



(11) Número de Publicação: PT 835447 E

(51) Classificação Internacional:
C07K 14/435 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 1996.05.06	(73) Titular(es): APOPTOSIS TECHNOLOGY, INC. 148 SIDNEY STREET CAMBRIDGE, MA 02139-4239 US
(30) Prioridade(s): 1995.05.12 US 0440391	
(43) Data de publicação do pedido: 1998.04.15	(72) Inventor(es): THOMAS, D.CHITTENDEN ROBERT, J. LUTZ US US
(45) Data e BPI da concessão: 2006.07.19 012/2006	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA PT

(54) Epígrafe: NOVOS PÉPTIDOS E COMPOSIÇÕES QUE MODULAM A APOPTOSE

(57) Resumo:

RESUMO

"Novos péptidos e composições que modulam a apoptose"

O presente invento refere-se a novos péptidos e composições capazes de modular a apoptose em células e a métodos de modulação da apoptose que utilizam os novos péptidos e composições do invento. Num aspecto, o invento refere-se a um novo péptido designado "domínio GD", que é essencial quer para a interacção de Bak com Bcl-x_L, quer para a função de morte celular de Bak. São fornecidos métodos de identificação de agonistas ou antagonistas da função de domínio GD. O domínio GD é responsável pela mediação das interacções chave proteína/proteína com significado para as acções de múltiplas moléculas reguladoras da morte celular.

DESCRIÇÃO

"Novos péptidos e composições que modulam a apoptose"

Campo do Invento

O presente invento refere-se, em geral, ao campo da fisiologia celular e, mais particularmente, à morte celular programada, ou apoptose. Os novos péptidos e composições do invento são úteis para modular a apoptose em células.

Antecedentes do Invento

O fenómeno de morte celular programada, ou "apoptose" é conhecido por estar envolvido em, e ser importante no, curso normal de uma ampla variedade de processos de desenvolvimento, incluindo maturação do sistema imune e nervoso. A apoptose desempenha também um papel nos tecidos adultos tendo elevadas taxas de renovação (*turnover*) celular (Ellis, R.E., *et al.*, Annu. Rev. Cell. Biol. 7: 663-698 (1991); Oppenheim, R.W., Annu. Rev. Neurosci. 14: 53-501 (1991); Cohen, J.J., *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 10: 267-293 (1992); Raff, M.C., Nature 356: 397-400 (1992)). Um certo número de sinais fisiológicos diferentes activa normalmente a morte celular programada nestes contextos, no entanto, as agressões não fisiológicas, tais como irradiação e exposição a fármacos que danificam o ADN, podem também desencadear a apoptose (Eastman, A., Cancer Cells 2: 275-280 (1990); Dive, C., *et al.*, Br. J. Cancer 64: 192-196 (1991); Lennon, S.V., *et al.*, Cell Prolif. 24: 203-214 (1991)).

Adicionalmente ao seu papel no desenvolvimento, a apoptose tem sido implicada como uma protecção celular importante contra a tumorigénese (Williams, G.T., Cell 65: 1097-1098 (1991); Lane, D.P., Nature 362: 786-787 (1993)). Sob certas condições, as células morrem por apoptose em resposta à expressão de elevado nível ou desregulada de oncogenes (Askew, D., *et al.*, Oncogene 6: 1915-1922 (1991); Evan, G.I., *et al.*, Cell 69: 119-128 (1992); Rao, L., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7742-7746 (1992); Smeyne, R.J. *et al.*, Nature 363: 166-169 (1993); Tanaka, S., *et al.*, Cell 77: 829-839 (1994); Wu, X., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3602-

3606 (1994)). A supressão do programa apoptótico, por uma variedade de lesões genéticas, pode contribuir para o desenvolvimento e progressão de doenças. Isto é bem ilustrado pela mutação frequente do gene supressor de tumor p53 em tumores humanos (Levine, A.J., et al., Nature 351: 453-456 (1991)). O p53 de tipo selvagem é necessário para indução eficaz de apoptose após lesão do ADN (Clarke, A.R., et al., Nature 362: 849-852 (1993); Lowe, S.W., et al., Cell 74: 957-967 (1993); Lowe, S.W., et al., Nature 362: 847-849 (1993)) e morte celular induzida por expressão constitutiva de certos oncogenes (Debbas, M., et al., Genes & Dev. 7: 546-554 (1993); Hermeking, H., et al., Science 265: 2091-2093 (1994); Tanaka, S., et al., Cell 77: 829-839 (1994); Wu, X., et al., Natl. Acad. Sci. USA 91: 3602-3606 (1994)). A citotoxicidade de muitos agentes quimioterapêuticos normalmente utilizados é mediada pelo p53 de tipo selvagem (Lowe, S.W., et al., Cell 74: 957-967 (1993); Fischer, D.E., Cell 78: 539-542 (1994)). Assim a perda da função de p53 pode contribuir para o problema clinicamente significativo de células de tumor resistentes a fármaco que emergem após regimes de quimioterapia.

O produto de expressão do oncogene *bcl-2* funciona como um supressor potente da morte celular apoptótica (McDonnell, T.J., et al., Cell 57: 79-88 (1989); Hockenbery, D., et al., Nature 348: 334-336 (1990)). A expressão de Bcl-2 constitutivo pode suprimir a apoptose desencadeada por estímulos diversos, incluindo remoção do factor de crescimento, expressão de oncogenes, lesão do ADN e stress oxidativo (Vaux, D.L., et al., Nature 335: 440-442 (1988); Sentman, C.L., et al., Cell 67: 879-888 (1991); Strasser, A., et al., Cell 67: 889-899 (1991); Fanidi, A., et al., Nature 359: 554-556 (1992); Hockenbery, D.M., et al., Cell 75: 241-251 (1993)). Há também conservação da função de Bcl-2 entre as espécies. Por exemplo, o gene *ced-9* do nemátodo *C. elegans* parece ser um homólogo estrutural e funcional de *bcl-2* (Hengartner, M.O., et al., Cell 76: 665-676 (1994)) podendo o *bcl-2* complementar as mutações de *ced-9* em animais transgênicos (Vaux, D.L. et al., Science 258: 1955-1957 (1991)). Estas observações sugerem que o Bcl-2 está intimamente ligado a um programa de morte celular evolutivamente conservada.

Sabe-se que o *bcl-2* é um membro de uma família de genes relacionados, dos quais, pelo menos alguns, modulam também a apoptose. Destes, o *bcl-x* possui o maior grau de homologia a *bcl-2* sendo diferencialmente ligado para produzir uma forma longa, denominada *bcl-x_L*, e uma forma mais curta, *bcl-x_S*, que comporta uma deleção interna (Boise, L.H., et al., Cell 74: 597-608 (1993)). O Bcl-x_L funciona para suprimir a apoptose, enquanto que a forma delecionada, Bcl-x_S, inibe a protecção contra a morte celular proporcionada por expressão de Bcl-2. Um segundo homólogo de Bcl-2, Bax, forma heterodímeros com Bcl-2 (Oltvai, Z.N., et al., Cell 74: 609-619 (1993)) e tem mostrado contrariar o Bcl-2 e acelerar a apoptose. A análise mutacional de Bcl-2 tem sugerido que a interacção com Bax é necessária para Bcl-2 funcionar como um inibidor de morte celular (Yin, X.-M., et al., Nature 369: 321-323 (1994)).

Chittenden, T., et al., Nature 374: 733-736 (1995) descrevem a expressão de um gene relacionado com *bcl-2*, denominado *bak*. A expressão ectópica de Bak acelera a morte de uma linha de células dependente de IL-3 após remoção de citocinas e opõe-se à protecção contra a apoptose conferida por Bcl-2. Adicionalmente, a expressão forçada de Bak é suficiente para induzir a apoptose de fibroblastos privados de soro, criando a possibilidade do Bak activar directamente ou ser ele mesmo um componente da maquinaria de morte celular.

Os genes relacionados com Bcl-2 celular, conhecidos, quando analisados, têm modelos distintos de expressão e podem assim funcionar em diferentes tecidos. Embora a expressão de Bcl-2 pareça ser necessária para a manutenção do sistema imune maduro, é desejável identificar outros genes que possam dirigir a morte celular apoptótica noutras linhagens. Adicionalmente, a identificação de regiões ou domínios particulares das proteínas codificadas por tais genes pode proporcionar uma base para a compreensão das suas características estruturais e funcionais e permitir o desenvolvimento de diagnósticos e terapêuticas valiosos. Por exemplo, a identificação de agentes capazes de restabelecer ou induzir apoptose em células de tumor (nas quais a perda da função de gene supressor de tumor p53 pode estar implicada na tumorigénese e na resistência a fármacos clinicamente significativa) seria de valor terapêutico significativo,

particularmente quando tal restabelecimento ou indução fosse independente da função de p53. Similarmente, o desenvolvimento de agentes capazes de contrariar a função anti-apoptótica dos oncogenes tais como *bcl-2*, cuja activação está implicada na tumorigénese (por exemplo, linfoma) e na resistência quimioterapêutica ao fármaco, seria de grande valor potencial.

Sumário do Invento

O presente invento está dirigido para um novo domínio de proteína de significância geral para as acções de múltiplas moléculas reguladoras de morte celular, que tem sido identificado e mapeado numa curta subsequência da porção central da molécula Bak. Este domínio de proteína até agora desconhecido, que o inventor designou "domínio GD", é essencial quer para a interacção de Bak com Bcl-x_L quer para a função de morte celular de Bak. As espécies de Bak truncadas que abrangem o domínio GD são elas próprias suficientes para ligar Bcl-x_L e matar células em testes de transfecção.

O domínio GD foi identificado em duas outras proteínas de ligação a Bcl-2 que funcionam para induzir apoptose: Bax e Bipla. Tal como Bak, a mutação dos elementos de domínio GD homólogos em Bax e Bipla diminui a função de morte celular e de ligação a proteína. Assim, o domínio GD é responsável por mediar interacções chave proteína/proteína de significância para as acções de múltiplas moléculas reguladoras da morte celular. Num aspecto, o invento está então dirigido para um péptido isolado que consiste numa proteína truncada seleccionada a partir do grupo constituído por Bak, Bax e Bipla ou seu mutante, caracterizado por compreender o domínio GD e exibir actividade de morte celular e ligação a Bcl-x_L; o domínio GD de Bak QLAIIGDDIN, o domínio GD de Bax CLKRIGDELD e o domínio GD de Bipla RLACIGDEMD. Tais péptidos são úteis para induzir ou modular o estado apoptótico de uma célula. Os compostos químicos que rompem a função do domínio GD têm utilidade como agentes moduladores de apoptose. Por conseguinte, num outro aspecto, o invento está dirigido para agentes capazes de modular (i.e. inibir ou aumentar) a função do domínio GD para utilização na terapêutica de distúrbios degenerativos. Tais agentes incluem aqueles seleccionados a partir de péptidos de domínio GD e miméticos, fragmentos,

equivalentes funcionais e/ou seus híbridos ou mutantes, assim como vectores contendo ADNc que codifica qualquer um dos anteriores. O invento proporciona métodos para identificar agentes capazes de modular a função do domínio GD (por exemplo, moléculas que modulam a apoptose).

Em aspectos adicionais, o presente invento refere-se a produtos e processos envolvidos na clonagem, preparação e expressão dos péptidos acima derivados do invento, compreendendo o domínio GD; anticorpos com especificidade para o referido péptido e sequências nucleotídicas que codificam os referidos péptidos. Os péptidos do invento compreendendo o domínio GD são úteis para produzir anticorpos para eles. Tais anticorpos são úteis para detectar e isolar proteínas compreendendo o domínio GD em espécimes biológicos incluindo, por exemplo, células de todos os tecidos humanos incluindo tecido cardíaco, tecido dos pulmões, células de tumor, tecido cerebral, placenta, fígado, músculo esquelético, rim e pâncreas, assim como para modular a actividade apoptótica de proteínas compreendendo o domínio GD nelas, e de tais espécimes biológicos, e constituem aspectos adicionais do invento.

Ainda num outro aspecto, o invento proporciona vectores de expressão contendo sequências genéticas, hospedeiros transformados com tais vectores de expressão e métodos para produzir os péptidos de domínio GD recombinantes do invento.

Os agentes do presente invento podem ser utilizados em métodos para induzir ou suprimir a apoptose nas células e/ou tecidos de indivíduos que sofrem de desordens degenerativas caracterizadas por proliferação celular inadequada ou morte celular inadequada, respectivamente. As desordens degenerativas caracterizadas por proliferação celular inadequada incluem, por exemplo, condições inflamatórias, cancro, incluindo linfomas, tais como hiperplasia da próstata, tumores de genótipo, etc. As desordens degenerativas caracterizadas por morte celular inadequada incluem, por exemplo, doenças auto-imunes, doença de imunodeficiência adquirida (SIDA), morte celular devida a terapêutica com radiações ou quimioterapia, doenças neurodegenerativas, tais como doença de Alzheimer e doença de Parkinson, etc.

O presente invento refere-se também à utilização de um anticorpo contra um péptido de domínio GD seleccionado a partir de uma de SEQ ID NO:1 a 10, para pesquisar uma biblioteca de expressão de ADNc ou clones compreendendo inserções de ADN que codificam proteínas cruzadamente imunorreactivas para detecção da presença do péptido de domínio GD. O polinucleótido e anticorpos do invento podem ser utilizados no diagnóstico das desordens degenerativas, desordens que estão associadas a um nível aumentado ou diminuído de expressão de proteínas compreendendo o domínio GD, quando comparado ao nível esperado de expressão de tais proteínas na população de células normais.

O presente invento refere-se à utilização de péptidos do invento para o fabrico de um medicamento para o tratamento de desordens degenerativas caracterizadas por divisão celular inadequada ou morte celular inadequada.

Os péptidos do presente invento podem ser utilizados em métodos de modulação do estado apoptótico de uma célula por administração dos referidos péptidos ou seus mutantes, a um indivíduo que sofra de uma desordem degenerativa caracterizada por proliferação celular inadequada ou morte celular inadequada, de modo a estabilizar a proliferação celular inadequada (i.e., induzir apoptose) ou estabilizar a morte celular inadequada (i.e., suprimir a apoptose), respectivamente, e/ou, em qualquer caso, restabelecer o comportamento celular normal.

