



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 1010941-2 B1**



**(22) Data do Depósito:** 21/05/2010

**(45) Data de Concessão:** 22/06/2021

**(54) Título:** USO DE UM ESTABILIZADOR DE ANEL DE DINAMINA

**(51) Int.Cl.:** A61K 31/275; A61K 31/404; A61K 31/352; A61P 13/12.

**(30) Prioridade Unionista:** 21/05/2009 US 61/180,261.

**(73) Titular(es):** CHILDREN'S MEDICAL RESEARCH INSTITUTE; THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION.

**(72) Inventor(es):** PHILLIP J. ROBINSON; SANJA SEVER.

**(86) Pedido PCT:** PCT AU2010000677 de 21/05/2010

**(87) Publicação PCT:** WO 2010/132959 de 25/11/2010

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 21/11/2011

**(57) Resumo:** MÉTODOS PARA PROMOVER A FORMAÇÃO DE ANEL DE DINAMINA E/OU A MANUTENÇÃO DE ANÉIS DE DINAMINA EM UMA CÉLULA, PARA PROFILAXIA OU TRATAMENTO DE UMA DOENÇA OU CONDIÇÃO RENAL, E DE DISFUNÇÃO DOS PODÓCITOS, PARA INDUZIR ADESÕES FOCAIS E/OU CITOESQUELETO DE ACTINA EM UMA CÉLULA, E DE TRIAGEM DE UMA AGENTE DE TESTE PARA USO COMO UM ESTABILIZADOR DE ANEL DE DINAMINA, ESTABILIZADOR DE ANEL DE DINAMINA, E, USO DE PELO MENOS UM ESTABILIZADOR DE ANEL DE DINAMINA É provido um método para promover formação de anel de dinamina e/ou manutenção de anéis de dinamina em uma célula compreendendo tratar a célula com uma quantidade eficaz de um estabilizador de anel de dinamina, ou uma prodroga ou uma sal farmacologicamente aceitável do estabilizador de anel de dinamina. A manutenção ou acumulação da formação do anel de dinamina tem aplicação particular na profilaxia ou tratamento de uma doença ou condição renal distinguido por proteinúria. O estabilizador de anel de dinamina pode ser qualquer agente que interage com dinamina para promover montagem de anel de dinamina e/ou inibir desmontagem de anel de dinamina. São também providos métodos para profilaxia ou tratamento de manutenção e/ou disfunção ou induzir (...).

## USO DE UM ESTABILIZADOR DE ANEL DE DINAMINA

### **CAMPO DA INVENÇÃO**

[0001] A presente invenção refere-se ao uso de uma classe de agentes denominados no presente documento como “estabilizadores de anel de dinamina” para promover a formação de, e/ou manter, anéis de dinamina estáveis nas células. A invenção tem aplicação particular na profilaxia ou tratamento de doenças ou condições renais caracterizadas por proteinúria.

### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

[0002] A epidemia global de doença renal crônica (CKD) está progredindo a uma taxa alarmante. Até 11% da população geral é afetada nos Estados Unidos, Austrália, Japão e Europa. Há um constante aumento simultâneo da diabetes tipo II e de suas complicações renais associadas, particularmente na Índia, China e no Sudeste da Ásia, e doenças relacionadas ao rim estão iludindo os recursos e opções de tratamento atuais. Os dados genéticos e histológicos implicam fortemente disfunção de podócitos na doença glomerular (Susztak e Bottinger 2006; Tryggvason et al. 2006).

[0003] Um dos casos mais recentes que marcam a disfunção de podócitos é a interrupção de processos podálicos (FP) e diafragmas de fenda, os quais são considerados causadores de fusão de processo podálico e proteinúria (Susztak e Bottinger, 2006). Na maioria dos casos de CKD, o primeiro sinal clínico é proteinúria. Se essas mudanças estruturais precoces nos podócitos não são revertidas, ocorre dano severo progressivo, levando à separação de podócitos da membrana basal glomerular (GBM). Isso resulta em cicatrização, obliteração do espaço urinário, e desenvolvimento de glomerulosclerose segmentar e falha renal de estágio renal. A reorganização do citoesqueleto de actina que liga o diafragma de fenda, o domínio apical e placa única, serve como um denominador comum durante extinção do processo podálico (FP). Deste modo, um melhor entendimento de mecanismos que controlam a formação do processo podálico na saúde e na

doença é essencial projetar melhores diagnósticos e terapias precoces que intervêm, enquanto o dano permanente ainda pode ser evitável.

[0004] A filtração renal ocorre no glomérulo, uma estrutura especializada que assegura seletividade do filtro do rim de modo que água, eletrólitos e produtos residuais sejam passados pelo espaço urinário, enquanto proteínas de plasma essencial são retidas no sangue. Um sinal de disfunção glomerular é a perda de proteína na urina denominada proteinúria ou síndrome nefrótica (definida como perda de proteína que excede 3,5 gramas/dia). A proteinúria leva frequentemente à falha renal progressiva, exigindo eventualmente diálise ou transplante de rim. Junto com a GBM e as células endoteliais glomerulares, os podócitos formam um componente chave da barreira de permeabilidade do rim. A função do podócito depende de uma estrutura celular complexa, que consiste em um corpo celular, bem como processos mais importantes e processos podálicos (FP) conforme descrito acima. Os FPs de um podócito são inter-digitados com aqueles em sua proximidade, e o espaço intercelular entre processos podálicos adjacentes é ligado em ponto por um diafragma de fenda composto pela proteína nefrina, que também representa a barreira final para a perda de proteína. Deste modo, a lesão ao podócito está fortemente correlacionada à proteinúria.

[0005] Os FPs de podócito contêm um citoesqueleto à base de actina dinâmico e elaborado que é essencial para sua morfogênese de membrana e para o estabelecimento e manutenção da barreira de filtração no rim (Faul et al. 2007). Os FPs contêm um aparelho contrátil à base de microfilamento composto de actina, miosina II,  $\alpha$ -actinina, talina e vinculina, que está ligado à GBM em contatos focais por um complexo  $\alpha 3 \beta 1$  de integrina (Faul et al. 2007). A actina do FP é organizada em duas formas principais: a rede cortical similar a podossoma de filamentos de actina ramificados curtos, e fibras de tensão compostas de um núcleo de actina:miosina que ocupa o centro do FP (Ichimura et al. 2003). A estrutura de FP parece ter sido melhorada para

reorganizações morfológicas acionadas por actina constantes, que são essenciais para filtração glomerular (Moeller e Holzman 2006).

[0006] A maioria das formas de proteinúria e síndrome nefrótica envolve uma redução de extensões de membrana de podócito e transformação de FPs de podócito em uma banda de citoplasma (isto é, extinção de FP). As mudanças na morfologia de FP são acionadas primariamente através da reorganização de citoesqueleto de actina, que condensa em um feixe espesso contra o solado de processos podálicos de podócito. Inúmeras proteínas alteram direta ou indiretamente a organização citoesquelética de podócito. Por exemplo, as mutações em  $\alpha$ -actinina-4, que causa uma forma adquirida tardiamente de glomerulosclerose segmentar focal (FSGS), revelaram a importância de proteínas de ligação de actina estrutural para função de podócito (Kaplan et al. 2000). Os sinais que originam no diafragma de fenda podem influenciar diretamente o citoesqueleto de actina nos podócitos (Jones et al. 2006; Moeller et al. 2004).

[0007] Relatou-se que recuperação de aderência focal celular é mediada através de endocitose dependente de clatrina-dinamina de integrinas  $\beta$ 1 ativadas, e que a inativação da dinamina II ou de ambos os adaptadores de clatrina AP-2 e desativado-2 (DAB2) bloqueia a internalização de integrina  $\beta$ 1, levando à desmontagem da aderência focal enfraquecida e migração celular (Chao e Kunz, 2009).

[0008] A extinção de FP durante síndrome nefrótica é um evento migratório (Reiser et al. 2004). Os podócitos cultivados contêm todas as três categorias mais importantes de estruturas de actina necessárias para migração celular: lamelipodia, filopodia e fibras de tensão de actina contráteis. Os podócitos cultivados também expressam todas as características de marcadores de diferenciação conhecidas de podócitos incluindo: nefrina, podocina, CD2AP, sinaptopodina, bem como componentes conhecidos do diafragma de fenda como ZO-1, P-caderina,  $\alpha$ -,  $\beta$ -, e  $\gamma$ -catenina (Mundel et

al. 1997;Saleem et al. 2002). De fato, os podócitos têm sido extensivamente usados para estudar proteínas de agrupamento e de ligação de actina conhecidas (por exemplo,  $\alpha$ -actinina 4 e sinaptopodina (Asanuma et al. 2005;Asanuma et al. 2006). A rede de actina cortical que sustenta a formação de lamelipodia e filopodia em podócitos cultivados parece ser equivalente à rede de actina de ramificação curta nas proximidades da membrana de plasma observada por EM em podócitos *in vivo* (Ichimura et al. 2003). De modo similar, fibras de tensão de actina-miosina observadas em podócitos cultivados são provavelmente equivalentes a fibras de tensão não ramificadas que ocupam o centro de FP *in vivo* (Ichimura et al. 2003).

[0009] As dinâmicas citoesqueléticas são controladas frequentemente pela família Rho de pequenas GTPases. Na borda principal de células, Rac1 e Cdc42 promovem mobilidade celular através da formação de actina cortical, que, por sua vez, promove mobilidade através da formação de lamelipodia e filopodia, respectivamente. Em contraste, RhoA promove a formação de fibras de tensão contendo actina-miosina contráteis no corpo celular. A sinalização RhoA têm uma função importante na regulação do citoesqueleto de actina em podócitos. Deste modo, sinaptopodina, uma proteína de ligação de actina expressa em podócitos (Mundel et al. 1997) induz formação de fibra de estresse através da extensão do tempo de vida de RhoA ativa (Asanuma et al. 2006). As funções exatas de sinalização Rac1 e Cdc42 para função e estrutura de podócitos são menos bem compreendidos.

[0010] Relatou-se que, em alguns modelos de ratos de síndrome nefrótica, a preservação de dinamina é suficiente para neutralizar estágios precoces de extinção de processos podálicos e proteinúria (Sever et al. 2007). A dinamina é uma grande enzima GTPase que rompe vesículas revestidas com clatrina ligadas por membrana. A trajetória endocítica mediada por clatrina é de interesse especial para pesquisadores biomédicos devido ao fato de estar envolvida na internalização de receptores ativados, sequestrando

fatores de crescimento, apresentação de antígeno, citocinese, transmissão sináptica e como uma rota de entrada para uma variedade de patógenos. A dinamina compreende três isoformas mais importantes: dinamina I (neurônios); dinamina II (ubíqua) e dinamina III (neurônios e testes) (Cousin e Robinson 2001). Comum a todos os cinco domínios, um domínio GTPase (necessário para fissão de vesícula), um domínio mediano (MD, de função desconhecida), domínio de homologia à pleckstrina (PH, endereçamento de domínio e potencialmente um módulo inibitório de GTPase), um domínio efetor de GTPase (GED, que controla automontagem de dinamina em anéis), e um domínio rico em prolina (PRD, que interage com proteínas que contêm um domínio SH3 e é o sítio principal para fosforilação de dinamina I e III *in vivo*).

[0011] A dinamina é mais bem conhecida para suas funções na endocitose mediada por clatrina na membrana de plasma e endocitose de vesícula sináptica em neurônios (Sever et al. 2000b). Inúmeros estudos indicam que a dinamina tem funções adicionais, incluindo regulação do citoesqueleto de actina através de mecanismos moleculares que são compreendidos de forma insatisfatória (Schafer 2004). A função da dinamina na regulação do citoesqueleto de actina é atribuída a suas interações com proteínas regulatórias e de ligação de actina conhecidas como profilina, Nck e cortactina (Orth e McNiven 2003; Schafer 2004). Um estudo anterior também indicou que a dinamina é essencial para a formação de FPs funcionais em podócitos (Sever et al. 2007).

[0012] A dinamina exibe características bioquímicas exclusivas distintas de outras GTPases, como peso molecular elevado (MW=100 kDa) e afinidade atipicamente baixa para GTP ( $K_m = \sim 10 \mu M$ ). A dinamina existe nos três estados principais - basal, anel ou hélice- e sua atividade GTPase aumenta em etapas após transição para cada estado. Mais particularmente:

a) Em seu estado “basal”, a dinamina está em equilíbrio entre

monômero, dímeros e homotetrâmeros (Muhlberg et al. 1997), e tem uma taxa de GTPase “basal” de  $\sim 1 \text{ min}^{-1}$ .

b) Os dímeros ou tetrâmeros de dinamina podem adicionalmente se auto montar em estruturas de ordem mais elevada semelhante a “anéis” que têm um diâmetro externo de cerca de 50 nm e uma abertura interna de cerca de 30 nm (Hinshaw e Schmid, 1995). Isso ocorre tipicamente acima de 500 nM de dinamina *in vitro*. Os anéis não estão sempre fechados e o diâmetro pode variar entre os sistemas. A formação de anel é promovida por diálise de dinamina em tampões de sal inferior e ocorre com concentrações elevadas de dinamina de cerca de 0,5 a 1 micromolar. A formação de anel estimula a atividade GTPase de dinamina cerca de 10 vezes (Warnock et al. 1996). O aumento na taxa de hidrólise de GTP se dá devido à ativação de GTPase intramolecular que ativa o domínio na dinamina que se torna ativa apenas quando os tetrâmeros de dinamina se resumem (Sever et al. 1999). Relatou-se que um mutante de dinamina está previsto viver mais sob a forma de anel - dynR725A é um mutante debilitado na taxa estimulada de hidrólise de GTP (Sever et al. 2000a).

c) Na presença de um modelo de montagem, a dinamina pode montar adicionalmente em uma “hélice” *in vitro*. As modelos de montagem de hélice incluem lipossomas de fosfolipídeo, nanotubos de lipídeos ou microtúbulos. A hélice parece ser uma extensão da estrutura de anel individual em uma estrutura helicoidal altamente alongada, como uma mola. A formação de hélice estimula atividade GTPase de dinamina 100 a 1000 vezes (Warnock et al. 1996). A taxa estimulada de hidrólise de GTP, por sua vez, aciona a desmontagem dinamina *in vitro*, e leva à perda de cooperatividade positiva para ligação de GTP (Sever et al. 2006).

[0013] Há um novo campo emergente de farmacologia de dinamina com o desenvolvimento de inibidores de molécula pequena específico para a família de dinamina de GTPases como novas ferramentas potentes com as

quais se estuda endocitose celular nestes sistemas. Os inibidores de dinamina de pequena molécula têm atraído atenção generalizada e têm sido usados para o estudo de endocitose e outros aspectos das dinâmicas de membrana em uma variedade de sistemas celulares (Macia et al. 2006). Estes inibidores oferecem muitas vantagens distintas sobre meios tradicionais de inibição de dinamina nas células através da expressão de mutantes de GTPase de dinamina ou através de pequena interferência de inativação de dinamina mediado por (siRNA) de RNA que não pode ser usada para estudar efeitos celulares e rápidos. Os inibidores permeáveis à célula de pequena molécula são capazes de bloquear rapidamente a endocitose em minutos e são prontamente reversíveis (Macia et al. 2006; Quan et al. 2007).

[0014] Os primeiros inibidores de dinamina relatados foram sais de amônio de cadeia longa como brometo de miristil trimetil amônio (MiTMAB), brometo de octadeciltrimetil amônio (OcTMAB) (Hill et al. 2004) e tirfostinas diméricas como Bis-T (Hill et al. 2005). Posteriormente, uma série de líquidos iônicos à temperatura ambiente (RTILs) (Zhang et al. 2008) e dynasore (Macia et al. 2006) foi relatada. Finalmente, os inibidores à base de indol denominados “dinóis” (Hill et al. 2009) e inibidores à base de iminocromeno denominados “iminodinas” foram relatados (Hill et al 2010). A maioria dos estudos que executam a varredura para inibidores de dinamina usa ensaios de GTPase através dos quais dinamina é estimulada ao máximo, e é provável que esteja em seu estado helicoidal. Alguns dos inibidores mais potentes de cada uma da série também são inibidores reversíveis e potentes de endocitose nas células (Quan et al. 2007; Hill et al. 2009; Hill et al 2010).

### **Sumário da Invenção**

[0015] Em termos gerais, a invenção decorre de duas descobertas. Primeiramente, verificou-se que um subgrupo de moduladores de dinamina pode promover o acúmulo de dinamina em seu estado de anel oligomerizado e retardar a desmontagem do anel de dinamina. Os compostos neste subgrupo

são denominados “estabilizadores de anel de dinamina”. Uma consequência do prolongamento do tempo de vida do anel de dinamina é que isto estimula a atividade GTPase de dinamina basal, outra é que isso facilita a formação de actina filamentosa (F-actina). Em segundo lugar, verificou-se que a dinamina liga diretamente a actina através do domínio mediano de dinamina (MD), promovendo sua oligomerização em anéis que têm uma função direta na formação *de novo* de filamentos de actina e aderência focais nos podócitos. O estímulo de anéis de dinamina (distintos de hélices de dinamina) é uma nova função celular para dinamina que é separar de sua função endocítica conhecida. Prolongar a formação e/ou tempo de vida do anel de dinamina tem aplicação particular na profilaxia ou no tratamento de extinção de processo podálico em podócitos e doenças renais proteinúricas.

[0016] Em um aspecto da invenção, é fornecido um método para a promoção de formação e/ou manutenção de anel de dinamina de anéis de dinamina em uma célula, que compreender tratar a célula com uma quantidade eficaz de um estabilizador de anel de dinamina, ou um pró-fármaco ou sal farmaceuticamente aceitável do estabilizador de anel de dinamina.

[0017] Em outro aspecto da invenção, é fornecido um a método para profilaxia ou tratamento de uma condição ou doença renal caracterizada por proteinúria, que compreende administrar em um indivíduo em necessidade disso uma quantidade eficaz de pelo menos um estabilizador de anel de dinamina, ou um pró-fármaco ou sal farmaceuticamente aceitável do estabilizador de anel de dinamina.

[0018] Em outro aspecto da invenção, é fornecido um a método para profilaxia ou tratamento de uma condição ou doença renal caracterizada por proteinúria, que compreende tratar os podócitos com uma quantidade eficaz de pelo menos um estabilizador de anel de dinamina, ou um pró-fármaco ou sal farmaceuticamente aceitável do estabilizador de anel de dinamina.

[0019] Tipicamente, a disfunção de podócitos é caracterizada por, ou está associada ao processo podálico extinção.

[0020] Em outro aspecto da invenção, é fornecido um método para a manutenção ou indução de formação de citoesqueleto de actina em uma célula, que compreende tratar a célula com uma quantidade eficaz de pelo menos um estabilizador de anel de dinamina, ou um pró-fármaco ou sal farmaceuticamente aceitável do estabilizador de anel de diamina.

[0021] Em outro aspecto da invenção, é fornecido um método para a indução de aderências focais e/ou fibras de tensão de actina em uma célula, que compreende tratar a célula com uma quantidade eficaz de pelo menos um estabilizador de anel de dinamina, ou um pró-fármaco ou sal farmaceuticamente aceitável do estabilizador de anel de diamina.

[0022] Em outro aspecto, é fornecido um método de varredura de um agente de teste para uso como um estabilizador de anel de dinamina, que compreende:

fornecer o agente de teste;

incubar o agente de teste com proteína dinamina sob condições adequadas para a formação de anéis de dinamina; e

avaliar se o agente de teste promove acúmulo de anéis de dinamina e/ou inibe desmontagem de anéis de dinamina, em que o acúmulo de anéis de dinamina e/ou inibição de desmontagem de anéis de dinamina aumenta a atividade GTPase de dinamina basal.

[0023] A avaliação se o agente de teste promove o acúmulo de anéis de dinamina ou inibe a desmontagem de anéis de dinamina pode envolver submeter ao ensaio para um aumento da atividade GTPase de dinamina basal, e/ou liberação de dinamina que é um indicativo da desmontagem de anel de dinamina.

[0024] Em um aspecto da invenção, é fornecido um estabilizador de anel de dinamina de anel de dinamina para uso na promoção de formação de anel

de dinamina e/ou manutenção de anéis de dinamina em uma célula, ou um pró-fármaco ou sal farmaceuticamente aceitável do estabilizador de anel de dinamina.

