



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1390403 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 14/47 (2006.01) **A61K 38/17** (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2002.05.24	(73) Titular(es): NYMOX CORPORATION	
(30) Prioridade(s): 2001.05.25 US 293156	9900 CAVENDISH BOULEVARD SAINT-	
(43) Data de publicação do pedido: 2004.02.25	LAURENT, QUÉBEC H4M 2V2	CA
(45) Data e BPI da concessão: 2007.01.03 003/2007	(72) Inventor(es): PAUL, A. AVERBACK	CA
	(74) Mandatário: ÁLVARO ALBANO DUARTE CATANA	
	RUA NOVA DO DESTERRO, Nº 7, 1º ANDAR 1169-101	
	LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **PÉPTIDOS DERIVADOS A PARTIR DE PROTEÍNAS DE FILAMENTO NEURAL E A SUA UTILIZAÇÃO MÉDICA**

(57) Resumo:

RESUMO

"PÉPTIDOS DERIVADOS A PARTIR DE PROTEÍNAS DE FILAMENTO
NEURAL E A SUA UTILIZAÇÃO MÉDICA"

A presente invenção diz respeito a métodos de tratamento de estados que requerem a remoção ou destruição de células nocivas ou indesejáveis num doente, como tumores benignos e malignos, utilizando péptidos derivados a partir de sequências de aminoácidos de proteínas de filamento neural e moléculas relacionadas.

DESCRIÇÃO

"PÉPTIDOS DERIVADOS A PARTIR DE PROTEÍNAS DE FILAMENTO NEURAL E A SUA UTILIZAÇÃO MÉDICA"

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

1. Campo da Invenção

A presente invenção diz respeito a péptidos que consistem em sequências de aminoácidos que correspondem a parte da sequência de aminoácidos de proteínas de filamento neural. Estes compostos podem ser administrados intramuscularmente, oralmente, endovenosamente, intratecalmente, intratumoralmente, intranasalmente, topicamente, transdermicamente, etc., quer isoladamente quer em conjugação com um excipiente.

2. Descrição de Arte Relacionada

Muitos tratamentos e procedimentos médicos envolvem a remoção ou destruição de tecido nocivo ou indesejado. Exemplos desses tratamentos importantes incluem a remoção cirúrgica de massas cancerosas, a destruição de tumores metastáticos através de quimioterapia e a redução de hiperplasias glandulares (por exemplo, a próstata). Outros exemplos incluem a remoção de pêlos faciais indesejados, a remoção de verrugas e a remoção de tecido adiposo indesejado. Muitos destes tratamentos ou são invasivos através de uma técnica cirúrgica complicada e perigosa, ou destroem tecido saudável não visado através de técnicas não invasivas.

É necessária a existência de um agente eficaz que destrua e que (i) facilite sem cirurgia a remoção de; ou (ii) iniba a continuação do crescimento de células e tecidos nocivos ou indesejados, mas que tenha principalmente efeitos locais e pouca ou nenhuma toxicidade sistémica.

O cancro é uma anomalia no mecanismo interno regulador de uma célula que resulta num crescimento e numa reprodução descontrolados da célula. As células normais constituem tecidos e quando essas células perdem a sua capacidade de se comportarem como uma unidade específica, controlada e coordenada (desdiferenciação) o defeito leva a um desarranjo entre a população de células. Quando isto ocorre, forma-se um tumor.

Crescimentos excessivos benignos de tecidos são anomalias nas quais é desejável remover células de um organismo. Os tumores benignos são proliferações celulares que não metastizam pelo corpo, mas que no entanto causam sintomas de doença. Esses tumores podem ser letais se estiverem localizados em áreas inacessíveis, em órgãos como o cérebro. Os tumores benignos existem em muitos outros órgãos, incluindo o pulmão, a pele, a hipófise, a tiroideia, o córtex e a medula da supra-renal, o ovário, o útero, o testículo, o tecido conjuntivo, o músculo, o intestino, o ouvido, o nariz, a garganta, as amígdalas, a boca, o fígado, a vesícula biliar, o pâncreas, a próstata, o coração e outros órgãos.