Num outro aspecto, o presente invento está relacionado com a descoberta surpreendente de que o domínio GD de Bak está envolvido na e é suficiente para a homodimerização e heterodimerização de Bak. Exemplos não limitativos da dimerização de domínio GD de Bak incluem Bak (homodimerização), Bax (heterodimerização com uma proteína assassina diferente) e Bcl-x_L (heterodimerização com uma proteína sobrevivente). Além disso, descobriu-se inesperadamente que as regiões não essenciais da proteína Bak incluem neste aspecto os dois domínios no terminal carboxilo de metade da proteína que mostra o maior grau de homologia a outros membros da família de Bcl-2 (domínios I e II de homologia a Bcl-2). Assim, os péptidos compreendendo o domínio

GD são capazes de mediar interacções não só com Bcl-x_L, mas também, com Bak e Bax.

Estes e outros objectivos e aspectos do invento serão evidentes para aqueles peritos, a partir da descrição que se segue.

Descrição das Figuras

Figura 1. *Função de morte celular de Bak em diferentes linhas de células.*

As linhas de células indicadas foram co-transfectadas com um plasmídeo marcador de β-galactosidase em combinação ou com um plasmídeo de controlo (vector) ou com um plasmídeo que expressa Bak marcado com epítipo HA (HA-Bak). As células foram fixadas e coradas com X-gal 24 horas após a transfecção, e o número de células azuis (positivas à β-galactosidase) contadas por exame microscópico.

Figura 2. *Sumário da actividade de morte celular de mutantes de deleção de Bak e espécies truncadas.*

As estruturas dos vários mutantes de Bak são esquematicamente ilustradas. A(s) região(ões) de aminoácidos precisa(s) removida(s) por deleção é(são) indicada(s) pelos números à esquerda. Os extremos dos resíduos de aminoácidos Bak retidos nas espécies truncadas (fundo, QVG e PEM) são indicados por números que ladeiam os esquemas das suas estruturas respectivas. A actividade de morte celular Rat-1 é sumariada como se segue: +, capacidade de morte celular equivalente a Bak de tipo selvagem; -, sem actividade de morte celular; +/-, actividade de morte celular diminuída relativamente a Bak de tipo selvagem. **nd** indica que a experiência não foi realizada.

Figura 3. *Interacção de Bak com Bcl-x_L.*

A) Interacções Bak/Bcl-x_L medidas *in vitro*. O Bak traduzido *in vitro* marcado com ³⁵S (faixa 1) foi misturado ou com GST-Bcl-x_L (faixa 2) ou com GST (faixa 3). Os complexos foram capturados em pérolas de glutationa-agarose e a proteína Bak marcada com ³⁵S ligada foi detectada por electroforese em geles de SDS-poliacrilamida seguida por autorradiografia.

B) Interações Bak/Bcl-x_L detectadas em células transfectadas. Os plasmídeos que expressam formas marcadas com epítipo de Bak e Bcl-x_L (HA-Bak e Bcl-x_L marcado com Flag) foram co-transfectados em células COS. O HA-Bak foi imunoprecipitado (anti-HA IP) a partir de lisados de células transfectadas e o Bcl-x_L associado foi detectado por análise de *Western blot* com um anticorpo anti-marcador Flag.

Figura 4. *Sumário da função de ligação a Bcl-x_L de deleções de Bak e espécies truncadas.*

As estruturas dos vários mutantes Bak são esquematicamente mostradas, como descrito na Figura 2. A capacidade dos mutantes Bak e espécies truncadas para interagir com Bcl-x_L está sumariada (direita) como se segue: +, equivalente a Bak de tipo selvagem na capacidade para interagir com Bcl-x_L quer *in vitro* quer em células COS transfectadas; -, sem interação detectada com Bcl-x_L; -/+, interação muito diminuída relativamente a Bak de tipo selvagem e que apenas podia ser detectada *in vitro*.

Figura 5. *As regiões homólogas ao domínio GD de Bak estão presentes em Bipla e Bax.*

Topo. Estruturas esquemáticas das proteínas com as posições de homologia do domínio GD (caixas vazias), segmento hidrófobo (caixas a tracejado) e domínios de homologia de Bcl-2 (caixas pretas).

Fundo. Sequência de aminoácidos das regiões em Bipla e Bax homólogas ao domínio GD de Bak. Os resíduos realçados são idênticos em, pelo menos, duas das proteínas; resíduos a sombreado indicam alterações de aminoácidos conservativas. São também mostradas (linhas sólidas) as regiões de aminoácidos removidas nos mutantes de deleção Bipla, Bak e Bax indicados.

Figura 6. *Sumário das actividades de morte celular e ligação a Bcl-x_L de mutantes de deleção de domínio GD.*

Os dados para a função de morte celular e ligação a Bcl-x_L estão sumariados como descrito na Figura 2 e Figura 4, respectivamente.

Figura 7. *Dimerização do domínio GD de Bak.*

As interações do domínio GD de Bak com Bak e Bax foram medidas essencialmente como descrito para a ligação de Bak a

Bcl-x_L. Uma porção de Bak (PEM) que abrange o domínio GD (resíduos 58-103) foi fundida a GST, para criar GST-PEM. O Bcl-x_L, Bak, Bax e Bipla marcados com ³⁵S, traduzidos *in vitro*, foram incubados ou com GST isolado ou com proteínas de fusão expressas em bactérias por GST-PEM. Os complexos foram capturados com pérolas de glutathiona-agarose, lavados e as proteínas ligadas detectadas por electroforese em gel de poliacrilamida e autorradiografia. O Bcl-x_L, Bak e Bax interagem especificamente com GST-PEM, mas não com GST isolado. Assim, o domínio GD pode mediar a interacção não só com Bcl-x_L mas também com Bak e Bax.

Figura 8. Sequência de ADN que codifica o domínio GD em Bak, Bax e Bipla.

As sequências de ADN que codificam as regiões do domínio GD para Bak (1-4), Bax (5-7) e Bipla (8-10) são mostradas juntamente com as suas sequências de aminoácidos correspondentes. Os números dos nucleótidos acima de cada sequência são baseados no início do ATG inicial de cada proteína. O número a sublinhado refere-se à posição do primeiro e último aminoácidos do péptido mostrado.

Descrição Detalhada do Invento

Os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm os significados normalmente compreendidos por um perito na arte à qual pertence o presente invento, a não ser que de outro modo definido. É aqui feita referência a várias metodologias conhecidas daqueles peritos na arte. As publicações e outros materiais que descrevem tais metodologias conhecidas às quais se faz referência são aqui incorporados por referência na sua totalidade apesar de descritas por completo. Os procedimentos de referência padrão que descrevem os princípios gerais de tecnologia de ADN recombinante incluem Sambrook, J., *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Planview, Nova Iorque (1989); McPherson, M.J., Ed., Directed Mutagenesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford (1991); Jones, J., Amino Acid and Peptide Synthesis, Oxford Science Publications, Oxford (1992); Austen, B.M. e Westwood, O.M.R., Protein Targeting and Secretion, IRL Press, Oxford (1991). Quaisquer materiais e/ou métodos adequados conhecidos daqueles peritos na arte podem

ser utilizados para realizar o presente invento; no entanto, são descritos materiais e/ou métodos preferidos. Os materiais, reagentes e semelhantes aos quais se faz referência na descrição e exemplos seguintes são obtidos a partir de fontes comerciais, a não ser que de outro modo indicado.

Foi agora identificado um domínio previamente desconhecido na molécula Bak, que parece ser necessário e suficiente para as actividades biológicas conhecidas de Bak. Este domínio, aqui designado como "domínio GD", é suficiente para mediar a função de morte celular e a interacção física com Bcl-x_L. As sequências homólogas ao domínio GD de Bak foram também identificadas em Bax e Bipla e mostraram ser similarmente necessárias para as actividades de morte celular e de ligação a Bcl-x_L destas proteínas. Estas observações sugerem que Bak, Bax e Bipla modulam ou regulam a apoptose através de um mecanismo similar que, em cada caso, envolve os seus domínios GD respectivos. Como será notado por aqueles peritos, familiares com o presente invento, as sequências que compreendem o domínio GD são úteis na modulação da apoptose em células. Similarmente, os compostos e composições que são capazes de ligação ao domínio GD são úteis como agentes para a modulação de actividade apoptótica em células.

Como aqui utilizado, o termo "domínio GD" refere-se a um domínio de proteína primeiramente identificado em Bak, que foi aqui demonstrado ser essencial para a interacção de Bak com Bcl-x_L e para a função de morte celular de Bak e a péptidos e/ou moléculas capazes de mimetizar a sua estrutura e/ou função. Numa concretização preferida, o presente invento compreende um péptido tendo a sequência de aminoácidos seguinte:

GDDINRRYDSEFQ [SEQ ID NO:1]

correspondente aos resíduos de aminoácidos 82-94. Os seus equivalentes funcionais podem também ser úteis. Por "equivalente funcional" quer-se dizer um péptido que possui uma actividade biológica ou característica imunológica substancialmente similar à do domínio GD e que se destina a incluir "fragmentos", "variantes", "análogos", "homólogos" ou "derivados químicos" que possuem tal actividade ou

característica. Assim, os equivalentes funcionais do domínio GD podem não partilhar uma sequência de aminoácidos idêntica sendo possíveis substituições conservativas e não conservativas de aminoácidos, de aminoácidos convencionais ou não convencionais.

A referência aqui a substituição "conservativa" de aminoácidos pretende significar a permutabilidade dos resíduos de aminoácidos que têm cadeias laterais similares. Por exemplo, glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina completam um grupo de aminoácidos que têm cadeias laterais alifáticas; serina e treonina são aminoácidos que têm cadeias laterais hidroxilo alifáticas; asparagina e glutamina são aminoácidos que têm cadeias laterais contendo amida; fenilalanina, tirosina e triptofano são aminoácidos que têm cadeias laterais aromáticas; lisina, arginina e histidina são aminoácidos que têm cadeias laterais básicas; e cisteína e metionina são aminoácidos que têm cadeias laterais contendo enxofre. A troca de um aminoácido de um dado grupo por um outro aminoácido do mesmo grupo pode ser considerada uma substituição conservativa. Os grupos de substituição conservativa preferidos incluem asparagina-glutamina, alanina-valina, lisina-arginina, fenilalanina-tirosina e valina-leucina-isoleucina.

Numa concretização preferida do invento, é proporcionado um péptido tendo a sequência de aminoácidos seguinte:

PSSTMGQVGRQLAIIGDDINRRYDSEFQ [SEQ ID NO:2]

correspondente aos resíduos de aminoácidos 67-94 de Bak, unicamente necessária para função de morte celular de Bak.

Numa outra concretização preferida, é proporcionado um péptido tendo a sequência de aminoácidos seguinte:

QVGRQLAIIGDDINRRYDSEFQTMLQHLQPT [SEQ ID NO:3]

correspondente aos resíduos de aminoácidos 73-103 de Bak, suficiente para a função de morte celular de Bak.

Os presentes dados indicam que a actividade biológica do domínio GD e de seus derivados funcionais será afectada pela localização subcelular destas composições. Por conseguinte, numa outra concretização preferida do invento, os péptidos do domínio GD do invento terão fundida na sua extremidade C terminal uma cauda hidrófoba adequada, que pode compreender os aminoácidos 187-211 de Bak. Podem ser utilizados por aqueles peritos que utilizam métodos conhecidos, outros meios adequados de efectuar a localização subcelular, incluindo a selecção de caudas hidrófobas adequadas, tais como os aminoácidos 172-192 de Bax, os aminoácidos 213-233 de Bcl-x_L, os aminoácidos 220-240 de Bcl-2 e as caudas hidrófobas introduzidas através de lipidação de proteínas (Casey, T.J., Science, 268: 221-225 (1995)) tal como prenilação e acilação (por exemplo, miristilação, palmitilação).

O domínio GD aqui descrito está unicamente envolvido quer na actividade de morte celular quer na actividade de ligação a Bcl-x_L de Bak. Além disso, é aqui demonstrado que outras proteínas que interagem com Bcl-2 tendo propriedades funcionais semelhantes às de Bak, contêm regiões de aminoácidos tendo sequências portadoras de homologia a sequências no domínio GD de Bak. Estas proteínas incluem Bax e Bipla que, similarmente a Bak, interagem com Bcl-2, contendo estas duas proteínas regiões de aminoácidos portadoras de homologia às sequências no domínio GD de Bak. Em Bax, esta região compreende os aminoácidos 59-73, que possuem homologia com os aminoácidos 74-88 no domínio GD de Bak. A proteína Bipla contém similarmente uma região de aminoácidos compreendendo os aminoácidos 57-71 portadores de homologia para as mesmas sequências (aminoácidos 74-88) no domínio GD de Bak. A deleção das regiões do domínio GD de Bax e Bipla acima identificadas diminuem a sua actividade de morte celular e impedem a ligação a Bcl-x_L. Bipla carece de sequências homólogas às duas regiões altamente conservadas, designadas Domínio I e Domínio II (também referidos na literatura como "Domínios de homologia a Bcl-2" ou "Domínios BH" I e II ou "BH1" e "BH2"). Foi sugerido que estas duas regiões conservadas, e especialmente o Domínio I, sejam instrumentais para ditar homo- e heterodimerização em Bcl-2, Bax e noutros membros da família Bcl-2. Por conseguinte, o domínio GD constitui um elemento-chave envolvido na actividade biológica

de proteínas tais como Bak, Bax e Bipla, não necessariamente partilhado com membros da família Bcl-2, actividade que é independente dos domínios BH I e II. Isto sugere que o domínio GD define uma família distinta de proteínas, incluindo Bak, Bax e Bipla.

Por conseguinte, numa concretização preferida adicional, é proporcionado um péptido compreendendo os aminoácidos seguintes:

LSECLKRIGDELDSN [SEQ ID NO:4]

correspondente aos aminoácidos 59-73 de Bax. Numa outra concretização preferida, é proporcionado um péptido que compreende a sequência de aminoácidos:

LKRIGDELD [SEQ ID NO:5]

correspondente aos aminoácidos 63-71 de Bax. Numa outra concretização preferida, é proporcionado um péptido que compreende a sequência de aminoácidos:

QDASTKKLSECLKRIGDELDSNMELQ [SEQ ID NO:6]

correspondente aos aminoácidos 52-77 de Bax. Numa outra concretização preferida, é proporcionado um péptido que compreende a sequência de aminoácidos:

LALRLACIGDEMDVS [SEQ ID NO:7]

correspondente aos aminoácidos 57-71 de Bipla. Numa outra concretização preferida, é proporcionado um péptido compreendendo a sequência de aminoácidos seguinte:

IGDEM [SEQ ID NO:8]

correspondente aos aminoácidos 64-68 de Bipla. Numa outra concretização preferida, é proporcionado um péptido compreendendo a sequência de aminoácidos seguinte:

CMEGSDALALRLACIGDEMDVSLRAPRL [SEQ ID NO:9]

correspondente aos aminoácidos 50-77 de Bipla. Numa outra concretização preferida, é proporcionado um péptido compreendendo a sequência de aminoácidos seguinte:

VGRQLAIIGDDINRR [SEQ ID NO:10]

correspondente aos aminoácidos 74-88 de Bak.

