEQ ID N°: 9]. Pode ser definido adicionalmente um péptido TAT, que inclui a região que medeia a entrada e a incorporação nas células, utilizando técnicas conhecidas. Ver, e. g., Franked et al., *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* **86**: 7397-7401 (1989).

A sequência TAT pode ser ligada à extremidade do terminal N ou ao terminal C da sequência inibidora da JNK. Pode ser adicionada uma charneira de dois resíduos de prolina entre TAT e péptido inibidor da JNK, para criar o péptido de fusão completo. Por exemplo, os péptidos de fusão D retro-inversos podem ser o péptido D-TAT-IB1 [SEQ ID N°: 14], o péptido D-TAT-IB2 [SEQ ID N°: 15] ou péptido D-TAT-IB genérico [SEQ ID N°: 16]. Alternativamente, os péptidos de fusão D retro-inversos podem ser o péptido D-TAT-JNKI [SEQ ID N°: 22] ou péptido D-TAT-JNKI genérico [SEQ ID N°: 26]. O péptido TAT pode ser um péptido D retro-inverso tendo a sequência $\text{NH}_2\text{-X}_n\text{-RRRQRRKKR-X}_n\text{-COOH}$ [SEQ ID N°: 10]. Nas SEQ ID N°: 5-6, 9-10, 13, 16 e 25-26, o número "X" de resíduos não está limitado ao representado e pode

igualar qualquer número de resíduos de aminoácido, incluindo o zero e podem variar, como descrito acima.

A sequência de transporte pode ser uma única (*i. e.*, contínua) sequência de aminoácidos, presente na sequência TAT. Alternativamente, esta pode ser duas ou mais sequências de aminoácidos, as quais estão presentes na proteína TAT, mas que na proteína de ocorrência natural estão separadas por outras sequências de aminoácidos. Como aqui utilizado, proteína TAT inclui uma sequência de aminoácidos de ocorrência natural que é a mesma que a da proteína TAT de ocorrência natural ou sua proteína funcional equivalente ou os seus fragmentos funcionalmente equivalentes (péptidos). Essas proteínas equivalentes funcionais ou fragmentos funcionalmente equivalentes possuem actividade de incorporação na célula e no núcleo celular, que é substancialmente semelhante à da proteína TAT de ocorrência natural. A proteína TAT pode ser obtida a partir de fontes de ocorrência natural ou ser produzida, utilizando técnicas de engenharia genética ou síntese química.

A sequência de aminoácidos da da proteína TAT de HIV de ocorrência natural pode ser modificada, por exemplo, por adição, eliminação e/ou substituição de, pelo menos, um aminoácido presente na proteína TAT de ocorrência natural, para produzir a proteína TAT modificada (aqui também designada como proteína TAT). Pode ser produzida proteína TAT ou análogos de péptidos TAT modificados, com estabilidade aumentada ou reduzida, utilizando técnicas conhecidas. Em algumas formas de realização, as proteínas ou os péptidos TAT incluem sequências de aminoácidos que são substancialmente semelhantes, embora não idênticas, às das proteínas TAT de ocorrência natural ou às suas porções. Além disso, podem ser adicionados colesterol ou outros

derivados lipídicos à proteína TAT, para produzir uma TAT modificada, tendo solubilidade membranar aumentada.

As variantes da proteína TAT podem ser concebidas para modular a localização intracelular do péptido TAT-inibidor da JNK. Quando adicionadas exogenamente, essas variantes são normalmente concebidas de forma a que seja conservada a capacidade da TAT para entrar nas células (*i. e.*, que a incorporação da proteína TAT ou do péptido variante na célula seja, substancialmente, semelhante à da TAT do HIV de ocorrência natural). Por exemplo, a alteração da região básica que se considera importante para a localização nuclear (ver, *e. g.*, Dang e Lee, *J. Biol. Chem.* **264**:18019-18023 (1989); Hauber *et al.*, *J. Virol.* **63**:1181-1187 (1989); Ruben *et al.*, *J. Virol.* **63**:1-8 (1989)) pode resultar numa localização citoplasmática ou numa localização parcialmente citoplasmática da TAT e, conseqüentemente, do péptido inibidor da JNK. Alternativamente, pode ser introduzida na TAT uma sequência para a ligação a um componente ou compartimento citoplasmático ou qualquer outro (*e. g.*, retículo endoplasmático, mitocôndria, aparelho de Golgi, vesículas lisossômicas), para manter a TAT e o péptido inibidor da JNK no citoplasma ou em qualquer outro compartimento, para conferir regulação após a incorporação da TAT e do péptido inibidor da JNK.

Outras fontes de péptidos transportadores incluem, *e. g.*, VP22 (descrita, *e. g.*, no documento WO 97/05265; Elliott e O'Hare, *Cell* **88**: 223-233 (1997)) ou proteínas não-virais (Jackson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10691-10695 (1992)).

A sequência inibidora da JNK e a sequência de transporte podem ser ligadas por ligação química, de qualquer forma adequada, conhecida na técnica. Muitos métodos de reticulação química conhecidos são não-específicos, *i. e.*; estes não direccionam o ponto da ligação para qualquer local em particular no polipéptido de transporte ou macromolécula de carregamento. Consequentemente, a utilização de agentes de reticulação não-específicos pode atacar locais funcionais ou bloquear estericamente locais activos, tornando as proteínas conjugadas biologicamente inactivas.

Uma forma de aumentar a especificidade de ligação consiste em realizar, directamente, uma ligação química a um grupo funcional que ocorra apenas uma vez ou poucas vezes num ou em ambos os polipéptidos a serem reticulados. Por exemplo, em muitas proteínas, a cisteína, a qual é o único aminoácido proteico contendo um grupo tiol, ocorre apenas algumas vezes. Também, por exemplo, se um polipéptido não contiver quaisquer resíduos lisina, um reagente de reticulação específico para aminas primárias será selectivo para o terminal amina desse polipéptido. A utilização com sucesso desta abordagem para aumentar especificidade de ligação requer que o polipéptido tenha, adequadamente, os resíduos raros e reactivos em áreas da molécula que possam ser alteradas sem perda da actividade biológica da molécula.

Os resíduos de cisteína podem ser substituídos, quando estes ocorrem em partes de uma sequência polipeptídica em que a sua participação numa reacção de reticulação iria, provavelmente, interferir de outra forma na actividade biológica. Quando um resíduo de cisteína é substituído, é, tipicamente, desejável minimizar as modificações resultantes no

enrolamento do polipéptido. As modificações no enrolamento do polipéptido são minimizadas, quando a substituição é química e estericamente semelhante à cisteína. Por estas razões, é preferida a serina como uma substituição da cisteína. Como demonstrado nos exemplos abaixo, pode ser introduzido um resíduo de cisteína na sequência de aminoácidos de um polipéptido, para finalidades de reticulação. Quando é introduzido um resíduo de cisteína, é preferida a introdução no terminal amina ou carboxilo ou na sua proximidade. Estão disponíveis métodos convencionais para essas modificações da sequência de aminoácidos, quer o polipéptido de interesse seja produzido por síntese química, quer por expressão de ADN recombinante

A ligação dos dois constituintes pode ser realizada através de um agente de ligação ou de conjugação. Existem vários reagentes de reticulação intermolecular que podem ser utilizados, ver, por exemplo, Means e Feeney, *CHEMICAL MODIFICATION OF PROTEINS*, Holden-Day, 1974, pp. 39-43. Entre estes reagentes estão, por exemplo, J-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) ou N,N'-bismaleimida (1,3-fenileno) (sendo, ambos, altamente específicos para grupos sulfidrilo e formam ligações irreversíveis); N,N'-etileno-bis-(iodoacetamida) ou outro desses reagentes tendo 6 para 11 pontes de carbono de metileno (as quais são, relativamente, específicas para grupos sulfidrilo); e 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno (o qual forma ligações irreversíveis com grupos amina e tirosina). Outros reagentes de reticulação úteis para esta finalidade incluem: p,p'-difluoro-m,m'-dinitrodifenilsulfona (a qual forma reticulações irreversíveis com grupos amina e fenólicos); dimetiladipimidato (o qual é específico para grupos amina); cloreto de fenol-1,4-dissulfonilo (o qual reage, principalmente,

com grupos amina); hexametilenodiisocianato ou diisotiocianato ou azofenil-p-diisocianato (o qual reage, principalmente, com grupos amina); glutaraldeído (o qual reage com várias cadeias laterais diferentes) e disdiazobenzidina (a qual reage, principalmente, com tirosina e histidina).

Os reagentes de reticulação podem ser homobifuncionais, *i. e.*, tendo dois grupos funcionais que sofrem a mesma reacção. Um reagente de reticulação homobifuncional preferido é o bismaleimido-hexano ("BMH"). O BMH contém dois grupos funcionais maleimida, os quais reagem, especificamente, com compostos contendo sulfidrilo, sob condições suaves (pH 6,5-7,7). Os dois grupos maleimida são ligados por uma cadeia de hidrocarbonetos. Consequentemente, o BMH é útil para a reticulação irreversível de polipéptidos que contêm resíduos de cisteína.

Os reagentes de reticulação podem ser, também, heterobifuncionais. Os agentes de reticulação heterobifuncionais têm dois grupos funcionais diferentes, por exemplo, um grupo reactivo com amina e um grupo reactivo com tiol, que irão reticular duas proteínas tendo, respectivamente, aminas e tióis livres. São exemplos de agentes de reticulação heterobifuncionais, succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilolato ("SMCC"), éster m-maleimidobenzoi-N-hidroxisuccinimídico ("MBS") e butirato de succinimida 4-(p-maleimidofenilo) ("SMPB"), um análogo de cadeia estendida do MBS. O grupo succinimidilo destes agentes de reticulação reage com uma amina primária e a maleimida reactiva com tiol forma uma ligação covalente com o tiol de um resíduo cisteína.

Os reagentes de reticulação têm, frequentemente, uma baixa solubilidade em água. Pode ser adicionada uma parte hidrofílica,

tal como, um grupo sulfonato, ao reagente de reticulação, para melhorar a sua solubilidade em água. Sulfo-MBS e sulfo-SMCC são exemplos de reagentes de reticulação modificados para a solubilidade em água.

Muitos reagentes de reticulação produzem um conjugado que é, essencialmente, não-clivável, sob condições celulares. No entanto, alguns reagentes de reticulação contêm uma ligação covalente, tal como um persulfureto, que é clivável sob condições celulares. Por exemplo, o reagente de Traut, ditiobis(succinimidilpropionato) ("DSP") e N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato ("SPDP") são agentes de reticulação cliváveis, bem conhecidos. A utilização de um reagente de reticulação clivável permite à parte de carregamento separar-se do polipéptido de transporte, após a distribuição na célula alvo. A ligação persulfureto, directa, pode ser, também, útil.

Estão comercialmente disponíveis vários reagentes de reticulação, incluindo os discutidos acima. Estão facilmente disponíveis instruções detalhadas para a sua utilização, a partir dos fornecedores comerciais. Uma referência geral em reticulação de proteínas e preparação de conjugados é: Wong, *CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING*, CRC Press (1991).

A reticulação química pode incluir a utilização de braços espaçadores. Os braços espaçadores proporcionam flexibilidade intramolecular ou ajustam as distâncias intramoleculares entre as partes conjugadas e, deste modo, podem auxiliar a conservar a actividade biológica. Um braço espaçador pode estar sob a forma de uma parte polipeptídica que inclui aminoácidos espaçadores,

e. g. prolina. Alternativamente, um braço espaçador pode ser parte do reagente de reticulação, tal como em "SPDP de cadeia longa" (Pierce Chem. Co., Rockford, IL, N° de cat. 21651 H).

MÉTODOS DE TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DE DISTÚRBIOS

DISTÚRBIOS NEURONAIS

São também incluídos na invenção péptidos para utilização nos métodos de tratamento ou de prevenção de distúrbios relacionados com a morte de células neuronais administrando a uma célula ou a um indivíduo uma composição de um péptido bioactivo permeável em células em que o péptido previne danos aos neurónios ou a apoptose neuronal. A composição é por exemplo o péptido da SEQ ID N°: 3, 4, 6, 14, 15, 16, 24 ou 26.

De um modo preferido, a composição funciona para inibir a morte de células neuronais induzida por stress excitotóxico ou oxidativo. Uma célula neuronal é qualquer célula derivada do sistema nervoso central ou periférico, por exemplo, neurónio, neurite ou dendrite. A célula é feita contactar *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro*. O indivíduo é, e. g., qualquer mamífero, e. g., humano, primata, murganho, rato, cão, gato, vaca, cavalo, porco.

A morte da célula neuronal é medida pelos métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, a morte celular é determinads microscopicamente ou utilizando um indicador químico, tal como Calcein-am (Molecular Probes).

A excitotoxicidade é o mecanismo principal subjacente à morte neuronal no acidente vascular cerebral, danos cerebrais

anóxicos e traumáticos são excitotoxicidade. A excitotoxicidade é desencadeada pela ativação excessiva dos receptores ionotrópicos do glutamato, particularmente, o subtipo de receptor N-metil-D-aspartato, originando, desse modo, um influxo rápido de Ca^{2+} que desencadeia a morte celular. Ver e. g., Dirnagl et al., *Trends Neurosci.* **22**:391-97 (1999); Zipfel et al., *J. of Neurotrauma* **17**:857-69 (2000).

Os métodos são úteis aliviar os sintomas de vários dos distúrbios neuronais. O distúrbio neuronal é agudo ou crónico. Os distúrbios neuronais incluem os associados com um evento excitotóxico, tais como acidente vascular cerebral isquémico, isquemia cerebral, danos cerebrais hipóxicos/isquémicos, danos cerebrais traumáticos, morte neuronal resultante de episódios epilépticos e morte neuronal associada com vários distúrbios neurodegenerativos, tais como a doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica (ALS) e doença de Huntington.

A morte neuronal na isquemia cerebral está associada com mecanismos excitotóxicos. A isquemia cerebral (e. g., isquemia cerebral global e isquemia cerebral focal) é devida a acidente vascular cerebral, lesões na cabeça ou paragem cardíaca. A isquemia cerebral global resulta de paragem cardíaca ou oclusão bilateral da artéria carótida. A isquemia cerebral focal resulta de uma redução no fluxo sanguíneo cerebral após oclusão da artéria cerebral. A isquemia cerebral focal resulta na morte neuronal necrótica por uma cascata patogénica complexa de eventos que inclui esgotamento de energia, excitotoxicidade e depolarização peri-infarte, assim como um mecanismo mais retardado envolvendo apoptose e inflamação. A isquemia cerebral focal pode ser adicionalmente dividida em isquemia focal trombótica ou embólica. Um acidente vascular cerebral trombótico

ocorre quando as artérias cerebrais ficam obstruídas por um coágulo de sangue que é formado dentro do cérebro. Um acidente vascular cerebral embólico é causado também por uma artéria obstruída por um coágulo, mas no acidente vascular cerebral embólico, o coágulo é formado num outro local que não o próprio cérebro

Os métodos aqui descritos originam uma redução na gravidade ou o alívio de um ou mais sintomas de um distúrbio neuronal, tal como aqui descritos. Os distúrbios neuronais são diagnosticados e/ou monitorizados, tipicamente por um médico utilizando metodologias convencionais.

Os péptidos JNKI da invenção revelaram, como descrito nos Exemplos, proporcionar níveis elevados de neuroprotecção e além disso, o nível de protecção permanece alto mesmo quando o péptido JNKI é administrado 6-12 horas após o estabelecimento da isquemia. Embora tenha sido demonstrada neuroprotecção a 30-50% com vários compostos administrados até 9 horas após isquemia (ver e. g., Fink et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **18**:1071-76 (1998); Williams et al., *Neuroreport*, **13**:821-24 (2002)), os péptidos JNKI da presente invenção revelaram proporcionar protecção quando administrados 12 horas após o evento isquémico, como descrito nos exemplos abaixo.

A maioria dos doentes que estão a sofrer ou sofreram, um evento excitotóxico, tal como um acidente vascular cerebral isquémico, procuram auxílio médico nas 3 a 6 horas após o evento excitotóxico. O intervalo de tempo disponível para tratar ou prevenir danos excitotóxicos, tal como os danos que ocorrem num evento isquémico, é importante, dado que a activação dos mecanismos de morte celular pode demorar várias horas após o

evento excitotóxico. Consequentemente, o agente terapêutico pode ser administrado ao indivíduo antes sofrer um evento excitotóxico. Alternativamente, o agente terapêutico pode ser administrado após o indivíduo sofrer um evento excitotóxico.

O indivíduo pode ser, e. g., qualquer mamífero, e. g., humano, primata, murganho, rato, cão, gato, vaca, cavalo, porco.

COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

Os agentes terapêuticos incluem, e. g.: qualquer um ou mais dos péptidos inibidores da JNK como aqui descritos e os seus derivados, fragmentos, análogos e homólogos;

A expressão “terapeuticamente eficaz” significa que a quantidade do péptido inibidor que é, por exemplo, utilizada, é uma quantidade suficiente para melhorar o distúrbio associado com a JNK,

Tratamento inclui a administração de um reagente que modula a actividade da cinase JNK, como definida acima. O termo “modula” inclui a supressão da expressão da JNK quando esta é sobreexpressa. Este inclui, também, a supressão da fosforilação de c-Jun, ATF2 ou NFAT4, utilizando, por exemplo, um péptido de qualquer uma ou mais das SEQ ID N°: 3, 4, 6 e 22 e SEQ ID N°: 14, 15, 16, 24 e 26, como um inibidor competitivo do local de ligação natural de c-Jun, ATF2 e NFAT4, numa célula. Deste modo inclui, também, a supressão dos complexos hetero e homoméricos dos factores de transcrição constituídos por c-Jun, ATF2 ou NFAT4 e os seus parceiros relacionados, tal como, por exemplo, o complexo AP-1 que é constituído por c-Jun, AFT2 e

c-fos. Quando um distúrbio proliferativo celular está associado com a sobreexpressão da JNK, podem ser introduzidos esses péptidos inibidores da JNK supressores numa célula. Em alguns casos, “modula” pode incluir o aumento da expressão da JNK, por exemplo, pela utilização de um anticorpo específico para o péptido IB, que bloqueia a ligação de um péptido IB à JNK, prevenindo, deste modo, a inibição da JNK pelo péptido relacionado com IB. Os péptidos inibidores da JNK, os péptidos de fusão e os ácidos nucleicos da invenção podem ser formulados em composições farmacêuticas. Estas composições podem compreender, além de uma das substâncias acima, um excipiente, veículo, tampão estabilizador farmacêuticamente aceitável ou outros materiais bem conhecidos dos especialistas na técnica. Esses materiais deverão ser não-tóxicos e não deverão interferir na eficácia do ingrediente activo. A natureza precisa do veículo ou de outro material pode depender da via de administração, e. g. vias oral, intravenosa, cutânea ou subcutânea, nasal, intramuscular, intraperitoneal, intraauricular ou emplastro.

As composições farmacêuticas para administração oral podem estar sob a forma de comprimido, cápsula, pó ou líquido. Um comprimido pode incluir um veículo sólido, tais como gelatina ou um adjuvante. De um modo geral, as composições farmacêuticas líquidas incluem um veículo líquido, tais como água, vaselina, óleos vegetais ou animais, óleo mineral ou óleo sintético. Pode ser incluída uma solução salina fisiológica de dextrose ou outra solução de sacáridos ou glicóis, tais como etilenoglicol, propilenoglicol ou polietilenoglicol.

Para injeção intravenosa, cutânea ou subcutânea, ou injeção no local da lesão, o ingrediente activo estará sob a forma de uma solução aquosa, parentericamente aceitável, a qual

é isenta de pirogénios e tem pH, isotonicidade e estabilidade adequados. Os especialistas na técnica têm uma boa capacidade para preparar soluções adequadas, utilizando, por exemplo, veículos isotónicos, tais como Injecção de Cloreto de Sódio, Injecção de Ringer, Injecção de Ringer com Lactato. Se necessário, podem ser incluídos conservantes, estabilizantes, tampões, antioxidantes e/ou outros aditivos.

Se este for um polipéptido, péptido, outro composto farmacêuticamente útil de acordo com a presente invenção, que se destina a ser administrado a um indivíduo, a administração é realizada, de um modo preferido, numa "quantidade profilaticamente eficaz" ou numa "quantidade terapeuticamente eficaz" (de acordo com o caso, embora a profilaxia possa ser considerada terapia), sendo esta suficiente para apresentar um benefício para o indivíduo. A quantidade real administrada e a velocidade e a evolução ao longo do tempo da administração, irá depender da natureza e da gravidade do que está a ser tratado. A prescrição do tratamento, e. g. decisões sobre a dosagem etc., está dentro da responsabilidade dos médicos de clínica geral e de outros médicos e, tipicamente, tem em consideração o distúrbio a ser tratado, o estado do doente individual, o local de distribuição, o método de administração e outros factores conhecidos dos médicos. Em *REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 16^a edição, Osol, A. (ed), 1980, podem ser encontrados exemplos das técnicas e protocolos referidos acima.

Alternativamente, podem ser utilizadas terapias direccionadas, para distribuir mais especificamente o agente activo a determinados tipos de células, pela utilização de sistemas direccionados, tais como ligandos específicos de anticorpos ou células. O direccionamento pode ser desejável por

vários motivos; por exemplo, se o agente for inaceitavelmente tóxico ou se este requerer, de qualquer outra forma, uma dosagem demasiado elevada ou se este não for, de qualquer outra forma, capaz entrar nas células alvo.

Alternativamente, o agente pode ser administrado numa forma de precursor, para a conversão na forma activa por um agente de activação produzido ou direccionado para as células a serem tratadas. Este tipo da abordagem é, por vezes, conhecida como ADEPT envolvendo direccionar o agente de activação para as células, por conjugação com um anticorpo específico para uma célula.

EXEMPLOS ESPECÍFICOS

Exemplo 1: Identificação de Péptidos Inibidores da JNK

As sequências de aminoácidos importantes para a interacção eficiente com a JNK foram identificadas através de alinhamentos de sequências entre JBD conhecidos. A comparação entre as sequências dos JBD de IB1 [SEQ ID N°: 17], IB2 [SEQ ID N°: 18], c-Jun [SEQ ID N°: 19] e ATF2 [SEQ ID N°: 20] definiu uma sequência de 8 aminoácidos pouco conservada (FIG. 1A). Uma vez que os JBD de IB1 e IB2 são, aproximadamente, 100 vezes tão eficientes quanto c-Jun ou ATF2, na ligação a JNK (Dickens *et al. Science* **277**: 693 (1997)), foi considerado que os resíduos conservados entre IB1 e IB2 devem ser importantes para conferir uma ligação máxima. A comparação entre os JBD de IB1 e IB2 definiu dois blocos de sete e três aminoácidos, que são altamente conservados, entre as duas sequências. Estes dois blocos estão contidos no interior de uma sequência peptídica com

23 aminoácidos em IB1 [SEQ ID N°: 1] e 21 aminoácido em IB2 [SEQ ID N°: 2]. Estas sequências são mostradas na FIG. 1B, os tracejados na sequência IB2 indicam um espaço na sequência, de forma a alinhar os resíduos conservados.

Os péptidos inibidores da JNK (JNKI) da presente invenção foram obtidos pela ligação do motivo de ligação à JNK, com 20 aminoácidos, de JIP-1/IB1, aqui referido como JBD₂₀, a uma proteína de transporte, tal como, por exemplo, a sequência transportadora HIV-TAT₄₈₋₅₇, com 10 aminoácidos.

Exemplo 2: Preparação de Proteínas de Fusão Inibidoras da JNK

Foram sintetizadas proteínas de fusão do inibidor da JNK, por ligação covalente da extremidade do terminal C de JBD₂₃ ou da sequência com 21 aminoácidos derivada do JBD de IB2 (JBD₂₁) ou da extremidade do terminal C da sequência de aminoácidos JBD₂₀, a um péptido transportador do terminal N com 10 aminoácidos de comprimento, derivado de HIV-TAT₄₈₋₅₇ (Vives *et al.*, *J. Biol. Chem.* **272**: 16010 (1997)), através de um espaçador consistindo em dois resíduos de prolina. Este espaçador foi utilizado para permitir a flexibilidade máxima e prevenir modificações estruturais secundárias não pretendidas. Como mostrado na FIG. 1C estas preparações foram designadas, respectivamente, L-TAT [SEQ ID N°: 7], L-TAT-IB1 [SEQ ID N°: 11], L-TAT-IB2 [SEQ ID N°: 12] e L-TAT-JNKI1 [SEQ ID N°: 21]. Foram, também, sintetizados péptidos de fusão com a TAT constituída, unicamente, por péptidos D retro-inversos e foram designados, respectivamente, D-TAT [SEQ ID N°: 8], D-TAT-IB1 [SEQ ID N°: 14] e D-TAT-JNKI1 [SEQ ID N°: 22]. Todos os péptidos D e L foram

produzidos por síntese F-mock normal e foram, adicionalmente, analisados por Espectrometria de Massa. Estes foram, finalmente, purificados por HPLC. Para determinar os efeitos do espaçador de prolina, foram produzidos dois tipos de péptidos TAT, um com e um sem duas prolinas. A adição das duas prolinas não pareceu modificar a entrada ou localização do péptido TAT no interior das células.

Na FIG. 2 são apresentados péptidos genéricos, apresentando os resíduos de aminoácido conservados. Um "X" indica um qualquer aminoácido. O número de X num determinado péptido não está limitado ao representado e pode variar (*i. e.*, X pode representar qualquer número de resíduos de aminoácido, incluindo zero). Ver acima, para uma descrição mais detalhada das sequências genéricas.

Exemplo 3: Inibição da Morte de Células β por JBD₂₃

Foram, seguidamente, estudados os efeitos da sequência do JBD de IB1, com 23 aminoácidos de comprimento, sobre as actividades biológicas da JNK. A sequência com 23 aminoácidos foi ligada ao terminal N da Proteína Verde Fluorescente (construção GFP-JBD₂₃) e foi avaliado o efeito desta construção sobre a apoptose de células β pancreáticas, induzida pela IL-1 β . Ver a FIG. 3. Este modo de apoptose demonstrou, anteriormente, ser bloqueado por transfecção com JBD₁₋₂₈₀, enquanto que os inibidores específicos de ERK1/2 ou p38 não protegeram. Ver Ammendrup *et al.*, *supra*.

Foram sintetizados oligonucleótidos correspondendo à sequência com 23 aminoácidos (JBD₂₃; FIG 1B) e uma sequência com

mutação nas regiões totalmente conservadas (JBD_{23mut}) e foram inseridos direccionalmente nos locais EcoRI e SalI do vector pEGFP-N1 codificando a Proteína Verde Fluorescente (GFP) (de Clontech). Foram cultivadas células β TC-3 produtoras de insulina, em meio RPMI 1640, suplementado com Soro de Vitelo Fetal a 10%, Estreptomicina 100 μ g/mL, Penicilina 100 unidades/mL e Glutamina 2 mM. Foram transfectadas células β TC-3 produtoras de insulina com os vectores indicados e foi adicionada IL-1 β (10 ng/mL) ao meio de cultura celular. Foi contado o número de células apoptóticas às 48 horas após a adição de IL-1 β , utilizando um microscópio de fluorescência invertido. As células apoptóticas foram discriminadas das células normais pela característica de “formação de bolhas” do citoplasma e foram contadas ao fim de dois dias.

Como indicado na FIG. 3, a GFP é o vector de expressão de Proteína Verde Fluorescente utilizado como um controlo; JBD23 é o vector expressando uma GFP quimérica ligada à sequência com 23 aminoácidos do JBD de IB1; JBD23Mut é o mesmo vector que GFP-JBD23, mas com um JBD com mutações em quatro resíduos conservados, mostrados na FIG 1B; e JBD280 é o vector de GFP ligado ao JBD completo (aminoácidos 1-280). A construção expressando GFP-JBD₂₃ preveniu a apoptose de células β pancreáticas induzida pela IL-1 β , tão eficientemente quanto o JBD₁₋₂₈₀ completo (FIG. 3, JBD23/IL-1, em comparação com JBD280/IL-1). As sequências com mutações nos resíduos IB1 totalmente conservados, como controlos adicionais, tinham reduzido significativamente a capacidade para prevenir a apoptose (FIG. 3, JBD23Mut/IL-1).

Exemplo 4: Importação Celular Dos Péptidos TAT-IB1 E TAT-IB2

Foi avaliada a capacidade de entrar nas células das formas L- e D-enantioméricas dos péptidos TAT, TAT-IB1 e TAT-IB2 ("péptidos TAT-IB").

Os péptidos L-TAT, D-TAT, L-TAT-IB1, L-TAT-IB2 e D-TAT-IB1 [respectivamente, as SEQ ID N°: 7, 8, 11, 12 e 14] foram marcados pela adição de um resíduo de glicina conjugado com fluoresceína no terminal N. Foram adicionados péptidos marcados (1 μ M) a culturas de células β TC-3, as quais foram mantidas como descrito no Exemplo 3. Em tempos predeterminados, as células foram lavadas com PBS e fixas durante cinco minutos em metanol-acetona gelada (1:1), antes de serem examinadas sob um microscópio de fluorescência. Foi utilizada BSA marcada com fluoresceína (1 μ M, 12 moles/mole BSA) como um controlo. Os resultados demonstraram que a totalidade dos péptidos marcados com fluoresceína, acima, entraram eficiente e rapidamente (menos de cinco minutos) nas células, quando adicionados ao meio de cultura. Pelo contrário, a albumina de soro bovino marcada com fluoresceína (1 μ M de BSA, 12 moles fluoresceína/mole BSA) não entrou nas células.

Um estudo da evolução ao longo do tempo indicou que a intensidade do sinal fluorescente para os péptidos L-enantioméricos diminuiu em 70%, após um período de 24 horas. Às 48 horas estava presente pouco ou nenhum sinal. Pelo contrário, D-TAT e D-TAT-EB1 foram extremamente estáveis dentro das células. Os sinais fluorescentes destes péptidos D retro-inversos estavam ainda muito fortes, após 1 semana e o sinal

estava, apenas, ligeiramente diminuído, 2 semanas após o tratamento.

Exemplo 5: Inibição *In Vitro* Da Fosforilação De c-Jun, ATF2 e Elk1

Foram investigados os efeitos dos péptidos sobre a fosforilação mediada por JNK dos seus factores de transcrição alvo, *in vitro*. Foram produzidas JNK1, JNK2 e JNK3, recombinantes e não-activadas, utilizando um kit de lisado de reticulócito de coelho TRANSCRIPTION AND TRANSLATION (Promega) e utilizadas em ensaios de cinase em fase sólida, com c-Jun, ATF2 e Elk1, quer, isolados, quer fundidos com glutathione-S-transferase (GST), como substratos. Foram realizados estudos de resposta à dose, em que foram misturados péptidos L-TAT, L-TAT-IB1 ou L-TAT-IB2 (0-25 μ M) com as cinases recombinantes JNK1, JNK2 ou JNK3, em tampão de reacção (Tris-acetato 20 mM, EGTA 1 mM, p-nitrofenil-fosfato (pNPP) 10 mM, pirofosfato de sódio 5 mM, p-glicerofosfato 10 mM, ditiotritol 1 mM), durante 20 minutos. As reacções da cinase foram, então, iniciadas pela adição de MgCl_2 10 mM e 5 μ Ci de ^{33}P - γ -dATP e 1 μ g de qualquer um de GST-Jun (aminoácidos 1-89), GST-ATF2 (aminoácidos 1-96) ou GST-ELK1 (aminoácidos 307-428). As proteínas GST de fusão foram adquiridas de Stratagene (La Jolla, CA). Foram, também, adicionados dez μ L de esferas de glutathione-agarose à mistura. Os produtos de reacção foram, então, separados por SDS-PAGE num gel de poliácridamida desnaturante a 10%. Os géis foram secos e foram, subsequentemente, expostos a películas de raios X (Kodak). Foi observada a inibição quase completa da fosforilação de c-Jun, ATF2 e Elk1 por JNK em doses do péptido TAT-IB tão baixas quanto 2,5 μ M. No

entanto, uma excepção significativa foi a ausência de inibição da fosforilação JNK3 de Elk1, por TAT-IB. Globalmente, o péptido TAT-IB1 pareceu ligeiramente superior a TAT-IB2, na inibição da fosforilação pela família das JNK dos seus factores de transcrição alvo. (Ver, FIG. 4A).

Foi analisada a capacidade dos péptidos D-TAT, D-TAT-IB1 e L-TAT-IB1 (estudo de dosagem de 0-250 μ M) para inibirem a fosforilação de GST-Jun (aminoácidos 1-73) por JNK1, JNK2 e JNK3 recombinantes, como descrito acima. Globalmente, o péptido D-TAT-IB1 reduziu a fosforilação de c-Jun mediada por JNK, mas em níveis, aproximadamente, 10-20 vezes menos eficientemente do que L-TAT-IB1. (Ver, FIG. 4B).

Exemplo 6: Inibição da Fosforilação de c-Jun por JNK Activadas

Foram avaliados os efeitos dos péptidos L-TAT, L-TAT-IB1 ou L-TAT-IB2 sobre JNK activadas, por estímulos de stress, utilizando GST-Jun para anular as JNK de células HeLa irradiadas com luz UV ou células β TC tratadas com IL-1 β . as células β TC foram cultivadas como descrito acima. As células HeLa foram cultivadas em meio DMEM suplementado com Soro Fetal de Vitelo a 10%, Estreptomicina 100 μ g/mL, Penicilina 100 unidades/mL e Glutamina 2 mM. As células β TC foram activadas com IL-1 β , como descrito acima, uma hora antes de serem utilizadas na preparação de extracto celular, enquanto que as células HeLa foram activadas por luz UV (20 J/m²). Foram preparados extractos celulares a partir do controlo, de células HeLa irradiadas com luz UV e de células β TC-3 tratadas com IL-1 β , por raspagem das culturas celulares em tampão de lise (Tris-acetato 20 mM,

EGTA 1 mM, Triton X-100 a 1%, p-nitrofenil-fosfato 10 mM, pirofosfato de sódio 5 mM, β -glicerofosfato 10 mM, ditionotrietioliol 1 mM). Os detritos foram removidos por centrifugação, durante cinco minutos, a 15000 rpm, num rotor SS-34 Beckman. Foram incubados com μ g de extractos, durante uma hora, à temperatura ambiente, com uma μ g de GST-Jun (aminoácidos 1-89) e 10 μ L de esferas de glutational-agarose (Sigma). Após quatro lavagens com tampão de raspagem, as esferas foram ressuspensas no mesmo tampão suplementado com os péptidos L-TAT, L-TAT-IB1 ou L-TAT-IB2 (25 μ M), durante 20 minutos. Foram, então, iniciadas reacções de cinase, pela adição de 10 mM de MgCl_2 e 5 μ Ci de ^{33}P - γ -dATP e incubadas durante 30 minutos a 30 °C. Os produtos de reacção foram, então, separados por SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida desnaturante, a 10%. Os géis foram secos e, subsequentemente, expostos a películas de raios X (Kodak). Os péptidos TAT-IB preveniram, eficientemente, a fosforilação de c-Jun por JNK activadas, nestes experiências. (Ver, FIG. 6).