A cirurgia é frequentemente o primeiro passo na tratamento do cancro. O objectivo da cirurgia varia. Às

vezes ela é utilizada para remover tanta quantidade de tumor quanto possível, ou pelo menos para o diminuir (remover a maior parte da massa do tumor para que haja menos massa que necessite de ser tratada através de outros meios). Dependendo do tipo e localização do cancro, a cirurgia também poderá proporcionar algum alívio nos sintomas do doente. Se um cirurgião remover uma grande porção de um tumor cerebral em expansão, por exemplo, a pressão craniana diminui, o que conduz a uma melhoria nos sintomas do doente.

Nem todos os tumores são passíveis de ser resolvidos pela cirurgia. Alguns podem estar localizados em partes do corpo que tornem a sua remoção total impossível. Exemplos disso seriam os tumores no tronco cerebral (uma parte do cérebro que controla a respiração) ou um tumor que tenha crescido dentro ou à volta de um grande vaso sanguíneo. Nestes casos, o papel da cirurgia é limitado devido ao grande risco associado à remoção do tumor.

Em alguns casos, não se utiliza a cirurgia para diminuir o tumor porque ela simplesmente não é precisa. Um exemplo disto é o linfoma de Hodgkin, um cancro dos nódulos linfáticos que responde muito bem às combinações de quimioterapia e de radioterapia. No linfoma de Hodgkin, raramente se recorre à cirurgia para alcançar a cura, mas ela é quase sempre precisa para se chegar ao diagnóstico.

A quimioterapia é outra forma comum de tratamento do cancro. Ela envolve, essencialmente, a utilização de medicações (normalmente administradas por os ou injectáveis) que atacam especificamente células que se

dividem rapidamente (como aquelas que se encontram num tumor) por todo o corpo. Isto torna a quimioterapia útil no tratamento de cancros que já metastizaram, assim como tumores cujo risco de se espalharem através dos sistemas sanguíneo e linfático é elevado mas que não são evidentes para além do tumor primário. A quimioterapia também pode ser utilizada para melhorar a resposta de tumores localizados à cirurgia e à radioterapia. Isto é, por exemplo, o caso de alguns cancros da cabeça e do pescoço.

Infelizmente, a quimioterapia também pode afectar outras células do corpo humano que se dividem rapidamente (como o revestimento do estômago e o cabelo). Por esta razão, alguns (apesar de nem todos) agentes de quimioterapia provocam náuseas e perda de cabelo. Estes efeitos secundários são temporários e os médicos têm medicações que podem ajudar a aliviar muitos destes efeitos secundários. Assim, geralmente, os tratamentos de quimioterapia são bem tolerados pelos doentes. À medida que o nosso conhecimento aumenta, os investigadores desenvolveram novos agentes quimioterapêuticos que não só são melhores a destruir células cancerígenas, mas também têm menos efeitos secundários para o doente.

A quimioterapia é administrada aos doentes de muitas maneiras. Algumas são comprimidos que são tomados diariamente ou uma vez por semana ou que têm outro esquema horário e algumas são administradas através de uma injeção endovenosa. Na quimioterapia injectável, o doente dirige-se ao consultório do médico ou ao hospital. Outros agentes quimioterapêuticos necessitam de uma infusão contínua na corrente sanguínea, 24 horas por dia. Para estes tipos de

quimioterapia é realizado um pequeno procedimento cirúrgico para implantar uma pequena bomba no doente. Depois, a bomba administra lentamente a medicação. Em muitos casos é colocado um acesso permanente numa veia do doente para eliminar a necessidade de repetidas picadas de agulha.

A radioterapia é outra arma habitualmente utilizada no combate contra o cancro. A radiação destrói o cancro ao danificar o ADN nas células tumorais. A radiação é «aplicada» de duas maneiras possíveis. A primeira, e mais comum, envolve apontar um feixe de radiação ao doente de um modo muito preciso, focando o tumor. Para o fazer, o doente está deitado numa mesa e o feixe move-se à sua volta. Isto demora apenas alguns minutos mas é realizado cinco dias por semana durante 3 a 6 semanas (dependendo do tipo de tumor), para alcançar uma determinada «dose» total prescrita.