Um aspecto surpreendente do presente invento é a descoberta de que o domínio GD isolado é suficiente para homodimerização de Bak, assim como para heterodimerização de Bak com Bax e Bcl-x_L e que os Domínios I e II da família Bcl-2 altamente conservados não são necessários para esta dimerização. Isto indica que o domínio GD é capaz de modular a função de proteínas incluindo Bak, Bax e Bcl-x_L directamente através de dimerização podendo assim modular também a função de outras proteínas incluindo Bcl-2.

Assim, a importância funcional do domínio GD, está provavelmente relacionada com a sua capacidade para mediar uma ou mais interacção(ões) proteína/proteína com outros membros da família Bcl-2 ou com outra(s) proteína(s) celular(es) ainda não identificada(s). É possível que as proteínas sobreviventes tais como Bcl-2 e Bcl-x_L suprimam a apoptose por ligação e inactivação de proteínas que promovem activamente morte celular, tais como Bak, Bax e Bipla, através dos seus domínios GD. Para suporte deste ponto de vista, a interacção com Bax parece ser necessária para Bcl-2 suprimir a apoptose (Yin, et al., Nature 369: 321-323 (1994)). Uma segunda possibilidade é a de que Bak, Bax e Bipla induzam morte celular por ligação (através dos seus domínios GD) e inactivação de proteínas, incluindo Bcl-2 e Bcl-x_L, que promovem activamente a sobrevivência de células. É também possível que Bak, Bax e Bipla se liguem a uma ou mais proteína(s) celular(es) adicional(ais) e que esta interacção medeie a função de morte celular. O presente inventor, não pretende estar ligado a qualquer teoria particular; no entanto, independentemente do(s) seu(s) mecanismo(s) de acção, o domínio GD em Bak, Bax e Bipla é de importância central para mediar estas interacções proteína/proteína.

Os agentes capazes de modular o domínio GD mediado por interacções proteína/proteína podem incluir péptidos compreendendo o domínio GD, assim como mutantes do domínio GD ou de proteínas compreendendo o domínio GD. Um "mutante" como aqui utilizado refere-se a um péptido tendo uma sequência de aminoácidos que difere da do péptido ou proteína que ocorrem naturalmente em, pelo menos, um aminoácido. Os mutantes podem ter a mesma actividade biológica e imunológica que o péptido de domínio GD que ocorre naturalmente ou da proteína que ocorre naturalmente. No entanto, a actividade biológica ou imunológica de mutantes pode diferir ou estar ausente. Por exemplo, um mutante de domínio GD pode carecer da actividade biológica que caracteriza o péptido de domínio GD que ocorre naturalmente, mas pode ser útil como um antigénio para criar anticorpos contra o domínio GD ou para a detecção ou purificação de anticorpos contra o domínio GD ou como um agonista (competitivo ou não competitivo), antagonista ou agonista parcial da função do péptido de domínio GD que ocorre naturalmente.

A modulação de interacções proteína/proteína mediadas por domínio GD pode também ser efectuada por agonistas ou antagonistas de péptidos de domínio GD. A pesquisa de bibliotecas de péptidos, bibliotecas de compostos e outros bancos de informação para identificar agonistas ou antagonistas da função de proteínas compreendendo o domínio GD é realizada com testes para detecção da capacidade dos agonistas ou antagonistas potenciais para inibir ou aumentar a ligação do domínio GD, por exemplo, homodimerização ou heterodimerização do domínio GD.

Por exemplo, os testes de pesquisa de elevada produtividade podem ser utilizados para identificar compostos que modulam a função de ligação a proteína do domínio GD. Tais testes de pesquisa facilitam a identificação de compostos que aceleram ou inibem a apoptose por influenciarem as interacções proteína/proteína mediadas pelo domínio GD. Por exemplo, uma pesquisa *in vitro* de compostos que rompem a interacção do domínio GD de Bak com GST-Bcl-x_L compreende placas de multicavidades revestidas com GST-Bcl-x_L que são incubadas com uma sonda de péptido de domínio GD marcada na presença de um ou mais composto(s) a ser(em) testado(s). As moléculas que

rompem especificamente a interacção podiam, em princípio, ligar-se quer a "ligando" do domínio GD quer ao domínio "receptor" ainda não identificado em Bcl-x_L. Qualquer classe de compostos podia ser um agente de modulação de apoptose candidato.

Assim, os métodos do invento podem ser utilizados, por exemplo, para analisar um agente capaz de modular a apoptose, compreendendo um tal método de pesquisa, o revestimento de uma placa multicavidades com GST-Bcl-x_L e a incubação da placa multicavidades revestida com uma sonda de péptido de domínio GD marcada na presença de um agente que se deseja testar, em que a ruptura da interacção do domínio GD com GST-Bcl-x_L indica que o referido agente é capaz de modular a apoptose. Os agentes identificados por este método são também concretizações contempladas do invento.

Os marcadores adequados incluem um marcador detectável tal como uma enzima, isótopo radioactivo, composto fluorescente, composto quimioluminescente ou composto bioluminescente. Aqueles peritos na arte conhecerão outros marcadores adequados ou serão capazes de verificar tal utilizando a experimentação de rotina. Além disso, a ligação destes marcadores aos péptidos é realizada utilizando técnicas padrão conhecidas na arte.

Uma pesquisa de velocidade elevada para agentes que se ligam directamente ao domínio GD pode utilizar bibliotecas combinatórias immobilizadas ou "marcadas". Os agentes que se ligam especificamente a tais bibliotecas são candidatos a ser testados quanto à sua capacidade para bloquear as interacções Bak/Bcl-x_L. Como acima discutido, tais agentes podem funcionar como supressores de apoptose quer inibindo directamente a função de Bak (e/ou Bax/Bipla) quer por aumento da actividade efectiva de Bcl-2/Bcl-x_L endógeno (ou outro membro da família Bcl-2). Tais agentes podiam ser úteis para suprimir a apoptose aberrante em desordens degenerativas ou após lesão isquémica.

Os anticorpos contra péptidos de domínio GD do invento podem ser utilizados para pesquisar bibliotecas de expressão de ADNC para identificação de clones contendo inserções de ADNC que codificam proteínas cruzadamente imunorreactivas,

estruturalmente relacionadas, que podem ser membros da família de proteínas de domínio GD. A pesquisa de bibliotecas de expressão de ADNc e ARNm é conhecida na arte. Similarmente, os anticorpos contra péptidos de domínio GD são utilizados para identificar ou purificar proteínas cruzadamente imunorreactivas relacionadas com este domínio ou para detectar ou determinar a quantidade de proteínas contendo o domínio GD numa célula ou população de células, por exemplo, em tecidos ou células, tais como linfócitos, obtidos a partir de um doente. Os métodos conhecidos para tais medições incluem a imunoprecipitação de extractos de células seguida por PAGE, detecção *in situ* por métodos imuno-histoquímicos e métodos ELISA, os quais são todos bem conhecidos na arte.

A modulação da apoptose pode ser causada por métodos que utilizam polinucleótidos anti-sentido específicos complementares de toda ou parte das sequências nucleotídicas que codificam as proteínas compreendendo o domínio GD aqui descrito. Tais polinucleótidos anti-sentido complementares podem incluir adições, deleções, substituições e transposições de nucleótidos, desde que a hibridação específica à sequência alvo persista. Os oligonucleótidos de ARN ou ADN anti-sentido solúveis que podem hibridar especificamente nas espécies de ARNm que codificam as proteínas ou péptidos do invento e que impedem a transcrição da espécie de ARNm e/ou tradução do polipéptido codificado são contemplados como polinucleótidos anti-sentido complementares, de acordo com o invento. A produção de proteínas compreendendo o domínio GD é inibida por polinucleótidos anti-sentido de acordo com o invento, podendo tais polinucleótidos anti-sentido inibir a apoptose, senescência e semelhante, e/ou inverter o fenótipo transformado de células. Pode-se utilizar uma cassette de expressão heteróloga para produzir polinucleótidos anti-sentido num transfectante ou célula transgénica. Os polinucleótidos anti-sentido podem também ser administrados como oligonucleótidos solúveis no meio externo da célula alvo, tal como no meio de cultura de células *in vitro* ou no fluido intersticial (por exemplo através do sistema circulatório) *in vivo*. Os polinucleótidos anti-sentido e a sua utilização são conhecidos daqueles peritos na arte e estão descritos, por exemplo, em Melton, D.A., Ed., Antisense RNA and DNA, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova

Iorque (1988).

A actividade biológica prevista dos agentes identificados de acordo com o invento varia dependendo dos pressupostos feitos relativamente ao mecanismo de funcionamento de Bak/Bcl-2. Por exemplo, pode-se prever que um agente que se liga fortemente ao domínio GD iniba a função de Bak (e talvez de Bax/Bipla). Partindo do princípio que Bak (e/ou Bax/Bipla) é a molécula reguladora de morte celular activa, um agente que se liga fortemente ao domínio GD pode inibir a função de Bak através de um mecanismo similar à acção de ligação a Bcl-2/Bcl-x_L. Tais agentes vão compreender miméticos "Bcl-2/Bcl-x_L" e podem, por conseguinte, exibir actividade anti-apoptótica sob condições nas quais Bcl-2 tem um efeito protector demonstrado (por exemplo, protecção de neurónios contra lesão ou privação de citocinas). Os agentes desta classe podem ter utilidade no tratamento de doenças caracterizadas por morte celular excessiva ou inadequada, incluindo, por exemplo, doenças neurodegenerativas e lesão resultante de isquemia.

Se a ligação de Bcl-2/Bcl-x_L promover activamente a sobrevivência de células, e se a repressão de Bak for devida simplesmente à sua ligação e inactivação destas proteínas sobreviventes, então um agente que previna esta ligação pode aumentar eficazmente a actividade de Bcl-2/Bcl-x_L residente numa célula aliviando a repressão por Bak (e/ou por Bax/Bipla). Isto vai também promover a sobrevivência de células, mas apenas em células que expressam Bcl-2/Bcl-x_L endógeno. Os agentes que se ligam a Bcl-x_L e, por conseguinte, impedem a sua interacção com Bak (e/ou com Bax/Bipla) podem inibir a actividade de supressão de morte celular de Bcl-x_L (e/ou de Bcl-2). Tais agentes compreendem "miméticos de domínio GD" e promovem a morte celular de uma forma mecanisticamente similar à acção de Bak. Os agentes miméticos de domínio GD são úteis no tratamento terapêutico do cancro e doença viral.

Os peptidomiméticos de péptido de domínio GD são também fornecidos pelo presente invento e podem actuar como fármacos para a modulação da apoptose, por exemplo, por bloqueio da função das proteínas que compreendem o domínio GD ou

interferência com a dimerização mediada pelo domínio GD. Os peptidomiméticos são geralmente entendidos na indústria farmacêutica por incluírem fármacos não peptídicos tendo propriedades análogas às do péptido mimetizado. Os princípios e práticas de desenho peptidomimético são conhecidos na arte e estão descritos, por exemplo, em Fauchere J., Adv. Drug Res., 15: 29 (1986); e Evans et al., J. Med. Chem., 30: 1229 (1987). Os peptidomiméticos que possuem similaridade estrutural aos péptidos terapêuticamente úteis podem ser utilizados para produzir um efeito terapêutico ou profilático equivalente. Tais peptidomiméticos têm, tipicamente, uma ou mais ligação(ões) peptídica(s) opcionalmente substituída(s) por uma ligação que pode converter propriedades desejáveis tal como resistência à ruptura química *in vivo*. Tais ligações podem incluir $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ e $-\text{CH}_2\text{SO}-$. Os peptidomiméticos podem exibir propriedades farmacológicas aumentadas (semivida biológica, taxas de absorção, etc.), especificidade diferente, estabilidade aumentada, economias de produção, antigenicidade diminuída e semelhante o que torna a sua utilização como medicamento particularmente desejável.

Como aqui discutido, o domínio GD parece ser uma área de motivos envolvidos na dimerização estando esta actividade relacionada com a regulação da apoptose por proteínas que compreendem o domínio GD. Bak possui uma região hidrófoba terminal C que parece atravessar a membrana. Assim, a localização subcelular de proteínas contendo o domínio GD pode desempenhar um papel na regulação programada de morte celular *in vivo*. Por conseguinte, é possível utilizar o invento para detecção ou determinação de proteínas que compreendem o domínio GD, por exemplo, em fracções de excisões de tecidos/órgãos, por meio de técnicas imunoquímicas ou outras técnicas tendo em vista as suas propriedades antigénicas. A imunização de animais com péptidos que compreendem o domínio GD isolado ou em conjunto com adjuvantes por métodos conhecidos pode produzir anticorpos específicos para o péptido de domínio GD. O anti-soro obtido por procedimentos convencionais pode ser utilizado para este fim. Por exemplo, um mamífero, tal como um coelho, pode ser imunizado com um péptido que compreende o domínio GD, induzindo assim a formação de anticorpos policlonais contra ele. Os anticorpos

monoclonais podem também ser produzidos utilizando procedimentos conhecidos. Tais anticorpos podem ser utilizados de acordo com o invento para detectar a presença e quantidade de péptidos que compreendem o domínio GD.

Os péptidos de domínio GD do invento podem ser utilizados para a detecção de Bak, Bcl-x_L, Bipla e outras proteínas por meio de testes padrão incluindo radioimunoensaios e imunoensaios enzimáticos.

Será notado pelos peritos que a estrutura química precisa de péptidos que compreendem o domínio GD vai variar dependendo de um certo número de factores. Por exemplo, uma dada proteína pode ser obtida como um sal ácido ou básico, ou em forma neutra, uma vez que se encontram na molécula grupos carboxilo e amino ionizáveis. Por conseguinte, para os fins do invento, qualquer forma dos péptidos que compreende o domínio GD que retém a actividade terapêutica ou de diagnóstico do péptido que ocorre naturalmente é considerada estar no âmbito do presente invento.

Os péptidos de domínio GD e outras composições do presente invento podem ser produzidos por técnicas de ADN recombinante conhecidas na arte. Por exemplo, as sequências nucleotídicas que codificam os péptidos de domínio GD do invento podem ser inseridas num vector de ADN adequado, tal como um plasmídeo e o vector utilizado para transformar um hospedeiro adequado. O péptido GD recombinante é produzido no hospedeiro por expressão. O hospedeiro transformado pode ser uma célula procariótica ou eucariótica. As sequências nucleotídicas preferidas para este fim que codificam os domínios GD de Bak, Bax e Bipla são apresentadas na Figura 8.