[0025] Em outro aspecto da invenção, é fornecido pelo menos um estabilizador de anel de dinamina para uso na profilaxia ou tratamento de uma condição ou doença renal caracterizada pela proteinúria, ou um pró-fármaco ou sal farmaceuticamente aceitável do estabilizador de anel de dinamina.

[0026] Em um aspecto da invenção, é fornecido o uso de pelo menos um estabilizador de anel de dinamina na fabricação de um medicamento para a promoção da formação de anel de dinamina e/ou manutenção de anéis de dinamina nas células de um indivíduo em necessidade disso, ou um pró-fármaco ou sal farmaceuticamente aceitável do estabilizador de anel de dinamina.

[0027] Em outro aspecto da invenção, é fornecido o uso de pelo menos um estabilizador de anel de dinamina na fabricação de um medicamento para profilaxia ou tratamento de uma condição ou doença renal caracterizada pela proteinúria, ou um pró-fármaco ou sal farmaceuticamente aceitável do estabilizador de anel de dinamina.

[0028] O estabilizador de anel de dinamina usado em uma modalidade da invenção pode ser qualquer composto que promova montagem, ou que iniba a desmontagem, de anéis de dinamina. A inibição pode ser retardamento ou prevenção de desmontagem de anel de dinamina.

[0029] Pelo termo “anel de dinamina” para uso no presente documento significa um anel de unidades de dinamina oligomerizada. O anel pode ser um anel fechado ou uma volta única de uma hélice de dinamina (dinamina helicoidal).

[0030] Pelo termo “estabilizador de anel de dinamina” para uso no presente documento significa um agente que interage com dinamina e estimula a atividade GTPase de dinamina basal na ausência de um modelo de

montagem (por exemplo, microtúbulos, vesículas de fosfolipídeos e/ou nanotubos) ao redor do qual se formam as hélices de dinamina. Um estabilizador de anel de dinamina promove montagem de anel de dinamina e/ou inibe desmontagem de anel de dinamina, sendo que ambos podem resultar em acúmulo de anel de dinamina e/ou um aumento de atividade GTPase de dinamina basal. Por conseguinte, um agente que promove montagem de anel de dinamina e/ou inibe desmontagem de anel de dinamina é abrangido pelo termo “estabilizador de anel de dinamina” no contexto da presente invenção. Tipicamente, o estabilizador de anel de dinamina será um agente que inibe desmontagem de anel de dinamina.

[0031] O estímulo à atividade GTPase de dinamina basal pelo estabilizador de anel de dinamina é em um nível menor que aquele associado à dinamina helicoidal ativa em máximo através da atividade máxima é alcançado na presença de um modelo de montagem.

[0032] A interação do estabilizador de anel de dinamina com a dinamina pode ser a ligação do estabilizador de anel de dinamina à dinamina, ou através da associação direta ou indireta do estabilizador de anel de dinamina com a dinamina. Quando a dinamina está em seu estado helicoidal, o estabilizador de anel de dinamina pode aumentar a atividade GTPase de anéis de dinamina individuais naquela hélice, mas em um nível inferior que aquele alcançado através de interação cooperativa entre anéis de dinamina.

[0033] Mais tipicamente, o estabilizador de anel de dinamina utilizado em um método incorporado pela invenção é um inibidor da atividade GTPase de dinamina helicoidal estimulada ao máximo. Da mesma forma, o agente de teste submetido à varredura para uso como um estabilizador de anel de dinamina pode ser um inibidor da atividade GTPase de dinamina helicoidal. No entanto, a partir do que foi posto acima, compreende-se que o estabilizador de anel de dinamina não precisa ser um inibidor de desmontagem de anel de dinamina e, de fato, não precisa ser um inibidor de

atividade GTPase de dinamina helicoidal.

[0034] A dinamina com a qual o estabilizador de anel de dinamina interage e/ou a dinamina a partir da qual o anel de dinamina ou anéis são formados, pode ser selecionada a partir do grupo que consiste em dinamina I (dynI), dinamina II (dynII), dinamina III (dynIII), e isoformas de dinamina, e misturas do disposto acima.

[0035] Os recursos e vantagens da invenção se tornarão mais evidentes a partir da seguinte descrição detalhada das modalidades não limitadoras juntamente com os desenhos em anexo.

### **Breve descrição dos desenhos**

[0036] A Figura 1 é um gráfico que mostra que a tirfostina banzilidenomalonitrila dimérica Bis-T-23 inibe dinamina estimulada por lipídeo, mas estimula atividade GTPase de dinamina basal.

[0037] A Figura 2 é um gráfico que mostra que a inibição e a ativação de dinamina ocorrem na mesma concentração de Bis-T-23.

[0038] A Figura 3 é um gráfico que mostra estímulo de Bis-T-23 (5  $\mu$ M) de atividade GTPase de dinamina basal que ocorre após uma “fase de atraso”.

[0039] A Figura 4 é um gráfico que mostra a potência relativa de três iminodinas no estímulo da atividade GTPase basal de dinamina I de comprimento total (200 nM, nenhum outro ativador no conhecido como lipossomas PS estava presente). Os compostos estavam presentes nas concentrações indicadas e a concentração ocasionando estímulo quase máximo é mostrada como o EC<sub>50</sub>.

[0040] A Figura 5 é um gráfico que mostra a atividade GTPase basal do construto de dinamina I truncado conhecido como GG2, contendo apenas o domínio GTPase ligado a uma pequena parte do Domínio GED (Chappie et al 2009). Diferente da dinamina de comprimento total, este construto é conhecido por ser incapaz de se auto montar ou de formar anéis. Bis-T-22 e -

23 e imminodyn-22 não apresentam efeitos sobre a atividade basal deste construto de montagem incompetente.

[0041] A Figura 6 mostra que Bis-T-22 em concentração elevada [dyn] (520 nM) promove automontagem de anel de dinamina.

[0042] A Figura 7 mostra que Bis-T-23 evita desmontagem de dinamina.

[0043] As Figuras 8 (A) a (D) são micrográficos de elétron que mostram que Bis-T-23 evita constrição ou expansão helicoidal de dinamina em lipossomas PS *in vitro*. Isso estabiliza a hélice de dinamina, que perde sua flexibilidade e forma anéis de diâmetro uniforme, inibindo a desmontagem de anel de dinamina.

[0044] A Figura 9 mostra o efeito de tratamento de dinamina I de comprimento total purificada com Bis-T-23 na ausência de um modelo. A dinamina foi, então, examinada através de microscópio eletrônico. Os anéis de dinamina são especificamente induzidos por Bis-T-23 (5,4  $\mu$ M, A). Os anéis são anéis de dinamina *bona fide* (B). As análises quantitativas mostram um aumento de 6 vezes nos anéis *bona fide* (C).

[0045] A Figura 10 mostra que Bis-T-22 (100  $\mu$ M por 30 minutos) induz caroços revestidos com clatrina nas células que têm pescoços usualmente longos e são circuladas por anéis nas células de linfoblastos humanas cultivadas (A) ou sinaptossomas de cérebro de rato (B).

[0046] A Figura 11 (A) é um gráfico que mostra Bis-T-23 e dois inibidores de dinamina da série “dyngo” são estabilizadores de anel de dinamina. Dyngo-7a também é conhecido como dynasore. O estímulo de GTPase de dinamina I (50 nM) foi realizado na ausência do detergente Tween-80 (e na ausência de qualquer outro ativador como Lipossomas PS, nanotubos ou microtúbulos). Em contraste, dinole 34-2, um inibidor de dinamina potente, não estimula atividade de dinamina basal sob estas condições. B) é um gráfico que mostra uma variedade de inibidores de

dinamina potentes que são ativadores de atividade GTPase de dinamina basal (compostos de série Bis-T foram usados a uma conc. de 10  $\mu$ M, todos os outros compostos foram usados a uma conc. de 30  $\mu$ M). Todos os compostos testados inibiram dinamina estimulada por (PS) de fosfatidilserina entre 300 nM – 3  $\mu$ M (dados não mostrados). A atividade GTPase de dinamina I (dynI; 200 nM) foi medida na ausência de ativadores de lipídeos (e na presença de Tween-80 padrão a 0,06%).

[0047] A Figura 12 mostra a detecção de interações de dinamina-actina diretas com o uso de ensaios padrão de cossedimentação nos quais sedimentos de F-actina estão sob centrifugação de alta velocidade.

[0048] A Figura 13 mostra alinhamentos de sequência de aminoácido entre dinamina II (dyn2) (variantes divididas a e b) (SEQ ID N° 2 e SEQ ID N° 1), dinamina I (dyn1) (variantes divididas a e b) (SEQ ID N° 3 e SEQ ID N° 4), *Drosófila* (Shi) (SEQ ID N° 5), *C. elegans* (Cele) (SEQ ID N° 6), levedura (Vps1) (SEQ ID N° 7), Dnm1 (SEQ ID N° 8), mutantes de ‘perda de função’ DynK/E (SEQ ID N° 9) e Dyn K/A (SEQ ID N° 10), e mutante de ‘ganho de função’ Dyn E/K (SEQ ID N° 11). Dnm1 é um membro da família de dinamina envolvido na morfogênese mitocondrial.

[0049] A Figura 14 mostra uma plotagem de Scatchard das interações de F-actina e dinamina diretas. Concentrações crescentes de dinamina (livre) foram adicionadas a 5  $\mu$ M de F-actina. Após centrifugação a 100,000 x g, as proteínas foram separadas em SDS-PAGE e as bandas foram analisadas com o uso de densitometria.

[0050] As Figuras 15 (A-E) são fotografias que ilustram que as interações de actina-dinamina são essenciais para a organização do citoesqueleto de actina em podócitos. Os podócitos foram infectados com viroses que expressam mutantes de dinamina conforme indicado. O citoesqueleto de actina aparece enormemente aumentado nas células que expressam dynE/K e dynR725A.

[0051] A Figura 16 mostra filamentos de actina reticulados de anéis de dinamina montados em feixes delgados na presença de GTP $\gamma$ S. Os filamentos de actina foram visualizados com o uso de microscópio eletrônico e manchamento negativo. As setas apontam na direção de anéis de dinamina ao longo de filamentos ramificados.

[0052] A Figura 17 é um gráfico que mostra anéis de dinamina que promovem polimerização de actina. São mostrados cursos de tempo representativos da repolimerização de actina quando 0,33  $\mu$ M de complexos de Gsn-actina (G1:200A ou G1:1000A) são incubados na ausência e presença de 0,1  $\mu$ M de dinamina com ou sem 100  $\mu$ M de GTP $\gamma$ S.

[0053] A Figura 18 é um gráfico que mostra a tirfostina benzilidenomalonitrila dimérica Bis-T-22 que estimula a taxa de dinamina basal de hidrólise de GTP. A F-actina coberta com jato de gelsolina também estimula a taxa de dinamina basal de hidrólise de GTP. O curso de tempo para hidrólise de GTP basal de 0,2  $\mu$ M de dyn1 incubou com ou sem 7  $\mu$ M de Bis-T-22 e com ou sem 10  $\mu$ M de complexos de Gsn-F-actina. Os efeitos de Bis-T-22 e Gsn-F-actina são pelo menos aditivos.

[0054] A Figura 19 é uma fotografia que mostra os efeitos de Bis-T-23 sobre o citoesqueleto de actina em podócitos. As células foram manchadas com o uso de rodamina-faloidina para F-actina (coluna esquerda) e anticorpo monoclonal anti-paxilina (coluna central). O manchamento incorporado é mostrado na coluna direita. O citoesqueleto de actina e adesões focais são enormemente aumentados em número e quantidade nas células tratadas com Bis-T-23 e células que expressam mutantes de dinamina, dynE/K e dynR725A.

[0055] A Figura 20 é um gráfico que mostra um camundongo de controle e um camundongo que expressa a proteína do mutante de  $\alpha$ -actinina 4 de 'ganho de função' e esses foram submetidos à injeção intraperitoneal com Bis-T-23 (100  $\mu$ g/100 g de peso corporal). A proteinúria foi medida com

o uso de kits de ensaio Companion de Creatinina e ELISA específico de albumina de camundongo (Exocell e Bethyl Laboratories) seguindo os protocolos do fabricante. Uma redução na proteinúria para níveis do tipo selvagem foi obtida até 6 horas após a administração do fármaco.

[0056] A Figura 21 é um gráfico que mostra que a Bis-T-23 estabilizadora de anel resgata a proteinúria em camundongos tratados com lipopolissacarídeo (LPS). O LPS é um modelo para doença renal proteinúrica. Os níveis de albumina foram determinados em 6 camundongos antes de (Con), 24 horas após a injeção de LPS (2x LPS) e 2, 4, 6 e 8 h após a administração de Bis-T-23 (barras abertas) ou DMSO (solução de aplicação, barras cinzas). Uma redução em proteinúria foi notada a partir de 2 a 8 horas após a administração de uma única dose desse anel estabilizador.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DE MODALIDADES EXEMPLIFICADORAS DA INVENÇÃO**

[0057] Um subgrupo de moduladores de dinamina de especificidade dupla foi revelado por existir entre o grupo mais amplo de inibidores de dinamina. Os compostos nesse subgrupo são “estabilizadores de anel de dinamina” visto que inibem a desmontagem de anel de dinamina, dessa forma, prolongando o tempo de vida do anel de dinamina e promovendo o acúmulo de anel de dinamina. Isso é consistente com o fato de que a hidrólise de GTP é conhecida por ativar a desmontagem de dinamina (Sever et al. 2006). No entanto, embora esses compostos reduzam a atividade GTPase massiva de dinamina helicoidal, esses podem simultaneamente aumentar a atividade GTPase basal de anéis de dinamina individuais .

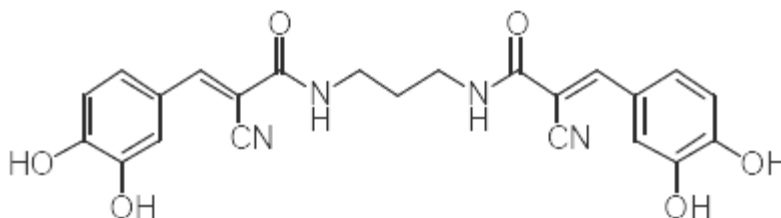
[0058] Um anel de dinamina é uma volta única de dinamina oligomerizada ou, no caso de dinamina helicoidal (uma hélice de dinamina), uma única volta da hélice. Os anéis de dinamina foram primeiramente observados *in vitro* (Hinshaw e Schmid. 1995). Esses têm, tipicamente, um diâmetro externo de aproximadamente 50 nm e um diâmetro interno de cerca

de 30 nm, e os anéis podem ser abertos ou fechados. A dinamina helicoidal também é conhecida como uma hélice, nano-mola, espiral ou “pilha de anéis” de dinamina (Stowell *et al.* 1999). O microscópio crio-eletrônico indica que o tamanho do anel de dinamina é flexível e pode compreender 13 a 15 unidades de dinamina repetidas assimétricas, sugerindo que um único anel de dinamina helicoidal compreende 26 a 30 moléculas de dinamina (unidades de dinamina) (Zhang e Hinshaw. 2001). No entanto, desde que o diâmetro do anel seja flexível, esses números não são fixos.

[0059] Um estabilizador de anel de dinamina útil em um método incorporado pela invenção pode, por exemplo, ser selecionado a partir do grupo que consiste em inibidores de GTPase de dinamina helicoidal, tirfostinas monoméricas, tirfostinas diméricas e, particularmente, tirfostinas benzilidenomalonitrila diméricas, iminocromenos, hidrazidas de ácido 3-naftaleno substituído-2-carboxílico (benzilideno) hidrazidas, polipeptídeos e peptídeos conforme descrito adicionalmente abaixo.

[0060] As tirfostinas benzilidenomalonitrila diméricas (Bis-T) adequadas e compostos relacionados que podem encontrar aplicação como estabilizadores de anel de dinamina de acordo com as modalidades da invenção são descritos no pedido de patente internacional N° PCT/AU2004/001624 (WO 2005/049009) e Hill *et al.* 2005, em que os conteúdos do mesmo são incorporados no presente documento em sua totalidade.

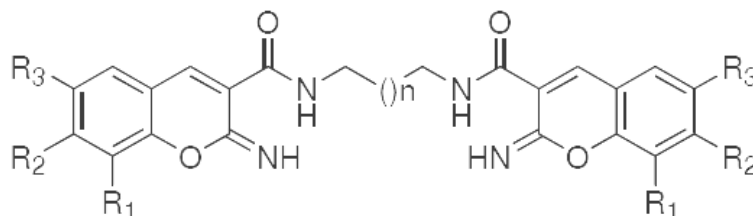
[0061] A Bis-tirfostina-22 (Bis-T-22) é uma tirfostina dimérica e é um potente inibidor *in vitro* de dinamina quando a dinamina é ativada por lipossomas de fosfatidilserina (PS) para se montar formando uma hélice flexível. Na ausência de Lipossomas PS, a dinamina pode apenas se montar formando anéis únicos. Surpreendentemente, enquanto a Bis-T-22 inibe a atividade de dinamina helicoidal, essa também de forma única e simultânea estimula a atividade GTPase de dinamina basal, evitando a desmontagem de



[0062] Particularmente, as tirfostinas diméricas adequadas úteis como estabilizadoras de anel de dinamina incluem aqueles compostos de Bis-T nos quais dois dentre os átomos de carbono C3-C5 de pelo menos um anel de fenila terminal têm substituintes de hidroxila (OH), de preferência, em uma disposição catecol (por exemplo, como em Bis-T-22), ou todos os três átomos de carbono são substituídos por hidroxila (por exemplo, como em Bis-T-23). Os exemplos incluem 2-ciano-N-{3-[2-ciano-3-(3,4-diidroxifenil)-acriloilamino]-etil}-3-(3,4-diidroxifenil)-acrilamida, 2-ciano-N-{3-[2-ciano-3-(3,4,5-triidroxifenil)-acriloilamino]-etil}-3-(3,4,5-triidroxifenil)-acrilamida, 2-ciano-N-{3-[2-ciano-3-(3,4-diidroxi-4-metoxifenil)-acriloilamino]-etil}-3-(3,4-diidroxi-5-metoxifenil)-acrilamida, 2-ciano-N-{3-[2-ciano-3-(3,4-diidroxifenil)-acriloilamino]-propil}-3-(3,4-diidroxifenil)-acrilamida (Bis-T-22), 2-ciano-N-{3-[2-ciano-3-(3,4,5-triidroxifenil)-acriloilamino]-propil}-3-(3,4,5-triidroxifenil)-acrilamida (Bis-T-23), 2-ciano-N-{3-[2-ciano-3-(3,4-diidroxi-5-metoxifenil)-acriloilamino]-propil}-3-(3,4-diidroxi-5-metoxifenil)-acrilamida, 2-ciano-N-{3-[2-ciano-3-(3,4-diidroxifenil)-acriloilamino]-butil}-3-(3,4-diidroxifenil)-acrilamida, 2-ciano-N-{3-[2-ciano-3-(3,4,5-triidroxifenil)-acriloilamino]-butil}-3-(3,4,5-triidroxifenil)-acrilamida, 2-ciano-N-{3-[2-ciano-3-(3,4-diidroxi-5-metoxifenil)-acriloilamino]-butil}-3-(3,4-diidroxi-5-metoxifenil)-acrilamida, 2-ciano-N-{3-[2-ciano-3-(3,4-diidroxifenil)-acriloilamino]-pentil}-3-(3,4-diidroxifenil)-acrilamida, 2-ciano-

N-{3-[2-ciano-3-(3,4,5-triidroxifenil)-acriloilamino]-pentil}-3-(3,4,5-triidroxifenil)-acrilamida, 2-ciano-N-{3-[2-ciano-3-(3,4-diidroxi-5-metoxifenil)-acriloilamino]-pentil}-3-(3,4-diidroxi-5-metoxifenil)-acrilamida, 2-ciano-N-{3-[2-ciano-3-(3,4-diidroxiifenil)-acriloilamino]-hexil}-3-(3,4-diidroxiifenil)-acrilamida, 2-ciano-N-{3-[2-ciano-3-(3,4,5-triidroxifenil)-acriloilamino]-hexil}-3-(3,4,5-triidroxifenil)-acrilamida, e 2-ciano-N-{3-[2-ciano-3-(3,4-diidroxi-5-metoxifenil)-acriloilamino]-hexil}-3-(3,4-diidroxi-5-metoxifenil)-acrilamida.