Exemplo 7: Inibição *In vivo* da Fosforilação de c-Jun por Péptidos TAT-IB

Para determinar se os péptidos permeáveis em células podem bloquear a sinalização JNK *in vivo*, a requerente utilizou um sistema GAL4 heterólogo. Foram co-transfectadas células HeLa, cultivadas como descrito acima, com o vector repórter 5xGAL-LUC, em conjunto com a construção de expressão GAL-jun (Stratagene), compreendendo o domínio de activação de c-Jun (aminoácidos 1-89) ligado ao domínio GAL4 de ligação ao ADN. A activação da JNK foi realizada pela co-transfecção de vectores expressando as cinases MKK4 e MKK7, directamente a montante (Ver, Whitmarsh et al., *Science* **285**: 1573 (1999)). Resumidamente, foram transfectadas

3×10^5 células com os plasmídeos, em placas de 3,5 cm, utilizando DOTAP (Boehringer Mannheim), seguindo as instruções do fabricante. Para experiências envolvendo GAL-jun, foram transfectadas 20 ng do plasmídeo com 1 µg do plasmídeo repórter pFR-Luc (Stratagene) e 0,5 µg de qualquer um dos plasmídeos expressando MKK4 ou MKK7. Três horas após a transfecção, os meios celulares foram substituídos e foram adicionados os péptidos TAT, TAT-IB1 e TAT-IB2 (1 µM). Foram medidas as actividades da luciferase, 16 horas mais tarde, utilizando o "Dual Reporter System" da Promega, após a normalização do conteúdo em proteína. Como mostrado na FIG. 5, adição de ambos os péptidos TAT-IB1 e TAT-IB2 bloqueou activação de c-Jun, após a activação da JNK mediada por MKK4 e MKK7. Dado que as células HeLa expressam ambas as isoformas JNK1 e JNK2, mas não a JNK3, os requerentes transfectaram células com JNK3. Novamente, os dois péptidos TAT-IB inibiram a activação de c-Jun mediada pela JNK2.

Exemplo 8: Inibição da Morte de Células β Pancreáticas Induzida pela IL-1 β , por Péptidos TAT-IB

Os requerentes investigaram os efeitos dos péptidos L-TAT-IB na promoção de apoptose de células β pancreáticas, desencadeada por IL-1 β . Foram incubadas culturas de células β TC-3, durante 30 minutos, com 1 µM de qualquer um dos péptidos L-TAT-IB1 ou L-TAT-IB2, seguida por 10 ng/mL de IL-1 β . Foi realizado uma segunda adição de péptido (1 µM), após 24 horas. As células apoptóticas foram contadas após dois dias de incubação com IL-1 β , utilizando coloração nuclear com Iodeto de Propídio (as células coradas de vermelho são células mortas) e Hoechst 33342 (as células coradas de azul são células com a

membrana plasmática intacta). Como mostrado na FIG. 5, a adição dos péptidos TAT-IB inibiu a apoptose de células β TC-3, cultivadas na presença de IL-1 β , induzida pela IL-1 β , para dois

Foi examinada a inibição a longo prazo de morte celular induzida pela IL-1 β , por tratamento de células β TC-3, como descrito acima, excepto por a incubação das células com os péptidos e IL-1 β ter sido mantida durante 12 dias. Foram adicionados péptidos adicionais (1 μ M), em cada dia e foi adicionada IL-1 β adicional (10 ng/mL), cada 2 dias. O péptido TAT IB1 confere uma protecção significativa contra a apoptose, nestas condições. No seu conjunto, estas experiências estabelecem que os péptidos TAT-IB são moléculas biologicamente activas, capazes de prevenir os efeitos da sinalização da JNK sobre o destino celular.

Exemplo 9: Síntese de Péptidos Unicamente-D-retro-inversos

Os péptidos da invenção podem ser péptidos de aminoácidos unicamente-D sintetizados em reverso, para prevenir a proteólise natural (*i. e.*, péptidos unicamente-D-retro-inversos). Um péptido unicamente-D retro-inverso da invenção irá proporcionar um péptido com propriedades funcionais semelhantes às do péptido nativo, em que os grupos laterais dos aminoácidos componentes irão corresponder ao alinhamento do péptido nativo, mas que irão conservar uma estrutura base resistente a proteases.

Os péptidos retro-inversos da invenção são análogos sintetizados utilizando D-aminoácidos, por ligação dos aminoácidos numa cadeia peptídica, de forma a que a sequência de aminoácidos no análogo peptídico retro-inverso seja,

exactamente, oposta à da do péptido seleccionado, a qual serve do modelo. Para ilustrar, se a proteína TAT de ocorrência natural (formada pelos L-aminoácidos) tiver a sequência GRKKRRQRRR [SEQ ID N°: 7], o análogo peptídico retro-inverso deste péptido (formado por D-aminoácidos) terá a sequência RRRQRRKKRG [SEQ ID N°: 8]. São conhecidos na técnica processos para sintetizar uma cadeia de D-aminoácidos, para formar os péptidos retro-inversos. Ver, e. g., Jameson et al., *Nature*, **368**, 744-746 (1994); Brady et al., *Nature*, **368**, 692-693 (1994)); Guichard et al., *J. Med. Chem.* **39**, 2030-2039 (1996). Especificamente, os péptidos retro foram produzidos por síntese de F-mock normal e foram, adicionalmente, analisados por Espectrometria de Massa. Estes foram, finalmente, purificados por HPLC.

Uma vez que um problema inerente aos péptidos nativos é a degradação por proteases naturais e imunogenicidade inerente, os compostos heterobivalentes ou de heteromultivalentes desta invenção serão preparados de forma a incluir o “isómero retro-inverso” do péptido pretendido. A protecção do péptido contra a proteólise natural deve, consequentemente, aumentar a eficácia do composto heterobivalente ou heteromultivalente específico, prolongando a meia-vida e reduzindo a extensão da resposta imunitária direccionada para destruir activamente os péptidos.

Exemplo 10: Actividade biológica a longo prazo de todos os Péptidos IB unicamente-D-retro-inversos

É prevista actividade biológica a longo prazo para o heteroconjugado peptídico contendo D-TAT-IB retro-inverso, quando comparada com o análogo de L-aminoácidos nativo, devido à

protecção do péptido D-TAT-IB da degradação por proteases nativas, como mostrado no Exemplo 5.

Foi analisada a inibição da morte de células β pancreáticas induzida pela IL-1 β , pelo péptido D-TAT-IB1. Como mostrado na FIG. 10, foram incubadas células β TC-3, como descrito acima, durante 30 minutos, com uma adição única dos péptidos indicados (1 μ M), seguidamente, foi adicionada IL-1 β (10 ng/mL). Foram, então, contadas as células apoptóticas, após dois dias de incubação com IL-1 β , pela utilização de coloração nuclear com Iodeto de Propídio e Hoechst 33342. Foi contado um mínimo de 1000 células para cada experiência. É indicado o Erro Padrão das Médias (SEM), n=5. O péptido D-TAT-IB1 diminuiu a apoptose induzida pela IL-1 numa extensão semelhante à dos péptidos L-TAT-IB (comparar a FIG. 5 e a FIG. 10).

Foi, também, analisada a inibição a longo prazo da morte celular induzida pela IL-1 β , pelo péptido D-TAT-IB1. Foram incubadas células β TC-3, como acima, durante 30 minutos, com uma adição única dos péptidos indicados (1 μ M), seguidamente, foi adicionada IL-1 β (10 ng/mL), seguida pela adição de citocina, cada dois dias. Foram, então, contadas as células apoptóticas, após 15 dias de incubação com IL-1 β , pela utilização de coloração nuclear com Iodeto de Propídio e Hoechst 33342. Verifica-se que uma adição única do péptido L-TAT-IB1 não confere protecção a longo prazo. Foi contado um mínimo de 1000 células para cada experiência. É indicado o Erro Padrão das Médias (SEM), n=5. Os resultados são mostrados na FIG. 9. O D-TAT-IB1 foi capaz de conferir protecção a longo prazo (15 dias), mas não L-TAT-IB1.

Exemplo 11: Inibição da Morte de Células β Pancreáticas Induzida por Irradiação, por Péptidos TAT-IB

A JNK é, também, activada por radiação ionizante. Para determinar se os péptidos TAT-IB irão proporcionar protecção contra danos da JNK induzidos por radiação, foram irradiadas células "WiDr" (30 Gy) na presença ou ausência de péptidos D-TAT, L-TAT-IB1 ou D-TAT-IB1 (1 μ M adicionado 30 minutos antes da irradiação), como indicado na FIG. 10. As células de controlo (CTRL) não foram irradiadas. As células foram analisadas após 48 horas, utilizando coloração com PI e Hoechst 33342, como descrito acima. N=3, SEM estão indicados. Os péptidos L-TAT-IB1 e D-TAT-IB1 foram ambos capazes de impedir a apoptose induzida pela irradiação, nesta linha celular de cancro do cólon humano.

Exemplo 12: Radioprotecção contra Radiação Ionizante por Péptidos TAT-IB

Foram irradiados murganhos C57 B1/6 (2 a 3 meses) com um raios R Phillips RT 250, numa proporção de dose de 0,74 Gy/min (17 mA, filtro Cu com 0,5 mM), para determinar os efeitos radioprotectores dos péptidos TAT-IB. Os animais foram injectados i. p. com qualquer dos péptidos TAT, L-TAT-IB1 e D-TAT-IB1 (30 μ L de uma solução de 1 mM), trinta minutos antes da irradiação. Resumidamente, os murganhos foram irradiados como se segue: os murganhos foram colocados em pequenas caixas de plástico com a cabeça situada fora da caixa. Os animais foram colocados de costas sob o irradiador e o seu pescoço foi fixo num pequeno túnel de plástico, para manter a sua cabeça numa posição correcta. O corpo foi protegido com chumbo. Antes da irradiação os murganhos foram mantidos com ração para murganhos

normal, no entanto, após a irradiação, os murganhos foram alimentados com uma comida semi-líquida que foi renovada todos os dias.

Foi, então, classificada a reacção da mucosa do lábio, por 2 observadores independentes, de acordo com o sistema de classificação desenvolvido por Parkins *et al.* (Parkins *et al.*, *Radiotherapy & Oncology*, **1**: 165-173, 1983), em que foi quantificado o estado do eritema, assim como a presença de edema, descamação e exudação. Adicionalmente, os animais foram pesados antes de cada registo do estado de eritema/edema.

A Fig. 12A: ilustrou peso dos murganhos após irradiação. Os valores referem-se ao peso inicial dos murganhos que foi estabelecido em 100. CTRL: murganhos de controlo injectados com 30 µL de uma solução salina. N = 2 para cada um dos valores referidos, são indicados os S. D. Os valores de x são dias.

FIG. 12B é ilustrativa da classificação do eritema/edema após a irradiação. Foi quantificado o estado de edema e de eritema do lábio ventral, dos mesmos murganhos que na FIG. 12A. N=2 para cada valor referido. Os valores de x são dias.

Os resultados destas experiências indicam que os Péptidos TAT-IB podem proteger contra a perda de peso e eritema/edema associados à radiação ionizante.

Exemplo 13: Supressão de Factores de Transcrição da JNK por péptidos L-TAT-IB1

Foram realizados ensaios de retardação em gel com uma sonda (5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3') duplamente marcada com um AP-1. Os extractos nucleares celular de HeLa foram ou não tratados durante uma hora com TNF- α 5 ng/mL, como indicado. Foram adicionados os péptidos TAT e L-TAT-IB1, 30 minutos antes do TNF- α . É mostrada, apenas, a parte do gel com o complexo AP-1 ADN específico (como demonstrado por experiências de competição com competidores específicos e não-específicos não marcados). Os péptidos L-TAT-IB1 reduzem a formação do complexo de ligação AP-1 ADN, na presença do TNF- α . (Ver, FIG 11).

Exemplo 14: Protecção contra a perda de audição, induzida por ruído, por D-TAT-IB

Foi injectada uma solução de D-JNKI (1 μ M, 1 μ L/h) no ouvido interno direito de uma cobaia, como mostrado na FIG 13, painel A, enquanto que o ouvido esquerdo foi injectado com, apenas, soro fisiológico. A cobaia foi, então, exposta a um traumatismo acústico (120 db, 30 minutos) e foi realizado um registo da sensibilidade auditiva, após três dias (FIG 13, painel B), assim como um exame histológico do ouvido interno (FIG 13, painel C e D). Como mostrado na FIG 13, as estruturas ciliadas no ouvido tratado com JNKI são completamente protegidas da destruição induzida pelo ruído, como avaliado por exame histológico, ao contrário do ouvido não-tratado, em que a maior parte das estruturas ciliadas desapareceram. Além disso, a sensibilidade do ouvido tratado com D-JNK1 ao ruído, parece ter sido conservada (FIG 13, painel B).

Exemplo 15: Protecção contra a perda de audição, induzida por antibióticos, por péptidos D-TAT-IB

Foram tratados ouvidos internos de galinhas, com estreptomicina, na presença/ausência de D-JNKI. Foram, então, realizadas experiências de TUNEL para detectar a apoptose (núcleos verdes). Como mostrado na FIG 14, o D-JNKI protege, totalmente, os ouvidos internos, da apoptose induzida pela estreptomicina. Deste modo, o D-JNK-I é útil na prevenção de estados de perda de audição provocados por terapia com antibióticos.

Exemplo 16: Protecção contra a destruição dos ilhéus pancreáticos, induzida por citocinas pró-inflamatórias, por péptidos D-TAT-IB

Foram tratadas células de ilhéus pancreáticos com D-JNK1 (1 mM, durante uma hora, antes de serem expostas à interleucina 1B (10 ng/mL). Como mostrado na FIG 15, os ilhéus tratados com D-JNKI resistem à destruição induzida por IL-1B. Isto indica que o tratamento com D-JNKI auxilia a preservação de ilhéus enxertados.

Exemplo 17: Aumento da recuperação de células de ilhéus pancreáticos, por péptidos D-TAT-IB

Foi adicionado D-JNK-I em conjunto com collagenase, durante o isolamento de células dos ilhéus. Isto resultou numa

quantidade aumentada de ilhéu, após 3 dias em cultura, como medido pelo aumento em desidrogenase do lactato. Ver a FIG 15.

Exemplo 18: Métodos gerais utilizados no teste dos efeitos dos péptidos JNKI sobre a activação da JNK e a acção relacionada com JNK

Cultura Neuronal Geral: Foram dissecadas pequenas porções do córtex proveniente de cérebros de filhotes de rato com dois dias de idade e foram incubadas com 200 unidades de papaína, durante 30 minutos, a 34 °C. Seguidamente, os neurónios foram plaqueados numa densidade de, aproximadamente, 1×10^6 células/placa, em placas que tinham sido pró-revestidas com poli-D-lisina 100 µg/mL. As células foram cultivadas utilizando um meio de cultura B27/Neurobasal (Life Technologies), suplementado com glutamina 0,5 M, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL.

Ensaio da citotoxicidade da desidrogenase do lactato (LDH): Foi medida a quantidade de LDH libertada no meio de cultura, utilizando o kit de ensaio de citotoxicidade não-radioactivo Citotox 96 (Promega).

Ensaio da anulação de GST-c-Jun e cinase: Foram preparados extractos celulares por raspagem de células em tampão de lise (Tris-acetato 20 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 a 1%, p-nitrofenil-fosfato 10 mM, pirofosfato de sódio 5 mM, β-glicerofosfato 10 mM, ditiotreitól 1 mM). Foram incubadas 25 µg de amostras, durante 1 hora, à temperatura ambiente, com 1 µg de GST-c-Jun (resíduos de aminoácido 1-89) e 10 µL de esferas de glutathiona-agarose (Sigma). As esferas foram lavadas quatro

vezes e, seguidamente, ressuspensas no tampão de lise descrito acima. Foram, então, realizados ensaios de cinase, *in vitro*, utilizando JNK1 α 1 recombinante e 0,5 μ g de um substrato seleccionado do grupo consistindo em proteínas de fusão com GST (e. g., as proteínas de fusão GST-Jun e GST-Elk1), caseína e histona (Sigma). Foram iniciadas reacções com MgCl₂ 10 mM e ATP 10 μ M, na presença de 5 μ Ci de ³³P-ATP e foram incubadas durante 30 minutos, a 30 graus Celsius. Os produtos de reacção foram separados por SDS-PAGE e os géis foram secos e foram, seguidamente, expostos a películas de raios X (Kodak).