Os polinucleótidos que codificam péptidos compreendendo o domínio GD podem ser de ADN genómico ou ADNc, isolado a partir de bibliotecas de clones por métodos convencionais incluindo métodos de pesquisa por hibridação. Alternativamente, as sequências polinucleotídicas sintéticas podem ser construídas por métodos químicos sintéticos conhecidos para a síntese de oligonucleótidos. Tais métodos sintéticos são descritos, por exemplo, em Blackburn, G.M. e Gait, M.J., Ed., Nucleic Acids in Chemistry and Biology, IRL Press, Oxford, Inglaterra (1990)

e será evidente que os sintetizadores de oligonucleótidos comercialmente disponíveis podem também ser utilizados de acordo com as instruções do fabricante. Um desses fabricantes é a Applied Bio Systems.

A reacção em cadeia de polimerase (PCR), que utiliza iniciadores à base dos dados de sequência nucleotídica aqui descritos, pode ser utilizada para amplificar fragmentos de ADN de grupos de ARNm, bibliotecas de clones de ADNc ou ADN genómico. Os métodos de amplificação de nucleótidos por PCR são conhecidos na arte e estão descritos, por exemplo, em Erlich, H.A., Ed., PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, Stockton Press, Nova Iorque, Nova Iorque (1989); Patente U.S. No. 4683202; Patente U.S. No. 4800159; e Patente U.S. No. 4683195. As várias deleções, adições e substituições de nucleótidos podem ser incorporadas nos polinucleótidos do invento como é reconhecido por aqueles peritos, que vão reconhecer que a variação na sequência nucleotídica que codifica os péptidos de domínio GD pode ocorrer como resultado de, por exemplo, polimorfismos alélicos, erros de sequenciação menores e semelhantes. Os polinucleótidos que codificam os péptidos de domínio GD do invento podem incluir oligonucleótidos curtos que são úteis, por exemplo, como sondas de hibridação e iniciadores de PCR. As sequências polinucleotídicas do invento podem também compreender uma porção de um polinucleótido maior e, através de ligação polinucleotídica, podem ser fundidas na estrutura, com uma ou mais sequência(s) polinucleotídica(s) que codifica(m) proteínas diferentes. Neste caso, a proteína expressa pode compreender uma proteína de fusão. Evidentemente que as sequências polinucleotídicas do invento podem ser utilizadas no método de PCR para detectar a presença de ARNm que codifica péptidos de domínio GD no diagnóstico de doenças ou na análise forense.

As proteínas que codificam ADNc que interagem com o domínio GD (ou proteínas contendo o domínio GD) podem ser identificadas por pesquisa de bibliotecas de expressão de ADNc, que utiliza métodos conhecidos. Exemplos de tais métodos incluem o sistema de dois híbridos de levedura (Patente U.S. No. 5283173, inventores Fields e Song, requerida a 1 de Fevereiro, 1994; Chien, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 88:

9578 (1991) e o sistema de pesquisa interactivo de *E. coli*/BCCP (Guarente, L., Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 1639 (1993) e Germino, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 933-937 (1993)). As bibliotecas de ADNc adequadas incluem as bibliotecas de ADNc de mamífero, tal como humano, ratinho ou rato, que podem conter ADNc produzido a partir de ARN e de uma única célula, tecido ou tipo de órgão ou fase de desenvolvimento, como conhecido na arte.

Uma sequência nucleotídica que codifica uma proteína ou um péptido compreendendo o domínio GD pode ser inserida num vector de ADN de acordo com técnicas convencionais, incluindo formação de terminais de extremidades lisas ou de extremidades desfasadas para ligação, digestão por enzimas de restrição para proporcionar terminais adequados, enchimento de extremidades coesivas, quando adequado, tratamento com fosfatase alcalina para evitar ligação indesejável e ligação com ligases adequadas. As técnicas para tais manipulações são descritas, por exemplo, por Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Planview, Nova Iorque (1989) e são bem conhecidas na arte.

A sequência de resíduos de aminoácidos numa proteína ou péptido que compreende o domínio GD é aqui designada quer através da utilização das suas designações de três letras normalmente utilizadas quer pelas suas designações de uma letra. Uma lista destas designações de três letras e de uma letra pode ser encontrada em manuais tais como Biochemistry, Segunda Edição, Lehninger, A., Worth Publishers, Nova Iorque, NY (1975). Quando a sequência de aminoácidos está disposta na horizontal, o terminal amino destina-se a estar na extremidade esquerda enquanto que o terminal carboxi se destina a estar na extremidade direita. Os resíduos de aminoácidos num péptido podem ser separados por hífenes. Tais hífenes destinam-se apenas a facilitar a apresentação de uma sequência.

O desenho racional de miméticos de domínio GD ou moléculas de ligação, baseado na estrutura peptídica modelada (ou experimentalmente determinada), pode ser realizado por aqueles peritos na arte, utilizando métodos conhecidos de desenho racional de fármacos. Os métodos terapêuticos ou

profilácticos para tratamento de condições patológicas tais como doença auto-imune, doença neurodegenerativa, cancro e semelhante, podem ser realizados pela administração de uma quantidade eficaz de um agente terapêutico capaz de inibir especificamente a homodimerização ou heterodimerização de domínio GD, modulando assim a actividade biológica de proteínas contendo domínio GD e o estado apoptótico num doente.

As moléculas Bak truncadas que compreendem o domínio GD, tal como QVG ou PEM, assim como outros derivados peptídicos pequenos que constituem um domínio GD "mínimo", mostram aqui reter a função de ligação a proteína e de morte celular exibida pelo Bak de tipo selvagem. Estas moléculas, ou derivados peptidomiméticos, podem induzir apoptose em células de tumor proporcionando o mesmo sinal biológico produzido pelo elevado nível de expressão de Bak (que tem mostrado matar células de tumor num teste *in vitro*). Tais agentes compreendem uma classe nova de fármacos quimioterapêuticos que se pode prever operarem independentemente do estado de p53.

Se a interacção com Bak resultar na supressão da função anti-apoptótica de Bcl-x_L e/ou outros membros da família Bcl-2, então os péptidos de domínio GD, ou agentes que mimetizam a estrutura de domínio GD, podem actuar como inibidores da função anti-apoptótica de proteínas semelhantes a Bcl-2. O elevado nível de expressão de Bcl-2 tem sido implicado na resistência das células de tumor a uma variedade de fármacos quimioterapêuticos (Fisher, *et al.*, Cancer Res. 53: 3321-3326 (1993); Miyashita e Reed, Blood 81: 151-157 (1993); Dole, *et al.*, Cancer Res. 54: 3253-3259 (1994). A administração de miméticos de domínio GD pode suprimir a função de Bcl-2 e restabelecer a sensibilidade de células de tumor à apoptose induzida por agentes quimioterapêuticos tradicionais. Adicionalmente, Bak ou os miméticos de domínio GD que inibem Bcl-2 podem eles mesmos ser selectivamente tóxicos para certos tumores, tais como linfoma folicular, que dependem do elevado nível de actividade de Bcl-2 para o seu crescimento contínuo e sobrevivência.

Os miméticos de domínio GD do invento podem também ter utilidade no combate de infecções virais. A apoptose de

células infectadas, com fragmentação de ADN associada, proporciona uma defesa importante contra a patogénese viral por limitar os títulos virais e restringir a propagação viral (Vaux, *et al.*, Cell 76: 777-779 (1994)). Por esta razão, os vírus têm desenvolvido diversos mecanismos para suprimir a apoptose de células hospedeiras infectadas. Certas proteínas virais, tais como o vírus de Epstein-Barr BHRF-1, Vírus da Febre Suína Africana (ASFV) LHW5-HL e Adenovírus E1B 19 kD, parecem ser homólogos estruturais ou funcionais de Bcl-2. Um segundo gene de vírus de Epstein-Barr, LMP1, transactiva a expressão do gene *bcl-2* celular em células latentemente infectadas (Henderson, *et al.*, Cell 65: 1107-1115 (1991)). Nestes casos, o sinal apoptótico desencadeado pela infecção viral pode ser posto em dúvida pela acção de um homólogo de Bcl-2 viral (ou celular). Um mimético de domínio GD de Bak que se opõe à função anti-apoptótica do homólogo de Bcl-2 viral/celular vai servir para aliviar este bloqueio e induzir apoptose em células infectadas e conseqüentemente inibir a propagação viral. As proteínas anti-apoptóticas codificadas, pelo menos, por dois vírus não relacionados (EBV BHRF1 e Adenovírus E1B 19 kD) têm demonstrado interagir com Bak. A evidência experimental suporta a conclusão de que a ruptura da interacção E1B 19 kD/Bak (i.e., por competição com um mimético de domínio GD) vai reduzir os títulos virais e a replicação produtiva. As mutações em E1B 19 kD que rompem a interacção com Bak anulam correspondentemente a função anti-apoptótica de E1B 19 kD. As estirpes de adenovírus que codificam proteínas E1B 19 kD defeituosas dão *in vitro* vírus de descendência muito inferior devido à apoptose de células infectadas (Pilder, *et al.*, J. Virol. 52: 664-671 (1984); Subramanian, *et al.*, J. Biol. Chem. 259: 11777-11783 (1984)).

Um mecanismo adicional pelo qual os vírus impõem um bloqueio na via de transdução de sinal de apoptose é através da inactivação da proteína supressora de tumor p53. A proliferação celular forçada causada por infecção viral induz um sinal apoptótico que requer a função de p53 (ver, por exemplo, Wu e Levine, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3602-3606 (1994)). A função de p53 é, tipicamente, anulada durante a infecção por interacção física com um produto de gene viral. Exemplos de vírus que codificam as proteínas de ligação a p53 incluem adenovírus, vírus políoma, vírus papiloma e

citomegalovírus (Levine, et al., Nature 351: 453-456 (1991); Speir, et al., Science 265: 391-394 (1994)). As células infectadas são "iniciadas" para sofrer apoptose, no entanto, a morte celular é impedida ou retardada por inibição viral da função de p53. É possível que este bloqueio na via de transdução de sinal de apoptose possa ser aliviado, ou ultrapassado, por um agente que module a apoptose a jusante de p53. Bak, ou os miméticos de domínio GD, induzem a apoptose independentemente de p53, e conseqüentemente proporcionam uma via para implementar ou restabelecer o sinal de morte celular que está suprimido em células infectadas.

Qualquer modo de administração que resulte na distribuição do agente terapêutico através da membrana celular e para a célula desejada pode ser utilizado para distribuir os péptidos e agentes do invento. O sítio de administração e as células, podem ser seleccionados por um perito na arte com base na compreensão da desordem particular a ser tratada. Adicionalmente, a dosagem, frequência de administração e duração do curso de tratamento, podem ser determinadas e optimizadas por um perito na arte dependendo da desordem degenerativa particular a ser tratada. O modo de administração particular pode também ser rapidamente seleccionado por um perito na arte e pode incluir, por exemplo, administração oral, intravenosa, subcutânea, intramuscular, etc., com o requisito do agente terapêutico atravessar a membrana celular. Os princípios de dosagem farmacêutica e de distribuição de fármacos são conhecidos e estão descritos, por exemplo, em Ansel, H.C. e Popovich, N.G., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 5ª Edição, Lea & Febiger, Publisher, Filadélfia, PA (1990). É possível, por exemplo, utilizar lipossomas para distribuir especificamente os agentes do invento. Tais lipossomas podem ser produzidos de forma a conter compostos bioactivos adicionais e semelhantes tais como fármacos, radio-isótopos, anticorpos, lectinas e toxinas, que vão actuar no sítio alvo.

Os agentes adequados do invento incluem péptidos de domínio GD e miméticos, fragmentos, equivalentes funcionais e/ou híbridos ou seus mutantes, assim como vectores contendo ADNc que codifica qualquer um dos anteriores. Tais agentes podem ser administrados isoladamente ou em combinação com e/ou

simultaneamente com outros fármacos adequados e/ou cursos de terapia.

Os agentes do presente invento são adequados para o tratamento de desordens degenerativas, incluindo desordens caracterizadas por proliferação celular inadequada ou morte celular inadequada ou nalguns casos, ambas. A proliferação celular inadequada inclui o aumento estatisticamente significativo no número de células quando comparado com a proliferação daquele tipo de células particular na população normal. Estão também incluídas as desordens nas quais uma célula está presente e/ou persiste numa localização inadequada, por exemplo, a presença de fibroblastos no tecido dos pulmões após lesão aguda dos pulmões. Por exemplo, tais células incluem células cancerígenas que exibem as propriedades de invasão e metástase e são altamente anaplásicas. Tais células incluem, mas não estão limitadas a, células cancerígenas incluindo, por exemplo, células de tumor. A morte celular inadequada inclui uma diminuição estatisticamente significativa no número de células quando comparada com a presença daquele tipo de células particular na população normal. Tal sub-representação pode ser devida a uma desordem degenerativa particular, incluindo, por exemplo, SIDA (HIV), que resulta na morte de células T inadequada, e doenças auto-imunes que são caracterizadas por morte celular inadequada. As doenças auto-imunes são desordens causadas por uma resposta imune dirigida contra auto-antígenos. Tais doenças são caracterizadas pela presença de auto-anticorpos em circulação ou imunidade mediada por células contra auto-antígenos em conjunto com lesões inflamatórias causadas por células imunologicamente competentes ou complexos imunes em tecidos contendo auto-antígenos. Tais doenças incluem lúpus eritematoso sistémico (SLE), artrite reumatóide.

Os trabalhos de referência padrão que descrevem os princípios gerais de imunologia incluem Stites, D.P., e Terr, A.I., Basic and Clinical Immunology, 7^a Ed., Appleton & Lange, Publisher, Norwalk, CT (1991); e Abbas, A.K., et al., Cellular and Molecular Immunology, W.B. Saunders Co., Publisher, Filadélfia, PA (1991).

Os péptidos de domínio GD, miméticos, agentes e semelhantes aqui descritos, assim como vectores compreendendo sequências nucleotídicas que os codificam ou suas sequências anti-sentido correspondentes, e hospedeiros compreendendo tais vectores, podem ser utilizados no fabrico de medicamentos para o tratamento de doenças.