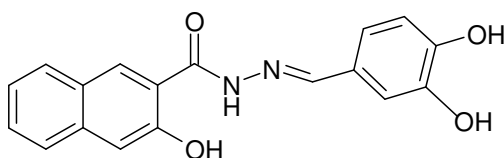
[0063] Os estabilizadores de anel de dinamina adicionais incluem aqueles nos quais um substituinte no átomo de carbono C2 de pelo menos um anel de fenila terminal de um composto de Bis-T e a posição ocupada por um grupo cianila adjacente (CN) são cilizados conforme descrito em WO 2005/049009. Por exemplo, quando o substituinte é hidróxi, o grupo hidróxi pode reagir com o grupo cianila para formar um iminocromeno conforme a seguir:



em que, por exemplo,  $R_1$  é OH,  $R_2$  é OH e  $R_3$  é H;  $R_1$  é H,  $R_2$  é OH e  $R_3$  é OH; ou  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$  são OH; e  $n$  é usualmente 0, 1, 2 ou 3, mais usualmente, 1. Adicionalmente, os exemplos de iminocromenos úteis nas modalidades da invenção são descritos abaixo (vide Tabela 2). Os análogos de Bis-T ou compostos de iminocromeno conforme descrito acima em que pelo menos um dos átomos de oxigênio de anel e/ou pelo menos um dos grupos de NH e/ou átomos de oxigênio de cadeia principal do composto são submetidos à substituição de bioisótero, também podem ser usados (por exemplo, vide Lima e Barreiro. 2005, em que o conteúdo do mesmo é incorporado no presente documento em sua totalidade por referência cruzada).

[0064] Em adição, os análogos assimétricos dos compostos diméricos acima podem ser utilizados. Os exemplos incluem os análogos de azido e diazarinila assimétricos de tirfostinas diméricas descritas por Odell et al. 2009. Além disso, os análogos de tirfostina monomérica das tirfostinas diméricas exemplificadas acima podem ser utilizados. No entanto, no caso dessas tirfostinas, esses não são inibidores de GTPase (por exemplo, vide Hill *et al.* 2005).

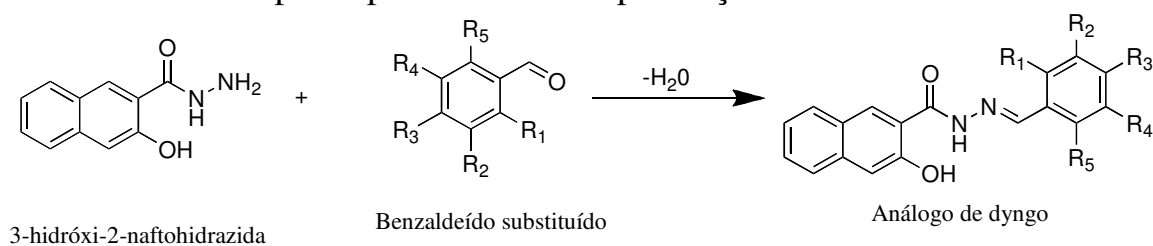
[0065] Ainda, exemplos adicionais de estabilizadores de anel de dinamina incluem hidrazida (3,4-dihidroxibenzilideno) de ácido 3-hidroxinaftaleno-2-carboxílico (dynasore) e análogos do mesmo. A estrutura para dynasore é conforme a seguir.



Estrutura de Dynasore

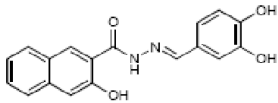
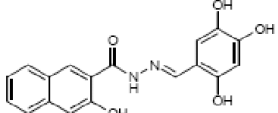
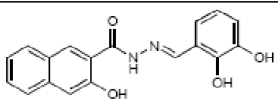
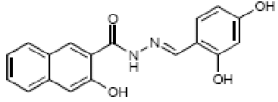
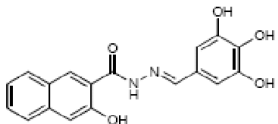
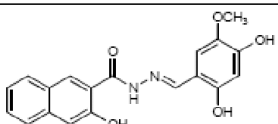
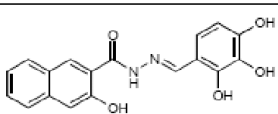
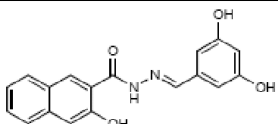
[0066] O dynasore foi revelado em uma triagem de biblioteca com o uso de dinamina I recombinante ativada pelo domínio SH3 contendo proteína grb2 (Macia et al. 2006). A estrutura de dynasore é superficialmente similar àquela de Bis-T-22 onde a posição e número das hidroxilas ao redor do anel de fenila terminal de Bis-T-22 revelaram contribuir significativamente com a potência inibitória de dinamina do composto. Os exemplos de análogos adicionais de hidrazida (benzilideno) de ácido 3-naftaleno substituído-2-carboxílico de dynasore (chamados de compostos dyngo no presente documento) revelaram exibir potência inibitória de dinamina aperfeiçoada comparada ao dynasore conforme mostrado na Tabela 1. Cada um dentre os compostos dyngo foi sintetizado por uma reação de única etapa simples que acopla a hidrazida de ácido 3-hidróxi-2-natólico com uma variedade de benzaldeídos substituídos por hidroxilas, proporcionando uma biblioteca orientada conforme ilustrado pelo Esquema 1 abaixo (por exemplo, através da

mistura dos reagentes em etanol (por exemplo, 10 ml) em um frasco de fundo redondo, refluxo de uma mistura por 2 horas, resfriamento da mesma e remoção do solvente *in vacuo* antes da recristalização do produto a partir de etanol, apesar de outros métodos de síntese disponíveis). Em particular, a Tabela 1 mostra a estrutura de cada composto dyngo, seu peso molecular (MW) e IC<sub>50</sub> para a inibição de atividade GTPase de dinamina I de cérebro nativo estimulada por Lipossomas PS na presença ou ausência de Tween 80.



Esquema 1: Síntese de compostos dyngo

Tabela 1: Compostos Dyngo

| Composto            | Estrutura                                                                           | MW (g/mo) | IC <sub>50</sub> (µM)<br>Dyn I de comprimento total<br>(7 nM, 2 µg/ml PS)<br>com tween 80 | IC <sub>50</sub> (µM)<br>Dyn I de comprimento total<br>(7 nM, 2 µg/ml PS)<br>sem tween 80 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Dynasore (Dyngo-7a) |    |           |                                                                                           |                                                                                           |
| Dyngo-4a            |    | 338,32    | 2,7 ± 0,7                                                                                 | 0,31 ± 0,05                                                                               |
| Dyngo-6a            |    | 322,31    | 19,8                                                                                      | 22,1                                                                                      |
| Dyngo-1a            |    | 322,31    | 200                                                                                       | 7,3                                                                                       |
| Dyngo-5a            |    | 338,32    | ~ 468                                                                                     | 4,4                                                                                       |
| Dyngo-2a            |   | 352,35    | 1170                                                                                      | 3,6                                                                                       |
| Dyngo-3a            |  | 338,32    | Não Ativo                                                                                 | 3,1                                                                                       |
| Dyngo-8a            |  | 322,31    | Não Ativo                                                                                 | 39,8                                                                                      |

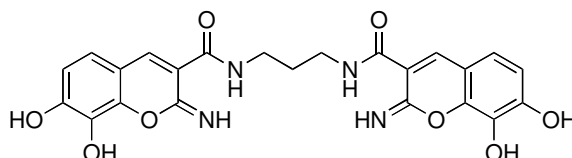
[0067] Um estabilizador de anel de dinamina que estimula a atividade basal de dinamina ou inibe a desmontagem de anéis de dinamina conforme descrito no presente documento terá, tipicamente, grupo fenila terminal com substituintes hidroxila em pelo menos dois dos três átomos de carbono consecutivos do anel fenila, como em Bis-T-22 e Bis-T-23. No entanto, apesar de os grupos fenila terminais da tirfostina dimérica exemplificada acima, análogos de iminocromeno e dyngo serem substituídos por grupos hidroxila, elementos de habilidade comum na técnica apreciarão que uma ou mais dessas hidroxilas pode ser submetida à substituição bioisostérica (como, mas não se limitando a, um grupo -NH<sub>2</sub> ou um átomo halo como F, Cl, Br ou I, e similares). De modo similar, um elemento de habilidade comum na

técnica reconhecerá que outras alterações podem ser feitas em relação à tirfostina benzilidenomalonitrila dimérica, iminocromeno, tirfostina monomérica, dynasore e compostos dyngo descritos acima, de modo que a atividade estabilizadora d anel de dinamina do composto seja mantida ou aprimorada, e quaisquer de tais análogos formas modificadas dos mesmos possam ser usados em um método conforme descrito no presente documento. Os exemplos de modificações incluem, mas não se limitam à substituição de um ou mais átomos de carbono de anel de cadeia principal para heteroátomo(s) (por exemplo, independentemente selecionados a partir de O, N e S) e/ou outras modificações para aqueles sistemas de anel. O grupo naftaleno dos compostos dyngo exemplificados acima é, particularmente, passível de tais modificações e/ou substituição bioisostérica, e um grande de tais compostos modificados úteis em métodos incorporados pela invenção é possível. Tais modificações e substituições bioisostéricas conforme descrito acima se encontram no escopo de um elemento com habilidade comum na técnica (por exemplo, vide Lima e Barreiro. 2005) e todas são expressamente abrangidas pela presente invenção. De fato, qualquer estabilizador de anel de dinamina fisiologicamente aceitável adequado pode ser empregado. Adicionalmente, compostos adequados para o uso no presente documento podem ser identificados através da triagem de composto químico e bibliotecas combinatórias, como uma biblioteca que se encontra no escopo do destinatário.

[0068] Os iminocromenos adequados (denominados “iminodinas” no presente documento) e compostos relacionados que podem revelar aplicação como estabilizadores de anel de dinamina de acordo com modalidades da invenção são descritos em Hill et al. 2010, em que os conteúdos do mesmo são incorporados no presente documento em sua totalidade por referência cruzada.

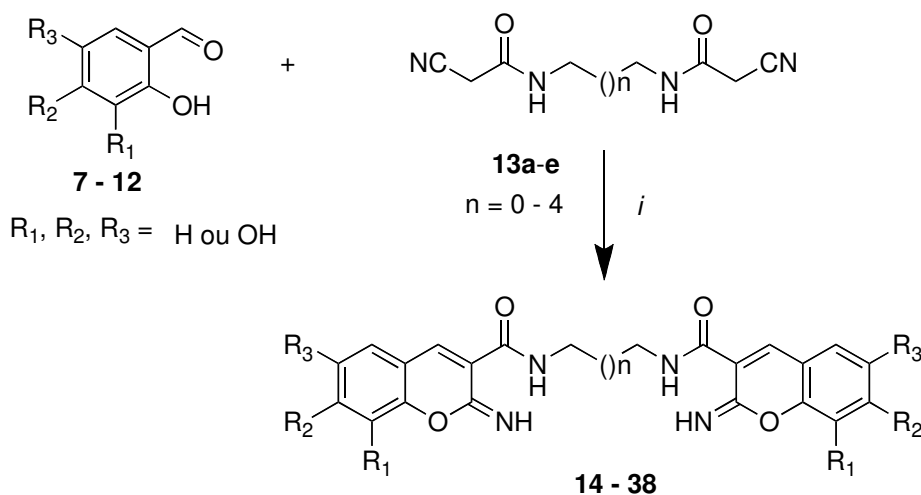
[0069] A iminodina-22 é um iminocromeno e é um potente inibidor *in*

*vitro* de dinamina quando a dinamina é ativada por lipossomas de fosfatidilserina (PS) para se montar formando uma hélice flexível. Embora a iminodina-22 iniba a atividade de dinamina helicoidal, essa também estimula simultaneamente a atividade GTPase de dinamina basal, evitando a desmontagem de anéis de dinamina. A estrutura de iminodina-22 é mostrada abaixo.



Estrutura de iminodina-22.

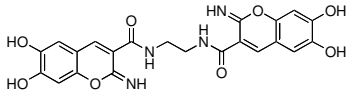
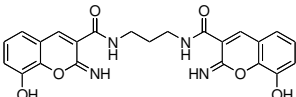
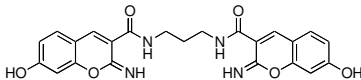
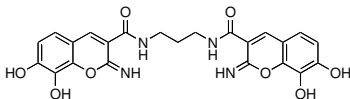
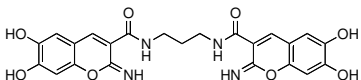
[0070] A trajetória para síntese das iminodinas é mostrada abaixo no Esquema 2.



Esquema 2: Reagentes e condições para geração das iminodinas: i) Etanol, piperidina (cat.) refluxo de 2 h

[0071] A estrutura de iminocromeno é diferente daquela da Bis-T-22, mas a posição e número das hidroxilas ao redor dos anéis fenila terminais contribuem significativamente para a potência inibitória de dinamina do composto. Os exemplos de análogos adicionais de iminocromeno são mostrados na Tabela 2. A tabela mostra a estrutura de cada composto, seu IC<sub>50</sub> para inibição de atividade GTPase de dinamina I de cérebro nativo (e 20 nM) estimulada por Lipossomas PS. A tabela também mostra o estímulo de atividade GTPase de dinamina I basal (a 200 nM) na ausência de lipossomas.

Tabela 2: Inibição de atividade GTPase *in vitro* de dinamina I e atividade estabilizadora de anel de iminodinas 17 e 20 a 23

| Composto de Iminodina | Estrutura de Iminodina                                                            | Atividade GTPase de Dyn I estimulada por PS<br>IC <sub>50</sub> (μM) | Estabilizador de anel:<br>Dyn I (no PS)<br>EC <sub>50</sub> (μM) |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| 17                    |  | 0,33 ± 0,07                                                          | 31                                                               |
| 20                    |  | 36,6 ± 7,2                                                           | Não Ativo                                                        |
| 21                    |  | 17,3 ± 1,0                                                           | 40                                                               |
| 22                    |  | 0,45 ± 0,05                                                          | 1                                                                |
| 23                    |  | 0,26 ± 0,08                                                          | 4                                                                |

[0072] Em outra forma, o estabilizador de anel de dinamina pode ser um peptídeo, polipeptídeo ou um fragmento ativo ou forma modificada dos mesmos que tem atividade estabilizadora de anel de dinamina. Tipicamente, um estabilizador de anel de dinamina conforme descrito no presente documento é diferente de uma forma modificada ou do tipo selvagem de dinamina ou um fragmento da mesma. Os exemplos de polipeptídeos ou peptídeos que podem ser usados incluem actina (particularmente, F-actina), isoformas e/ou fragmentos da mesma que fornecem um domínio de ligação de actina para uma ou mais das isoformas de dinamina ou para os anéis de dinamina, que promovem/estimulam a formação de anéis de dinamina e, desse modo, atuam como um estabilizador de anel de dinamina no contexto da invenção. Adicionalmente, as formas modificadas podem ser fornecidas nas quais um ou mais aminoácidos são adicionados, substituídos ou deletados comparados à actina do tipo selvagem, isoformas e fragmentos da mesma sem impactar substancial e adversamente em sua capacidade de interação com a dinamina e promove o acúmulo de anéis de dinamina conforme descrito no presente documento, e o uso de tais formas modificadas também é

expressamente abrangido.

[0073] As estratégias para identificar tais agentes proteináceos para o uso em métodos da presente invenção incluem técnicas de triagem de larga escala. Por exemplo, os protocolos de biblioteca de exibição de fago fornecem um modo eficiente de triagem de um grande número de agentes potenciais. A biblioteca utilizada pode ser uma biblioteca de exibição de peptídeo que expressa sequências de peptídeo randomizadas fundidas a uma proteína coberta do fago relevante utilizado, ou uma biblioteca que exhibe domínios variáveis de anticorpos (por exemplo, fragmentos de Fv). Os fagos que se ligam à dinamina podem ser recuperados e amplificados por infecção da bactéria hospedeira. Cada clone isolado nesse modo expressa um peptídeo específico ou partícula de ligação de antígeno. Os genes que encodificam o peptídeo ou a partícula de ligação de antígeno são exclusivos para cada fago e podem ser identificados pela recuperação do DNA do clone de fago selecionado, sequenciamento do DNA e comparação da sequência obtida com a sequência conhecida da proteína coberta de fago que expressa o peptídeo ou a molécula de ligação de antígeno. O DNA identificado pode, então, ser usado para a expressão do agente proteináceo encodificado ou modificado para fornecer outros tais agentes que utilizam técnicas recombinantes bem conhecidas na técnica.

[0074] Um composto (sendo ou não um inibidor de dinamina) pode ser identificado como um estabilizador de anel de dinamina através da avaliação para sua capacidade de promover acúmulo de anéis de dinamina e/ou inibir a desmontagem de anéis de dinamina. Isso pode, principalmente, ser determinado pela incubação do agente de teste com dinamina de comprimento total sob condições nas quais os anéis de dinamina não se formam por si só, e avaliação para um aumento na atividade GTPase de dinamina basal até um nível indicativo da formação ou acúmulo de anéis de dinamina em relação ao(s) controle(s). A atividade GTPase de dinamina ou anéis de dinamina pode

ser determinada por qualquer método convencionalmente conhecido (por exemplo, vide Quan e Robinson. 2005). Tais condições incluem: (a) a ausência de um modelo de montagem de hélice como lipossomas, microtúbulos ou nanotubos de lipídeos, e (b) concentrações de dinamina maiores do que as normalmente exigidas para detectar a atividade estimulada de modelo, tipicamente, 50 a 500 nM de dinamina, ao invés de 1 a 20 nM. Deste modo, a atividade estabilizadora de anel pode ser identificada pela capacidade de estimular a atividade GTPase de dinamina de comprimento total na ausência de outros fatores estimulantes (como Lipossomas PS, microtúbulos ou nanotubos). As características de definição adicionais estão disponíveis, mas não são essenciais se a primeira condição tiver sido satisfeita. Uma característica adicional de atividade estabilizadora de anel é que a atividade estimulada ocorre após uma fase de atraso de poucos minutos, especialmente, sendo uma ativação imediata *in vitro*. Outra característica é que um anel estabilizador não pode estimular a atividade de um construto de dinamina que não seja capaz de executar uma automontagem, como uma dinamina mutante ou um construto contendo o domínio GTPase e apenas um fragmento do domínio GED (por exemplo, GG2 ou GG5; Chappie et al 2009). Ainda outra característica de atividade estabilizadora de anel é a capacidade do composto de promover a formação de anéis de dinamina conforme detectado por microscópio eletrônico em tais concentrações de dinamina, através das quais essa não forma anéis por si só. Essas condições utilizam, em média, tipicamente de 50 a 200 nM de dinamina na ausência de um modelo distinto de concentrações maiores onde a automontagem é conhecida por ocorrer sem a adição de um estabilizador de anel de dinamina.

[0075] Um indicador dentro da célula de atividade estabilizadora de anel é a indução de fibras de tensão de actina e adesões focais após a aplicação do composto em podócitos cultivados ou células NIH3T3. A indução de processos podálicos de podócito também pode ser avaliada como um

indicador do acúmulo de anéis de dinamina e/ou inibição de desmontagem de anel de dinamina.