Transferências de Western: Foram obtidos extractos de proteína totais por raspagem de células em tampão de lise (descrito acima), separando as proteínas num gel de poliacrilamida de SDS a 12%. As proteínas separadas foram, então, transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Os anticorpos utilizados nas transferências de Western aqui descritas foram obtidos de Alexis.

Separação dos núcleos a partir do citoplasma: Foram lisados neurónios durante 15 minutos, em tampão de lise e as amostras foram, seguidamente, centrifugadas a 300 g, durante 10 minutos, a 4 °C, para isolar núcleos para análise de transferência de Western (ver a FIG. 17B). Os sedimentos nucleares foram reconstituídos em tampão de lise e foram, depois, sonicados.

RT-PCR em Tempo real: Foi realizado RT-PCR em tempo real utilizando iniciadores específicos, num equipamento lightcycler (Roche). Foi utilizada o transcrito de actina de manutenção, para normalizar para a quantidade e a qualidade dos ARN que foram extraídos pelo método de Chomczynski. Ver Chomczynski

et al., *Anal. Biochem.*, **162**:156-59 (1987). As sequências dos iniciadores utilizados foram as seguintes:

c-Fos: Directo: 5'-GCTGACAGATACTCCAAG-3'
Inverso: 5'-CCTAGATGATGCCGGAACA-3'

Actin: Directo: 5'-AACGGCTCCGGCATGTGCAA-3'
Inverso: 5'-ATTGTAGAAGGTGTGGTGCCA-5'

Imuno-histoquímica P-c-Jun: P-c-Jun, como aqui utilizado refere-se a formas fosforiladas de c-Jun. A P-c-Jun foi visada por um anticorpo policlonal de coelho (500 x em PBS) (Cell Signaling Technology). O complexo de anticorpo resultante foi visualizado com 3,3-diaminobenzidina como substrato.

Isquemia transiente em murganhos adultos: Foi provocada isquemia, introduzindo um filamento na artéria carótida interna, a partir da artéria carótida comum e fazendo avançar o filamento para o interior do círculo arterial, obstruindo, deste modo, a artéria cerebral média, utilizando murganhos ICR-CD1 do sexo masculino (com, aproximadamente, 6 semanas de idade e pesando na gama de, cerca de, 18 a 37 g) (Harlan, Inc.). Ver, e. g., Huang *et al.*, *Science*, **265**:1883-85 (1994); Hara *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **94**:2007-12 (1997). O fluxo sanguíneo cerebral regional foi medido por fluxometria de Doppler com laser, com uma sonda fixa no crânio ao longo da isquemia e até 10 minutos após a reperfusão. Foi medida a temperatura rectal e mantida a 37 °C. Os animais foram sacrificados 48 horas após a reperfusão. Foram contornadas secções seriadas de criostato com 20 µm de espessura, utilizando um sistema computador-microscópio, equipado com o programa Neurolucida (Microbrightfield, Inc.) e

foram calculados os volumes da área isquémica e do total do cérebro (cego), com o programa Neuroexplorer. Foi medida a pressão sanguínea sistólica e diastólica com um cateter arterial em três murganhos adicionais, desde 10 minutos antes da injeção de D-JNK11, até 30 minutos após esse momento. Estas medições da pressão sanguínea mostraram que as injeções não afectaram a pressão sanguínea (*i. e.*, alteração de menos de 10%). Foram seguidas as orientações do Swiss Federal Veterinary Office em todas as experiências.

Isquemia focal permanente em ratos jovens (Pl4): Foi obtida a oclusão de artéria cerebral média por electrocoagulação da artéria cerebral média, numa localização fechada em relação à sua origem, na junção com o ramo olfactivo. Os ratos (de Wistar), os quais pesavam na gama de, cerca de, 27-35 g, foram sacrificados 24 horas após a oclusão da artéria cerebral média. Os ratos foram sacrificados utilizando uma dose excessiva de hidrato de cloral e foram perfundidos através do ventrículo esquerdo, com o fixador de Zamboni. Os cérebros foram pós-fixados durante 2 horas, na mesma solução que a utilizada para a perfusão e, depois, os cérebros foram infiltrados, de um dia para o outro, em sacarose a 30%, para crioprotecção. Foram desenhados os contornos de cada área isquémica (corados) com um sistema computador-microscópio. Foi traçada a área da lesão isquémica e da totalidade do cérebro, a partir de secções seriadas de criostato com 50 µm, coradas com violeta de cresilo, utilizando o programa Neurolucida e foram calculados os volumes de cada um, utilizando o programa Neuroexplorer, como descrito acima.

Estatística: Os dados de ambos os modelos de isquemia (*i. e.*, transiente e permanente) foram transformados

logaritmicamente, para satisfazer o critério Gaussiano. Os dados foram analisados com uma ANOVA global ($p < 0,0001$ para ambos os modelos), seguida por testes t unicaudais não-emparelhados.

Exemplo 19: Sensibilidade e especificidade dos péptidos JNKI contra a acção da JNK

Os péptidos JNKI1 utilizados nestas experiências são direccionados para o bloqueio do acesso da JNK a c-Jun e a outros substratos, através de um mecanismo competitivo directo. Ver, e.g., Bonny et al., *Diabetes*, **50**:77-82 (2001); Barr et al., *J. Biol. Chem.*, **277**:10987-97 (2002).

Foi testado o efeito inibidor de L-JNKI1 e D-JNKI1 sobre a activação e a acção da JNK, utilizando os ensaios da cinase, como descrito acima, no Exemplo 18. Os resultados destas experiências são mostrados nas FIG. 16A-16C. O efeito inibidor de L-JNKI1 e D-JNKI1 sobre a activação e a acção da JNK é demonstrado pela sua capacidade para impedir a fosforilação *in vitro* dos alvos conhecidos da JNK, c-Jun e Elk1, utilizando JNK1 α 1. (Ver a FIG. 16A). Os termos "P-Jun" e "P-Elk1", como aqui utilizados, referem-se, respectivamente, às formas radiomarcadas (*i. e.*, fosforiladas com 33P-ATP) dos substratos GST-Jun e GST-Elk1. A FIG. 16B mostra o efeito inibidor da sequência mínima inibidora da JNK com 20 aminoácido, de JIP-IB1 (forma L de JBD₂₀ (SEQ ID N°: 21)) em experiências de resposta à dose, utilizando condições semelhantes às utilizadas para testar o efeito inibidor de L-JNKI1 e D-JNKI1 e utilizando quantidades decrescente de L-JBD₂₀. A FIG. 16B ilustra que o péptido L-JBD₂₀ (SEQ ID N°: 21) isolado (*i. e.*, sem a sequência TAT) pode inibir a acção da JNK. JBD₂₀ revelou, também, inibir outros alvos da

JNK, incluindo ATF2, IRS-1, MADD, bcl-x1. Em cada um destes casos, o IC₅₀ foi cerca de 1 µM (dados não apresentados). A sequência TAT não estava ligada a JBD₂₀ nestas experiências, porque, a uma concentração superior a 50 µM, a sequência TAT induz uma precipitação não-específica das proteínas nos extractos. Abaixo de 50 µM, a TAT não influencia as propriedades inibidoras dos péptidos JBD₂₀.

Foram realizadas experiências *in vitro*, para determinar a especificidade dos péptidos JNKI no bloqueio da activação da JNK. Foi testado, em particular, o efeito destes péptidos sobre a actividade de 40 cinases diferentes (péptidos 10 µM, ATP 10 µM) para os seus respectivos substratos. Em <http://www.upstate.com/img/pdf/KinaseProfiler.pdf> pode ser encontrada a lista completa de substratos utilizados nestas experiências. Como esperado, os péptidos JNKI tiveram um efeito sobre as cinases JNK e MKK4 e MKK7, cuja totalidade contém domínios de ligação a JNK. Os péptidos (as formas D-JNKI1 e L-JNKI1) não conseguiram interferir, absolutamente, com as actividades da totalidade das outras cinases. Experiências adicionais mostraram que 500 µM dos péptidos JBD₂₀ não interferiram com a actividade de 6 cinases particulares: ERK2, p38, pKC, p34, caK e pKA (Fig. 16C). Os substratos destas cinases são ERK2:ERK1; p38:ATF2; p34, pKC, pKA:histona; e caK:caseína. Este nível da especificidade está muito acima dos obtidos com outros pequenos inibidores químicos da cinase do terminal N da Jun, demonstrando, deste modo, a selectividade extremamente elevada dos péptidos JNKI da invenção. Para uma discussão de outros pequenos inibidores químicos da cinase do terminal N da Jun (JNK), ver Bennett *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **98**:13681-86 (2001).

Exemplo 20: Efeitos dos péptidos JNKI sobre alvos JNK no interior de neurónios corticais tratados com NMDA

Foi realizada uma série de experiências, para analisar os efeitos dos péptidos JNKI da invenção sobre alvos da JNK diferentes no interior dos neurónios. Foi estimada a activação da JNK em neurónios corticais tratados com N-metil-D-aspartato (NMDA) em cultura, pela realização de ensaios de cinase em JNK anulada, utilizando GST-c-Jun, utilizando os métodos descritos acima. (Ver *e. g.*, Ko *et al.*, *J. Neurochem.* **71**:1390-1395 (1998); Coffey *et al.*, *J. Neurosci.* **20**:7602-7613 (2000)). Os resultados destas experiências são mostrados nas FIG. 17-18.

A Fig. 17A mostra a actividade da JNK em neurónios não tratados ("0"), após 10 minutos de exposição a NMDA 100 μ M (10') ou após 30 minutos de exposição a NMDA 100 μ M. As duas pistas à direita da Fig. 17C demonstram que a activação da JNK foi, essencialmente, inalterada por D-JNKI1. O aumento da actividade da JNK pareceu máximo (*i. e.*, 2,2 vezes), após 30 minutos de tratamento com NMDA (FIG. 17A). Este aumento na actividade da JNK traduziu-se numa fosforilação elevada de c-Jun (FIG. 17B). A adição dos péptidos L-JNKI1 e D-JNKI1 penetrantes nas células demonstrou prevenir, completamente, o aumento em P-c-Jun, após 5 horas da exposição a 100 μ M de NMDA, apesar de um nível normal de activação da JNK. A adição de L-JNKI1 e D-JNKI1 levou nível de P-c-Jun para baixo, mesmo, do nível de P-c-Jun no controlo.

A transcrição do gene c-fos induzida por NMDA, sob a influência da JNK, através do factor de transcrição Elk1 foi, também, completamente impedida pela adição de L-JNKI e D-JNKI1 (FIG. 17C). Foi quantificada a expressão de c-fos por PCR em tempo real (Lightcycler), utilizando ARN extraído, utilizando os métodos descritos acima no Exemplo 18. Os dados na FIG. 17C são apresentados como a expressão c-fos relativa à actina (n = 4). Para uma descrição da indução da expressão de c-fos através da fosforilação de TCF/Elk-1 mediada por JNK, ver Cavigelli *et al.* *EMBOJ.*, **14**:5957-5964 (1995).

A evolução ao longo do tempo da neurotoxicidade do NMDA e da neuroprotecção por L-JNKI1 e D-JNKI1, assim como por dois péptidos de controlo, TAT-vazia (*i. e.*, a sequência TAT, apenas, sem a sequência JBD₂₀) e L-JNKI1_{mut} (tendo seis aminoácidos mutados em alanina, como descrito em Bonny *et al.*, *Diabetes* **50**:77-82 (2001)). As micrografias da FIG. 18 mostram neurónios corados com Hoechst, às 24 horas após o tratamento. A adição dos péptidos L-JNKI e D-JNKI1 protegeu, completamente, os neurónios contra os efeitos excitotóxicos do NMDA (FIG. 18) ou do cainato (dados não apresentados) enquanto que a adição de péptidos de controlo não teve qualquer efeito neuroprotector. Ambos os péptidos L-JNKI1 e D-JNKI1 demonstraram inibir a morte neuronal, às 12 horas após o tratamento, enquanto que os péptidos TAT-vazios não tiveram qualquer efeito (FIG. 18).

Como verificado na FIG 18, a forma D dos péptidos penetradores na célula da invenção, *i. e.*, D-JNKI1, foi superior na protecção dos neurónios durante períodos de tempo prolongados, *i. e.*, 12 horas, 24 horas e 48 horas após exposição a 100 µM de NMDA. Estas micrografias indicam que às 24 horas após o tratamento, D-JNKI1 ainda proporcionava neuroprotecção

total, dado que as culturas de controlo e as culturas de tratamento com D-JNKI1 e NMDA eram comparáveis. A forma L da JNKI1 deixou de proteger os neurónios às 24 horas após o tratamento, presumivelmente porque as formas L dos péptidos são, de um modo geral, mais susceptíveis à degradação. Os péptidos TAT-vazios não afectaram a morte celular em quaisquer condições. O histograma na FIG. 18 representa o nível de morte neuronal, às 12, 24 e 48 horas após a exposição a 100 μ M de NMDA, como indicado pela actividade da LDH no meio da placa de Petri. Os valores da absorvência, os quais representam a concentração de LDH, foram convertidos em valores de morte neuronal em %, pela divisão dos valores da absorvência pela absorvência média para a LDH total. A absorvência média para a LDH total foi obtida a partir do meio, mais os neurónios lisados.

Exemplo 21: Distribuição *in Vivo* de péptidos JNKI permeáveis em células

Para testar a praticabilidade da utilização dos péptidos permeáveis em células em aplicações *in vivo*, foi avaliada a sua capacidade de penetração no cérebro, utilizando L-JNKI1 marcado com FITC e D-JNKI1. Para uma discussão da distribuição *in vivo* de uma proteína biologicamente activa num murganho, ver Schwarze *et al.*, *Science*, **285**:1569-72 (1999). Estas experiências mostraram que L-JNKI1 marcado com FITC e D-JNKI1 foram capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e de penetrar nos neurónios de murganhos e ratos adultos de várias idades. Tanto L-JNKI1 marcado com FITC como D-JNKI1 foram capazes de penetrar nos neurónios no período de 1 hora após a injeção intraperitoneal (dados não apresentados).

Exemplo 22: Neuroprotecção pelos péptidos JNKI contra isquemia cerebral transiente e focal permanente

Num modelo de isquemia ligeira em murganhos, a artéria cerebral média esquerda foi obstruída durante 30 minutos, seguidos por 48 h de reperfusão. O grupo de controlo tratado com veículo recebeu uma injeção de, apenas, tampão fosfato salino (PBS). No grupo de controlo tratado com veículo, esta oclusão resultou, sistematicamente, num enfarte grave contendo severamente células picnóticas, as quais foram, predominantemente, encontradas no córtex e no estrato em todos os cérebros e, em 7 dos cérebros, estas células foram, também, encontradas no hipocampo. O volume de enfarte médio foi de $67,4 \text{ mm}^3$ ($n = 12$), nos indivíduos do grupo de controlo tratados com veículo.

Os indivíduos foram tratados com uma injeção intracerebro-ventricular (icv) de D-JNKI1 (15,7 ng em 2 μL de PBS), para avaliar a eficácia e a “janela terapêutica” do tratamento (*i. e.*, o período após os danos, durante o qual o tratamento com os péptidos da invenção permanece eficaz). A FIG. 19A mostra secções coradas com violeta de cresilo que mostram exemplos típicos do enfarte resultante (barra, 1 mm). A FIG. 19B representa volumes de enfarte após a injeção icv de D-JNKI1 em tempos diferentes antes (-1 hora) ou depois (+3,6 ou 12 horas), após a oclusão da artéria cerebral média. Na FIG. 19B, um asterisco (*) indica que o resultado é estatisticamente diferente do controlo (como indicado por um teste de t).

O pré-tratamento 1 hora antes da oclusão da artéria cerebral média, com a injeção icv de D-JNKI1, reduziu,

significativamente, o volume de enfarte medido 48 horas após a reperfusão, em 88%, para um volume de 7,8 mm³. (FIG. 19A-19B). A administração do péptido D-JNKI1, 3 ou 6 horas após a oclusão da artéria cerebral média, foi ainda significativamente protectora, uma vez que o volume de enfarte médio, para indivíduos injectados 3 horas após oclusão, foi reduzido para 5,8 mm³ (uma redução de 91%, em comparação com animais não tratados) e o volume de enfarte médio, para indivíduos injectados 6 horas após oclusão, foi reduzido para 4,8 mm³ (uma redução de 93% em comparação com animais não tratados). Pelo contrário, a injeção do péptido D-JNKI1 às 12 horas após a oclusão de artéria cerebral média não foi, significativamente, protectora. A obtenção de isquemia completa, seguida por reperfusão, foi confirmada em todos os animais, pela monitorização do fluxo sanguíneo cerebral regional no território da artéria cerebral média esquerda.