As células e animais transgénicos não humanos tendo um ou mais alelo(s) funcionalmente diminuído(s) que codifica(m) uma proteína compreendendo o domínio GD podem ser produzidos utilizando construções alvo homólogas a partir de clones genómicos de proteínas compreendendo o domínio GD. Os métodos para a produção de construções alvo homólogas são conhecidos e descritos, por exemplo, em Bradley, *et al.*, Bio/Technology 10: 534 (1992); e Koh, *et al.*, Science 256: 1210 (1992). Por exemplo, podem ser produzidos ratinhos "knock-out" que são homozigóticos ou heterozigóticos para um alelo inactivado de uma proteína compreendendo o domínio GD por utilização de alvo homólogo. Tais ratinhos são úteis como sujeitos de pesquisa para a investigação de doenças e para outras utilizações. Os métodos para a produção de ratinhos alvo quiméricos são conhecidos e estão descritos, por exemplo, em Robertson, E.J., Ed., Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C. (1987), que descreve também a manipulação de células estaminais embrionária. Adicionalmente, os transgenes para expressão de polipéptidos compreendendo o domínio GD em níveis elevados ou sob o controlo de sequências de controlo da transcrição, seleccionadas, podem ser construídos utilizando ADNc ou gene genómico de uma proteína compreendendo o domínio GD. Os transgenes assim construídos podem ser introduzidos em células e animais transgénicos não humanos por métodos conhecidos. Tais células transgénicas e animais transgénicos não humanos podem ser utilizados como filtros para agentes que modulam a apoptose.

O invento pode ser avaliado em certos aspectos com referência aos exemplos seguintes, oferecidos para ilustração, não para limitação.

EXEMPLOS

a. Métodos

i. Plasmídeos e manipulações de ADN

Todos os procedimentos de ADN recombinante foram realizados por métodos padrão. As deleções no ADNc *bak* foram introduzidas por mutagénese por PCR e as espécies Bak truncadas foram construídas por PCR (White, B.A., Ed., "PCR Protocols: Current Methods and Applications" em Methods in Molecular Biology, Humana Press, Totowa, CT (1993). As mutações foram confirmadas por análise da sequência de ADN. Todos os derivados Bak foram marcados no terminal amino com epítipo de hemaglutinina de vírus influenza e expressos a partir do promotor intensificador de CMV presente em pcDNA-1/Amp, pRcCMV e pcDNA-3 (Invitrogen, Inc.).

ii. Teste de transfecção transitória

O procedimento de teste de transfecção transitória é similar ao previamente descrito para detecção de apoptose induzida pela enzima de conversão de IL-1 β (Miura, et al., Cell 75: 653-660 (1993); Kumar, et al., Genes Dev. 8: 1613-1626 (1994); Wang, et al., Cell 78: 739-750 (1994)). Um dia antes da transfecção, as células Rat-1 foram plaqueadas em discos de 24 cavidades a $3,5 \times 10^4$ células/cavidade. No dia seguinte, as células foram transfectadas com um plasmídeo marcador que codifica β -galactosidase (0,16 μ g), em combinação com um plasmídeo de expressão que codifica Bak (0,42 μ g), pelo procedimento de Lipofectamine (Gibco/BRL). 24 horas após a transfecção, as células foram fixadas e coradas com X-Gal para detectar a expressão de β -galactosidase em células que receberam ADN de plasmídeo (Miura, et al., *supra*). O número de células azuis foi contado por exame microscópico e registado como vivo (células azuis planas) ou morto (células azuis redondas). A actividade de morte celular de Bak neste teste é manifestada por uma grande redução no número de células azuis obtida relativamente à co-transfecção do plasmídeo β -gal com um vector de expressão de controlo (i.e., sem inserção de ADNc *bak*).

A interpretação de que a perda de células azuis reflecte a função de morte celular de Bak é suportada por uma variedade de observações:

1. As células Rat-1 são rapidamente mortas por expressão reforçada de Bak em testes de transfecção estável;
2. Os plasmídeos de expressão de controlo que possuem o ADNc *bak* na orientação anti-sentido, ou vários ADNc não relacionados, não eliminam as células positivas a β -gal. Adicionalmente, certos mutantes Bak (i.e., Δ GD) têm capacidade muito diminuída para eliminar células azuis neste teste;
3. A enzima de conversão de IL-1 β , que previamente mostrou induzir apoptose em células Rat-1 (Miura, *et al.*, *supra*; Kumar, *et al.*, *supra*; Wang, *et al.*, *supra*), elimina também células azuis neste teste quando expressa a partir do mesmo vector;
4. O número de células azuis pode ser parcialmente restabelecido por co-transfecção de Bak com Bcl-x_L. Assim, as células que expressam Bak podem ser recuperadas até certo ponto pela função anti-apoptótica de Bcl-x_L e a expressão de Bak *per se* não elimina a actividade β -galactosidase.

iii. Detecção de interacções proteína/proteína *in vitro*

A GST e GST-Bcl-x_L foram expressas em *E. coli* e purificadas por cromatografia de afinidade utilizando glutationa-agarose (Smith e Johnson, Gene 67: 31-40 (1988)). As proteínas marcadas com ³⁵S-metionina foram expressas *in vitro* utilizando um sistema duplo de transcrição/tradução em lisados de reticulócitos de coelho, como descrito pelo fornecedor (Promega). As proteínas marcadas com ³⁵S-met foram pré-limpas por mistura com 20 ml de pérolas de GSH-agarose lavadas com BSA (pasta a 50%) a 4°C, durante 1 hora, em 0,1 ml de tampão Hepes 10mM, pH 7,2, contendo NP-40 a 0,25%, NaCl 142,5mM, MgCl₂ 5mM e EGTA 1mM (tampão de lise NP-40). As pérolas foram removidas por centrifugação e os sobrenadantes foram incubados com GST ou GST-Bcl-x_L (concentração final de 1mM) a 4°C, durante 1 hora. As proteínas de fusão GST e quaisquer proteínas de interacção foram recuperadas por incubação durante 1 hora com 20 ml adicionais de pérolas de GSH-agarose. As pérolas foram lavadas duas vezes com tampão de lise NP-40 seguido por duas lavagens com tampão de lise NP-40 sem NP-40. As proteínas foram eluídas a partir das pérolas por

incubação em tampão de amostra de SDS-PAGE a 100°C, durante 5 min., e introduzidas em geles de SDS-poliacrilamida a 4-20%. Após electroforese, os geles foram fixados e incubados numa solução intensificadora de fluorografia (Amplify; Amersham). Os geles foram secos e submetidos a autorradiografia a -70°C.

iv. Detecção de interações proteína/proteína em células transfectadas

As células COS foram deixadas crescer em meio de Eagle modificado por Dulbecco (Life Technologies, Inc.) suplementado com soro de vitelo de bovino a 10%, L-glutamina a 2% e pen/estrep a 1% (Life Technologies, Inc.). As células foram semeadas a $2,0 \times 10^5$ células/35 mm de cavidade e transfectadas com plasmídeos de expressão 24 horas mais tarde utilizando Lipofectamine, como descrito pelo fornecedor (Life Technologies, Inc.). O Bak (e mutantes Bak) foi expresso como uma proteína de fusão com a marca de epítipo HA no seu terminal amino. O Bcl-x_L foi também expresso com uma marca de epítipo de terminal amino (Flag; Kodak). 24 horas após a transfecção, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato e lisadas em tampão de lise NP-40 contendo também PMSF 1mM, pepstatina 1mM e 1 mg/ml de leupeptina. Os lisados foram incubados com anticorpo anti-HA (12CA5, Boehringer Mannheim) durante 1 hora e com 20 ml de pérolas de Proteína A-agarose lavadas com BSA (pasta a 50%) durante 1 hora adicional. As pérolas foram lavadas duas vezes com tampão de lise NP-40 seguida por duas lavagens com tampão de lise NP-40 sem NP-40. As proteínas foram eluídas a partir das pérolas por incubação em tampão de amostra de SDS-PAGE a 100°C durante 5 min e introduzidas em geles de SDS-poliacrilamida a 4-20%. Após electroforese, as proteínas foram transferidas para membranas Immobilon-P (Millipore) e as membranas foram bloqueadas por incubação durante 1 hora com uma solução de leite a 1% em PBS. O anticorpo primário (1 mg/ml de 12CA5, Boehringer Mannheim; DAKO-bcl-2, 1:500, 124, DAKO; 10 mg/ml de Anti-FLAG M2, Kodak) foi incubado com as membranas durante 1 hora, seguido pelo anticorpo secundário (0,8 mg/ml de IgG anti-ratinho de cabra conjugada com HRP; Jackson Laboratory) durante 1 hora adicional. A detecção foi por quimioluminescência aumentada (ECL; Amersham) como descrito pelo fornecedor, utilizando película X-OMAT AR (Kodak).

b. Resultados

i. Detecção da função de morte celular de Bak em linhas de células múltiplas

A expressão de *bak* forçada induz apoptose em linhas de células Rat-1 estáveis transfectadas com um plasmídeo de expressão *bak* indutível. De modo a avaliar mais rapidamente a função de morte celular de um grande número de mutantes *bak*, realizou-se um teste de transfecção transitória. As células Rat-1 foram transfectadas com um plasmídeo marcador que codifica β -galactosidase, em combinação com um plasmídeo de expressão que codifica Bak, ou vários plasmídeos de controlo. A actividade de morte celular de Bak neste teste foi manifestada por uma grande redução no número de células azuis (que expressam β -gal) obtido relativamente à co-transfecção do plasmídeo β -gal com um vector de expressão de controlo (Figura 1). A eliminação de células azuis indicou que as células transfectadas eram mortas por *bak* antes da expressão de níveis detectáveis de β -galactosidase.

A actividade de morte celular de Bak foi avaliada em várias linhas de células adicionais. Para se determinar se Bak requer p53 de tipo selvagem para induzir apoptose, realizou-se uma experiência de transfecção transitória em fibroblastos transformados derivados de um ratinho "knock-out" p53-/-. Estas células carecem de p53 funcional e são muito diminuídas quanto à sua capacidade para sofrer apoptose em resposta a irradiação γ e fármacos quimioterapêuticos que lesam o ADN (Lowe, et al., Cell 74: 957-967 (1993); Lowe, et al., Nature 362: 847-849 (1993)). A co-transfecção de Bak com β -gal reduziu muito o número de células azuis (Figura 1) o que indica que Bak não requer p53 de tipo selvagem para exercer a sua função de morte celular. Similarmente, as experiências de transfecção transitórias realizadas em linhas de células Hela (carcinoma cervical) e BT549 (carcinoma da mama) demonstraram que Bak pode matar células humanas de tumor neste contexto (Figura 1) o que indica que a sua actividade não está restringida a fibroblastos de roedores.

ii. Identificação de domínios Bak necessários para a função de morte celular

Foi realizada uma análise mutacional de Bak de modo a identificar as regiões da molécula que são necessárias e/ou suficientes para induzir apoptose. Introduziu-se uma série de mutações de deleção que abrangem a proteína Bak completa, por mutagénesse por PCR, e cada mutante foi testado quanto à actividade de morte celular num teste de transfecção transitória de células Rat-1. Esta análise revelou que muita da molécula Bak é dispensável para a sua função de morte celular detectada por este teste (Figura 2). Surpreendentemente, as regiões não essenciais da proteína Bak incluem os dois domínios no terminal carboxilo de metade da proteína o que mostra o maior grau de homologia a outros membros da família Bcl-2 (domínios I e II de homologia a Bcl-2).

A deleção do alongamento hidrófobo do terminal carboxilo de aminoácidos (resíduos 191-211) diminuiu parcialmente, mas não eliminou, a função de morte celular de Bak (mutante ΔC). Esta "cauda" hidrófoba serve provavelmente como uma sequência âncora de membrana em Bak. De facto, os estudos de imunofluorescência de ΔC em células COS transitoriamente transfectadas mostrou que a distribuição intracelular do mutante ΔC está alterada (citoplasmática difusa) relativamente ao Bak de tipo selvagem, que parece grandemente mitocondrial. A cauda hidrófoba de terminal carboxilo não é necessária para a função de morte celular de Bak, mas pode contribuir indirectamente, por assegurar a localização subcelular adequada da proteína.

Um segmento da proteína Bak abrangido pela deleção ΔGD (resíduos 82-94) é absolutamente necessário para a função de morte celular uma vez que este mutante é desprovido de actividade de morte celular no teste de transfecção transitória. A co-transfecção de β -gal com ΔGD de Bak rendeu, especificamente, tantas ou mais, células azuis relativamente à co-transfecção de β -gal com o plasmídeo de vector de controlo. A deleção de resíduos contíguos (aminoácidos 67-81) imediatamente N-terminais a este domínio reduziu, mas não eliminou, a actividade de morte celular (mutante ΔPS de Bak).

Todos os outros mutantes de deleção testados (com excepção de ΔC , acima discutido) estavam inalterados na sua capacidade para matar células. Quando tidos em conjunto, estes resultados indicam que um segmento co-linear (denominado o "domínio GD") definido pelos mutantes de deleção ΔGD e ΔPS (resíduos 67-94) é unicamente necessário para a função de morte celular de Bak detectada no teste transitório.

Para se determinar se o domínio GD é suficiente para a função de morte celular, foram testados dois derivados de proteína Bak truncados, PEM e QVG, correspondentes aos aminoácidos 58-103 e 73-123, respectivamente, quanto à actividade no teste de transfecção transitória. O QVG reduziu significativamente o número de células azuis quando co-transfectado com β -gal, o que indica que manteve alguma capacidade para matar células Rat-1. Embora a redução no número de células azuis esteja diminuída relativamente ao Bak de comprimento total, quer o PEM quer QVG, carecem de âncoras de membrana de terminal carboxilo e, por analogia ao mutante ΔC de Bak seria provável não exibirem função de morte celular total devido à localização subcelular alterada. De facto, o QVG era similar ao mutante ΔC de Bak relativamente à sua actividade. Num esforço para melhorar a capacidade de morte celular das espécies Bak truncadas, o elemento de cauda hidrófobo (aminoácidos 187-211) foi fundido nos terminais C de PEM e QVG (PEM+C e QVG+C, respectivamente). Em cada caso, a ligação da âncora de membrana putativa aumentou a capacidade dos mutantes Bak truncados para eliminar células azuis no teste de transfecção e resultou em actividade comparável ao Bak de tipo selvagem (Figura 2). Assim, estes resultados indicam que um domínio de proteína partilhado por PEM e QVG (resíduos 73-103) é suficiente para a função de morte celular de Bak.

iii. Identificação de domínios Bak que mediam a interacção com Bcl-x_L

A interacção física com outros membros da família Bcl-2, tal como Bcl-x_L, pode ser essencial para Bak exercer a sua função de morte celular ou pode regular a actividade de Bak. Por conseguinte, os domínios em Bak foram examinados para se determinar quais são necessários e/ou suficientes para a sua

actividade de ligação a Bcl-x_L. A interacção de Bak com Bcl-x_L foi medida quer por um teste de ligação a proteína *in vitro* quer por co-immunoprecipitação a partir de células transfectadas. O Bak marcado com ³⁵S traduzido *in vitro* ligase a uma proteína de fusão GST-Bcl-x_L expressa em bactérias sendo a especificidade desta interacção *in vitro* demonstrada pela incapacidade de Bak para se ligar a GST purificada isolada (Figura 3A). A interacção específica Bak/Bcl-x_L podia também ser detectada por co-transfecção de formas marcadas de epítipo de Bak e Bcl-x_L em células COS. O Bak foi imunoprecipitado a partir de lisados de células transfectadas e o Bcl-x_L associado foi detectado por análise de *Western blot* de proteínas co-precipitadas (Figura 3B). O Bcl-x_L não foi detectado em imunoprecipitados na ausência de Bak co-expresso, o que demonstra que a ligação é específica.