[0076] Um estabilizador de anel de dinamina de peptídeo ou polipeptídeo pode incluir D-aminoácido(s) e/ou ser C-terminal e/ou N-terminal protegido da digestão proteolítica (por exemplo, “peguilado” com polietileneglicol (PEG)). Além disso, os estabilizadores de anel de dinamina de peptídeo ou polipeptídeo podem ser acoplados a uma “porção facilitadora” para facilitar a passagem ou translocação do estabilizador de peptídeo/polipeptídeo através da célula externa/membrana de plasma para o citoplasma de células, como um peptídeo carreador que tem a capacidade de distribuir moléculas de carga através de membranas celulares em um modo independente de energia. Os peptídeos carreadores que são conhecidos na técnica incluem penetratina e variantes ou fragmentos da mesma, peptídeo derivado de Tat de vírus de imunodeficiência humana, peptídeo derivado de transportano, peptídeos de sinal e fragmentos dos mesmos que retêm a capacidade de passar através da membrana celular externa para a aplicação de forma eficaz do peptídeo anexado ou de outro agente na célula. Ao invés de um peptídeo carreador, a porção facilitadora pode ser uma porção de lipídeo ou outra porção não peptídica que aprimore a solubilidade da membrana celular do estabilizador de anel de dinamina, tal que a passagem do peptídeo/polipeptídeo através da membrana celular seja efetuada. A porção de lipídeo pode, por exemplo, ser selecionada a partir de triglicerídeos, incluindo triglicerídeos misturados. Os ácidos graxos e, particularmente, os ácidos graxos C<sub>16</sub> – C<sub>20</sub> saturados também podem ser usados (por exemplo, ácido esteárico). Um estabilizador de anel de dinamina de peptídeo ou polipeptídeo pode ser ligado à porção facilitadora em qualquer modo convencionalmente conhecido. Por exemplo, o peptídeo ou polipeptídeo pode ser ligado diretamente a um peptídeo carreador através de uma sequência ligante de aminoácido por uma ligação peptídica ou ligação covalente não peptídica com

o uso de um reagente de reticulação. Além disso, os métodos de ligação química podem ser usados para criar uma ligação covalente entre o aminoácido terminal carbóxi do peptídeo carreador ou sequência ligante e o estabilizador de anel de dinamina de peptídeo ou polipeptídeo.

[0077] A indução de adesões focais nas células conforme descrito no presente documento pode tornar as células capazes de migração, devido ao aumento resultante na célula, para interações celulares com células vizinhas. Como tal, a indução de adesões focais em podócitos ou outras células também pode ter aplicação na profilaxia ou tratamento de câncer (através da inibição de metástase celular de câncer), e outras doenças ou condições responsivas à indução de adesões focais celulares.

[0078] Qualquer célula adequada pode ser tratada com um estabilizador de anel de dinamina, ou um pró-fármaco ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo para promover a formação de e/ou para manutenção de anéis de dinamina na célula conforme descrito no presente documento. Uma modalidade desse aspecto da invenção pode incluir a seleção do estabilizador de anel de dinamina (ou pró-fármaco ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo) para efetuar a formação dos anéis de dinamina e/ou manutenção dos anéis de dinamina na célula. A promoção e/ou manutenção de anéis de dinamina em, por exemplo, podócitos tem aplicação particular na profilaxia ou tratamento de doenças ou condições renais caracterizadas por proteinúria.

[0079] A condição ou doença renal caracterizada por proteinúria para a qual o estabilizador de anel de dinamina é administrado de acordo com uma modalidade da invenção pode ser selecionada a partir de, mas não se limitar a, o grupo que consiste em síndrome nefrótica, doença renal crônica, doença glomerular, disfunção glomerular, glomerulonefrite incluindo glomerulonefrite pós infecção e glomerulonefrite mesangioproliferativa, nefropatia incluindo nefropatia diabética e nefropatia associada a HIV, disfunção de podócitos incluindo danificação de

podócitos e danos de podócitos, podocitopatia, extinção de processo podálico de podócito, esclerose mesangial difusa, síndrome nefrótica congênita (por exemplo, do tipo Finnish (CNSF)), síndrome de Alport e variantes (Alport +), doença de mudança mínima, glomerulosclerose segmentar focal (FSGS), glomerulonefropatia de colapso, glomerulonefropatia imune e inflamatória, nefropatia hipertensiva e glomerulonefropatia associada à idade.

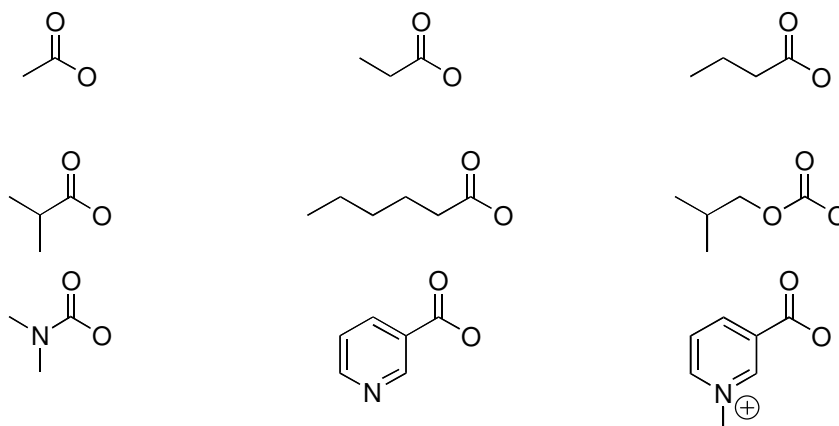
[0080] O indivíduo tratado por um método incorporado pela invenção pode, por exemplo, ser um membro das famílias de bovino, porcino, ovino ou equino, um animal de teste de laboratório como um camundongo, rato, coelho, porco da índia, gato ou cachorro, ou um primata ou um ser humano. Tipicamente, o mamífero será um ser humano.

[0081] Os sais farmacologicamente aceitáveis adequados incluem sais de adição de ácido e aminoácido, sais de adição de base, ésteres e amidas que estão dentro de uma razão risco/benefício razoável, farmacologicamente eficaz e apropriada para o contato com tecidos animais sem resposta indevida de toxicidade, irritação ou alérgica. Os sais de adição de ácido representativos incluem sais de cloridrato, sulfato, bissulfato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, tosilato, citrato, lactato, fosfato, oxalato e borato. Os sais de adição de base representativos incluem aqueles derivados de amônia, potássio, sódio e hidróxidos de amônio quaternário. Os sais podem incluir metal alcalino e cátions alcalinos terrosos como um sódio, cálcio, magnésio e potássio, bem como amônia e cátions de amina. A provisão de tais sais é bem conhecida do destinatário versado. Os sais farmacologicamente adequados são, por exemplo, exemplificados em S. M Berge *et al*, J. Pharmaceutical Sciences (1997), 66:1 a 19, em que o conteúdo do mesmo está incorporado no presente documento em sua totalidade por referência cruzada.

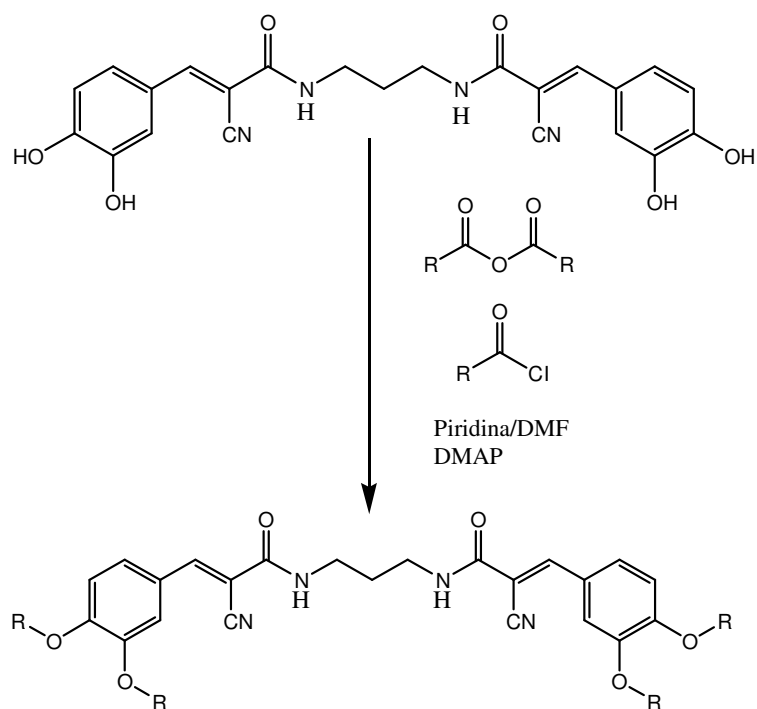
[0082] Os pró-fármacos de compostos da invenção incluem aqueles nos quais grupos selecionados a partir de carbonatos, carbamatos, amidas e alquil ésteres são ligados covalentemente a amino livre, amido, hidróxi ou grupos carboxílicos dos compostos. Os pró-fármacos adequados também incluem derivados de fosfato como ácidos, sais de ácidos ou ésteres, unidos através de uma ligação de fósforo-oxigênio a uma hidroxila livre ou outro grupo apropriado. Um pró-fármaco pode, por exemplo, ser inativo quando administrado, mas ser submetido à modificação *in vivo* no estabilizador de anel de dinamina como resultado de clivagem ou hidrólise de ligações ou a outra forma de modificação por ligação após a administração. A forma de pró-fármaco do composto ativo pode ter permeabilidade de membrana celular maior do que o composto ativo, desse modo, acentuando a potência do composto ativo. Um pró-fármaco também pode ser projetado para minimizar a hidrólise *in vivo* prematura do pró-fármaco externo da célula, de forma que as características de permeabilidade de membrana celular do pró-fármaco sejam mantidas para uma ótima disponibilidade para células e para o uso sistêmico do composto.

[0083] Os pró-fármacos esterificados podem, por exemplo, ser fornecidos por agitação de um composto incorporado pela invenção com um anidrido ou cloreto de ácido (em excesso molar) apropriado em uma solução de piridina/N,N-dimetilformamida (DMF) na presença de um catalisador adequado como dimetilaminopiridina (DMAP). Em alguns casos, a solução pode precisar ser refluxada para conduzir a reação até a conclusão. Na conclusão da reação, o produto esterificado é purificado ou por recristalização ou por cromatografia. Os ésteres representativos incluem alquila C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>, fenila e alquil ésteres de fenila (C<sub>1-6</sub>). Os ésteres incluem metil ésteres. Os exemplos de grupos de pró-fármacos adequados são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3: Exemplos de grupos de pró-fármacos



[0084] Por exemplo, os pró-fármacos de Bis-T-22 e análogos do mesmo foram desenvolvidos para aumentar as características de permeabilidade de membrana celular e, desse modo, aumentar a potência nas células. Uma reação adequada para fornecer pró-fármacos de compostos de tirfostina diméricos é ilustrada no Esquema 3. O Bis-T-22 é exemplificado como o reagente de partida. O composto de tirfostina dimérico é agitado com anidrido ou cloreto de ácido (em excesso molar) apropriado em uma solução de piridina/N,N-dimetilformamida (DMF) na presença de um catalisador apropriado como dimetilaminopiridina (DMAP). Em alguns casos, a solução pode precisar ser refluxada para conduzir a reação até a conclusão. Na conclusão da reação, o produto esterificado é purificado ou por recristalização ou por cromatografia. Os pró-fármacos de tirfostina benzilidenomalonitrila diméricos particulares são mostrados na Tabela 4 e Tabela 5.



Esquema 3: Síntese de pró-fármacos

Tabela 4: Pró-fármacos de bis-tirfostina (Bis-T-22)

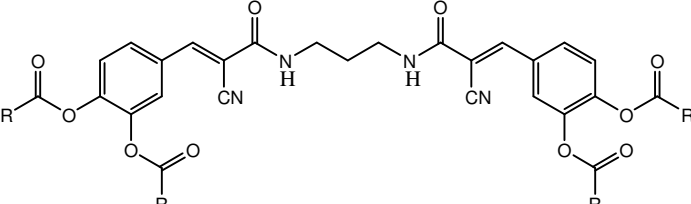
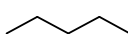
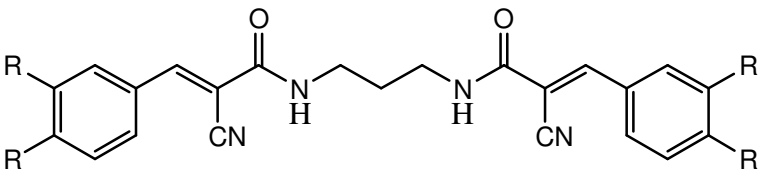
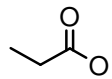
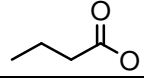
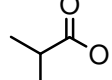
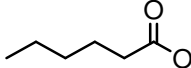
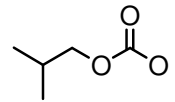
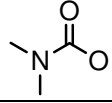
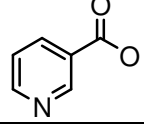
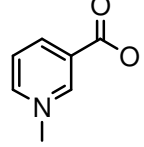
|  |                                                                                     |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Pró-fármaco                                                                          | R                                                                                   |
| TH-1                                                                                 | CH <sub>3</sub>                                                                     |
| TH-2                                                                                 |  |
| TH-3                                                                                 |  |
| TH-4                                                                                 |  |
| TH-5                                                                                 |  |
| TH-6                                                                                 |  |
| TH-7                                                                                 |  |
| TH-8                                                                                 |  |
| TH-9                                                                                 |  |

Tabela 5: Formas de pró-fármaco adicionais

|  |                                                                                     |         |
|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Pró-fármaco                                                                        | R                                                                                   | Mw      |
| Pro-BisT                                                                           |    | 616,59  |
| 80-1                                                                               |    | 672,68  |
| 80-2                                                                               |    | 728,78  |
| 80-3                                                                               |    | 728,78  |
| 80-4                                                                               |    | 841,00  |
| 80-5                                                                               |   | 964,04  |
| 80-6                                                                               |  | 723,74  |
| 81-1                                                                               |  | 868,80  |
| 81-2                                                                               |  | 928,942 |

[0085] O estabilizador de anel de dinamina pode ser administrado a um indivíduo em necessidade de tal tratamento sozinho ou ser coadministrado com um ou mais outros fármacos ou compostos terapêuticos usados convencionalmente para tratar ou aliviar os sintomas associados à doença renal proteinúrica. Por “coadministrado” entende-se a administração simultânea dos fármacos na mesma formulação ou em duas formulações diferentes pela mesma rota ou por rotas diferentes ou administração sequencial pela mesma rota ou por rotas diferentes, em que os fármacos atuam na sobreposição de janelas terapêuticas.

[0086] O estabilizador de anel de dinamina irá, em geral, ser formulado

em uma composição farmacêutica que compreende o estabilizador e um carreador farmacêuticamente aceitável. As soluções injetáveis serão, tipicamente, preparadas através da incorporação do estabilizador no carreador selecionado antes da esterilização da solução por filtração. Para a administração oral, o estabilizador de anel de dinamina pode ser formulado em qualquer carreador oralmente aceitável considerado adequado. Em particular, o estabilizador de anel de dinamina pode ser formulado com um diluente inerte, um carreador comestível assimilável ou pode ser confinado em uma cápsula de gelatina de carcaça macia ou dura. Além disso, o estabilizador de anel de dinamina pode ser fornecido sob a forma de tabletes para ingestão, tabletes bucais, pastilhas, cápsulas, elixires, suspensões ou xaropes.

[0087] Uma composição farmacêutica conforme descrita no presente documento também incorpora um ou mais conservantes como parabenos, clorobutanol, fenol e ácido sórbico. Adicionalmente, a absorção prolongada da composição pode ser ocasionada pela inclusão de agentes que atrasam a absorção como monoestearato de alumínio. Os tabletes, pastilhas, pílulas, cápsulas e similares também podem conter um ou mais dos seguintes: um aglutinante como goma de tragacanto, acácia, amido de milho ou gelatina, um agente de desintegração como amido de milho, amido de batata ou ácido algínico, um lubrificante, um agente adoçante como sacarose, lactose ou sacarina, um agente flavorizante, e ser dotados de um revestimento entérico para facilitar a passagem através do ambiente ácido do estômago no intestino fino.

[0088] Os carreadores farmacêuticamente aceitáveis incluem quaisquer solventes fisiologicamente aceitáveis conhecidos convencionalmente, meio de dispersão, preparações isotônicas e soluções adequadas incluindo, por exemplo, salina fisiológica. O uso de tais ingredientes e meios para substâncias farmacêuticamente ativas é bem conhecido. Exceto na medida em

que qualquer meio ou agente convencional é incompatível com o mimético, o uso dos mesmos é expressamente abrangido. É particularmente preferencial formular as composições na forma de dosagem unitária para a facilidade de administração e uniformização de dosagem. Uma forma de dosagem unitária como usada no presente documento deve ser entendida como unidades fisicamente distintas, cada uma contendo uma quantidade predeterminada do estabilizador de anel de dinamina calculada para produzir um efeito terapêutico ou profilático. Quando a forma de dosagem unitária é uma cápsula, essa pode conter o ativo em um carreador líquido. Vários outros ingredientes podem estar presentes como revestimentos ou para, de outro modo, modificar a forma física da dosagem unitária.

[0089] As composições farmacêuticas incorporadas pela invenção conterão, em geral, pelo menos cerca de 0,1% em peso do estabilizador de anel de dinamina até cerca de 80% de peso/peso da composição. A quantidade do estabilizador de anel de dinamina na composição será tal que uma dosagem eficaz adequada seja aplicada ao indivíduo levando em consideração o modo proposto de administração. As composições orais preferenciais conterão entre cerca de 0,1 µg e 4000 mg do estabilizador.

[0090] A dosagem do estabilizador de anel de dinamina dependerá de inúmeros fatores incluindo se deve ser administrada para uso profilático ou terapêutico, a doença ou condição para a qual o ativo é destinado a ser administrado, a gravidade da condição, a idade do indivíduo e fatores relacionados incluindo peso e saúde geral do indivíduo conforme podem ser determinados de acordo com os princípios médicos aceitáveis. Por exemplo, uma baixa dosagem pode ser dada inicialmente, a qual é subsequentemente aumentada em cada administração após a avaliação da resposta do indivíduo. De modo similar, a frequência da administração pode ser determinada no mesmo modo, ou seja, por monitoramento de forma contínua da resposta do indivíduo entre cada dosagem e, se necessário, aumentar a frequência de

administração ou, alternativamente, reduzir a frequência da administração.

[0091] Tipicamente, um estabilizador de anel de dinamina será administrado de acordo com um método incorporado pela invenção em uma dosagem até cerca de 50 mg/kg em peso corporal e, de preferência, em uma faixa de cerca de 1 mg/kg a cerca de 30 mg/kg em peso corporal.

[0092] As rotas de administração incluem, mas não se limitam a, forma intravenosa, intraperitoneal, por infusão, forma oral, forma retal e por implante. Os carreadores farmacologicamente aceitáveis e formulações úteis em composições da presente invenção podem, por exemplo, ser encontrados em manuais e textos bem conhecidos do destinatário versado, como “Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Mack Publishing Co., 1995)”, em que os conteúdos do mesmo são incorporados no presente documento em sua totalidade por referência.

[0093] A invenção será adicionalmente descrita doravante no presente documento com referência a Exemplos não limitadores.

### **EXEMPLO 1: Ensaios de montagem de dinamina**

#### **1. Ensaio de automontagem de dinamina – Baixa concentração de dinamina**

[0094] O ensaio de automontagem de dinamina foi realizado com dinamina nativa (40 nM) com o uso do mesmo tampão de coluna Hepes (HCB - 20 mM de Hepes, 2 mM de EGTA, 1 mM de  $MgCl_2$  1 mM de PMSF, 1 mM de DTT, 20 µg/ml de leupeptina, pH 7,4) conforme descrito anteriormente (Warnock *et al.* 1996). Entretanto, todos os tampões também incluíram 1% de DMSO, que foi o veículo usado para os inibidores de dinamina de teste. As concentrações de NaCl foram variadas a partir de um estoque em 200 mM de NaCl. A dinamina foi centrifugada a 100,000 g por 20 min e os sobrenadantes (S) e pelotas (P) foram coletadas, precipitadas com ácido tricloroacético, solubilizados em tampão de amostra SDS e separados em géis de SDS e dinamina I foi detectada por transferência de Western blot

com o uso de anticorpo  $\alpha$ -dinamina I policlonal de ovelha de laboratório (in-house).