Foram, também, avaliadas as capacidades protectoras de D-JNKI1 contra isquemia focal permanente em ratos jovens (P14). Uma zona isquémica no córtex cerebral de ratos P14, pela realização de uma oclusão permanente da artéria cerebral média, induzindo, deste modo, uma zona de degeneração significativa restringida ao córtex parietotemporal. Dado que os volumes cerebrais nos ratos P14 foram variáveis, as lesões foram expressas como uma percentagem do volume do hemisfério cerebral. D-JNKI1 foi injectado intraperitonealmente numa concentração de 11 mg/kg, a qual corresponde a, aproximadamente, 340 µg. Foi administrado D-JNKI1, 30 minutos antes da oclusão da artéria cerebral média ou 6 ou 12 horas após a oclusão. Os ratos foram fixos 24 horas após a oclusão. Em cada um destes pontos temporais (*i. e.*, administração a -30 minutos, +6 h ou +12 h), D-JNKI1 causou reduções significativas e estatisticamente

significativas do volume de enfarte, em comparação com animais de controlo (FIG. 20A-20B). A administração de D-JNKI1, 30 minutos antes da oclusão, originou uma redução do volume de enfarte de 68%, enquanto que a administração do péptido às 6 e 12 horas após oclusão originou reduções no volume de enfarte, respectivamente, de 78% e 49%.

Foi realizada análise imuno-histoquímica, para determinar a activação do factor de transcrição c-Jun, um alvo principal da JNK, nos cérebros de filhotes de rato com isquemia permanente. A fosforilação de c-Jun foi evidente em muitos neurónios no córtex peri-enfartado (FIG. 5C, barra = 200 μ M). Pelo contrário, em cérebros tratados com o péptido D-JNKI1, o córtex peri-enfartado foi negativo e foram, apenas, detectados alguns neurónios positivos, no limite da região enfartada.

Exemplo 22: Avaliação comportamental de potenciais efeitos laterais de péptidos JNKI

Tipicamente, a elevada toxicidade de outros compostos de neuroprotector limitou, significativamente, a sua utilização clínica. (Ver Gladstone *et al.*, *Stroke*, **33**:2123-36 (2002)). Foi utilizada a capacidade dos murganhos para se manterem num rotarod rotativo horizontal, como critério para efeitos secundários possíveis para doses diferentes de D-JNKI1 e de uma dose terapêutica de MK-801 (1 mg/kg, uma dose terapêutica padrão). Foi avaliada, em particular, a função motora dos murganhos, utilizando o teste do rotarod às 3 h, 24 h, 6 dias e 12 dias após injeções, tanto i. p. (11 e 110 mg/kg), como icv de D-JNKI1 (2 μ L contendo 15,7 ng ou 157 ng de D-JNKI1). Foi

utilizada a injeção i. p. de MK-801 (1 mg/kg), como um composto de controlo, durante este processo de avaliação.

Os murganhos foram treinados no dia antes e na manhã do dia da experiência, de modo a reduzir a variabilidade entre indivíduos. As sessões de treino e de teste foram idênticas para os murganhos de controlo e injectados. A função motora de cada murganho foi examinada, imediatamente antes da injeção e a 1, 6 e 12 dias após a injeção. Os murganhos foram colocados no rotarod, o qual foi programado para acelerar uniformemente, de 4 para 40 rpm. Foi registada a latência até às quedas de cada murganho testado. Na Tabela 2 são apresentados os resultados desta avaliação, utilizando os métodos de rotarod como a latência mediana até à queda (medida em segundos).

TABELA 2: EFEITO DO D-JNKI1 SOBRE A COORDENAÇÃO MOTORA

Latência Mediana até à queda (visualizações)

	DOSE	-1 h	+3 h	1 dia	6 dias	12 dias
PBS	2 µL icv	234	202	238	268	246
MK-801	1 mg/kg i. p.	226	incapaz	174	233	292
D-JNKI1	11 mg/kg i. p.	204	221	372	287	418
	110 mg/kg i. p.	276	266	447	416	325
	15,7 ng icv	210	342	302	345	285
	157 ng icv	260	200	253	338	335
	2 µL PBS icv	234	202	238	268	246

Como verificado na Tabela 2, a coordenação motora revelou não ser diminuída com as doses de D-JNKI1 em i. p. e icv (i. e., a dose, 2,8 µL/Kg, que conferiu 90% de neuroprotecção e uma dose

10 vezes mais elevada). Pelo, contrário, MK-801 originou uma diminuição significativa da coordenação motora, dado que os murganhos foram incapazes de permanecer no rotor. (Ver e. g., a Tabela 2; Dawson et al., *Brain Res.* **892**:344:350 (2001) (descrevendo resultados semelhantes para outros neuroprotectores) e uma dose 10 vezes mais elevada de MK-801 matou todos os murganhos. Os efeitos secundários da dose mais baixa de MK-801 revelaram desaparecer, essencialmente, após 24 horas. Aos 6 e 15 dias após o tratamento com D-JNKI1, não foi verificado qualquer sinal de diminuição motora e as classificações no rotarod foram reproduzivelmente melhores do que nos murganhos de controlo.

EQUIVALENTES

A partir da descrição detalhada anterior das formas de realização específicas da invenção, deve ser evidente que foram descritos péptidos bioactivos permeáveis em células únicos. Embora tenham sido aqui divulgadas em detalhe formas de realização particulares, isto foi realizado a título de exemplo, apenas para fins de ilustração e não pretende limitar no que respeita ao âmbito das reivindicações em anexo que se seguem.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Xiagen S.A

<120> Inibidores peptídicos da via de transdução de sinal da JNK, permeáveis em células

<130> U001P005WOEPT1T1

<140>

<141>

<150> documento US 10/165250

<151> 2002-06-07

<160> 33

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 23

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: péptido L-IB1 inibidor da JNK

<400> 1

Asp Thr Tyr Arg Pro Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln
1 5 10 15

Val Pro Arg Ser Gln Asp Thr
20

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: péptido L-IB2 inibidor da JNK

<400> 2

Glu	Glu	Pro	His	Lys	His	Arg	Pro	Thr	Thr	Leu	Arg	Leu	Thr	Thr	Leu
1				5					10					15	

Gly	Ala	Gln	Asp	Ser
			20	

<210> 3

<211> 23

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: péptido D-IB1 inibidor da JNK

<400> 3

Thr	Asp	Gln	Ser	Arg	Pro	Val	Gln	Pro	Phe	Leu	Asn	Leu	Thr	Thr	Pro
1				5					10					15	

Arg	Lys	Pro	Arg	Tyr	Thr	Asp
			20			

<210> 4

<211> 21

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: péptido D-IB2 inibidor da JNK

<400> 4

Ser Asp Gln Ala Gly Leu Thr Thr Leu Arg Leu Thr Thr Pro Arg His
1 5 10 15

Lys His Pro Glu Glu
20

<210> 5

<211> 19

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: péptido L-IB inibidor da JNK
(genérico) (XRPTTLXLXXXXXXXXQDS/TX)

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (1)..(1)

<223> /substituir = "Arg"
/substituir = "Asx"
/substituir = "Cys"
/substituir = "Glx"
/substituir = "Gly"
/substituir = "His"
/substituir = "Ile"
/substituir = "Leu"
/substituir = "Lys"
/substituir = "Met"
/substituir = "Phe"
/substituir = "Pro"
/substituir = "Ser"
/substituir = "Thr"

/substituir = "Trp"
/substituir = "Tyr"
/substituir = "Val"
/substituir = "Xaa"
/substituir = ""

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (7) .. (7)

<223> /substituir = "Arg"
/substituir = "Asx"
/substituir = "Cys"
/substituir = "Glx"
/substituir = "Gly"
/substituir = "His"
/substituir = "Ile"
/substituir = "Leu"
/substituir = "Lys"
/substituir = "Met"
/substituir = "Phe"
/substituir = "Pro"
/substituir = "Ser"
/substituir = "Thr"
/substituir = "Trp"
/substituir = "Tyr"
/substituir = "Val"
/substituir = "Xaa"
/substituir = ""

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (9) .. (15)

<223> /substituir = "Arg"
/substituir = "Asx"
/substituir = "Cys"
/substituir = "Glx"
/substituir = "Gly"
/substituir = "His"
/substituir = "Ile"
/substituir = "Leu"
/substituir = "Lys"
/substituir = "Met"
/substituir = "Phe"
/substituir = "Pro"
/substituir = "Ser"
/substituir = "Thr"
/substituir = "Trp"
/substituir = "Tyr"
/substituir = "Val"
/substituir = "Xaa"
/substituir = ""

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (18)..(18)

<223> /substituir = "Thr"

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (19)..(19)

<223> /substituir = "Arg"
/substituir = "Asx"
/substituir = "Cys"
/substituir = "Glx"

```

/substituir = "Gly"
/substituir = "His"
/substituir = "Ile"
/substituir = "Leu"
/substituir = "Lys"
/substituir = "Met"
/substituir = "Phe"
/substituir = "Pro"
/substituir = "Ser"
/substituir = "Thr"
/substituir = "Trp"
/substituir = "Tyr"
/substituir = "Val"
/substituir = "Xaa"
/substituir = ""

```

<400> 5

```

Ala Arg Pro Thr Thr Leu Ala Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gln
1           5           10           15

```

Asp Ser Ala

<210> 6

<211> 19

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: péptido D-IB inibidor da JNK
(genérico) (XS/TDQXXXXXXXXLXLTPRX)

<220>
<221> VARIAÇÃO
<222> (1)..(1)
<223> /substituir = "Arg"
 /substituir = "Asx"
 /substituir = "Cys"
 /substituir = "Glx"
 /substituir = "Gly"
 /substituir = "His"
 /substituir = "Ile"
 /substituir = "Leu"
 /substituir = "Lys"
 /substituir = "Met"
 /substituir = "Phe"
 /substituir = "Pro"
 /substituir = "Ser"
 /substituir = "Thr"
 /substituir = "Trp"
 /substituir = "Tyr"
 /substituir = "Val"
 /substituir = "Xaa"
 /substituir = ""

<220>
<221> VARIAÇÃO
<222> (2)..(2)
<223> /substituir = "Thr"

<220>
<221> VARIAÇÃO
<222> (5)..(11)
<223> /substituir = "Arg"

/substituir = "Asx"
/substituir = "Cys"
/substituir = "Glx"
/substituir = "Gly"
/substituir = "His"
/substituir = "Ile"
/substituir = "Leu"
/substituir = "Lys"
/substituir = "Met"
/substituir = "Phe"
/substituir = "Pro"
/substituir = "Ser"
/substituir = "Thr"
/substituir = "Trp"
/substituir = "Tyr"
/substituir = "Val"
/substituir = "Xaa"
/substituir = ""

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (13)..(13)

<223> /substituir = "Arg"
/substituir = "Asx"
/substituir = "Cys"
/substituir = "Glx"
/substituir = "Gly"
/substituir = "His"
/substituir = "Ile"
/substituir = "Leu"
/substituir = "Lys"
/substituir = "Met"

/substituir = "Phe"
/substituir = "Pro"
/substituir = "Ser"
/substituir = "Thr"
/substituir = "Trp"
/substituir = "Tyr"
/substituir = "Val"
/substituir = "Xaa"
/substituir = ""

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (19)..(19)

<223> /substituir = "Arg"
/substituir = "Asx"
/substituir = "Cys"
/substituir = "Glx"
/substituir = "Gly"
/substituir = "His"
/substituir = "Ile"
/substituir = "Leu"
/substituir = "Lys"
/substituir = "Met"
/substituir = "Phe"
/substituir = "Pro"
/substituir = "Ser"
/substituir = "Thr"
/substituir = "Trp"
/substituir = "Tyr"
/substituir = "Val"
/substituir = "Xaa"
/substituir = ""

<400> 6

Ala Ser Asp Gln Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Thr
1 5 10 15

Pro Arg Ala

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: péptido contendo a sequência TAT,
L-TAT

<400> 7

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: péptido de retro-inverso contendo
a sequência TAT D-TAT

<400> 8

Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Gly
1 5 10

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: péptido contendo a sequência TAT
genérica L-genérico-TAT

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (1)..(4)

<223> /substituir = "Arg"

/substituir = "Asx"

/substituir = "Cys"

/substituir = "Glx"

/substituir = "Gly"

/substituir = "His"

/substituir = "Ile"

/substituir = "Leu"

/substituir = "Lys"

/substituir = "Met"

/substituir = "Phe"

/substituir = "Pro"

/substituir = "Ser"

/substituir = "Thr"

/substituir = "Trp"

/substituir = "Tyr"

/substituir = "Val"

/substituir = "Xaa"

/substituir = ""

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (14)..(17)

<223> /substituir = "Arg"

/substituir = "Asx"

/substituir = "Cys"

/substituir = "Glx"

/substituir = "Gly"

/substituir = "His"

/substituir = "Ile"

/substituir = "Leu"

/substituir = "Lys"

/substituir = "Met"

/substituir = "Phe"

/substituir = "Pro"

/substituir = "Ser"

/substituir = "Thr"

/substituir = "Trp"

/substituir = "Tyr"

/substituir = "Val"

/substituir = "Xaa"

/substituir = ""

<400> 9

Ala Ala Ala Ala Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Ala Ala
1 5 10 15

Ala

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: péptido contendo a sequência TAT
genérica D-genérico-TAT

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (1) .. (4)

<223> /substituir = "Arg"
/substituir = "Asx"
/substituir = "Cys"
/substituir = "Glx"
/substituir = "Gly"
/substituir = "His"
/substituir = "Ile"
/substituir = "Leu"
/substituir = "Lys"
/substituir = "Met"
/substituir = "Phe"
/substituir = "Pro"
/substituir = "Ser"
/substituir = "Thr"
/substituir = "Trp"
/substituir = "Tyr"
/substituir = "Val"
/substituir = "Xaa"
/substituir = ""

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (14) .. (17)

```

<223> /substituir = "Arg"
      /substituir = "Asx"
      /substituir = "Cys"
      /substituir = "Glx"
      /substituir = "Gly"
      /substituir = "His"
      /substituir = "Ile"
      /substituir = "Leu"
      /substituir = "Lys"
      /substituir = "Met"
      /substituir = "Phe"
      /substituir = "Pro"
      /substituir = "Ser"
      /substituir = "Thr"
      /substituir = "Trp"
      /substituir = "Tyr"
      /substituir = "Val"
      /substituir = "Xaa"
      /substituir = ""

```

```

<400> 10

```

```

Ala Ala Ala Ala Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Ala Ala Ala
1      5      10      15

```

Ala

```

<210> 11

```

```

<211> 35

```

```

<212> PRT

```

```

<213> Desconhecido

```

```

<220>

```

<223> Descrição de sequência: proteína de fusão L-TAT-IB1
inibidora da JNK

<400> 11

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Asp Thr Tyr Arg
1 5 10 15

Pro Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser
20 25 30

Gln Asp Thr
35

<210> 12

<211> 33

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: proteína de fusão L-TAT-IB2
inibidora da JNK

<400> 12

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Glu Glu Pro His
1 5 10 15

Lys His Arg Pro Thr Thr Leu Arg Leu Thr Thr Leu Gly Ala Gln Asp
20 25 30

Ser

<210> 13

<211> 42

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: proteína de fusão L-TAT-IB
inibidora da JNK (genérica)
(XXXXXXXXRKRRQRRXXXXXXXXRPTTLXLXXXXXXXXQDS/TX)

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (1)..(7)

<223> /substituir = "Arg"
/substituir = "Asx"
/substituir = "Cys"
/substituir = "Glx"
/substituir = "Gly"
/substituir = "His"
/substituir = "Ile"
/substituir = "Leu"
/substituir = "Lys"
/substituir = "Met"
/substituir = "Phe"
/substituir = "Pro"
/substituir = "Ser"
/substituir = "Thr"
/substituir = "Trp"
/substituir = "Tyr"
/substituir = "Val"
/substituir = "Xaa"
/substituir = ""

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (17)..(24)

<223> /substituir = "Arg"

```

/substituir = "Asx"
/substituir = "Cys"
/substituir = "Glx"
/substituir = "Gly"
/substituir = "His"
/substituir = "Ile"
/substituir = "Leu"
/substituir = "Lys"
/substituir = "Met"
/substituir = "Phe"
/substituir = "Pro"
/substituir = "Ser"
/substituir = "Thr"
/substituir = "Trp"
/substituir = "Tyr"
/substituir = "Val"
/substituir = "Xaa"
/substituir = ""

```

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (30)..(30)

```

<223> /substituir = "Arg"
      /substituir = "Asx"
      /substituir = "Cys"
      /substituir = "Glx"
      /substituir = "Gly"
      /substituir = "His"
      /substituir = "Ile"
      /substituir = "Leu"
      /substituir = "Lys"
      /substituir = "Met"

```

/substituir = "Phe"
/substituir = "Pro"
/substituir = "Ser"
/substituir = "Thr"
/substituir = "Trp"
/substituir = "Tyr"
/substituir = "Val"
/substituir = "Xaa"
/substituir = ""

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (32) .. (38)

<223> /substituir = "Arg"
/substituir = "Asx"
/substituir = "Cys"
/substituir = "Glx"
/substituir = "Gly"
/substituir = "His"
/substituir = "Ile"
/substituir = "Leu"
/substituir = "Lys"
/substituir = "Met"
/substituir = "Phe"
/substituir = "Pro"
/substituir = "Ser"
/substituir = "Thr"
/substituir = "Trp"
/substituir = "Tyr"
/substituir = "Val"
/substituir = "Xaa"
/substituir = ""

<220>
<221> VARIAÇÃO
<222> (41) .. (41)
<223> /substituir = "Thr"