Os mutantes de deleção de Bak acima descritos foram testados quanto à sua capacidade de ligar Bcl-x_L, quer *in vitro* quer em células COS transfectadas, sendo os resultados sumariados na Figura 4. A deleção dos resíduos 82-94 (mutante ΔGD) eliminou completamente a capacidade de Bak para interagir com Bcl-x_L. A interacção com Bcl-x_L era também diminuída por deleção dos aminoácidos contíguos 67-81 (mutante ΔPS de Bak). Todos os outros mutantes de deleção testados, que abrangem a estrutura de leitura aberta Bak completa, mantiveram a capacidade para ligar Bcl-x_L nestes testes. Estes resultados identificam as sequências Bak abrangidas pelos mutantes ΔGD e ΔPS (no máximo, aminoácidos 67-94) como unicamente importantes na mediação da interacção com Bcl-x_L. A mesma região de Bak, o domínio GD, era necessária para a função de morte celular de Bak.

Para se determinar se a região de Bak definida por análise de deleção é suficiente para a função de ligação a proteína, testaram-se duas espécies de Bak truncadas pequenas (PEM e QVG), que abrangem os aminoácidos 58-103 e 73-123, respectivamente, quanto à sua capacidade para interagir com Bcl-x_L. Quer PEM quer QVG ligaram Bcl-x_L, o que indica que a região partilhada por estas duas espécies de Bak truncadas (aminoácidos 73-103) é suficiente para mediar a interacção com Bcl-x_L. Juntamente com a análise dos mutantes de deleção e espécies truncadas acima descritos, estes resultados

demonstram que as sequências de aminoácidos de Bak, que abrangem os resíduos 73-103, são ambas necessárias e suficientes para interação com Bcl-x_L. Como acima descrito, esta região está também implicada na função de morte celular de Bak, o que indica que a função de ligação a proteína pode estar ligada à função de morte celular.

iv. Os elementos de sequência funcionalmente significativa que se assemelham ao domínio GD estão presentes em Bax e Bipla

A análise mutacional de Bak, aqui descrita, demonstra que o domínio GD está unicamente envolvido nas actividades de morte celular e ligação a Bcl-x_L de Bak. Duas outras proteínas que interagem com Bcl-2, Bax e Bipla, têm propriedades funcionais que se assemelham às de Bak. Quer Bax quer Bipla eliminam células azuis quando co-transfectados com β -gal em células Rat-1, o que indica que eles também induzem apoptose neste contexto. Bax e Bipla interagem também especificamente com Bcl-x_L quer *in vitro* quer em células COS transfectadas. Estas similaridades funcionais induziram o exame quanto à partilha de quaisquer características estruturais por estas três proteínas que contribua para as suas funções biológicas similares. Tendo em vista a análise apresentada acima, Bax e Bipla, foram especificamente examinados para determinar se contêm sequências que se assemelhem ao domínio GD de Bak e que sejam também importantes para as suas actividades biológicas.

Bax apresenta homologia extensa aos membros da família Bcl-2 (incluindo Bak), com o maior grau de homologia de sequência centrado à volta de BH1 e BH2 (Oltvai, *et al.*, Cell 74: 609-619 (1993)). Um alongamento dos aminoácidos (59-73) N-terminais a BH1 em Bax possui homologia para as sequências (resíduos 74-88) no domínio GD de Bak (Figura 5). Por contrário a Bax, a sequência primária de Bipla não se assemelha aos parentes de Bcl-2 conhecidos, e carece de sequências homólogas a BH1 e BH2 que são características da família Bcl-2. No entanto, Bipla contém uma região (aminoácidos 57-71) que é homóloga ao mesmo elemento no domínio GD em Bak e Bax (Figura 5).

Os elementos do domínio GD de Bax e Bipla foram avaliados para determinar se eles também eram críticos para as funções de morte celular e ligação a proteínas destas proteínas. Foram

introduzidas, em Bax e Bipla, pequenas deleções que removeram os motivos de domínio GD conservados e os mutantes foram pesquisados quanto à sua capacidade para matar células Rat-1 e ligar a Bcl-x_L. Esta análise revelou que, similarmente a Δ GD de Bak, os mutantes Δ GD de Bax e Δ GD de Bipla estão diminuídos na sua capacidade para eliminar células azuis quando co-transfectados com β -gal em células Rat-1 (Figura 6). Adicionalmente, os dois mutantes não têm mais a capacidade para interagir com Bcl-x_L (Figura 6). Assim, a função do elemento do domínio GD é conservada em Bak, Bax e Bipla, e é crítica para as actividades biológicas de todas as três proteínas.

v. O domínio GD é suficiente para formação de homo e heterodímero

De forma a avaliar se o domínio GD media outras interacções proteína/proteína que podiam ser relevantes para a sua actividade biológica, fundiu-se uma porção de Bak (PEM) que abrange o domínio GD (resíduos 58-103) a GST, para criar GST-PEM. A Bcl-x_L, Bak, Bax e Bipla marcadas com ³⁵S, traduzidas *in vitro*, foram incubadas quer com GST isolada quer com proteína de fusão expressa em bactérias GST-PEM. As interacções do domínio GD com Bak e Bax foram essencialmente medidas como aqui descrito para ligação de Bak a Bcl-x_L. Os complexos foram capturados com pérolas de glutationa-agarose, lavados e as proteínas ligadas detectadas por electroforese em gel de poliacrilamida e autorradiografia.

Os resultados desta experiência são apresentados na Figura 6. Bcl-x_L, Bak e Bax interagem todos especificamente com GST-PEM, mas não com GST isolada. Estes resultados demonstram que o domínio GD de Bak é suficiente para ligar a Bak (homodimerização), Bax (heterodimerização com uma proteína assassina diferente) e Bcl-x_L (heterodimerização com uma proteína sobrevivente). Assim, o domínio GD é capaz de mediar interacções não só com Bcl-x_L, mas também com Bak e Bax. Ele não interage com Bipla.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

- (i) REQUERENTE: IMMUNOGEN, INC.
- (ii) TÍTULO DO INVENTO: NOVOS PÉPTIDOS E COMPOSIÇÕES QUE MODULAM A APOPTOSE
- (iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 34
- (iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:
 - (A) DESTINATÁRIO: Hale e Dorr
 - (B) RUA: 1455 Pennsylvania Avenue, N.W.
 - (C) CIDADE: Washington
 - (D) ESTADO: D.C.
 - (F) CÓDIGO POSTAL: 20004
- (v) FORMATO LEGÍVEL EM COMPUTADOR:
 - (A) TIPO DE MEIO: Disquete
 - (B) COMPUTADOR: Compatível com PC IBM
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versão #1.25
- (vi) DADOS DO PEDIDO ACTUAL:
 - (A) NÚMERO DO PEDIDO: A SER DESIGNADO
 - (B) DATA DE APRESENTAÇÃO: A PRESENTE
 - (C) CLASSIFICAÇÃO:
- (vii) DADOS DO PEDIDO ANTERIOR:
 - (A) NÚMERO DO PEDIDO: US 08/440391
 - (B) DATA DE APRESENTAÇÃO: 12 de Maio de 1995
 - (C) CLASSIFICAÇÃO:
- (viii) INFORMAÇÃO SOBRE REPRESENTANTE/AGENTE:
 - (A) NOME: HENRY N. WIXON
 - (B) NÚMERO DE REGISTO: 32073
 - (C) NÚMERO DE REFERÊNCIA DO AGENTE: 104322.147PCT
- (ix) INFORMAÇÃO PARA TELECOMUNICAÇÕES:
 - (A) TELEFONE: 202-942-8400
 - (B) TELEFAX: 202-942-8484

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 13 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1:

```
Gly Asp Asp Ile Asn Arg Arg Tyr Asp Ser Glu Phe Gln
          5                               10
```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 28 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:2:

```
Pro Ser Ser Thr Met Gly Gln Val Gly Arg Gln Leu Ala Ile Ile Gly
          5                               10                               15
Asp Asp Ile Asn Arg Arg Tyr Asp Ser Glu Phe Gln
          20                               25
```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 31 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:3:

```
Gln Val Gly Arg Gln Leu Ala Ile Ile Gly Asp Asp Ile Asn Arg Arg
          5                               10                               15
Tyr Asp Ser Glu Phe Gln Thr Met Leu Gln His Leu Gln Pro Thr
          20                               25                               30
```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 15 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:4:

Leu	Ser	Glu	Cys	Leu	Lys	Arg	Ile	Gly	Asp	Glu	Leu	Asp	Ser	Asn
				5					10					15

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:5:

Leu	Lys	Arg	Ile	Gly	Asp	Glu	Leu	Asp
				5				

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 26 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:6:

Gln	Asp	Ala	Ser	Thr	Lys	Lys	Leu	Ser	Glu	Cys	Leu	Lys	Arg	Ile	Gly
			5						10						15
Asp	Glu	Leu	Asp	Ser	Asn	Met	Glu	Leu	Gln						
			20						25						

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:7:

Leu	Ala	Leu	Arg	Leu	Ala	Cys	Ile	Gly	Asp	Glu	Met	Asp	Val	Ser
			5						10					15

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:11:

Ala Ala Pro Ala Asp Pro Glu Met Val Thr Leu Pro Leu Val
 5 10

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 36 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:12:

Leu Glu Cys Met Glu Gly Ser Asp Ala Leu Ala Leu Arg Leu Ala Cys
 5 10 15

Ile Gly Asp Glu Met Asp Val Ser Leu Arg Ala Pro Arg Leu Ala Gln
 20 25 30

Leu Ser Glu Val
 35

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 34 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:13:

Val Pro Gln Asp Ala Ser Thr Lys Lys Leu Ser Glu Cys Leu Lys Arg
 5 10 15

Ile Gly Asp Glu Leu Asp Ser Asn Met Glu Leu Gln Arg Met Ile Ala
 20 25 30

Ala Val

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:14:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 36 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:14:

```

Leu Gln Pro Ser Ser Thr Met Gly Gln Val Gly Arg Gln Leu Ala Ile
                    5                      10                      15

Ile Gly Asp Asp Ile Asn Arg Arg Tyr Asp Ser Glu Phe Gln Thr Met
                    20                      25                      30

Leu Gln His Leu
                    35

```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:15:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 93 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:15:

```

CAGGTGGGAC GGCAGCTCGC CATCATCGGG GACGACATCA ACCGACGCTA TGACTCAGAG
60

TTCCAGACCA TGTTGCAGCA CCTGCAGCCC ACG
93

```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:16:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 31 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:16:

```

Gln Val Gly Arg Gln Leu Ala Ile Ile Gly Asp Asp Ile Asn Arg Arg
                    5                      10                      15

Tyr Asp Ser Glu Phe Gln Thr Met Leu Gln His Leu Gln Pro Thr
                    20                      25                      30

```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:17:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
- (A) COMPRIMENTO: 84 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:17:

CCTAGCAGCA CCATGGGGCA GGTGGGACGG CAGCTCGCCA TCATCGGGGA CGACATCAAC
60

CGACGCT ATGACTCAGA GTTCCAG

84

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:18:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
- (A) COMPRIMENTO: 28 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:18:

Pro Ser Ser Thr Met Gly Gln Val Gly Arg Gln Leu Ala Ile Ile Gly
5 10 15

Asp Asp Ile Asn Arg Arg Tyr Asp Ser Glu Phe Gln
20 25

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:19:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
- (A) COMPRIMENTO: 45 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:19:

GTGGGACGGC AGCTCGCCAT CATCGGGGAC GACATCAACC GACGC

45

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:20:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 15 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:20:

Val	Gly	Arg	Gln	Leu	Ala	Ile	Ile	Gly	Asp	Asp	Ile	Asn	Arg	Arg
				5				10						15

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:21:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 39 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:21:

GGGGACGACA	TCAACCGACG	CTATGACTCA	GAGTTCCAG
39			

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:22:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 13 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:22:

Gly	Asp	Asp	Ile	Asn	Arg	Arg	Tyr	Asp	Ser	Glu	Phe	Gln
				5				10				

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:23:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 78 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:23:

CAGGATGCGT CCACCAAGAA GCTGAGCGAG TGTCTCAAGC GCATCGGGGA CGAACTGGAC
60

AGTAACATGG AGCTGCAG

78

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:24:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 26 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:24:

Gln Asp Ala Ser Thr Lys Lys Leu Ser Glu Cys Leu Lys Arg Ile Gly
5 10 15

Asp Glu Leu Asp Ser Asn Met Glu Leu Gln
20 25

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:25:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 45 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:25:

CTGAGCGAGT GTCTCAAGCG CATCGGGGAC GAACTGGACA GTAAC
45

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:26:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:26:

Leu	Ser	Glu	Cys	Leu	Lys	Arg	Ile	Gly	Asp	Glu	Leu	Asp	Ser	Asn
				5					10					15

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:27:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 27 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:27:

CTCAAGCGCA TCGGGGACGA ACTGGAC
27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:28:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:28:

Leu Lys Arg Ile Gly Asp Glu Leu Asp
5

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:29:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 84 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:29:

TGCATGGAGG GCAGTGACGC ATTGGCCCTG CGGCTGGCCT GCATCGGGGA CGAGATGGAC
60

GTGAGCCTGA GGGCCCCGCG CCTG
84

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:30:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 (A) COMPRIMENTO: 28 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:30:

Cys	Met	Glu	Gly	Ser	Asp	Ala	Leu	Ala	Leu	Arg	Leu	Ala	Cys	Ile	Gly
				5					10					15	
Asp	Glu	Met	Asp	Val	Ser	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Leu				
			20					25							

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:31:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 (A) COMPRIMENTO: 45 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADEIA: simples
 (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:31:

TTGGCCCTGC GGCTGGCCTG CATCGGGGAC GAGATGGACG TGAGC
 45

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:32:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 (A) COMPRIMENTO: 15 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:32:

Leu	Ala	Leu	Arg	Leu	Ala	Cys	Ile	Gly	Asp	Glu	Met	Asp	Val	Ser
				5					10					15

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:33:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 (A) COMPRIMENTO: 15 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADEIA: simples
 (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:33:

ATCGGGGACG AGATG

15

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:34:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 5 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:34:

Ile Gly Asp Glu Met

5

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Péptido isolado consistindo numa proteína truncada seleccionada do grupo constituído por Bak, Bax e Bipla ou um seu mutante, caracterizado por o péptido compreender o domínio GD e exibir actividade de morte celular e ligação a Bcl-x_L; sendo o domínio GD de Bak QLAIIGDDIN, sendo o domínio GD de Bax CLKRIGDELD e sendo o domínio GD de Bipla RLACIGDEMD.