## **2. Ensaio de automontagem de alta concentração de dinamina – Alta concentração de dinamina**

[0095] Esse ensaio de automontagem de dinamina foi realizado com dinamina nativa (5,2  $\mu$ M) com o uso do tampão de coluna Hepes descrito acima no Exemplo 1.1, (com a adição de 1% de DMSO conforme descrito acima). Os efeitos de Bis-T foram medidos através de pré-incubação da dinamina com as concentrações de Bis-T indicadas por 10 min à temperatura ambiente (22 °C). As concentrações de NaCl foram variadas a partir de um estoque em 200 mM de NaCl. Após a incubação, os tubos foram transferidos para um rotor TLA120.2 (Beckman) e centrifugados em uma ultracentrífuga de mesa (Optima TLX, Beckman) a 100,000 g durante 20 min e os sobrenadantes (S) e pelotas (P) foram coletadas, precipitados com ácido tricloroacético, solubilizados em tampão de amostra SDS e separados em géis de SDS.

## **EXEMPLO 2: Estabilizadores de anel de dinamina são um subgrupo de inibidores de dinamina**

[0096] Dentre as várias classes de inibidores de dinamina estão os subconjuntos de estabilizadores de anel de dinamina. As tirfostinas benzilidenomalonitrila diméricas de Bis-T inibem potencialmente a atividade GTPase da dinamina helicoidal e podem estimular a atividade basal por meio da promoção da formação de anel na ausência de um modelo para a montagem helicoidal da dinamina. A Figura 1 mostra a atividade GTPase *in vitro* da dinamina de cérebro de ovelha (principalmente esta é dinamina I) em concentrações de dinamina crescentes, abaixo daquelas exigidas para a montagem de anel. Os símbolos preenchidos (linhas sólidas) mostram que a dinamina é estimulada por lipossomas em todas as concentrações de dinamina testadas (formando uma hélice). 2-Ciano-N-{3-[2-ciano-3-(3,4,5-

triidroxifenil)-acriloilamino]-propil}-3-(3,4,5-triidroxifenil)-acrilamida (Bis-T-23) a 5  $\mu$ M inibe potencialmente a dinamina em todos os pontos (entretanto, em dinamina muito alta (400 nM), Bis-T-23 falha ao inibir de modo potente devido à alta concentração de dinamina).

[0097] Em contraste, na ausência de lipossomas (onde a dinamina é incapaz de formar hélices) os resultados são flagrantemente opostos (Figura 1, símbolos abertos, linhas pontilhadas). Com o uso de concentrações de diamina abaixo daquelas necessárias para formar anéis, a Bis-T-23 estimula potencialmente a atividade de dinamina. Em contraste à dinamina helicoidal que é inibida em todas as concentrações de diamina, na ausência de lipossomas a Bis-T-23 não ativa ou inibe a dinamina em baixas concentrações de diamina, mas estimula apenas a 100 nM ou em concentração de dinamina superior (Figura 1). Isso indica que a Bis-T-23 não nem ativadora nem inibidora da atividade GTPase basal de diamina, mas afeta a diamina de anel.

[0098] O  $IC_{50}$  para inibição de dinamina helicoidal estimulada por PS nesse experimento é o estudo 500 nM (Figura 2). A concentração de Bis-T-23 que causa 50% de ativação de atividade de dinamina basal ( $EC_{50}$ ) foi notadamente sobre valor. Isso sugere que o mecanismo de estabilização e inibição do anel podem estar relacionados para essa série de compostos.

[0099] Em seguida, um experimento de curso de tempo de estimulação Bis-T-23 de GTPase de dinamina (Figura 3) foi conduzido. Com o uso de altas concentrações de diamina (800 nM) e concentrações médias de NaCl (30 mM), a atividade GTPase de dinamina basal foi aumentada linearmente com o tempo, visto que não se montam como anéis nessas condições. Na presença de Bis-T-23 a 5  $\mu$ M, a atividade de dinamina foi enormemente aumentada após uma “fase de atraso” inicial de cerca de 4 minutos. Acredita-se que a fase de atraso indica o tempo necessário para que a dinamina se monte como anéis. Os resultados mostram que Bis-T-23 não acelera as taxas iniciais de montagem de anel de dinamina, ao invés, sugerindo que a mesma inibe a

desmontagem de anel.

[00100] Quando uma série de inibidores potentes de dinamina-iminodina foi testada para a atividade de estabilização de anel, um subconjunto foi revelado por ser um potente ativador da atividade GTPase de dinamina basal (isto é, na ausência de PS; Figura 4). As iminodinas 17, 22 e 23 tiveram valores de estímulo ( $EC_{50}$ ) de 1 a 20  $\mu M$ , indicativos da atividade do estabilizador de anel.

[00101] Houve pouca correlação entre o  $IC_{50}$  para a dinamina estimulada por PS e o  $EC_{50}$  para a dinamina na ausência de PS. Portanto, apenas um subconjunto de inibidores de dinamina são estabilizadores de anel e os estabilizadores de anel não podem ser reconhecidos como simplesmente inibidores potentes da atividade GTPase de dinamina estimulada por PS (Tabela 2). Por exemplo, as iminodinas 17 e 22 são inibidoras equipotentes de dinamina e ainda são 30 vezes diferentes na atividade estabilizadora de anel. Do mesmo modo, as iminodinas 20 e 21 são similarmente potentes inibidoras de dinamina e ainda a iminodina 20 não exibe atividade estabilizadora de anel (Tabela 2). Deste modo, a atividade estabilizadora de anel pode ser identificada pela capacidade para estimular a atividade de proteína dinamina, na ausência de outros fatores estimulantes (como microtúbulos, nanotubos ou lipossomas PS).

[00102] Para verificar que os estabilizadores de anel necessitam de oligomerização de dinamina, uma forma recombinante de dinamina, chamada de GG-2, que é dimérica e ainda é incapaz de se associar a oligômeros de ordem superior (Chappie et al 2009) foi testada. Os estabilizadores de anel são incapazes de estimular a atividade basal de tais construtos (Figura 5).

[00103] A dependência-concentração de dinamina do efeito de ativação de Bis-T-23 sugeriu que isso poderia alterar a formação *in vitro* de anéis de dinamina. Um bloqueio na desmontagem de anel deve ser manifestado como um acúmulo de anéis *in vitro*. A própria dinamina se monta em anéis na

ausência de quaisquer cofatores quando a resistência iônica de tampão é reduzida (Song *et al.* 2004). Para determinar se os compostos de Bis-T regulam ou não as interações de dinamina-dinamina, um método bem estabelecido de centrifugação de alta velocidade em quantidades decrescentes de NaCl para coletar anéis na pelota (Warnock *et al.* 1996) foi usado. As concentrações superiores de dinamina (520 nM) e dinamina foram visualizadas através de manchamento Coomassie sobre géis de SDS (Figura 6). Conforme relatado por outros, a dinamina está no sobrenadante em  $\geq 40$  mM de NaCl, mas se auto montou em  $\leq 20$  mM de NaCl e é encontrada na pelota. A Bis-T-22 em 100  $\mu$ M aumentou a montagem de anel nas concentrações intermediárias de sal (40, 60 nM) antes de sua montagem espontânea em sal inferior. Em um NaCl a 40 mM fixo, a Bis-T-22 promoveu todas as diaminas para formar anéis em concentrações de 300  $\mu$ M. Portanto, mediante essas condições, a Bis-T-22 estabilizou/promoveu a automontagem de dinamina I. Deste modo, concluiu-se que existe um efeito direto sobre as interações de dinamina-dinamina, com o composto aparecendo para promover a montagem de anel de dinamina e atividade GTPase *in vitro* em virtude da prevenção da desmontagem de anel. Por conseguinte, anéis ativos de GTPase acumulam.

[00104] Para demonstrar diretamente se os estabilizadores de anel de dinamina evitam ou retardam a desmontagem de anéis de dinamina, um ensaio de centrifugação bem estabelecido foi empregado. Brevemente, a dinamina I foi pré-montada como uma hélice na presença de lipossomas PS durante 30 min, após isso o estabilizador de anel de dinamina Bis-T-23 ou estabilizador de anel de não dinamina dinole 34-2 (vide Exemplo 4) foi adicionado. As amostras foram, então, centrifugadas em uma microcentrífuga durante 10 min para coletar sobrenadantes (Sup) ou pelotas. Nesse ensaio, a dinamina helicoidal é encontrada primeiramente na pelota. Entretanto, a adição de NaCl (150 mM) ou Mg/GTP (1 mM) é conhecida para desmontar

dinamina e é encontrada primeiramente no sobrenadante (vide Figura 7). A Bis-T-23 foi revelada por reduzir a desmontagem de dinamina helicoidal, enquanto que a dinole 34-2 não (Figura 7). Isso mostra que o mecanismo através do qual a Bis-T atua como uma estabilizadora de anel de dinamina é, ou inclui, retardar a desmontagem da hélice ou anel de dinamina. Esse mecanismo único de ação explica porque estabilizadores de anel de dinamina podem estimular GTPase basal enquanto inibe a atividade GTPase de dinamina helicoidal ao mesmo tempo.

### **EXEMPLO 3: Bis-T-23 produz anéis de dinamina inflexíveis *in vitro***

[00105] Uma característica de dinamina helicoidal é que a hélice é uma estrutura altamente flexível. Mediante a hidrólise de GTP, essa é capaz de reduzir rapidamente seu diâmetro (*constrição*) ao mesmo tempo em que também expande em comprimento (*expansão helicoidal*) (Stowell et al. 1999; Chen et al. 2004; Roux et al. 2006). Acredita-se que isso seja um mecanismo potencial utilizado para a fissão dos pescoços de vesículas endocíticas recentemente germinadas nas células (Roux et al. 2006). A natureza altamente flexível de dinamina helicoidal foi confirmada por análise EM de dinamina ligada a lipossomas de fosfatidilserina na ausência de GTP ou GDP (Figura 8). A dinamina misturada com lipossomas PS formou uma hélice com características específicas (Figuras 8A e C): os laços individuais da hélice eram altamente variados em diâmetro, formados em diferentes ângulos relativos ao lipídeo subjacente, e o espaçamento entre laços foi altamente variável. Em contraste, a Bis-T-23 a 5  $\mu$ M alterou drasticamente o formato helicoidal (Figuras 8B e D). Notavelmente, os laços individuais da hélice eram altamente uniformes em diâmetro, formados em ângulos constantes em relação ao lipídeo subjacente, e o espaçamento entre laços foi altamente constante. A dinamina ligada à Bis-T-23 aparentou ser similar aos relatos anteriores de dinamina ligada à GTP $\gamma$ S em nanotubos lipídicos (Stowell et al. 1999). Isso indica que a Bis-T-23 pode fechar laços de

dinamina em um diâmetro inflexível e uniforme, semelhante ao estado ligado a GTP, através da prevenção da desmontagem de anel. O efeito é particularmente notável nas extremidades de cada tubo helicoidal, que são “afuniladas” na ausência de Bis-T-23, ainda “grossas” em sua presença (Figuras 8C e D), demonstrando a inflexibilidade de laços afetados com Bis-T-23.

[00106] Os resultados do microscópio eletrônico (EM) revelaram um mecanismo comum tanto para inibição quanto ativação de GTPase de dinamina. Concluiu-se que a atividade GTPase super elevada de dinamina helicoidal é inibida por Bis-T-23, devido ao fato de que o fármaco torna os laços da hélice inflexíveis. Na ausência de lipossomas PS, a atividade dos anéis de dinamina individuais induzida pela presença de Bis-T-23 é estimulada devido ao mesmo acúmulo de anéis inflexíveis uniformemente dimensionados. Deste modo, foi concluído que a Bis-T-23 evita a rápida desmontagem de dinamina que seria normalmente conduzida por hidrólise de GTP, a qual conduz a desmontagem de dinamina *in vitro*.

[00107] A seguir, o efeito de uma Bis-T-23 estabilizadora de anel sobre a formação de anéis de dinamina na ausência de um modelo como lipossomas PS foi examinado. Em concentrações elevadas *in vitro*, a dinamina é conhecida por ser submetida à automontagem formando anéis que são detectáveis por EM (Hinshaw e Schmid, 1995). Essa automontagem requer altas concentrações de diamina tipicamente na ordem de 500 a 1,000 nM e não é observada em concentrações inferiores de diamina. Especificamente, o efeito de Bis-T-23 (5,4  $\mu$ M) sobre dinamina a 200 nM na ausência de modelo foi testado, que está abaixo da concentração limite para a automontagem. Conforme esperado, a dinamina não foi submetida à automontagem em níveis apreciáveis nessa concentração (Figura 9A). Entretanto, na presença de Bis-T-23, a dinamina mostrou um aumento massivo imprevisto em automontagem (Figura 9A). As imagens de alta potência confirmaram que as estruturas

densas de elétron são anéis de dinamina *bona fide* (Figura 9B). A análise quantitativa de cerca de 2,000 anéis de dinamina mostrou um aumento massivo na formação de anel induzida por Bis-T-23 (Figura 9C). Esses resultados confirmam que a Bis-T-23 promove o acúmulo de anéis de dinamina ou através da indução de sua formação ou através da prevenção de sua desmontagem. As conclusões com dinamina basal são completamente inesperadas para um inibidor de dinamina e são indicativos da atividade estabilizadora de anel.

#### **EXEMPLO 4: Bis-T-22 produz anéis de dinamina inflexíveis nas células**

[00108] Esse Exemplo mostra que um estabilizador de anel de dinamina é capaz de promover a formação de anel de dinamina nas células e evitar ou retardar sua desmontagem. Quando vesículas são endocitadas por meio da trajetória dependente da clatrina, essas são conhecidas por serem internalizadas como figuras conformadas em ômega próximas da membrana de plasma com pescoços curtos e parcialmente constritos. Esses podem ser detectados pela transmissão de microscópio eletrônico (EM) em uma baixa frequência. O tratamento de células por 10 a 30 minutos com um inibidor de dinamina clássico como dynasore causa um acúmulo massivo de depressões revestidas com clatrina na membrana de plasma de células sem a promoção de anéis de dinamina (Macia et al, 2006). Outros inibidores de dinamina como MiTMAB (Quan et al, 2007) ou dynole 34-2 não incluem qualquer acúmulo de depressões revestidas, provavelmente devido ao fato de esses, pelo menos parcialmente, atuarem na superfície lipídica para evitar sua formação inicial e serem inibidores sem características estabilizadoras de anel. Em contraste a essas observações, um estabilizador de anel de dinamina causa o acúmulo de depressões revestidas de clatrina nas células com dois recursos distintos: os pescoços de vesículas são altamente alongados e são cercados por anéis densos de elétron. Os linfoblastos humanos (que expressam dinamina II) foram tratados com dynasore, MiTMAB (não mostrado) ou Bis-T-22 por 30

min e preparados para análise EM. Embora o dynasore e MiTMAB tenham produzido os resultados esperados relatados previamente, a Bis-T-22 eliciou um acúmulo massivo em todas as células de depressões revestidas de clatrina com pescoços altamente alongados e que foram cercados por anéis ou espirais (Figura 10A). De modo similar, quando os sinaptossomas de cérebro de rato (terminais nervosos isolados, que expressam principalmente a dinamina I) foram tratados com Bis-T-22 durante 30 min e despolarizados com KCl para evocar a endocitose, foram detectadas depressões endocíticas presas que foram cercadas por um único anel denso de elétron (Figura 10B painéis 3 inferiores). Nenhum anel ou vesículas presas foram detectados quando os sinaptossomas foram desestimulados (Figura 10B topo). Isso imita as observações *in vitro* sobre dinamina I purificada descrita anteriormente que forma anéis únicos (Figura 9).

[00109] Essas observações ilustram que estabilizadores de anel têm a capacidade de promover e estabilizar anéis em sítios de endocitose presa em tipos celulares distintos. Essa característica não é encontrada com inibidores de dinamina que não são estabilizadores de anel de dinamina, suportando que a estabilização do anel de dinamina é uma ação inovadora de compostos estabilizadores de anel que podem ocorrer no contexto de células vivas e não está restrita às condições *in vitro* com a proteína purificada.

#### **EXEMPLO 5: Nem todos os inibidores de dinamina são estabilizadores de anel de dinamina**

[00110] Uma nova série de potentes inibidores GTPase de dinamina com base na estrutura de dynasore (Macia *et al.* 2006) foi designada. Esses compostos foram chamados de dyngo. O análogo de dyngo mais ativo é dyngo-4a, com um IC<sub>50</sub> para dinamina estimulada por PS de 300 nM, em comparação com IC<sub>50</sub> de dynasore (dyngo-7a) de 14 µM. A estrutura dos dyngos lembra uma forma monomérica da Bis-T e também tirfostinas monoméricas. Entretanto, foi revelado que os dyngos e, especialmente

dynasore, se ligam fortemente ao detergente Tween-80 que é um componente normal de ensaios para triar inibidores de dinamina (Quan e Robinson 2005). Mediante a realização do ensaio de GTPase basal nos estudos presentes na ausência de Tween-80, foi revelado que tanto os dyngos quanto dynasore estimularam a atividade GTPase de dinamina basal para extensões similares como Bis-T-23 (Figura 10A). Isso mostra que a ativação GTPase de dinamina basal (isto é, ativação do anel de dinamina) não está restrita às tirfostinas de Bis-T nem às iminodinas.

[00111] Outra série de inibidor potente de dinamina em uma classe química inovadora é a série “dinol” de compostos, que são inibidores baseados em indol conforme descrito no pedido de patente internacional N° PCT/IB2008/002387 (WO 2009/034464) (vide também Hill *et al.* 2009). O dinol mais potente desenvolvido até e presente data é dinol 34-2 (2-ciano-3-(1-(2-(dimetilamino)-etil)-1H-indol-3-il)-N-octilacrilamida) com um IC<sub>50</sub> para dinamina estimulada por PS de 1 µM. Dinol 34-2 falhou ao estimular a atividade basal de dinamina (Figura 11A). Por conseguinte, não é um inibidor de desmontagem de anel de dinamina (isto é, não um estabilizador de anel de dinamina).

[00112] A seguir, uma gama de análogos de Bis-T potentes foi testada no ensaio de GTPase padrão empregado na presença de Tween-80. Quatro dentre os inibidores de dinamina mais potentes (Hill *et al.* 2005) também se revelaram estabilizadores de anel de dinamina visto que aumentaram a atividade basal (Figura 11B). Dingo-4a também foi eficaz, embora dynasore tenha falhado ao estimular a atividade GTPase basal sob essas condições (devido a sua ligação de Tween-80 não específica). De forma importante, inúmeros inibidores de dinamina na série de MiTMAB (que tinha como alvo o domínio PH, Quan et al 2007) ou série de dinol (que tinha como alvo um sítio alostérico no domínio GTPase, Hill *et al.* 2009) falharam ao estimular a atividade GTPase de dinamina basal (Figura 11B). Portanto, nem todos os

inibidores de dinamina com mecanismos de ação distintos sobre a dinamina aumentaram a atividade GTPase de dinamina basal (isto é, esses não são todos estabilizadores de anel de dinamina). Isso indica que os estabilizadores de anel representam uma classe distinta de modulador de dinamina, não especificamente conectada à sua capacidade ou para não inibir a atividade GTPase *in vitro* de dinamina estimulada por modelo.

[00113] Em resumo, uma variedade de estabilizadores de anel de dinamina a partir de várias classes químicas distintas foi identificada no presente documento por sua capacidade de estimular a atividade basal de dinamina de comprimento total. O mecanismo de estímulo foi explicado visto que esses compostos estabilizam especificamente a automontagem de dinamina formando anéis únicos (desse modo, estimulando a taxa basal de hidrólise de GTP), mais provavelmente através da inibição da desmontagem de dinamina. Nem todos os estabilizadores de anel de dinamina foram potentes inibidores de atividade GTPase de dinamina helicoidal. De forma importante, a automontagem de dinamina formando anéis tem um efeito específico e seletivo sobre o citoesqueleto de actina (ver abaixo) e esses compostos são capazes de estabilizar ou prolongar a função de anéis de dinamina no citoesqueleto de actina.