<220>
<221> VARIAÇÃO
<222> (42) .. (42)
<223> /substituir = "Arg"
 /substituir = "Asx"
 /substituir = "Cys"
 /substituir = "Glx"
 /substituir = "Gly"
 /substituir = "His"
 /substituir = "Ile"
 /substituir = "Leu"
 /substituir = "Lys"
 /substituir = "Met"
 /substituir = "Phe"
 /substituir = "Pro"
 /substituir = "Ser"
 /substituir = "Thr"
 /substituir = "Trp"
 /substituir = "Tyr"
 /substituir = "Val"
 /substituir = "Xaa"
 /substituir = ""

<900> 13

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10 15

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg Pro Thr Thr Leu Ala Leu Ala
20 25 30

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gln Asp Ser Ala
35 40

<210> 14

<211> 35

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: proteína de fusão D-TAT-IB1
inibidora da JNK

<400> 14

Thr Asp Gln Ser Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro
1 5 10 15

Arg Lys Pro Arg Tyr Thr Asp Pro Pro Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys
20 25 30

Lys Arg Gly
35

<210> 15

<211> 33

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: proteína de fusão D-TAT-IB2
inibidora da JNK

<400> 15

Ser	Asp	Gln	Ala	Gly	Leu	Thr	Thr	Leu	Arg	Leu	Thr	Thr	Pro	Arg	His
1				5					10					15	
Lys	His	Pro	Glu	Glu	Pro	Pro	Arg	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Lys	Lys	Arg
			20					25					30		

Gly

<210> 16

<211> 42

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: proteína de fusão D-TAT-IB
inibidora da JNK (genérica)
(XT/SDQXXXXXXXXLXLTPRXXXXXXXXRRRQRRKKRXXXXXXXX)

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (1)..(1)

<223> /substituir = "Arg"
/substituir = "Asx"
/substituir = "Cys"
/substituir = "Glx"
/substituir = "Gly"
/substituir = "His"
/substituir = "Ile"
/substituir = "Leu"
/substituir = "Lys"
/substituir = "Met"
/substituir = "Phe"

/substituir = "Pro"
/substituir = "Ser"
/substituir = "Thr"
/substituir = "Trp"
/substituir = "Tyr"
/substituir = "Val"
/substituir = "Xaa"
/substituir = ""

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (2)..(2)

<223> /substituir = "Ser"

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (5)..(11)

<223> /substituir = "Arg"
/substituir = "Asx"
/substituir = "Cys"
/substituir = "Glx"
/substituir = "Gly"
/substituir = "His"
/substituir = "Ile"
/substituir = "Leu"
/substituir = "Lys"
/substituir = "Met"
/substituir = "Phe"
/substituir = "Pro"
/substituir = "Ser"
/substituir = "Thr"
/substituir = "Trp"

/substituir = "Tyr"
/substituir = "Val"
/substituir = "Xaa"
/substituir = ""

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (13)..(13)

<223> /substituir = "Arg"
/substituir = "Asx"
/substituir = "Cys"
/substituir = "Glx"
/substituir = "Gly"
/substituir = "His"
/substituir = "Ile"
/substituir = "Leu"
/substituir = "Lys"
/substituir = "Met"
/substituir = "Phe"
/substituir = "Pro"
/substituir = "Ser"
/substituir = "Thr"
/substituir = "Trp"
/substituir = "Tyr"
/substituir = "Val"
/substituir = "Xaa"
/substituir = ""

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (19)..(26)

<223> /substituir = "Arg"

```

/substituir = "Asx"
/substituir = "Cys"
/substituir = "Glx"
/substituir = "Gly"
/substituir = "His"
/substituir = "Ile"
/substituir = "Leu"
/substituir = "Lys"
/substituir = "Met."
/substituir = "Phe"
/substituir = "Pro"
/substituir = "Ser"
/substituir = "Thr"
/substituir = "Trp"
/substituir = "Tyr"
/substituir = "Val"
/substituir = "Xaa" /substituir = ""

```

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (36)..(42)

```

<223> /substituir = "Arg"
      /substituir = "Asx"
      /substituir = "Cys"
      /substituir = "Glx"
      /substituir = "Gly"
      /substituir = "His"
      /substituir = "Ile"
      /substituir = "Leu"
      /substituir = "Lys"
      /substituir = "Met"
      /substituir = "Phe"

```

```

/substituir = "Pro"
/substituir = "Ser"
/substituir = "Thr"
/substituir = "Trp"
/substituir = "Tyr"
/substituir = "Val"
/substituir = "Xaa"
/substituir = ""

```

<400> 16

```

Ala Thr Asp Gln Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Thr
1          5          10          15

```

```

Pro Arg Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg Arg Arg Gln Arg Arg
          20          25          30

```

```

Lys Lys Arg Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
          35          40

```

<210> 17

<211> 29

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: JBD de IB1, IB1-longo

<400> 17

```

Pro Gly Thr Gly Cys Gly Asp Thr Tyr Arg Pro Lys Arg Pro Thr Thr
1          5          10          15

```

```

Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser Gln Asp Thr
          20          25

```

<210> 18

<211> 27

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: JBD de IB2, IB2-longo

<400> 18

Ile Pro Ser Pro Ser Val Glu Glu Pro His Lys His Arg Pro Thr Thr
1 5 10 15

Leu Arg Leu Thr Thr Leu Gly Ala Gln Asp Ser
20 25

<210> 19

<211> 29

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: JBD de c-Jun, c-Jun

<400> 19

Gly Ala Tyr Gly Tyr Ser Asn Pro Lys Ile Leu Lys Gln Ser Met Thr
1 5 10 15

Leu Asn Leu Ala Asp Pro Val Gly Asn Leu Lys Pro His
20 25

<210> 20

<211> 29

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: JBD de ATF2, ATF2

<400> 20

Thr	Asn	Glu	Asp	His	Leu	Ala	Val	His	Lys	His	Lys	His	Glu	Met	Thr
1				5					10					15	

Leu	Lys	Phe	Gly	Pro	Ala	Arg	Asn	Asp	Ser	Val	Ile	Val
			20				25					

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: péptido L-JBD20 inibidor da JNK

<400> 21

Arg	Pro	Lys	Arg	Pro	Thr	Thr	Leu	Asn	Leu	Phe	Pro	Gln	Val	Pro	Arg
1				5					10					15	

Ser	Gln	Asp	Thr
			20

<210> 22

<211> 20

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: péptido inibidor da JNK D-JBD20

<400> 22

Thr Asp Gln Ser Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro
1 5 10 15

Arg Lys Pro Arg
20

<210> 23

<211> 32

<21 PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: proteína de fusão L-TAT-JNKI1
inibidora da JNK (*i. e.*, L-TAT-JBD20)

<400> 23

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Arg Pro Lys Arg
1 5 10 15

Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser Gln Asp Thr
20 25 30

<210> 24

<211> 32

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: proteína de fusão D-TAT-JNKI1
inibidora da JNK (*i. e.*, D-TAT-JBD20)

<400> 24

Thr	Asp	Gln	Ser	Arg	Pro	Val	Gln	Pro	Phe	Leu	Asn	Leu	Thr	Thr	Pro
1				5					10					15	

Arg	Lys	Pro	Arg	Pro	Pro	Arg	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Lys	Lys	Arg	Gly
		20						25					30		

<210> 25

<211> 34

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: proteína de fusão L-TAT-JNKI1
inibidora da JNK (genérica)
(XXXXRKKRRQRRRXXXXRPTTLXLXXXXXXXXQDS/T)

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (1)..(4)

<223> /substituir = "Arg"
/substituir = "Asx"
/substituir = "Cys"
/substituir = "Glx"
/substituir = "Gly"
/substituir = "His"
/substituir = "Ile"
/substituir = "Leu"
/substituir = "Lys"
/substituir = "Met"
/substituir = "Phe"
/substituir = "Pro"

/substituir = "Ser"
/substituir = "Thr"
/substituir = "Trp"
/substituir = "Tyr"
/substituir = "Val"
/substituir = "Xaa"
/substituir = ""

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (14) .. (17)

<223> /substituir = "Arg"
/substituir = "Asx"
/substituir = "Cys"
/substituir = "Glx"
/substituir = "Gly"
/substituir = "His"
/substituir = "Ile"
/substituir = "Leu"
/substituir = "Lys"
/substituir = "Met"
/substituir = "Phe"
/substituir = "Pro"
/substituir = "Ser"
/substituir = "Thr"
/substituir = "Trp"
/substituir = "Tyr"
/substituir = "Val"
/substituir = "Xaa"
/substituir = ""

```

<220>
<221> VARIAÇÃO
<222> (23)..(23)
<223> /substituir = "Arg"
      /substituir = "Asx"
      /substituir = "Cys"
      /substituir = "Glx"
      /substituir = "Gly"
      /substituir = "His"
      /substituir = "Ile"
      /substituir = "Leu"
      /substituir = "Lys"
      /substituir = "Met"
      /substituir = "Phe"
      /substituir = "Pro"
      /substituir = "Ser"
      /substituir = "Thr"
      /substituir = "Trp"
      /substituir = "Tyr"
      /substituir = "Val"
      /substituir = "Xaa"
      /substituir = ""

```

```

<220>
<221> VARIAÇÃO
<222> (25)..(31)
<223> /substituir = "Arg"
      /substituir = "Asx"
      /substituir = "Cys"
      /substituir = "Glx"
      /substituir = "Gly"
      /substituir = "His"

```

```

/substituir = "Ile"
/substituir = "Leu"
/substituir = "Lys"
/substituir = "Met"
/substituir = "Phe"
/substituir = "Pro"
/substituir = "Ser"
/substituir = "Thr"
/substituir = "Trp"
/substituir = "Tyr"
/substituir = "Val"
/substituir = "Xaa"
/substituir = ""

```

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (39)..(39)

<223> /substituir = "Thr"

<400> 25

Ala Ala Ala Ala Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Ala Ala
1 5 10 15

Ala Arg Pro Thr Thr Leu Ala Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gln
20 25 30

Asp Ser

<210> 26

<211> 34

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: proteína de fusão D-TAT-JNKI1
inibidora da JNK (genérica)
(S/TDQXXXXXXXXLXLTPRXXXXRRRQRRKKRXXXX)

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (1)..(1)

<223> /substituir = "Thr"

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (4)..(10)

<223> /substituir = "Arg"
/substituir = "Asx"
/substituir = "Cys"
/substituir = "Glx"
/substituir = "Gly"
/substituir = "His"
/substituir = "Ile"
/substituir = "Leu"
/substituir = "Lys"
/substituir = "Met"
/substituir = "Phe"
/substituir = "Pro"
/substituir = "Ser"
/substituir = "Thr"
/substituir = "Trp"
/substituir = "Tyr"
/substituir = "Val"
/substituir = "Xaa"
/substituir = ""

```

<220>
<221> VARIAÇÃO
<222> (12)..(12)
<223> /substituir = "Arg"
      /substituir = "Asx"
      /substituir = "Cys"
      /substituir = "Glx"
      /substituir = "Gly"
      /substituir = "His"
      /substituir = "Ile"
      /substituir = "Leu"
      /substituir = "Lys"
      /substituir = "Met"
      /substituir = "Phe"
      /substituir = "Pro"
      /substituir = "Ser"
      /substituir = "Thr"
      /substituir = "Trp"
      /substituir = "Tyr"
      /substituir = "Val"
      /substituir = "Xaa"
      /substituir = ""

```

```

<220>
<221> VARIAÇÃO
<222> (18)..(21)
<223> /substituir = "Arg"
      /substituir = "Asx"
      /substituir = "Cys"
      /substituir = "Glx"
      /substituir = "Gly"

```

/substituir = "His"
/substituir = "Ile"
/substituir = "Leu"
/substituir = "Lys"
/substituir = "Met"
/substituir = "Phe"
/substituir = "Pro"
/substituir = "Ser"
/substituir = "Thr"
/substituir = "Trp"
/substituir = "Tyr"
/substituir = "Val"
/substituir = "Xaa"
/substituir = ""

<220>

<221> VARIAÇÃO

<222> (31)..(39)

<223> /substituir = "Arg"
/substituir = "Asx"
/substituir = "Cys"
/substituir = "Glx"
/substituir = "Gly"
/substituir = "His"
/substituir = "Ile"
/substituir = "Leu"
/substituir = "Lys"
/substituir = "Met"
/substituir = "Phe"
/substituir = "Pro"
/substituir = "Ser"
/substituir = "Thr"

```

/substituir = "Trp"
/substituir = "Tyr"
/substituir = "Val"
/substituir = "Xaa"
/substituir = ""

```

<400> 26

```

Ser Asp Gln Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Thr Pro
1          5          10          15

```

```

Arg Ala Ala Ala Ala Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Ala Ala
      20          25          30

```

Ala Ala

<210> 27

<211> 20

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: péptido L-JBD20-mut inibidor da JNK

<400> 27

```

Arg Pro Lys Arg Pro Thr Ala Ala Asn Ala Phe Pro Gln Val Pro Arg
1          5          10          15

```

```

Ser Gln Asp Thr
      20

```

<210> 28

<211> 20

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: péptido D-JBD20-mut inibidor da JNK

<400> 28

Thr	Asp	Gln	Ser	Arg	Pro	Val	Ala	Pro	Phe	Ala	Asn	Ala	Ala	Thr	Pro
1				5					10					15	

Arg	Lys	Pro	Arg
			20

<210> 29

<211> 21

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: sonda AP-1 duplamente marcada (ver a página 48 da descrição)

<400> 29

cgcttgatga gtcagccgga a 21

<210> 30

<211> 20

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: iniciador directo c-Fos para RT-PCR (ver a página 51 da descrição)

<400> 30

gctgacagat acactccaag 20

<210> 31

<211> 20

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: iniciador inverso c-Fos para RT-PCR (ver a página 51 da descrição)

<400> 31

cctagatgat gccggaaaca 20

<210> 32

<211> 20

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: iniciador directo Actina para RT-PCR (ver a página 51 da descrição)

<400> 32

aacggctccg gcatgtgcaa 20

<210> 33

<211> 21

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Descrição de sequência: iniciador reverso da Actina para
RT-PCR (ver a página 51 da descrição)

<400> 33

attgtagaag gtgtggtgcc a 21

Lisboa, 20 de Novembro de 2013

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de qualquer um dos péptidos incluindo qualquer uma das sequências de aminoácidos seleccionadas das SEQ ID N°: 3, 4, 6 e 22 ou sendo qualquer uma das sequências de aminoácidos seleccionadas das SEQ ID N°: 14-16, 24 e 26 ou dos péptidos tendo, pelo menos, uma identidade da sequência de 95% com estes péptidos, na preparação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio neuronal associado com um evento excitotóxico devido a danos cerebrais ou a acidente vascular cerebral traumático ou a morte neuronal resultante de episódios epilépticos.
2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o péptido se destina a ser administrado por qualquer via de administração seleccionada do grupo consistindo em distribuição intraauricular, intraperitoneal, nasal, intravenosa, oral e por emplastro.
3. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, em que o péptido é seleccionado da sequência de aminoácidos de acordo com a SEQ ID N°: 22 ou 24 e péptidos tendo, pelo menos, uma identidade da sequência de 95% com estes péptidos.

Lisboa, 20 de Novembro de 2013

Sequências Peptídicas de Humano, Murganho e Rato

A.

```

                                ::  **.:
IB2                          :  IPSPSVEEPHKHRPTTLRL--TTLGAQDS
IB1                          :  PGTGCGDTYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT
c-Jun                        :  GAYGYSNPKILKQSMTLNLADPVGNLKPH
ATF2                         :  TNEDHLAVHKHKHEMTLKFGPARNSVIV

```

B.

```

                                :  . .***** *          **:
L-IB2                        :  EEPHKHRPTTLRL--TTLGAQDS
L-IB1                        :  DTYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT
                                . . .