2. Péptido isolado e purificado tendo uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo constituído por:

GDDINRRYDSEFQ, [SEQ ID NO:1]

PSSTMGQVGRQLAIIGDDINRRYDSEFQ, [SEQ ID NO:2]

QVGRQLAIIGDDINRRYDSEFQTMLQHLQPT, [SEQ ID NO:3]

LSECLKRIGDELDSN, [SEQ ID NO:4]

LKRIGDELD, [SEQ ID NO:5]

QDASTKKLSECLKRIGDELDSNMELQ, [SEQ ID NO:6]

LALRLACIGDEMDVS, [SEQ ID NO:7]

IGDEM, [SEQ ID NO:8]

CMEGSDALALRLACIGDEMDVSLRAPRL, [SEQ ID NO:9]; e

VGRQLAIIGDDINRR, [SEQ ID NO:10].

3. Polinucleótido isolado constituído por uma sequência nucleotídica que codifica um péptido de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, ou uma sequência nucleotídica que lhe é complementar.

4. Polinucleótido de acordo com a reivindicação 3, tendo uma sequência nucleotídica seleccionada a partir de SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31 ou SEQ ID NO:33.

5. Molécula de ADN recombinante isolada constituída essencialmente por uma sequência nucleotídica de acordo com a reivindicação 3 ou a reivindicação 4.

6. Vector constituído essencialmente por uma molécula de ADN recombinante de acordo com a reivindicação 5.

7. Vector compreendendo uma molécula de ADN recombinante de acordo com a reivindicação 5, em que o referido vector

expressa um ARN anti-sentido.

8. Célula hospedeira transformada com o vector de acordo com a reivindicação 6 ou a reivindicação 7, em que, opcionalmente, a referida célula hospedeira é, uma célula de mamífero.

9. Método para produção de péptido isolado de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, compreendendo:

- a) a construção de um vector de acordo com a reivindicação 6;
- b) a transformação de uma célula hospedeira adequada com o vector do passo (a);
- c) a cultura da célula hospedeira sob condições que permitem a expressão do péptido pela célula hospedeira; e
- d) o isolamento do péptido expresso pela célula hospedeira do passo (c);

em que se produz o péptido isolado e em que, opcionalmente, a célula hospedeira é uma célula de mamífero.

10. Anticorpo criado contra um péptido de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, em que, de preferência, o anticorpo é seleccionado do grupo constituído por um anticorpo policlonal e um anticorpo monoclonal.

11. Anticorpo de acordo com a reivindicação 10, em que o anticorpo é detectavelmente marcado, em que, de preferência, o marcador detectável é seleccionado do grupo constituído por: um marcador radioactivo, um marcador enzimático, um marcador de cofactor, um marcador fluorescente, um marcador paramagnético, um marcador quimioluminescente e um marcador metálico.

12. Sonda nucleotídica detectavelmente marcada, compreendendo uma primeira sequência nucleotídica que é substancialmente complementar a uma segunda sequência nucleotídica que codifica um péptido de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2.

13. Composição farmacêutica compreendendo um péptido de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

14. Método de identificação de um agente capaz de modular a heterodimerização mediada por domínio GD, compreendendo:

a realização de um teste de heterodimerização que inclui uma primeira e uma segunda proteínas ou polipéptidos em que o domínio GD é caracterizado por qualquer uma das sequências em SEQ ID NO:2, 4, 6, 7, 9 e 10 e em que a referida primeira e segunda proteínas ou polipéptidos são diferentes, e um agente;

a determinação se o referido agente inibe ou aumenta a heterodimerização da referida primeira proteína ou polipéptido com a referida segunda proteína ou polipéptido;

em que, se for determinada inibição ou aumento de heterodimerização, isso indica que o referido agente é capaz de modular a heterodimerização mediada por domínio GD.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, em que a referida proteína ou polipéptido é seleccionada do grupo constituído por Bak, Bcl-x_L, Bax e Bipla.

16. Método de identificação de um agente capaz de modular a homodimerização mediada por domínio GD, compreendendo:

a realização de um teste de homodimerização que inclui uma primeira e uma segunda proteínas ou polipéptidos em que o domínio GD é caracterizado por qualquer uma das sequências em SEQ ID NO:2, 4, 6, 7, 9 e 10 e em que as referidas primeira e segunda proteínas ou polipéptidos são iguais, e um agente;

a determinação se o referido agente inibe ou aumenta a homodimerização da referida primeira proteína ou polipéptido com a referida segunda proteína ou polipéptido;

em que, se for determinada inibição ou aumento de homodimerização, isso indica que o referido agente é capaz de modular a homodimerização mediada por domínio GD.

17. Agente seleccionado a partir de péptidos de domínio GD e seus miméticos, fragmentos, equivalentes funcionais e/ou híbridos ou mutantes, assim como vectores contendo ADNc que codifica qualquer um dos anteriores, identificado pelo método de acordo com a reivindicação 14 ou a reivindicação 16 para utilização na terapêutica de desordens degenerativas quando administrado isoladamente ou em combinação com, e/ou simultaneamente com, outros fármacos adequados.

18. Utilização de um anticorpo contra um péptido de domínio GD seleccionado a partir de SEQ ID NO:1 a 10, para pesquisar uma biblioteca de expressão de ADNc ou clones compreendendo inserções de ADN que codificam proteínas cruzadamente imunorreactivas.

19. Agente de acordo com a reivindicação 17, compreendendo uma molécula capaz de se ligar a uma proteína anti-apoptótica seleccionada do grupo constituído por Bcl-2 e Bcl-x_L, em que a ligação induz ou modula o estado apoptótico de uma célula.

20. Péptido compreendendo o domínio GD seleccionado a partir do grupo constituído por SEQ ID NO:3, aminoácidos 58-103 e aminoácidos 73-123 de Bak, substancialmente equivalente ao de Bak de tipo selvagem.

21. Péptido de acordo com a reivindicação 1, a reivindicação 2 ou a reivindicação 20, para utilização como um produto farmacêutico.

22. Utilização de um péptido de acordo com a reivindicação 1, a reivindicação 2 ou a reivindicação 20, no fabrico de um medicamento para o tratamento de desordens degenerativas caracterizadas por divisão celular inadequada ou morte celular inadequada.