#### **EXEMPLO 6: Actina estimula a montagem *in vitro* do anel de dinamina**

[00114] No presente estudo, foi revelado que a formação de anéis por dinamina é essencial para o aumento do citoesqueleto de actina em podócitos, e interações diretas entre dinamina e actina filamentosa (F-actina) foram identificadas. Em particular, foi identificado um sítio de ligação de actina não reconhecido em dinamina que se liga ao longo de filamentos de actina e os alinha em feixes. A F-actina e, em particular, filamentos curtos cobertos em suas extremidades farpadas por gelsolina (Gsn), promovem a formação de anel de dinamina e estimulam sua atividade GTPase. Essa interação, por sua vez, dissocia a gelsolina das extremidades filamentosas farpadas e promove o

alongamento. A interação recíproca entre a dinamina e filamentos cobertos com Gsn pode, desse modo, influenciar a arquitetura e a dinâmica de actina. Os mutantes de dinamina defectivos na ligação de actina *in vitro* prejudicaram a oligomerização nas células e reduziram a montagem de fibras de tensão de actina e alteraram o comportamento do citoesqueleto de actina cortical em podócitos cultivados. Em contraste, um mutante de dinamina com afinidade de actina aumentada tem uma propensão maior para oligomerizar no citoplasma e estimula a montagem de fibra de tensão na região perinuclear da célula. Essas conclusões sugerem uma interação complexa entre ciclo de GTPase de dinamina e a organização global do citoesqueleto de actina em podócitos.

#### **EXEMPLO 7: Dinamina liga F-actina**

[00115] Para determinar se a dinamina afeta o citoesqueleto de actina, a questão de se a dinamina deve ligar diretamente a actina filamentosa ou não (F-actina) foi testada. Em particular, um ensaio de cossedimentação de actina foi realizado, no qual a F-actina sedimenta sob centrifugação de alta velocidade. Se a dinamina interagir com F-actina, seria esperado cossedimentar e, desse modo, estar presente na fração de pelota. Na presença de F-actina, mas não em sua ausência, grande parte de dinamina foi encontrada na pelota (Figura 12, pistas 2 e 14). As interações de dinamina-actina não exigem a presença de GTP, indicando que não necessitam da oligomerização de dinamina. Além disso, a dinamina que se liga à F-actina foi observada na presença de GTP $\gamma$ S (Figura 12, pista 6), indicando que a oligomerização de dinamina não foi inibitória para a ligação. O Kd de dinamina para actina foi de aproximadamente 0,4  $\mu$ M, que é similar às afinidades de outras proteínas de ligação de actina como  $\alpha$ -actinina 4 para actina (Weins et al. 2005).

#### **EXEMPLO 8: O domínio de ligação de actina de dinamina está no domínio mediano de dinamina**

[00116] A seguir, o sítio de ligação de actina foi mapeado para uma região entre o aminoácido 399 e aminoácido 444 de dinamina II (dyn2) (Figura 13). Conforme previsto para um domínio de ligação de actina (Van *et al.* 1996), essa região contém inúmeros aminoácidos positivamente carregados conservados em todos os produtos de gene de dinamina de levedura a mamíferos. Também é alternativamente dividida dentro de isoformas de dinamina de mamífero diferentes (chamadas variante a e b em dinaminas I e II) (vide Figura 13, SEQ ID N° 1-4). Uma mutagênese sítio-direcionada foi realizada em resíduos carregados e conservados dentro desse domínio de ligação de actina para gerar os mutantes de ‘perda de função’ putativos, dynK/E (SEQ ID N° 9) e dynK/A (SEQ ID N° 10) e um mutante de ‘ganho de função’ putativo, dynE/K (SEQ ID N° 11) (Figura 13). As afinidades de dynK/E e dynK/A para actina foram reveladas como sendo reduzidas ( $K_d$  de 1,7 e 2,8  $\mu\text{M}$ , respectivamente), enquanto que a afinidade de dynE/K para actina foi aumentada ( $K_d = 0,03 \mu\text{M}$ ) (Figura 14). Todas as três proteínas mutantes tiveram propriedades do tipo selvagem com relação à taxa estimulada e basal de hidrólise de GTP, indicando dobramento apropriado.

#### **EXEMPLO 9: Interações de dinamina-actina estão envolvidas no citoesqueleto de actina de podócitos**

[00117] Para determinar o papel das interações de dinamina-actina na organização de actina, as consequências para a morfologia de podócitos de expressão de mutantes de dinamina com afinidade alterada para F-actina foram examinadas. Em podócitos de camundongo totalmente diferenciados, o citoesqueleto de actina é organizado em feixes paralelos de fibras de tensão contrátil de actina-miosina no corpo celular e uma rede cortical de filamentos de actina ramificados e curtos localizados abaixo da membrana de plasma que aciona a formação de lamelipodia e filopodia. A expressão de dynK44A, um mutante de dinamina que não se liga a GTP, aboliu fibras de tensão dentro do corpo celular e gerou uma rede de actina espessa com hiper feixes nas

proximidades da membrana de plasma, causando um formato celular poligonal (Sever *et al.* 2007). No presente estudo foi revelado que a expressão de dynK44A aboliu a formação de lamelipodia e filopodia (Figura 15B). A expressão do mutante de ‘perda de função’ dynK/E resultou in redução de fibras de tensão e alterações drásticas no formato celular (Figura 15C). Em contraste, a expressão do dynE/K de ‘ganho de função’ causou um claro aumento nas fibras de tensão dentro do corpo celular (Figura 15D). Um aumento similar nas fibras de tensão foi observado nas células que expressam dynR725A (Figura 15E), o mutante que vive mais tempo no estado ligado a GTP montado.

#### **EXEMPLO 10: F-actina de reticulação de anéis de dinamina em feixes apertados**

[00118] Para avaliar os efeitos de dinamina na estrutura de filamentos de actina, a F-actina foi examinada com o uso de manchamento negativo e microscópio eletrônico (EM). A dinamina foi oligomerizada formando anéis através da adição de GTP $\gamma$ S (um análogo de GTP não hidrolisável que promove sua formação de anel) e os filamentos de actina reticulados formando feixes apertados (Figura 16). O espaçamento de filamento a filamento nesses foi de 17 a 20 nm, menor do que o diâmetro de um anel de dinamina (~ 50 nm). Deste modo, essas conclusões sugerem que na ausência de outros anéis de dinamina de proteínas de ligação de actina podem-se formar feixes de actina compostos de filamentos paralelos com um espaçamento bem definido. Esses filamentos paralelos de actina ocorrem em fibras de tensão e filopodia. Acredita-se que isso seja o primeiro relato de uma função biológica para formação de anel de dinamina.

#### **EXEMPLO 11: Anéis de dinamina deslocam gelsolina a partir de extremidades de filamento farpadas**

[00119] A seguir, a questão de se a dinamina pode ou não expor as extremidades farpadas de F-actina coberta com gelsolina (Gsn) foi testada. A

actina foi polimerizada na presença de gelsolina nas razões indicadas (1G:A200 ou 1G:A1000) (Figura 17). Mediante essas condições, a gelsolina cobre >99% da extremidade farpada. O comprimento do filamento é definido pela razão de Gsn:actina ( $\sim 0,5 \mu\text{m}$  ou  $2,7 \mu\text{m}$ , respectivamente) e a extensão da polimerização de actina é controlada pela concentração crítica de extremidades filamentosas pontiagudas que é  $\sim 0,6 \mu\text{M}$ . A solução de actina foi, então, diluída para  $0,33 \mu\text{M}$  na presença ou ausência de dinamina. Mediante essas condições, a actina pode apenas se polimerizar novamente se as extremidades farpadas tornarem-se disponíveis. A adição da dinamina induziu a polimerização de actina, mas apenas na presença de  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  (Figura 17, comparar os diamantes e círculos com os quadrados). Isso é consistente com os anéis de dinamina que têm a capacidade de deslocar a gelsolina a partir das extremidades filamentosas farpadas ou diretamente ou através da alteração da estrutura de F-actina conforme suas extremidades farpadas. Em geral, os dados estabelecem uma interconexão entre a dinâmica de F-actina e a oligomerização de dinamina. Em particular, os curtos filamentos de actina cobertos com gelsolina promovem a formação do anel de dinamina que, por sua vez, dissocia a gelsolina das extremidades farpadas e permite o alongamento do filamento.

#### **EXEMPLO 12: Bis-T-23 estimula a formação de anéis de dinamina**

[00120] Prevê-se que tanto dynR725A quanto dynE/K vivam mais tempo na formação de anel de dinamina (Sever et al. 2007). O DynR725A foi relatado anteriormente para resgatar a proteinúria em um modelo LPS através da oligomerização nos anéis e, desse modo, evitando a clivagem pela protease catepsina L (CatL) (Sever *et al.* 2007). A expressão de dynR725A é suficiente para reduzir a proteinúria em um modelo de camundongo de síndrome nefrótica (Sever et al. 2007).

[00121] A questão de se a Bis-T-22 e Bis-T-23 deve ativar ou não o anel de dinamina do tipo selvagem e a fenocópia do fenótipo de dynR725A foi

testada. A Bis-T-23 aumentou a taxa de hidrólise de GTP de dinamina basal para um nível similar à adição de complexos de Gsn-F-actina (Figura 18). Deste modo, tanto a Bis-T-23 quanto os complexos de Gsn-F-actina promovem a oligomerização de dinamina em anéis. Quando ambos os reagentes estavam presentes simultaneamente, houve um estímulo adicional de atividade GTPase de dinamina (Figura 18). Juntos, esses dados sugerem que Bis-T-23 não compete por ligação de F-actina através de dinamina e que ambos os componentes atuam adicional e sinergicamente em relação à oligomerização de dinamina.

### **EXEMPLO 13: Bis-T-23 estimula adesões focais e fibras de tensão em podócitos cultivados**

[00122] Para determinar se a ação *in vitro* dos estabilizadores de anel de dinamina também ocorre nas células, o efeito de Bis-T-23 sobre o citoesqueleto de actina em podócitos de camundongo cultivados foi testado (Figura 19). 10 min após a adição de Bis-T-23 houve um aumento drástico nas fibras de tensão bem definidas (Figura 19B a D). Isso foi associado a um aumento drástico no número de adesões focais (manchamento de paxilina na Figura 19B). Enquanto a Bis-T-23 inibe a endocitose (não mostrada), o citoesqueleto de actina é profundamente diferente comparado a células que expressam dynK44A (perda de fibras de tensão e aumento em filamentos de actina de hiper feixes). Deste modo, o aumento observado nas fibras de tensão é diferente devido à inibição de endocitose.

[00123] Esses resultados mostram que os anéis de dinamina têm um papel na formação de fibras de tensão e adesões focais em podócitos cultivados e que as moléculas estabilizadoras de anel de dinamina como Bis-T, podem inibir ou reverter a proteinúria através da recuperação de FP funcional devido à reorganização de actina.

### **EXEMPLO 14: Inibição de proteinúria em modelos animais**

[00124] Para demonstrar a efetividade de um anel estabilizador *in vivo*,

dois diferentes modelos de ratos de doença renal foram utilizados, um modelo genético e um modelo de toxicidade aguda. Os camundongos que expressam uma mutação de ‘ganho de função’ na encodificação de gene ACTN4 para  $\alpha$ -actinina 4 foram completamente caracterizados (Kaplan et al. 2000; Henderson et al. 2008; Yao et al. 2004). Esses animais desenvolveram extinção de FP e proteinúria devido à atividade de “hiper agrupamento” do mutante de  $\alpha$ -actinina 4 que induz a agregação de fibras de tensão. A proteinúria se desenvolve em 4 a 6 semanas de idade. Os animais usados no presente estudo foram obtidos junto à Dr. Martin Pollak, Brigham e Women’s Hospital, Boston, MA, EUA. O fenótipo proteinúrico foi confirmado pela determinação de albumina e creatinina urinária com o uso de kits de ensaio Companion de Creatinina e ELISA específico de albumina de camundongo (Exocell e Bethyl Laboratories) seguindo os protocolos do fabricante. O animal de controle foi um companheiro de ninhada. A Bis-T-23 foi dissolvida em 100% de DMSO para fazer uma solução estoque de 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  da qual 5  $\mu\text{l}$  foi diluída em 200  $\mu\text{l}$  de 1x PBS e isso foi injetado intraperitonealmente (IP) no animal de teste (166  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de peso corporal) no tempo 0 h. Os níveis de proteína na urina foram medidos a cada 2 horas após a injeção. Os resultados são mostrados na Figura 20. Conforme pode ser visto, uma redução em proteinúria para níveis do tipo selvagem foi obtida até 6 horas depois da administração da Bis-T-23.

[00125] Um Segundo modelo de proteinúria aguda foi, então, empregado para testar a capacidade de um estabilizador de anel de dinamina de aprimorar a proteinúria em um modelo reversível de doença renal proteinúrica. A proteinúria induzida por LPS foi utilizada conforme previamente descrito (Sever et al., 2007). De maneira breve, camundongos BALB/c fêmeas com quatro semanas de idade foram submetidos à injeção intraperitoneal (IP) duas vezes com 200  $\mu\text{g}$  de LPS ultra puro diluído em salina tamponada com fosfato em uma concentração de 1 mg/ml. A proteinúria se desenvolveu dentro de 48

h (Figura 20, 2xLPS). A Bis-T-23 foi dissolvida em DMSO para as concentrações apropriadas e 300 µg por 100g de peso corporal foram aplicados por injeção IP e DMSO foi usado como um controle de veículo. O nível de proteína na urina foi determinado pelo uso de um kit ELISA específico de albumina de camundongo de acordo com o protocolo do fabricante (Bethyl Laboratories). A administração da Bis-T-23 resgatou parcialmente a proteinúria a partir de 2 a 6 h após a injeção (Figura 21). Sua capacidade de resgatar a proteinúria foi reduzida 8 h após a injeção. Esses resultados mostram que um anel estabilizador pode aprimorar a proteinúria em um modelo de camundongo de doença renal proteinúrica.

[00126] Embora várias modalidades tenham sido descritas, será apreciado por elementos versados na técnica que inúmeras variações e/ou modificações podem ser feitas sem que se afaste do espírito ou escopo da invenção conforme amplamente descrita. As modalidades presentes devem, portanto, ser consideradas em todos os aspectos como ilustrativas e não restritivas.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Asanuma K., Kim K., Oh J., Giardino L., Chabanis S., Faul C., Reiser J. e Mundel P. (2005) Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner. *J. Clin. Invest.* 115, 1.188 a 1.198.

Asanuma K., Yanagida-Asanuma E., Faul C., Tomino Y., Kim K. e Mundel P. (2006) Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. *Nat. Cell Biol.* 8, 485 a 491.

Chappie J. S., Acharya S., Liu Y. W., Leonard M., Pucadyil T. J. e Schmid S. L. (2009) An intramolecular signaling element that modulates dynamin function in vitro and in vivo. *Mol. Biol. Cell* 20, 3.561 a 3.571.

Chen Y. J., Zhang P., Egelman E. H. e Hinshaw J. E. (2004) The stalk region of dynamin drives the constriction of dynamin tubes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 574 a 575.

Chao W-T., e Kunz J. (2009). Focal adhesion disassembly requires clathrin-dependent endocytosis of integrins. *FEBS Lett.* 583, 1.337 a 1.343.

Cousin M. A. e Robinson P. J. (2001) The dephosphins: Dephosphorylation by calcineurin triggers synaptic vesicle endocytosis. *Trends Neurosci.* 24, 659 a 665.

Faul C., Asanuma K., Yanagida-Asanuma E., Kim K. e Mundel P. (2007) Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 17, 428 a 437.

Henderson J. M., Al-Waheeb S., Weins A., Dandapani S. V. e Pollak M. R. (2008) Mice with altered alpha-actinin-4 expression have distinct morphologic patterns of glomerular disease. *Kidney Int.* 73, 741 a 750.

Hill T. A., Gordon C. P., McGeachie A. B., Venn-Brown B., Odell L. R., Chau N., Quan A., Mariana A., Sakoff J., Chircop M., Robinson P. J. e McCluskey A. (2009) Inhibition of dynamin mediated endocytosis by the dynoles - synthesis and functional activity of a family of indoles. *J. Med. Chem.* Accepted 13-2-2009.

Hill T. A., Odell L. R., Edwards J. K., Graham M. E., McGeachie A. B., Rusak J., Quan A., Abagyan R., Scott J. L., Robinson P. J. e McCluskey A. (2005) Small molecule inhibitors of dynamin I GTPase activity: Development of dimeric tyrphostins. *J. Med. Chem.* 48, 7.781 a 7.788.

Hill T. A., Odell L. R., Quan A., Abagyan R., Ferguson G., Robinson P. J. e McCluskey A. (2004) Long chain amines and long chain ammonium salts as novel inhibitors of dynamin GTPase activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 3.275 a 3.278.

Hill T. A., Mariana A., Gordon C. P., Odell L. R., McGeachie A. B., Chau N., Daniel J. A., Gorgani N. N., Robinson P. J. e McCluskey A.

(2010) Iminochromene inhibitors of dynamin I & II GTPase activity and endocytosis. *J. Med. Chem.* In press DOI: 10.1021/jm100119c. Publicação online <http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jm100119c>

Hinshaw J. E. e Schmid S. L. (1995) Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* 374, 190 a 192.

Ichimura K., Kurihara H. e Sakai T. (2003) Actin filament organization of foot processes in rat podocytes. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 1.589 a 1.600.

Jones N., Blasutig I. M., Eremina V., Ruston J. M., Bladt F., Li H., Huang H., Larose L., Li S. S., Takano T., Quaggin S. E. e Pawson T. (2006) Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature* 440, 818 a 823.

Lima L. M. e Barreiro, E. J. (2005) Bioisosterism: A useful strategy for molecular modification and drug design. *Curr. Med. Chem.* 12, 23 a 49.

Kaplan J. M., Kim S. H., North K. N., Rennke H., Correia L. A., Tong H. Q., Mathis B. J., Rodriguez-Perez J. C., Allen P. G., Beggs A. H. e Pollak M. R. (2000) Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat. Genet.* 24, 251 a 256.

Macia E., Ehrlich M., Massol R., Boucrot E., Brunner C. e Kirchhausen T. (2006) Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* 10, 839 a 850.

Moeller M. J. e Holzman L. B. (2006) Imaging podocyte dynamics. *Nephron Exp Nephrol* 103, e69 a e74.

Moeller M. J., Soofi A., Braun G. S., Li X., Watzl C., Kriz W. e Holzman L. B. (2004) Protocadherin FAT1 binds Ena/VASP proteins and is necessary for actin dynamics and cell polarization. *EMBO J.* 23, 3.769 a 3.779.

Muhlberg A. B., Warnock D. E. e Schmid S. L. (1997) Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase. *EMBO J.* 16, 6.676 a 6.683.

Mundel P., Reiser J., Zuniga Mejia B. A., Pavenstadt H., Davidson G. R., Kriz W. e Zeller R. (1997) Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp. Cell Res.* 236, 248 a 258.

Odell L. R., Chau N., Mariana A., Graham M. E., Robinson P. J. e McCluskey A. (2009) Azido and diazarinyl analogues of Bis-Tyrphostin as asymmetrical inhibitors of dynamin GTPase. *ChemMedChem* In press, aceito em 10 de março de 2009.

Orth J. D. e McNiven M. A. (2003) Dynamin at the actin-membrane interface. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 31 a 39.

Quan A., McGeachie A. B., Keating D. J., van Dam E. M., Rusak J., Chau N., Malladi C. S., Chen C., McCluskey A., Cousin M. A. e Robinson P. J. (2007) MiTMAB is a surface-active dynamin inhibitor that blocks endocytosis mediated by dynamin I or dynamin II. *Mol. Pharmacol.* 72, 1.425 a 1.439.

Quan A. e Robinson P. J. (2005) Rapid purification of native dynamin I and colorimetric GTPase assay. *Methods Enzymol.* 404 (Ch 49), 556 a 569.

Reiser J., Oh J., Shirato I., Asanuma K., Hug A., Mundel T. M., Honey K., Ishidoh K., Kominami E., Kreidberg J. A., Tomino Y. e Mundel P. (2004) Podocyte migration during nephrotic syndrome requires a coordinated interplay between cathepsin L and alpha3 integrin. *J. Biol. Chem.* 279, 34.827 a 34.832.

Roux A., Uyhazi K., Frost A. e De Camilli P. (2006) GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in

membrane fission. *Nature* 441, 528 a 531.

Saleem M. A., O'Hare M. J., Reiser J., Coward R. J., Inward C. D., Farren T., Xing C. Y., Ni L., Mathieson P. W. e Mundel P. (2002) A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol* 13, 630 a 638.