```

C.

```

L-TAT                        :  NH2- GRKKRRQRRR -COOH
L-TAT-IB1                   :  NH2- GRKKRRQRRRPPDTYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT -COOH
L-TAT-IB2                   :  NH2- GRKKRRQRRRPPEEPHKHRPTTLRLTTLGAQDS -COOH
L-TAT-JBD20                 :  NH2- GRKKRRQRRRPPRPRKPTTLNLFQVPRSQDT -COOH

D-TAT                       :  NH2- RRRQRRKKRG -COOH
D-TAT-IB1                   :  NH2- TDQSRPVQPFLNLTTTPRKPRYTDPPIRRQRRKKRG -COOH
D-TAT- JBD20               :  NH2- TDQSRPVQPFLNLTTTPRKPRPPIRRQRRKKRG -COOH

```

Fig. 1

Sequências Genéricas de Humano, Murganho e Rato

L-TAT-IB	: NH ₂ - XXXXXXXRKKRRQRRXXXXXXXXXRPTTLXLXXXXXXXXQDS/TX -COOH
L-TAT-JBD ₂₀	: NH ₂ - XXXXXXXRKKRRQRRXXXXXXXXXRPTTLXLXXXXXXXXQDS/TX -COOH
D-TAT	: NH ₂ - XXXRRRQRRKKRXXX -COOH
D-TAT-IB	: NH ₂ - XT/SDQXXXXXXXXLXLTPRXXXXXXXXRRRQRRKKRXXXXXXXX -COOH
D-TAT- JBD ₂₀	: NH ₂ - XT/SDQXXXXXXXXLXLTPRXXXXXXXXRRRQRRKKRXXXXXXXX -COOH

Fig. 2

Efeitos da Construção GFP-JBD₂₃ sobre a Apoptose das Células β de Murganho

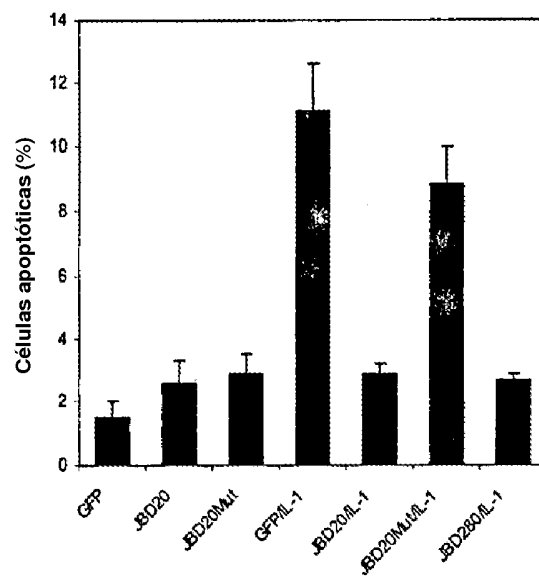


Fig. 3

Efeitos dos Péptidos TAT-IB sobre a Fosforilação Mediada por JNK

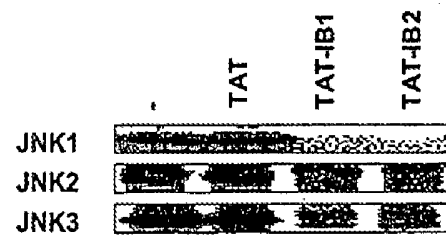


Fig. 4a

Efeitos dos Péptidos TAT-IB sobre a Fosforila  o Mediada por JNK

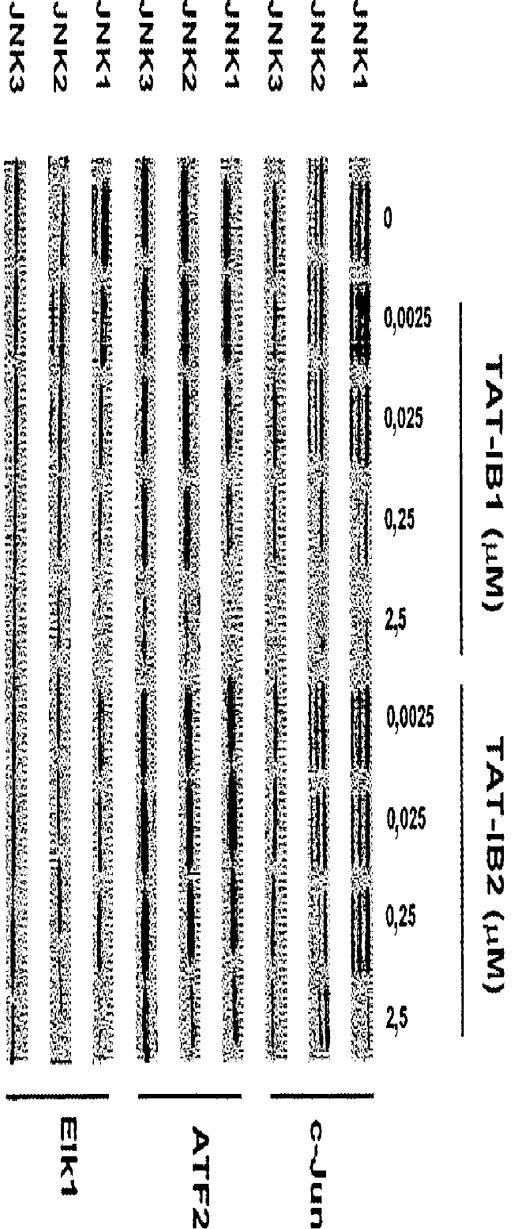


Fig. 4b

Inibição por L-TAT-IB da Fosforilação por JNK Recombinante

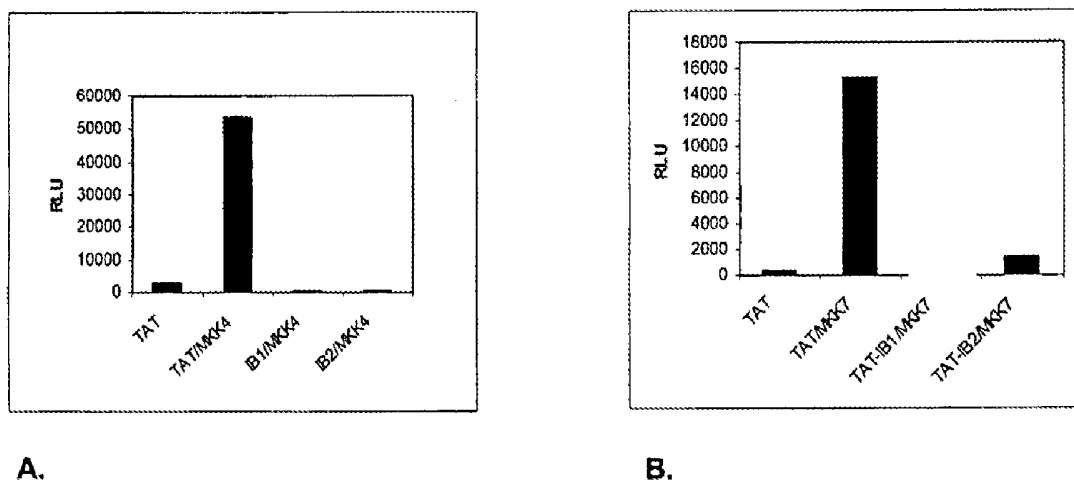


Fig. 5

Inibição *In Vivo* da Fosforilação de c-Jun por Péptidos

TAT-IB

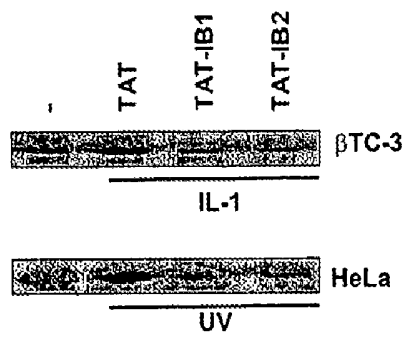


Fig. 6

**Inibição da Morte de Células β Pancreáticas induzidas
por IL-1 β , por Péptidos TAT-IB**

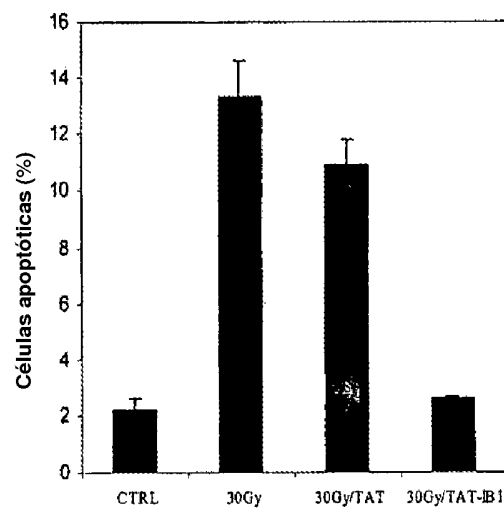


Fig. 7

O péptido D-TAT-IB1 reduz a apoptose induzida por IL1, em células β TC3

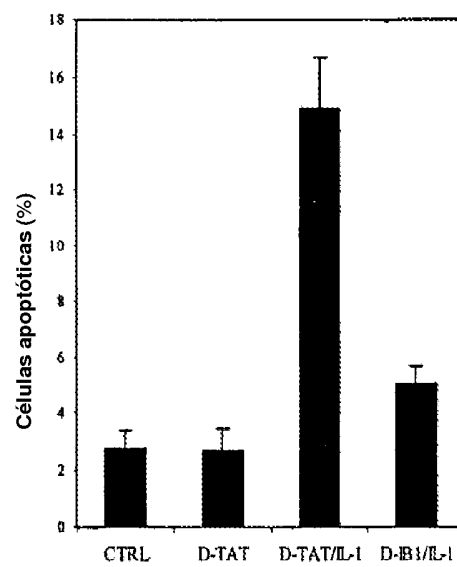


Fig. 8

**O péptido D-TAT-IB1 confere protecção a longo prazo
(15 dias) contra apoptose induzida por IL1, em células β TC-3**

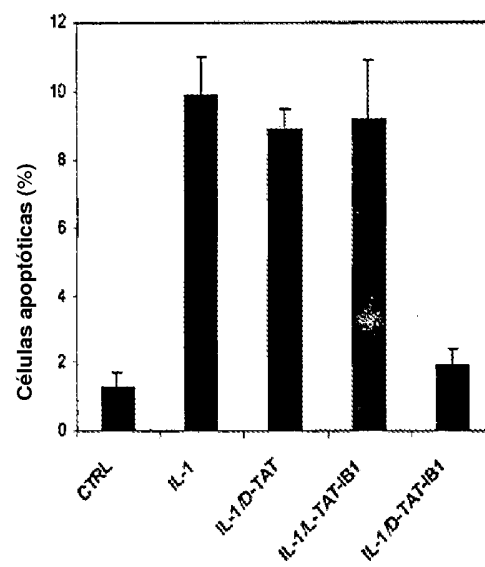


Fig. 9

Os péptidos D-TAT-IB1 e L-TAT-IB1 previnem a apoptose induzida por IR numa linha de células do cancro do cólon humano