Lisboa,

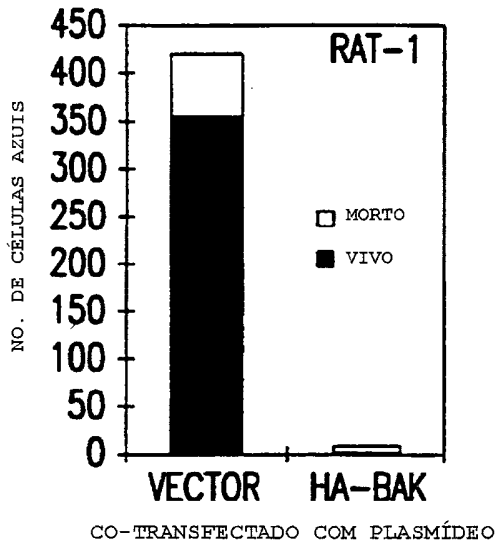


FIG.1A

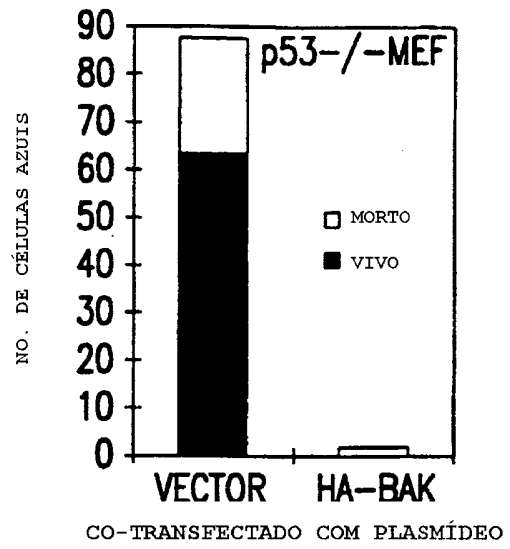


FIG.1B

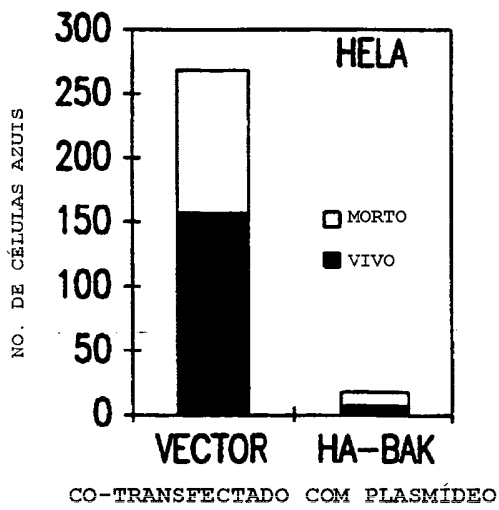


FIG.1C

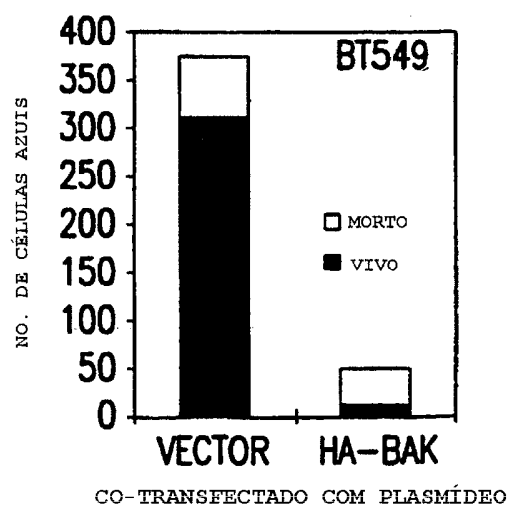


FIG.1D

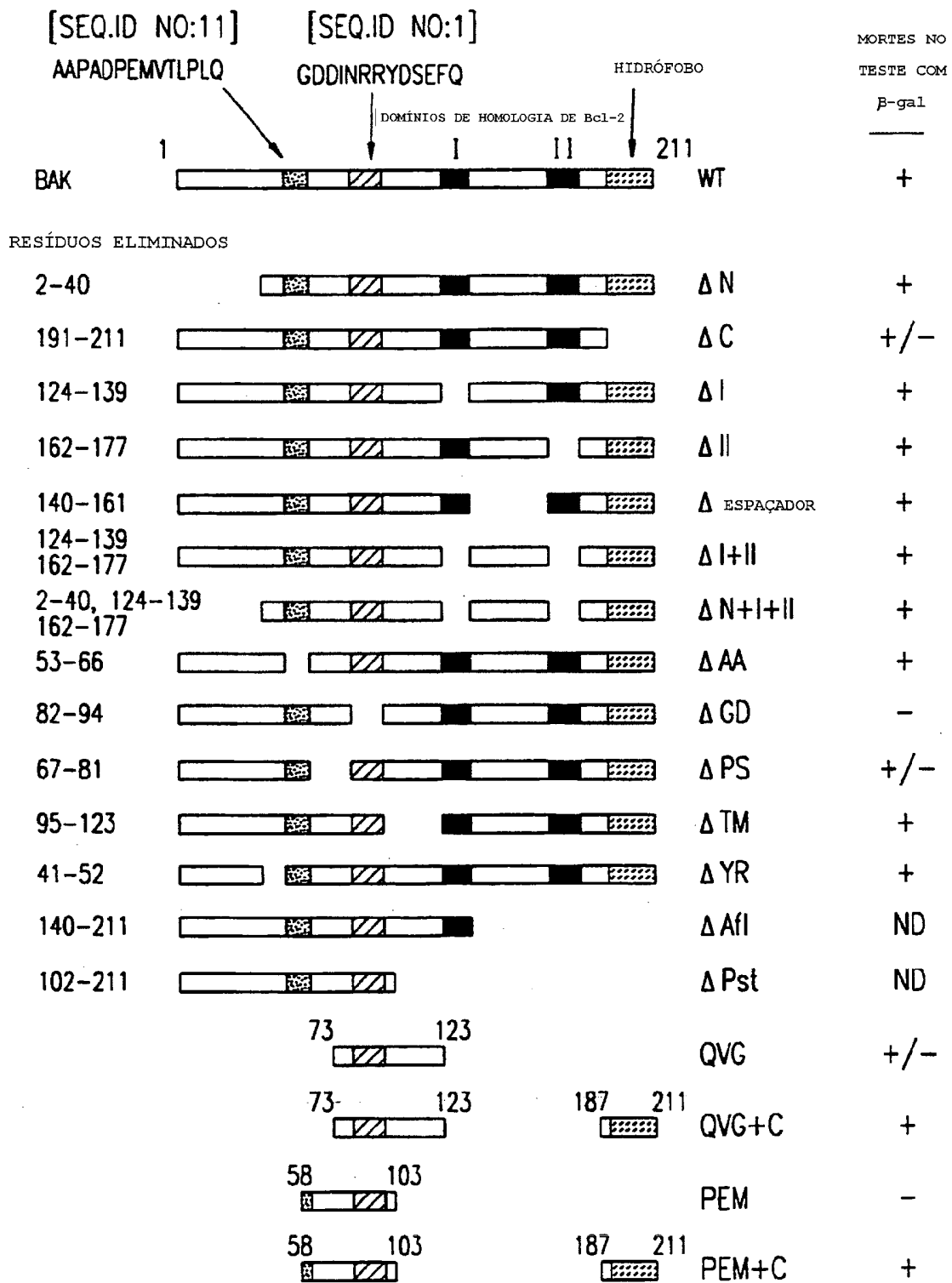


FIG.2

Interação de Bak com GST-Bcl-xL in vitro



FIG.3A

Interação de Bak com Bcl-xL em células COS

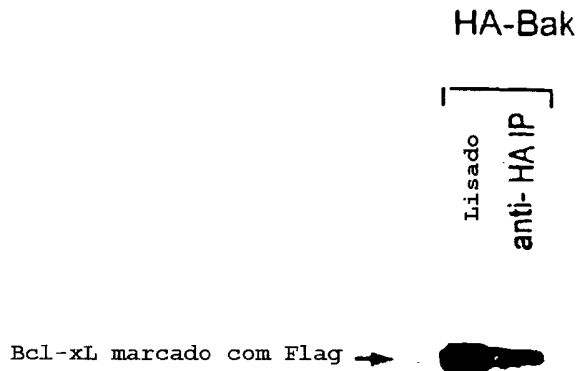


FIG.3B

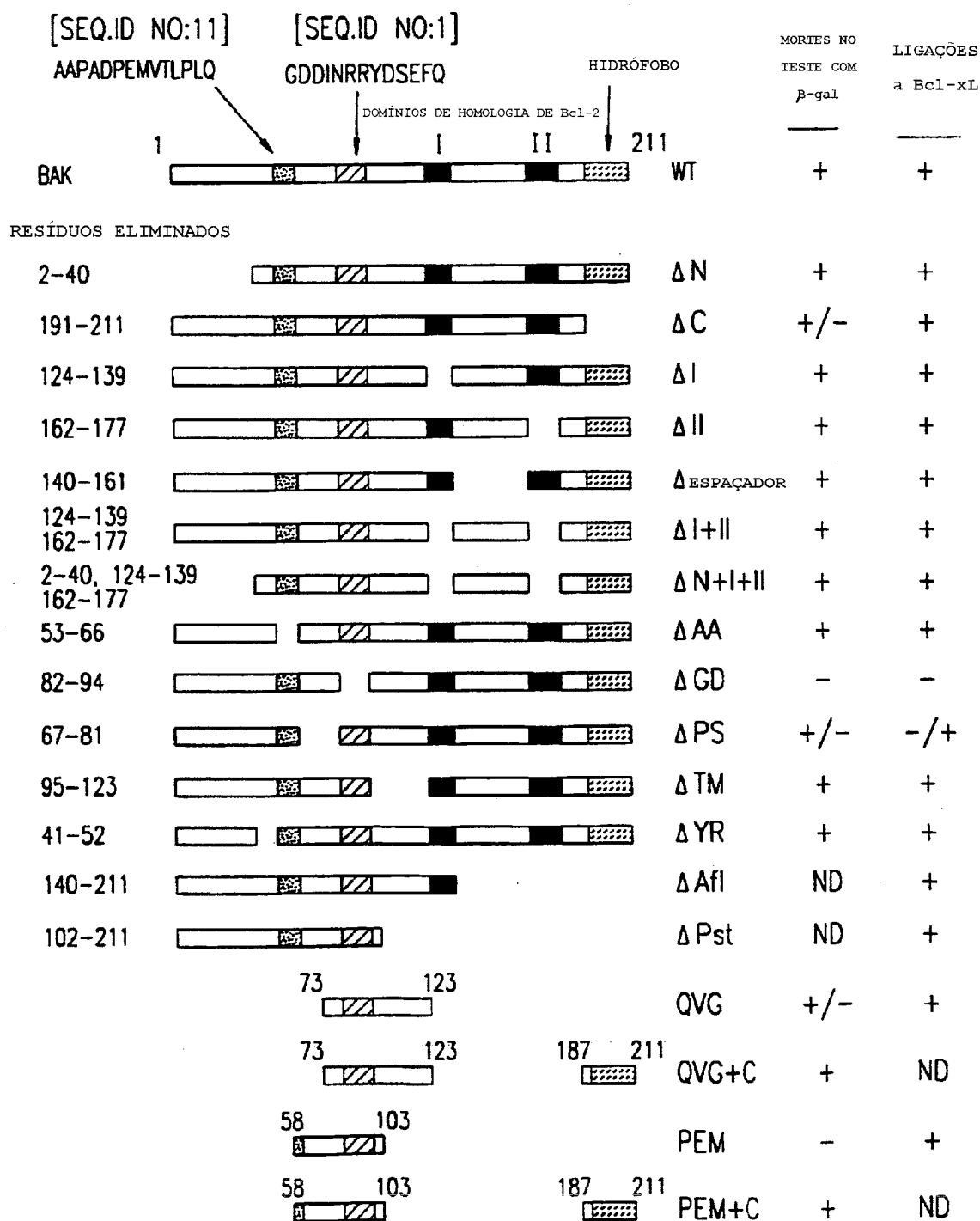


FIG.4

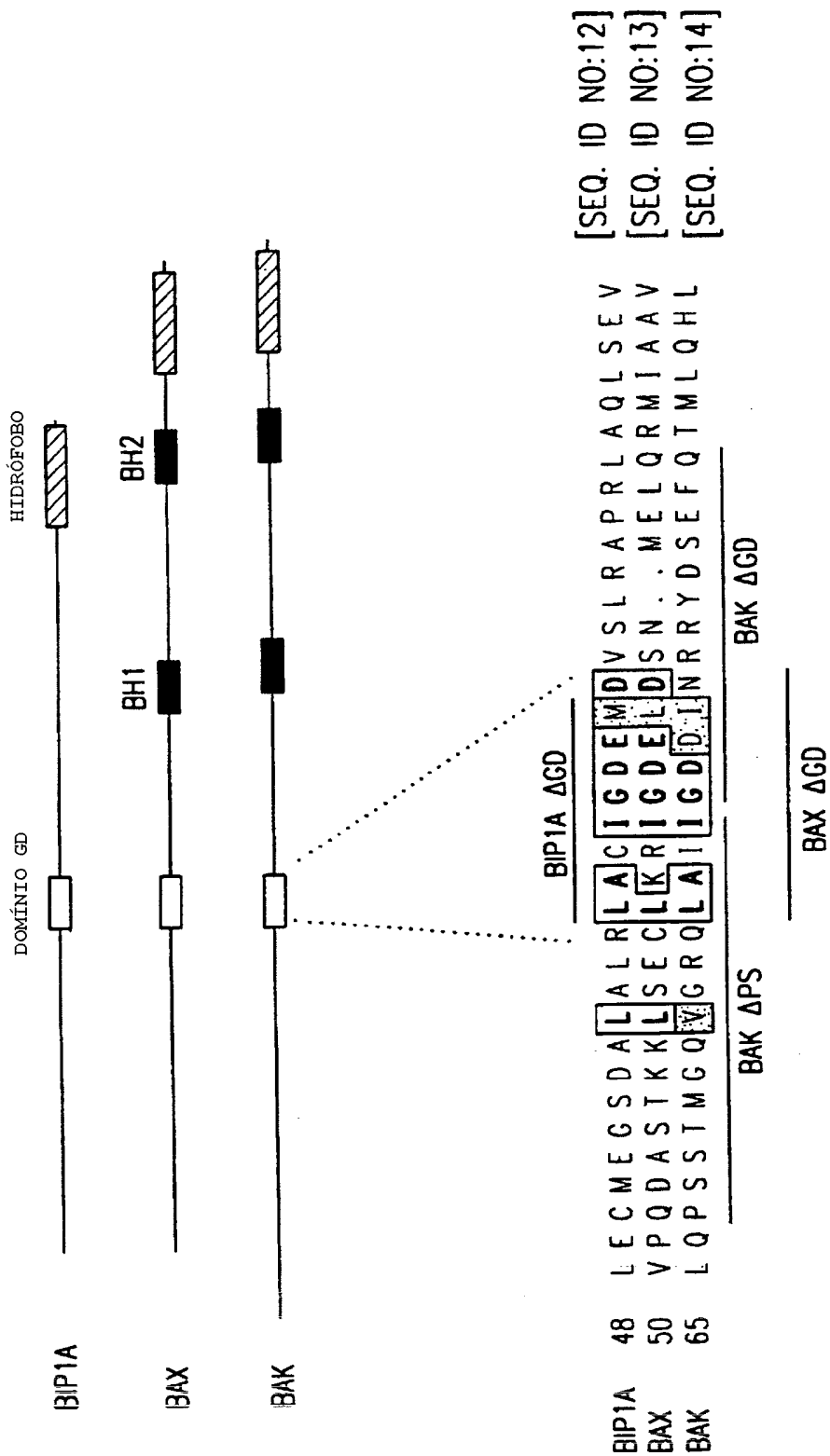


FIG.5

PLASMÍDEO	ACTIVIDADE DE MORTE CELULAR RAT-1	ACTIVIDADE DE LIGAÇÃO A Bcl-XL
Bak	+	+
Bak ΔPS	+/-	-/+
Bak ΔGD	-	-
Bax	+	+
Bax ΔGD	-	-
Bip1a	+	+
Bip1a ΔGD	+/-	-

FIG.6

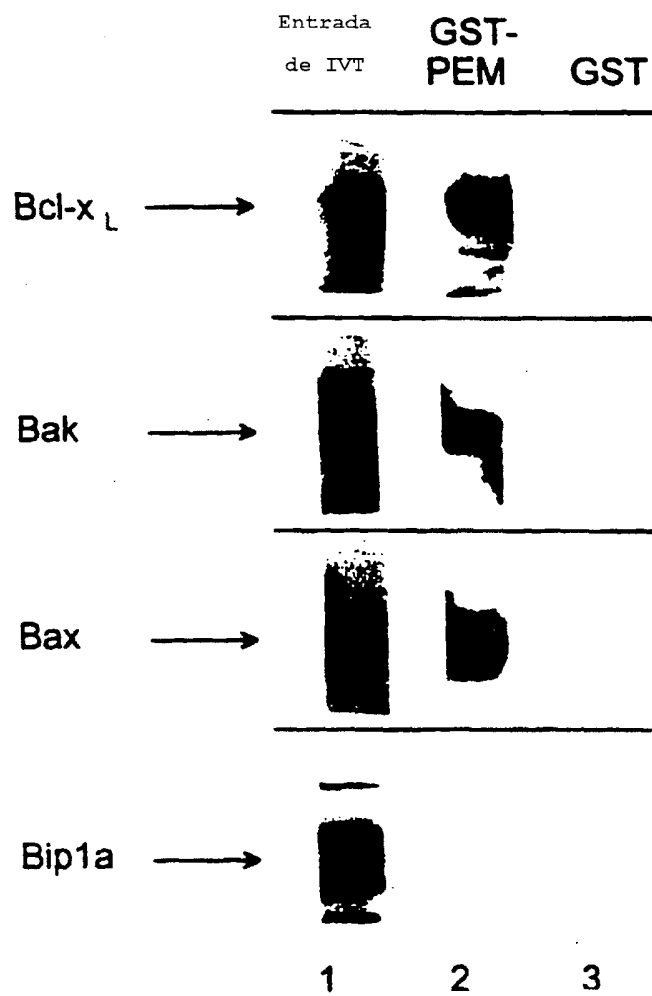


FIG.7

Bak

	220	230	240	250	260	270	
	*	*	*	*	*	*	
1.	CAG GTG GGA CGG CAG CTC GCC ATC ATC GGG GAC GAC ATC AAC CGA CGC TAT GAC TCA						
Z3	Q V G R Q L A I I G D D I N R R Y D S						
	280	290	300				
	*	*	*				
	GAG TTC CAG ACC ATG TTG CAG CAC CTG CAG CCC ACG						[SEQ. ID NO: 15]
	E F Q T M L Q H L Q P T				103		[SEQ. ID NO: 16]
	200	210	220	230	240	250	
	*	*	*	*	*	*	
2.	CCT AGC AGC ACC ATG GGG CAG GTG GGA CGG CAG CTC GCC ATC ATC GGG GAC GAC ATC						
67	P S S T M G Q V G R Q L A I I G D D I						
	260	270	280				
	*	*	*				
	AAC CGA CGC TAT GAC TCA GAG TTC CAG						[SEQ. ID NO: 17]
	N R R Y D S E F Q			94			[SEQ. ID NO: 18]
	220	230	240	250	260		
	*	*	*	*	*		
3.	GTG GGA CGG CAG CTC GCC ATC ATC GGG GAC GAC ATC AAC CGA CGC						
Z4	V G R Q L A I I G D D I N R R				88		[SEQ. ID NO: 19]
							[SEQ. ID NO: 20]

FIG. 8A

250 * 260 * 270 * 280 *
 4. GGG GAC GAC ATC AAC CGA CGC TAT GAC TCA GAG TTC CAG
 82 G D D I N R R Y D S E F Q 94
 [SEQ. ID NO: 21]
 [SEQ. ID NO: 22]

Bax
 160 * 170 * 180 * 190 * 200 * 210 *
 5. CAG GAT GCG TCC ACC AAG AAG CTG AGC GAG TGT CTC AAG CGC ATC GGG GAC GAA CTG
 52 Q D A S T K K L S E C L K R I G D E L

220 * 230 *
 GAC AGT AAC ATG GAG CTG CAG
 D S N M E L Q ZZ
 [SEQ. ID NO: 23]
 [SEQ. ID NO: 24]

180 * 190 * 200 * 210 *
 6. CTG AGC GAG TGT CTC AAG CGC ATC GGG GAC GAA CTG GAC AGT AAC
 59 L S E C L K R I G D E L D S N Z3
 [SEQ. ID NO: 25]
 [SEQ. ID NO: 26]

FIG. 8B

190 * 200 * 210 *
 7. CTC AAG CGC ATC GGG GAC GAA CTG GAC [SEQ. ID NO: 27]
 L K R I G D E L D ZI [SEQ. ID NO: 28]

Bipla

150 * 160 * 170 * 180 * 190 * 200 *
 8. TGC ATG GAG GGC AGT GAC GCA TTG GCC CTG CGG CTG GCC TGC ATC GGG GAC GAG ATG
 C M E G S D A L A L R L A C I G D E M

210 * 220 * 230 * [SEQ. ID NO: 29]
 GAC GTG AGC CTC AGG GCC CCG CGC CTG [SEQ. ID NO: 30]
 D V S L R A P R L ZZ

170 * 180 * 190 * 200 * 210 *
 9. TTG GCC CTG CGG CTG GCC TGC ATC GGG GAC GAG ATG GAC GTG AGC [SEQ. ID NO: 31]
 L A L R L A C I G D E M D V S ZI [SEQ. ID NO: 32]

190 * 200 *
 10. ATC GGG GAC GAG ATG [SEQ. ID NO: 33]
 I G D E M 68 [SEQ. ID NO: 34]

FIG. 8C