Schafer D. A. (2004) Regulating actin dynamics at membranes: a focus on dynamin. *Traffic* 5, 463 a 469.

Sever S., Altintas M. M., Nankoe S. R., Moller C. C., Ko D., Wei C., Henderson J., del Re E. C., Hsing L., Erickson A., Cohen C. D., Kretzler M., Kerjaschki D., Rudensky A., Nikolic B. e Reiser J. (2007) Proteolytic processing of dynamin by cytoplasmic cathepsin L is a mechanism for proteinuric kidney disease. *J. Clin. Invest.* 117, 2.095 a 2.104.

Sever S., Damke H. e Schmid S. L. (2000a) Dynamin:GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* 150, 1.137 a 1.148.

Sever S., Damke H. e Schmid S. L. (2000b) Garrotes, springs, ratchets, and whips: Putting dynamin models to the test. *Traffic* 1, 385 a 392.

Sever S., Muhlberg A. B. e Schmid S. L. (1999) Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature* 398, 481 a 486.

Sever S., Skoch J., Newmyer S., Ramachandran R., Ko D., McKee M., Bouley R., Ausiello D., Hyman B. T. e Bacsikai B. J. (2006) Physical and functional connection between auxilin and dynamin during endocytosis. *EMBO J.* 25, 4.163 a 4.174.

Song B. D., Leonard M. e Schmid S. L. (2004) Dynamin GTPase domain mutants that differentially affect GTP binding, GTP hydrolysis and clathrin-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.* 279, 40.431 a 40.436.

Stowell M. H., Marks B., Wigge P. e McMahon H. T. (1999)

Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat. Cell Biol.* 1, 27 a 32.

Susztak K. e Bottinger E. P. (2006) Diabetic nephropathy: a frontier for personalized medicine. *J Am Soc Nephrol* 17, 361 a 367.

Tryggvason K., Patrakka J. e Wartiovaara J. (2006) Hereditary proteinúria syndromes and mechanisms of proteinúria. *N. Engl. J. Med.* 354, 1.387 a 1.401.

Van T. M., Dewitte D., Goethals M., Carlier M. F., Vandekerckhove J. e Ampe C. (1996) The actin binding site of thymosin beta 4 mapped by mutational analysis. *EMBO J.* 15, 201 a 210.

Warnock D. E., Hinshaw J. E. e Schmid S. L. (1996) Dynamin self-assembly stimulates its GTPase activity. *J. Biol. Chem.* 271, 22.310 a 22.314.

Weins A., Kenlan P., Herbert S., Le T. C., Villegas I., Kaplan B. S., Appel G. B. e Pollak M. R. (2005) Mutational and biological analysis of alpha-actinin-4 in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 16, 3.694 a 3.701.

Yao J., Le T. C., Kos C. H., Henderson J. M., Allen P. G., Denker B. M. e Pollak M. R. (2004) Alpha-actinin-4-mediated FSGS: an inherited kidney disease caused by an aggregated and rapidly degraded cytoskeletal protein. *PLoS Biol* 2, e167.

Zhang J., Lawrance G. A., Chau N., Robinson P. J. e McCluskey A. (2008) From Spanish fly to room temperature ionic liquids (RTILs): Synthesis, thermal stability and inhibition of dynamin 1 GTPase by a novel class of RTILs. *New Journal of Chemistry* 32, 28 a 36.

### REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um estabilizador de anel de dinamina, caracterizado pelo fato de ser para a manufatura de um medicamento para profilaxia ou tratamento de uma doença renal ou condição em que há proteinúria em um indivíduo que necessite deste ou um sal farmacologicamente aceitável do estabilizador de anel de dinamina.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a doença renal ou condição é compreendida ainda por simplificação dos processos podocitários.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o medicamento induz filamentos de actina em células.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o estabilizador de anel de dinamina é selecionado do grupo que consiste de inibidores de dinamina GTPase helicoidal, tirfostinas diméricas, tirfostinas de benzilidenomalonitrila diméricas, iminocromenos, tirfostinas monoméricas e hidrazidas de ácido naftaleno-2-carboxílico 3-substituído (benzilideno).

5. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a condição ou doença renal é selecionada do grupo que consiste em síndrome nefrótica, doença renal crônica, doença glomerular, disfunção glomerular, glomerulonefrite, glomerulonefrite pós-infecciosa, glomerulonefrite mesangioproliferativa, nefropatia, nefropatia diabética, disfunção dos podócitos, danos nos podócitos, podocitopatias, simplificação dos processos podocitários, esclerose mesangial difusa, síndrome nefrótica congênita, síndrome de Alpor, variantes de síndrome de Alpor, doença de mudança mínima, glomeruloesclerose segmental focal (FSGS), glomerulonefropatia em colapso, glomerulonefropatia imune, glomerulonefropatias inflamatória, nefropatia hipertensiva e glomerulonefropatia associada à idade.

6. Uso, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a condição ou doença é selecionada do grupo que consiste em síndrome nefrótica, doença renal crônica, doença glomerular e disfunção dos podócitos.

7. Uso de um estabilizador de anel de dinamina, caracterizado pelo fato de ser para a manufatura de um medicamento para profilaxia ou tratamento de uma doença renal ou condição em que há simplificação dos processos podocitários ou um sal farmacologicamente aceitável do estabilizador de anel de dinamina.

8. Uso, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o estabilizador de anel de dinamina é selecionado a partir do grupo que consiste em inibidores de GTPase de dinamina helicoidal, tirfostinas diméricas, benzilidenomalonitrila, tirfostinas, iminocromenos, tirfostinas monoméricas e hidrazidas de ácido naftaleno-2-carboxílico 3-substituído (benzilideno).

FIGURA 1

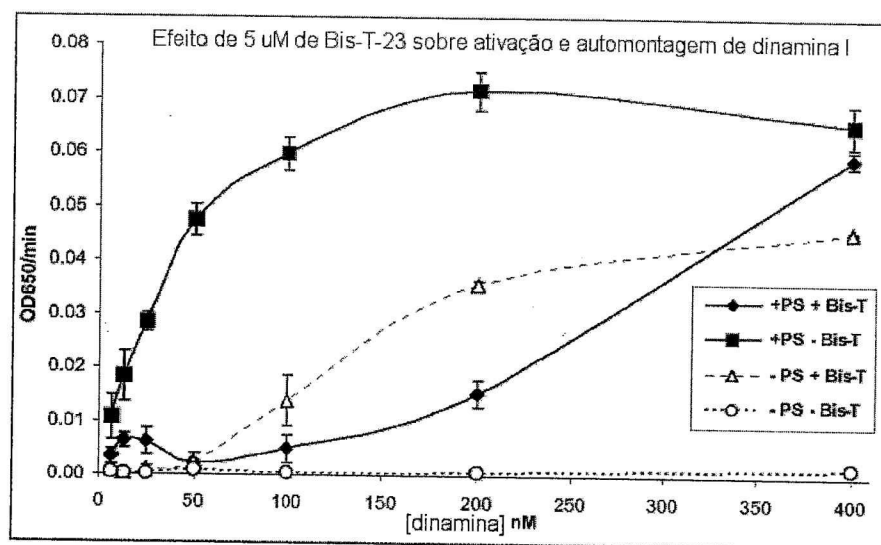


FIGURA 2

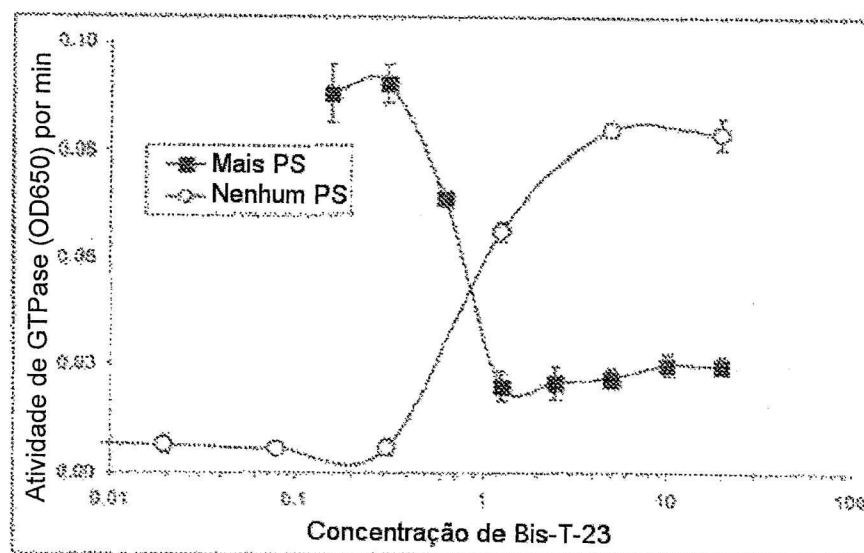


FIGURA 3

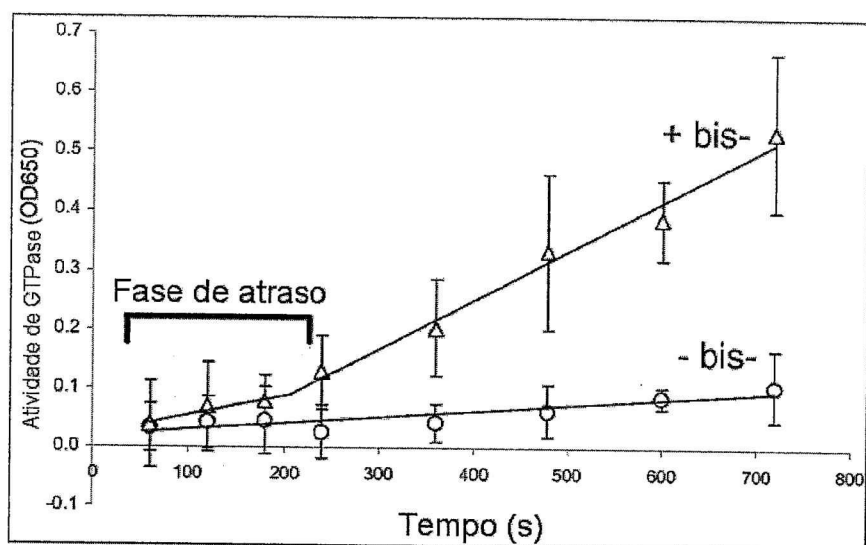


FIGURA 4

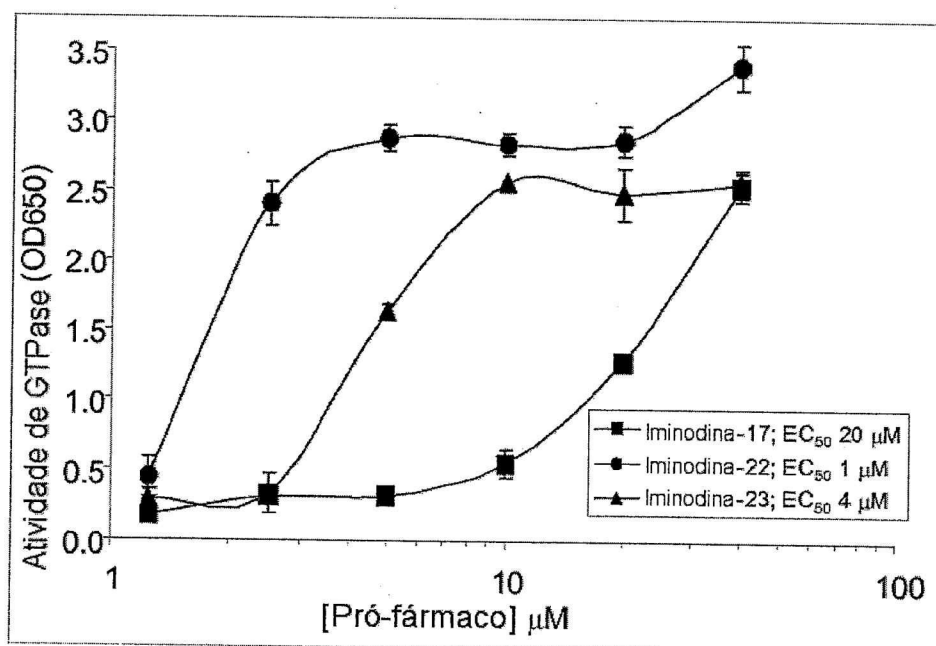


FIGURA 5

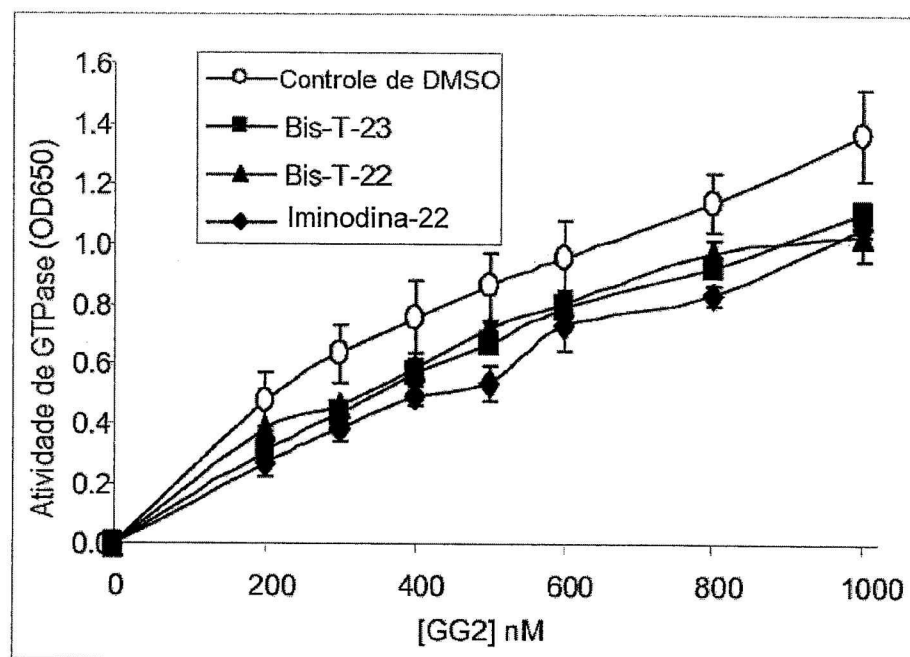


FIGURA 6

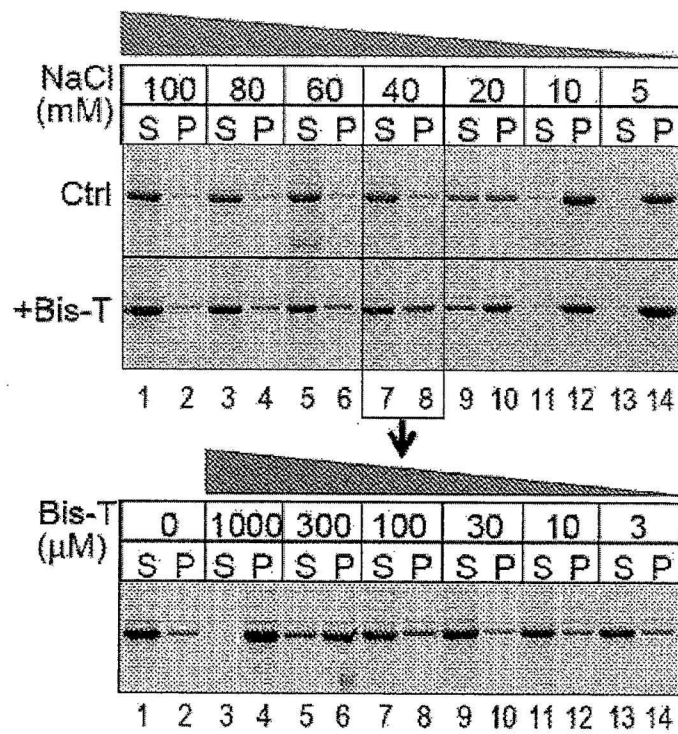
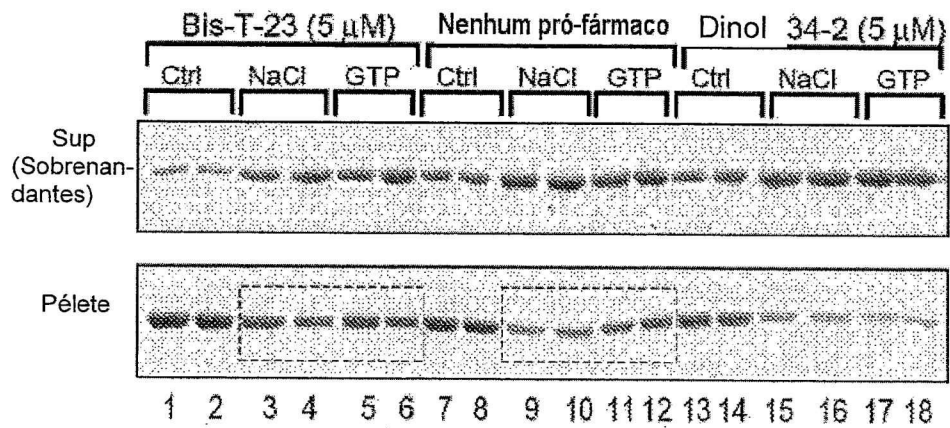


FIGURA 7



## FIGURA 8

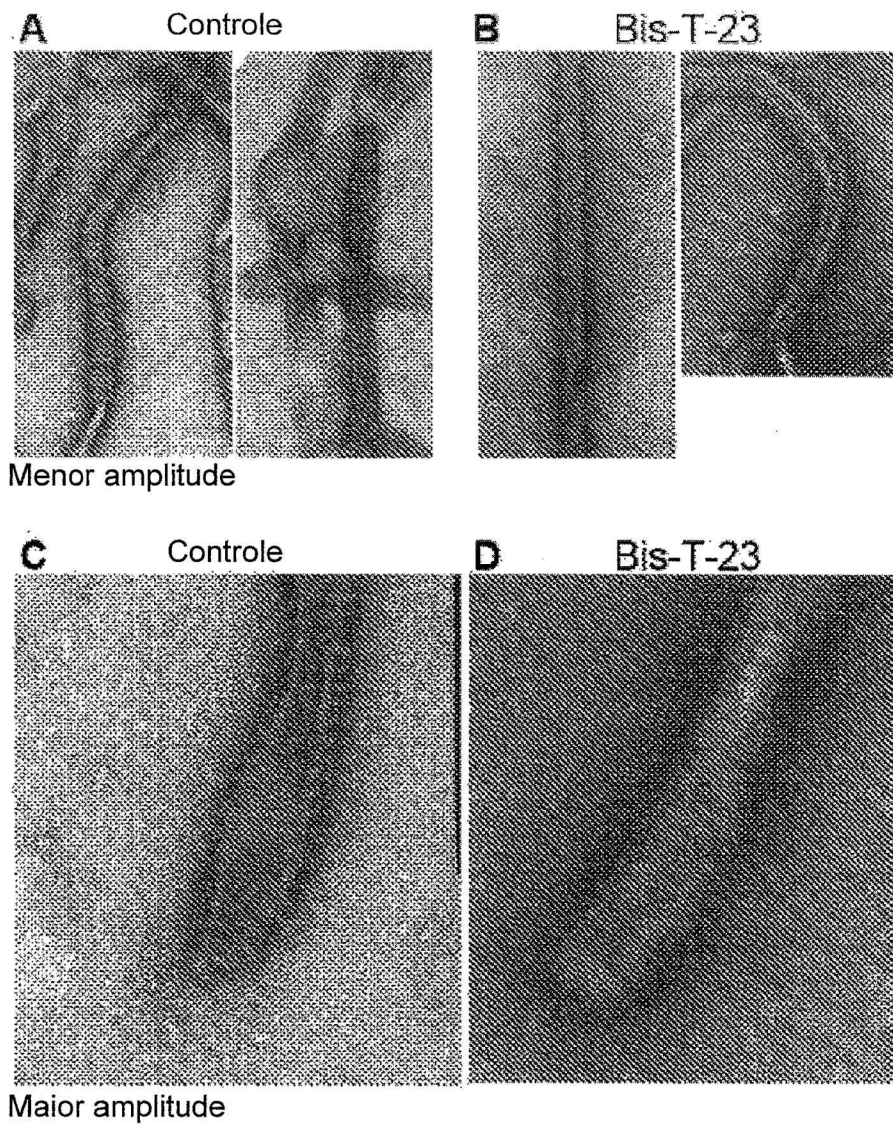
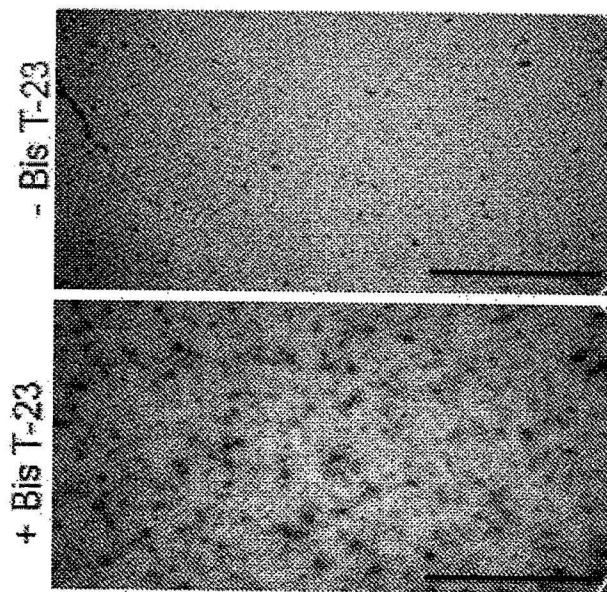
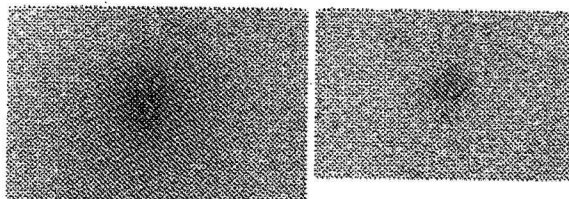