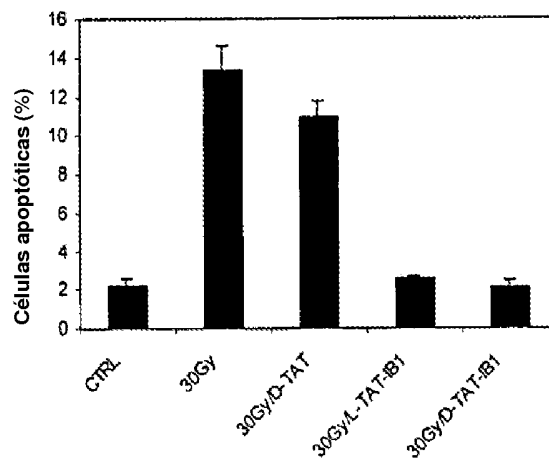


Fig. 10

Supressão do Factor de Transcrição da JNK por Péptidos L-TAT-IB

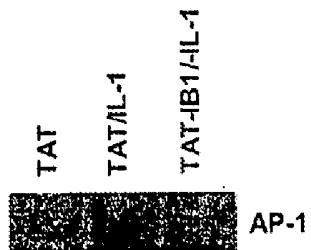


Fig. 11

Radioprotecção contra a Radiação Ionizante por péptidos TAT-IB1

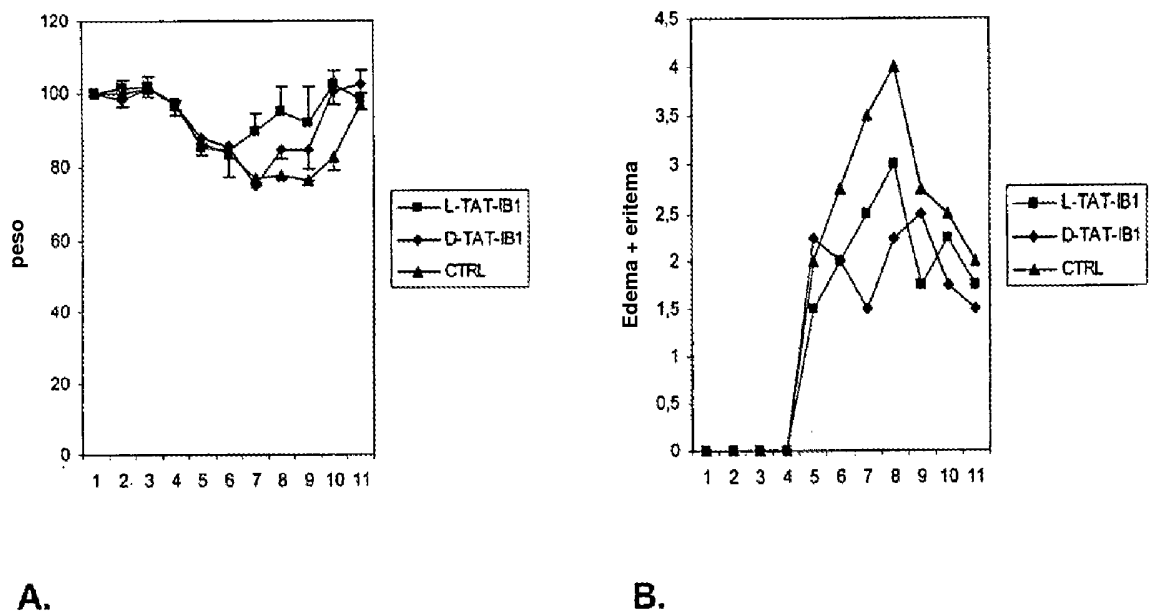


Fig. 12

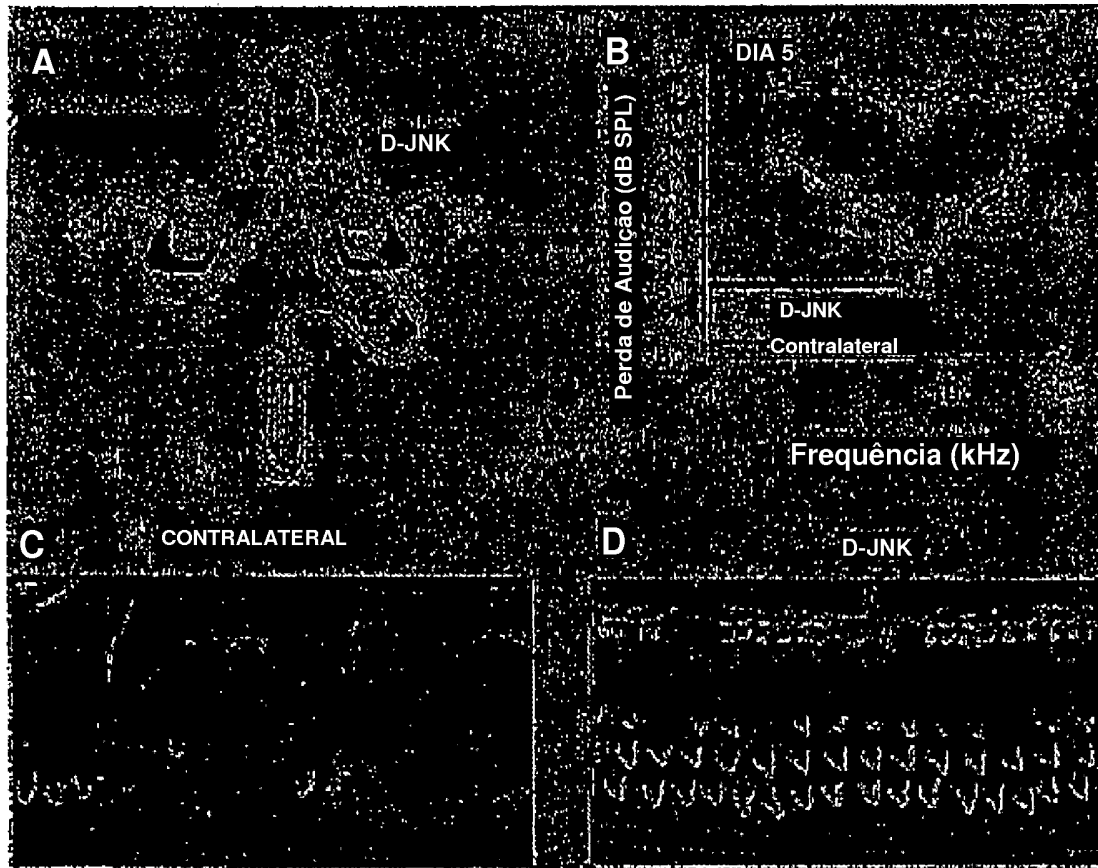


Fig. 13

Fig. 14A

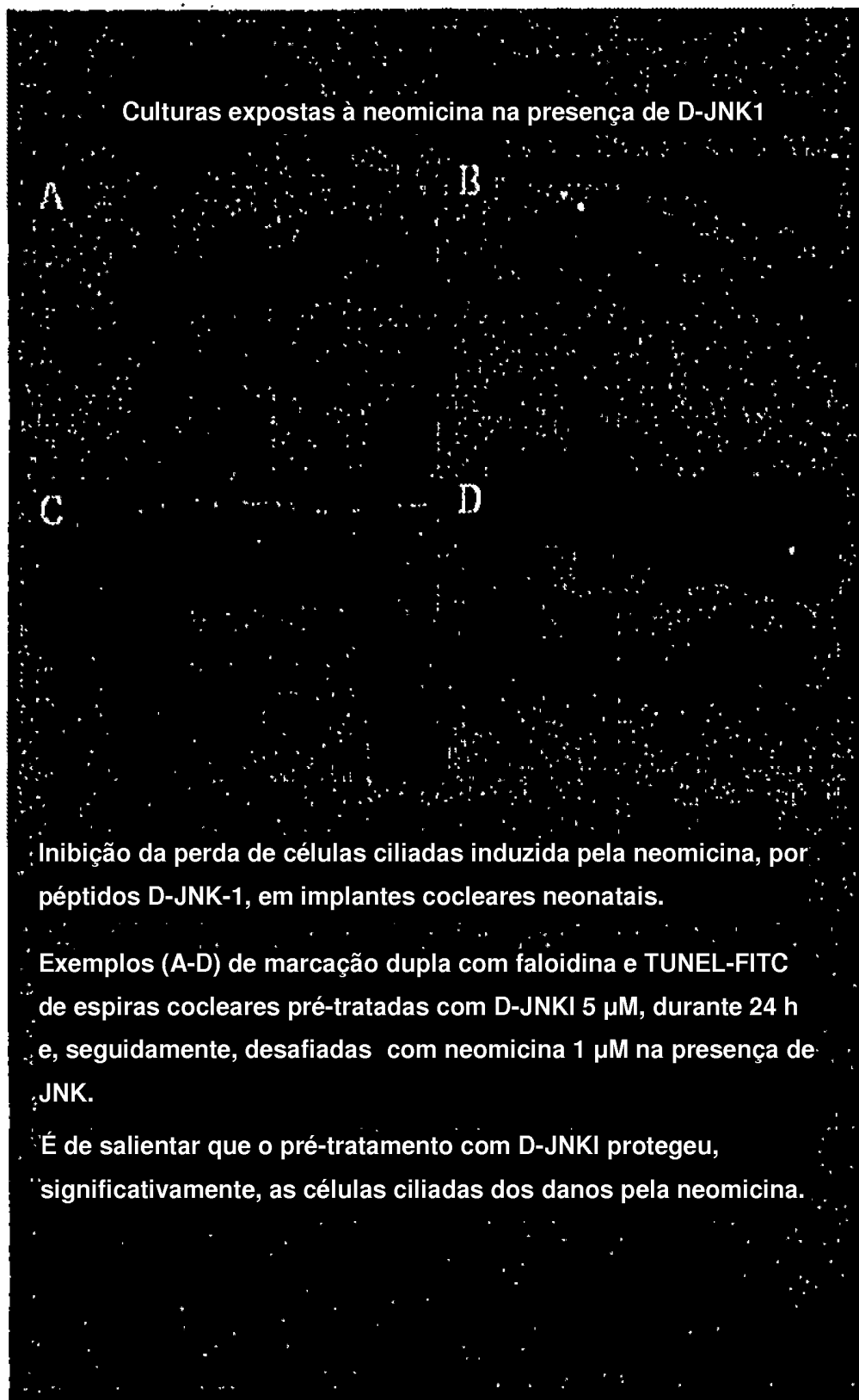


Fig. 14B

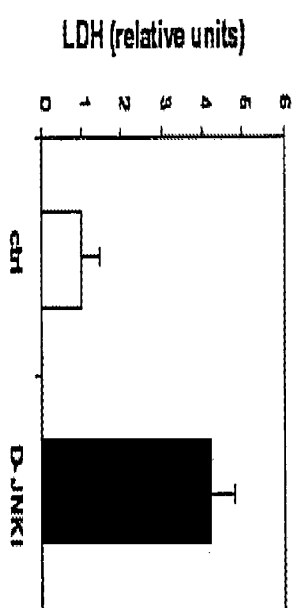


Fig. 15

FIG. 16

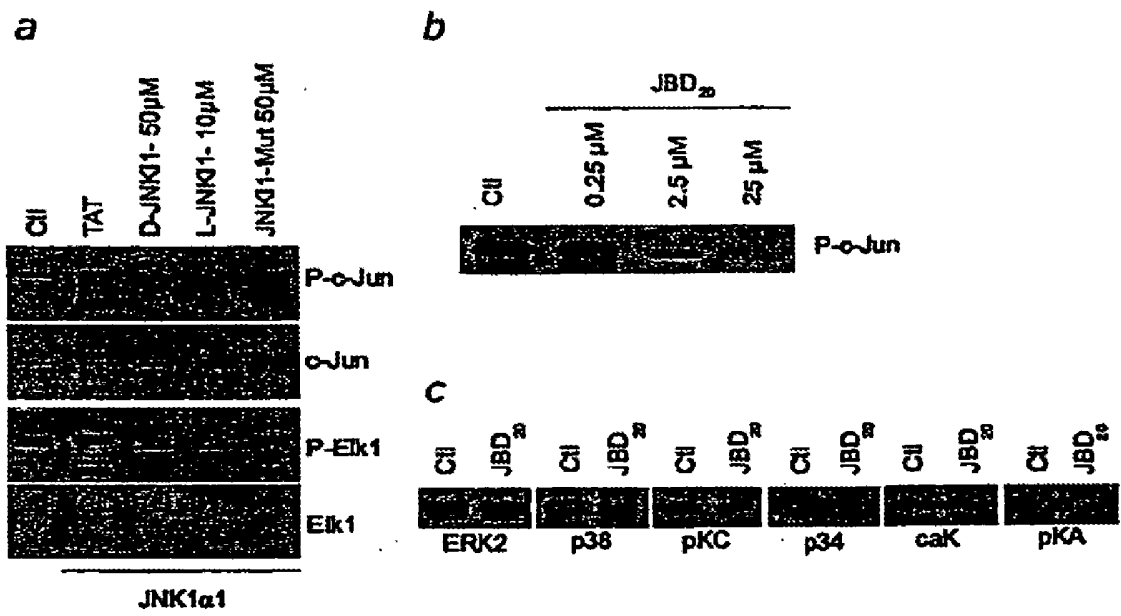


FIG. 17

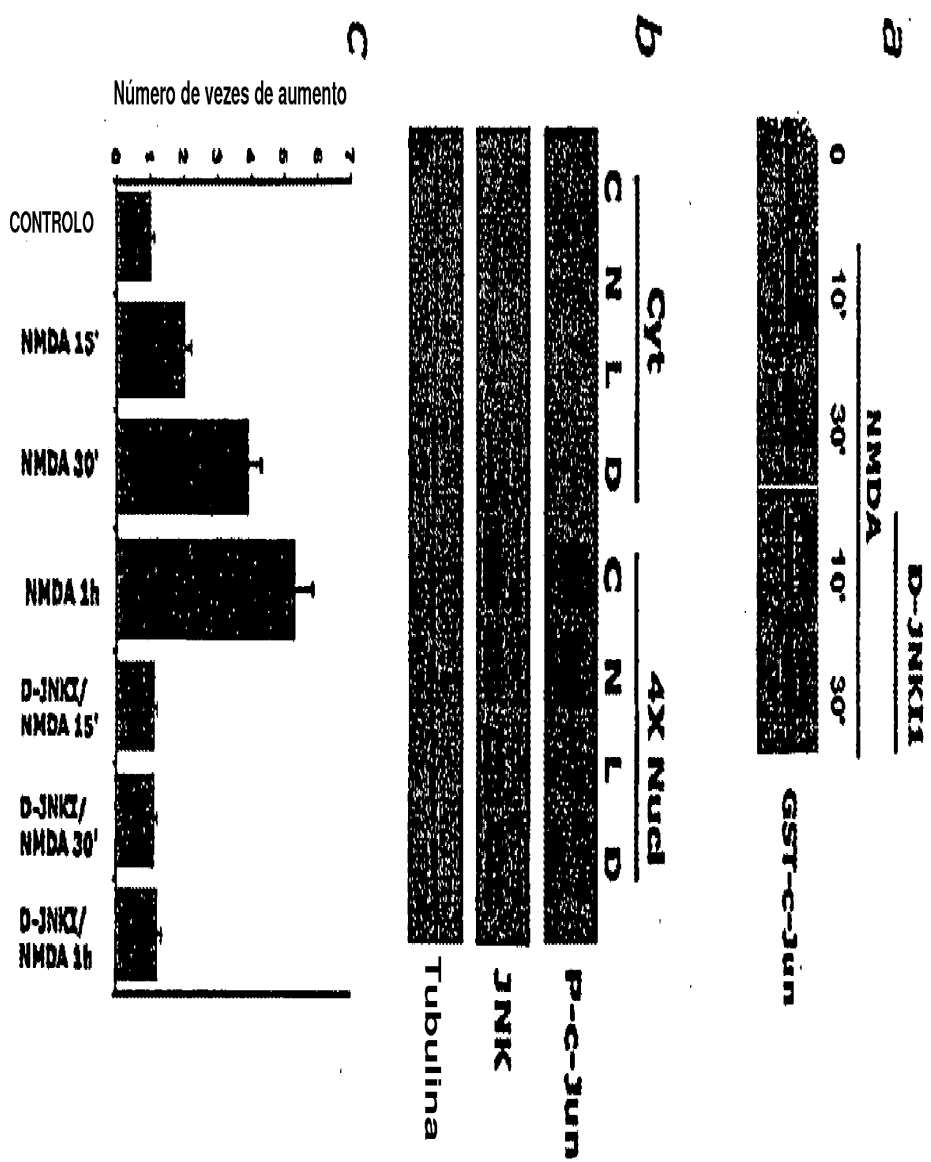


FIG. 18

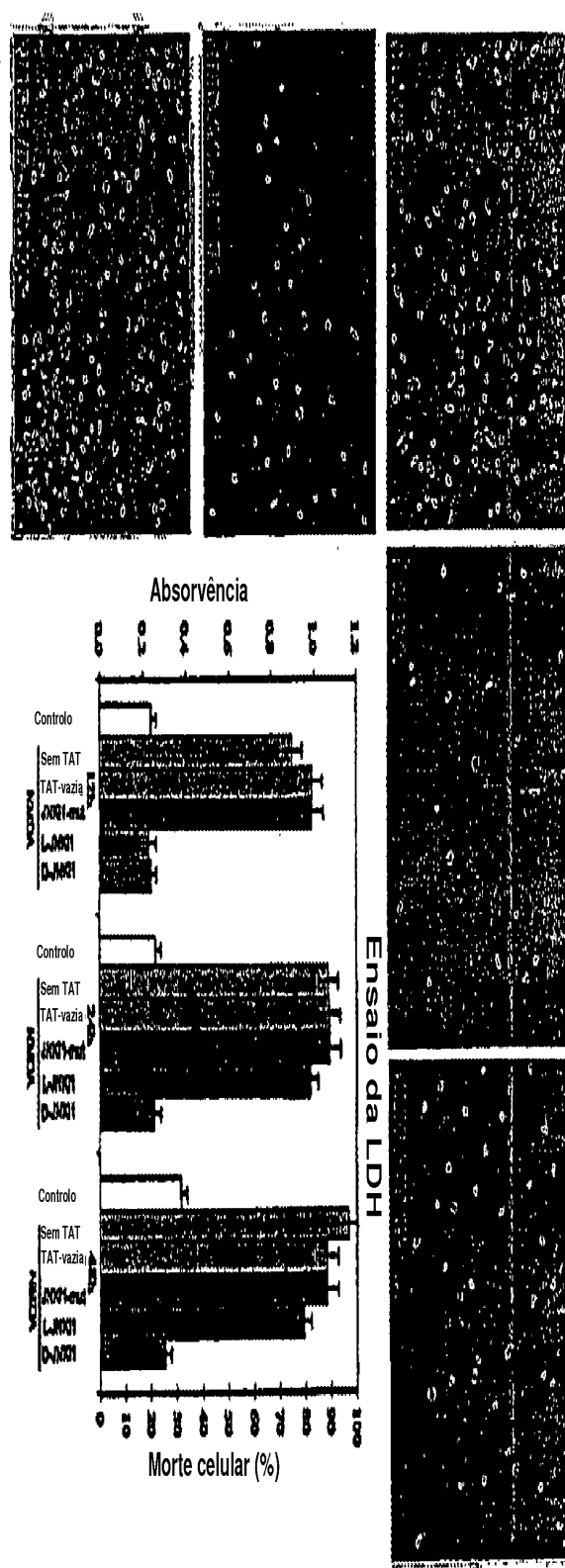


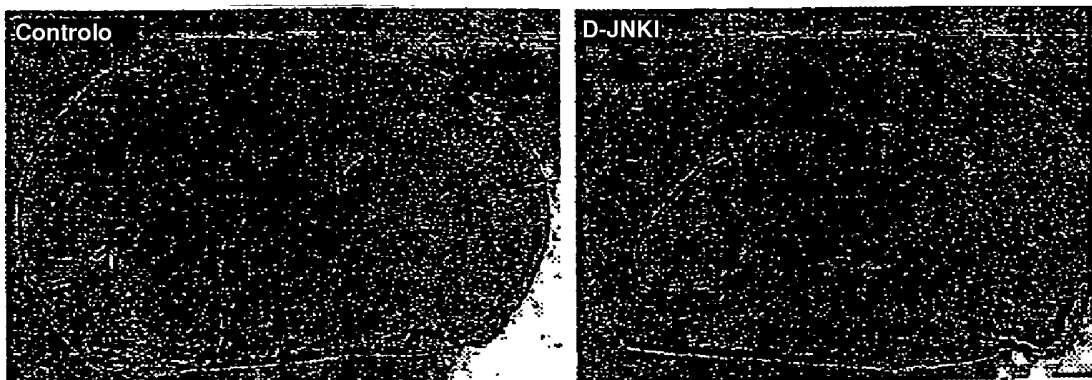
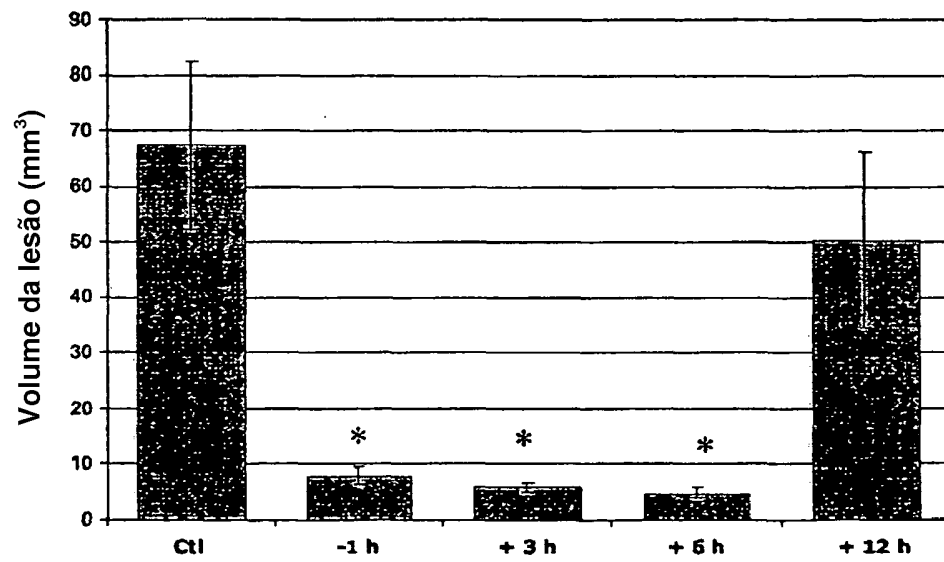
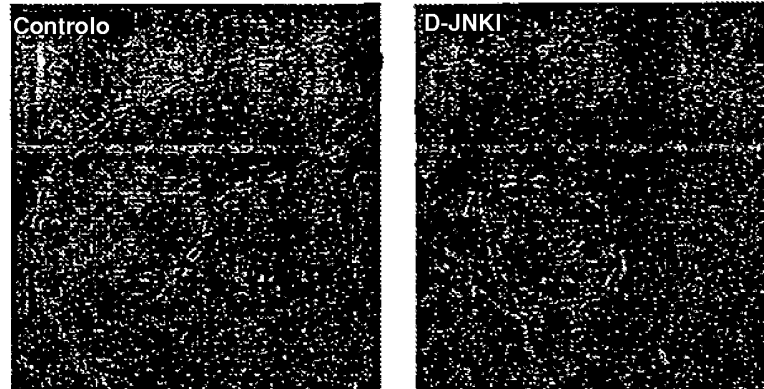
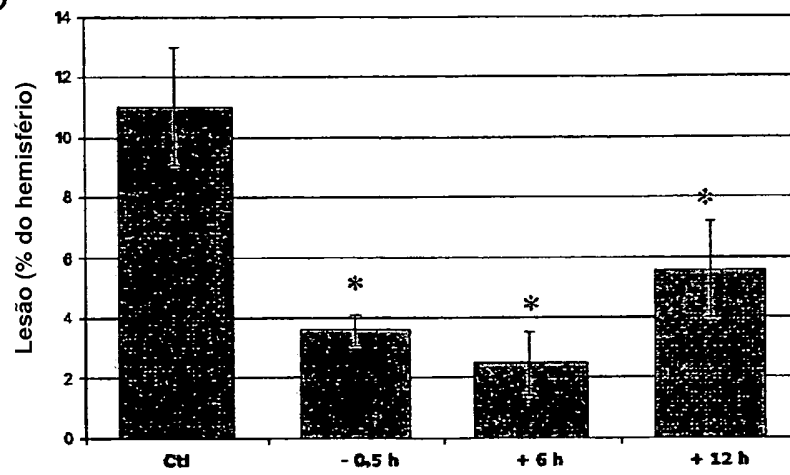
FIG. 19***a******b***

FIG. 20

a*b**c*