FIGURA 9

9A



9B



9C

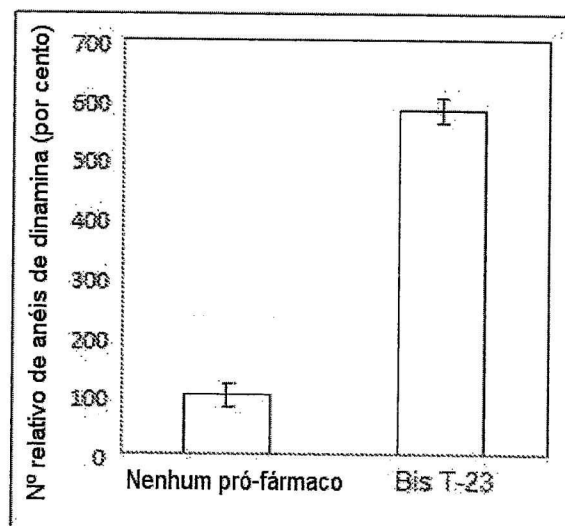
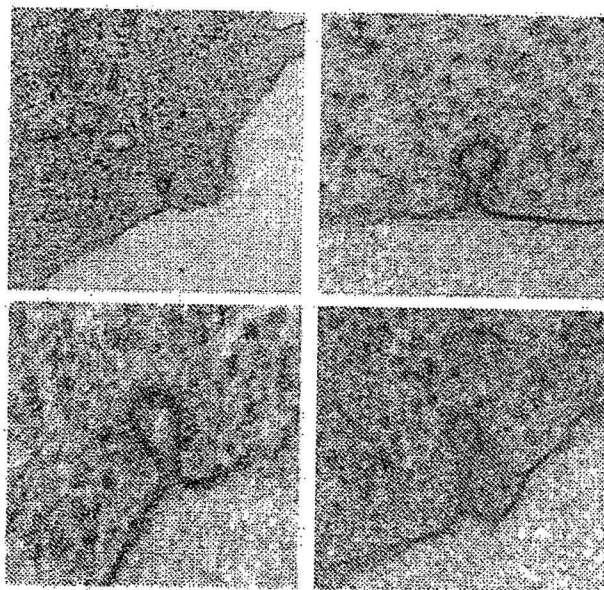


FIGURA 10

10A



10B

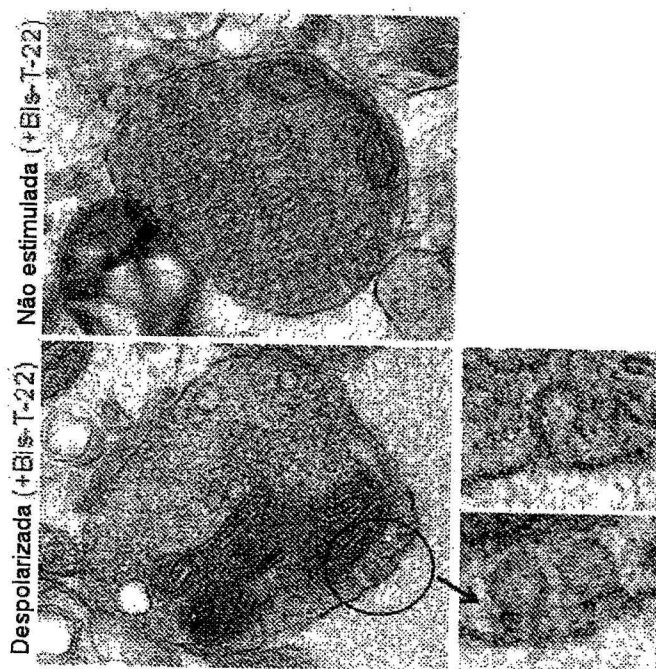
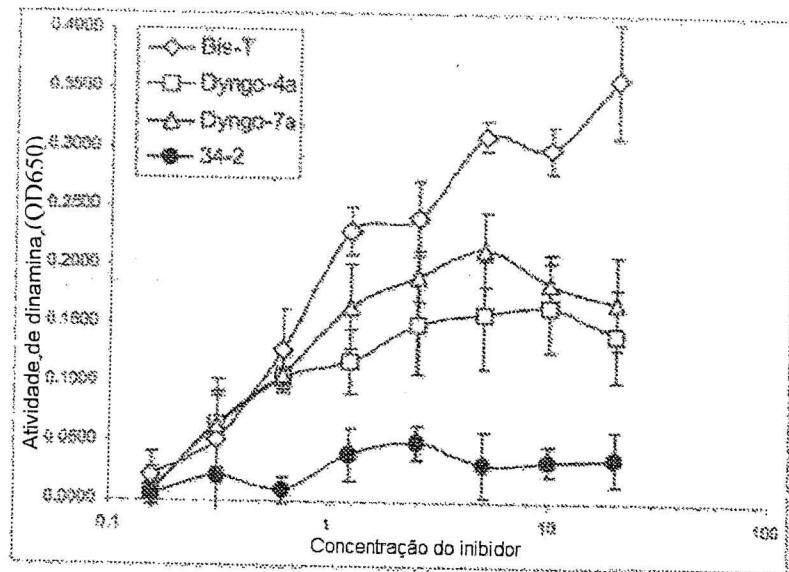
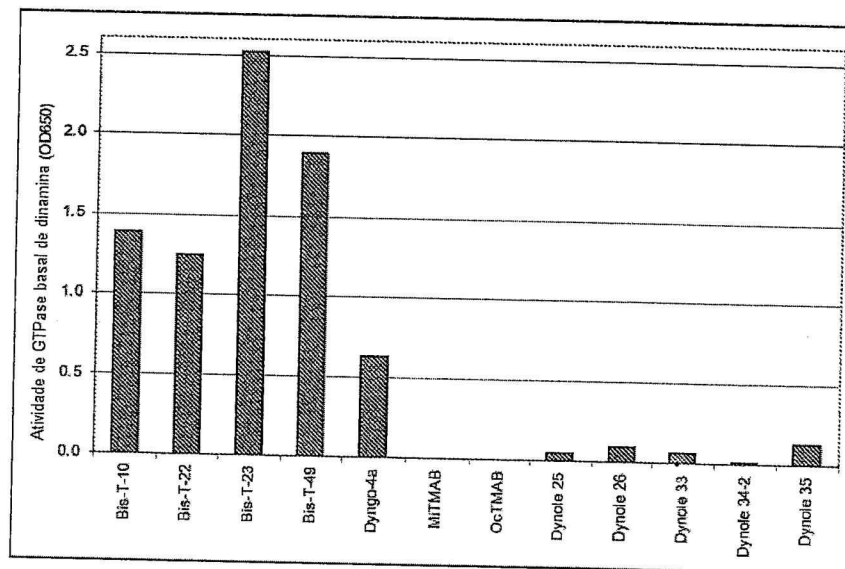


FIGURA 11

A



B



1.2.2 de D1 nas páginas 27, linhas 1-17, os inibidores de tirfostina, tirfostina A47 e Bis-T (Bis-T-22) não impedem a ligação de GTP à dinamina e, de fato, em concentrações mais elevadas, promoveram a ligação de GTP à dinamina. Portanto, uma pessoa versada na técnica não seria levada a selecionar um inibidor de dinamina, conforme divulgado em D1, para uso como ora reivindicado, dado que dinamina-GTP é clivada pela catepsina L *in vivo*, conforme ensinado por D1 e assim é totalmente oposto ao foco de D2.

Neste ponto, o Requerente reitera que D2 é direcionado para inibir a *clivagem ou desmontagem* de estruturas de dinamina de ordem superior, a fim de induzir a formação de estruturas do citoesqueleto de actina e para o tratamento da simplificação dos processos podocitários. D2 não considera nem ensina o uso de qualquer inibidor de GTPase de dinamina para *induzir a montagem* de dinamina em anéis de dinamina, a escolha de um *inibidor de GTPase* sendo *contraditória* para estimular a montagem de anel de dinamina e, assim, *estimular* a atividade de GTPase de dinamina basal associada à anéis de dinamina. Mesmo se alguém fosse considerar a utilização de um inibidor de GTPase de dinamina para *promover* a montagem do anel de dinamina (não há razão para fazê-lo à luz de D2), apenas alguns desses inibidores são estabilizadores de anel de dinamina como discutido acima e assim o resultado depende inteiramente da escolha do inibidor e não haveria garantia de sucesso.

Assim, no geral, o foco de D2 é direcionado para a *prevenção da clivagem por protease / catepsina L* da dinamina e manutenção de estruturas de dinamina de ordem superior para efetuar a atividade celular necessária, em vez da administração de uma classe específica de compostos como ora reivindicado para *estimular positivamente dinamina* para formar anéis de dinamina e estimular diretamente o alongamento da F-actina *in vitro* e nas células, *independentemente da proteólise da dinamina*. D2 também não fornece nenhuma consideração de como a dinamina pode ser estimulada para formar

FIGURA 15

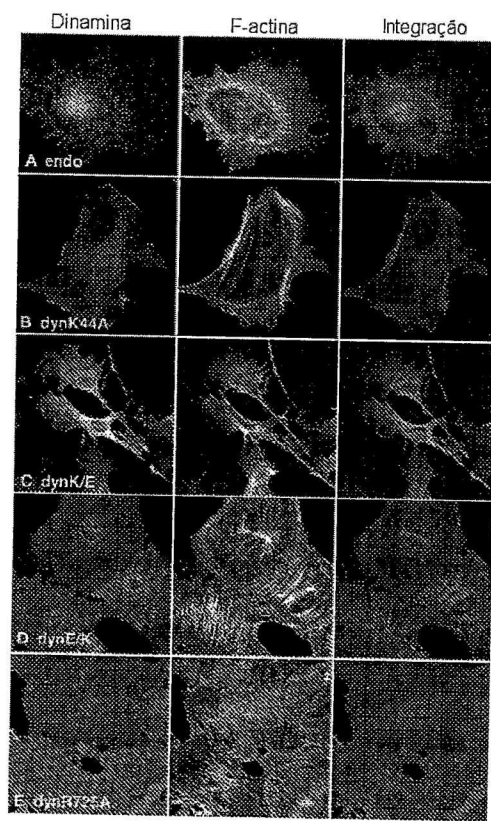


FIGURA 16

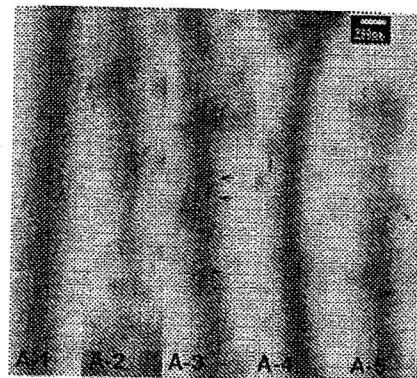


FIGURA 17

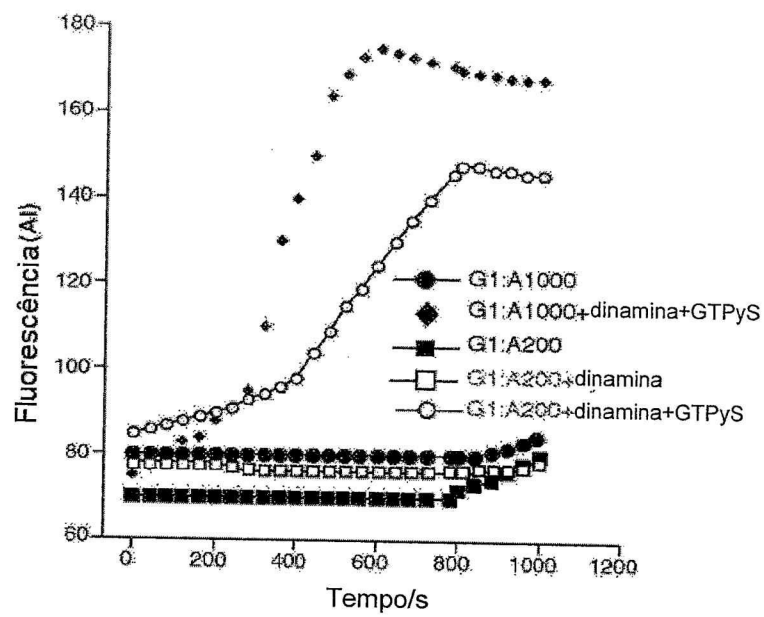


FIGURA 18

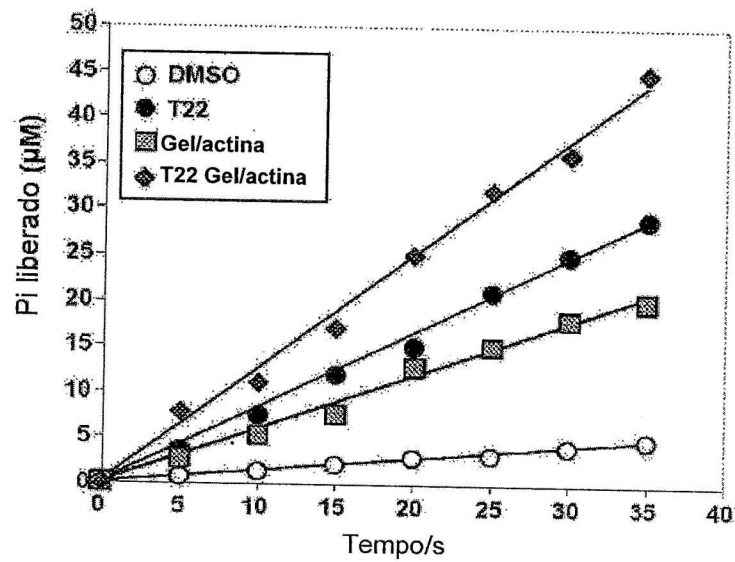


FIGURA 19

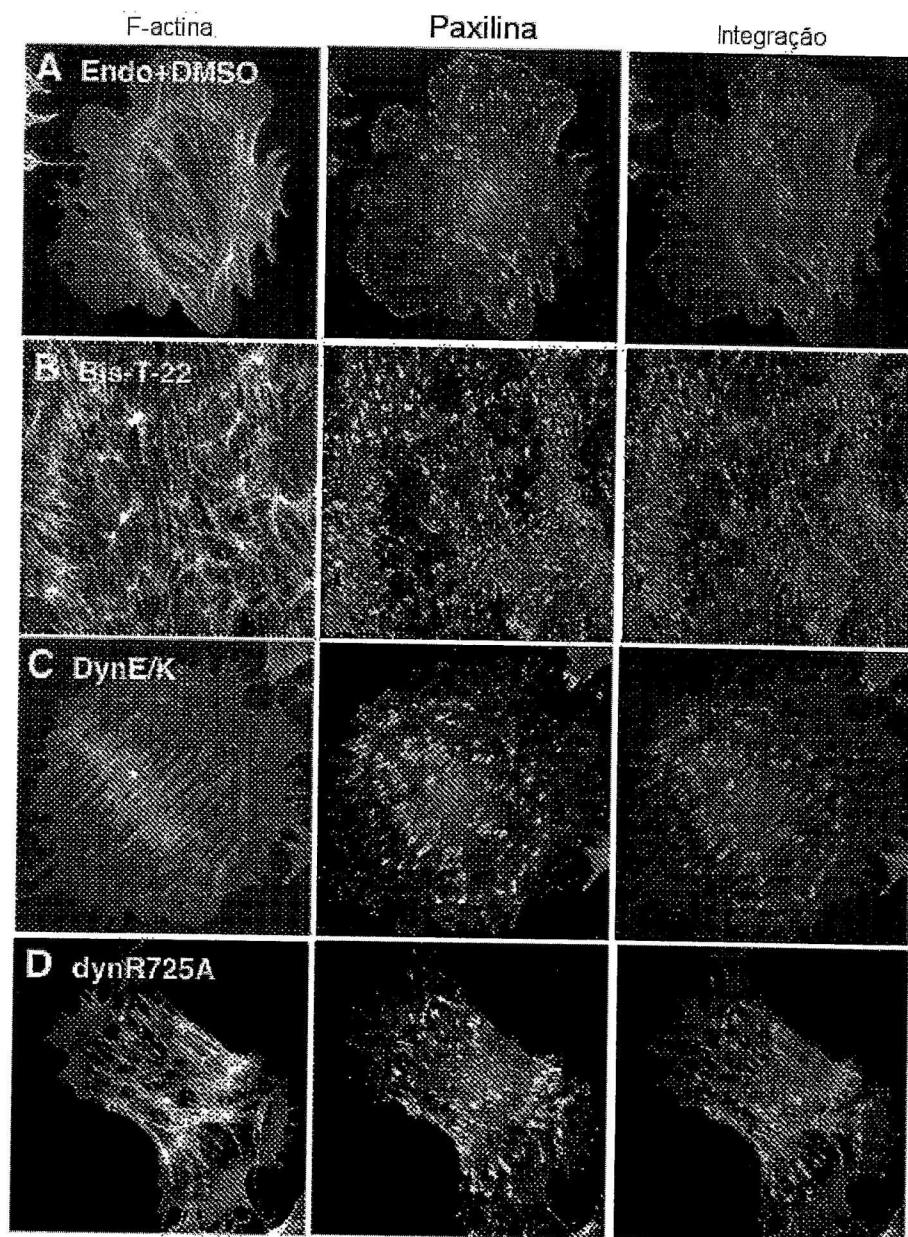


FIGURA 20

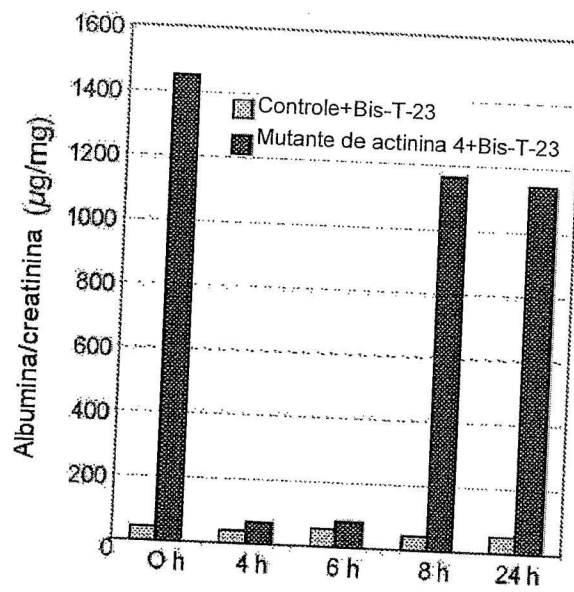


FIGURA 21