Outro método de radiação por vezes utilizado, designado por braquiterapia, envolve a utilização de pellets («sementes») ou fios radioactivos e a sua implantação no corpo, na área do tumor. Os implantes podem ser temporários ou permanentes. No que diz respeito aos implantes permanentes, a radiação nas sementes «degrada-se» ou desaparece ao longo de um período de dias ou semanas, de modo que o doente não é radioactivo. Quanto aos implantes temporários, a dose total de radiação é habitualmente administrada em cerca de dois dias e o doente tem de permanecer no hospital durante esse período. Os dois tipos de radiação da braquiterapia são geralmente administrados a uma área-alvo muito precisa para ganhar controlo local sobre um cancro (ao contrário de tratar todo o corpo, como é feito na quimioterapia).

Alguns doentes muito específicos podem ser referenciados para um transplante de medula óssea. Este procedimento é normalmente realizado ou porque o doente tem um cancro que é particularmente agressivo ou porque tem um cancro que recidivou após ter sido tratado com terapêutica convencional. O transplante de medula óssea é um procedimento complicado. Existem muitos tipos, que variam no seu potencial de causar efeitos secundários e a cura. A maioria dos transplantes é realizada em centros especiais e em muitos casos a sua prática é investigacional.

Existem terapêuticas adicionais, apesar de a maioria ainda estar em fase de investigação em ensaios clínicos e ainda não se ter tornado tratamento-padrão. Os exemplos incluem a utilização de imunoterapia, anticorpos monoclonais, factores anti-angiogénicos e terapêutica génica.

Imunoterapia: Desenvolveram-se várias técnicas para ajudar o próprio sistema imunitário do doente a combater o cancro, bem diferentes da radio ou quimioterapia. Muitas vezes, para alcançar o objectivo os investigadores injectam o doente com uma vacina especial derivada. A maioria da investigação nesta área tem sido conduzida em relação ao melanoma, apesar de também se visarem outros cancros actualmente.

Anticorpos Monoclonais: São pequenas proteínas que são especialmente desenvolvidas para se ligarem a células cancerosas (e não a células normais) ao tirar partido das diferenças entre células cancerosas e não cancerosas em relação às suas membranas celulares. Antes de administrar

os anticorpos ao doente, os anticorpos são «etiquetados» (ligados) a vários compostos citotóxicos ou são tornados radioactivos, de modo que o anticorpo visa preferencialmente as células cancerosas, administrando assim o agente tóxico às células desejadas.

Factores Anti-Angiogénicos: À medida que as células do cancro se dividem rapidamente e os tumores crescem, estes cedo excedem a capacidade de aporte sanguíneo. Para compensar esta situação, os tumores segregam um composto que se demonstrou que ajuda a induzir o crescimento de vasos sanguíneos na sua proximidade, assegurando assim às células cancerosas um aporte contínuo de nutrientes. Os investigadores têm estudado recentemente maneiras de interromper este processo ao parar o crescimento de vasos sanguíneos e/ou prevenindo que chegue mais sangue às células cancerosas.

Terapêutica Génica: O cancro é o produto de uma série de mutações que acabam por conduzir à produção de uma célula cancerosa e à sua proliferação excessiva. Os cancros podem ser tratados ao introduzir genes nas células cancerosas que vão actuar quer pela verificação ou quer pela interrupção da proliferação do cancro, pela activação dos mecanismos celulares programados da célula para destruir a célula, pelo aumento do reconhecimento imunológico da célula ou pela expressão de um pró-fármaco que se converte num metabólito tóxico ou uma citocina que inibe o crescimento tumoral.

Os tumores benignos e as malformações também podem ser tratados através de uma variedade de métodos, incluindo a

cirurgia, a radioterapia, a terapêutica com fármacos, a ablação térmica ou eléctrica, a crioterapia e outras. Apesar de não metastizarem, os tumores benignos podem tornar-se grandes e recidivar. A extirpação cirúrgica de tumores benignos tem todas os problemas e os efeitos secundários da cirurgia em geral e muitas vezes tem de ser realizada repetidas vezes em alguns tumores benignos, como os adenomas da hipófise, os meningiomas do cérebro, a hiperplasia prostática e outros.

Outros estados que envolvem elementos celulares indesejáveis em que é desejável uma remoção celular selectiva incluem, por exemplo, a doença cardíaca e os AVC. Estes estados são geralmente causados por aterosclerose, uma lesão proliferativa de elementos fibroadiposos e modificados de músculo liso que distorce a parede do vaso sanguíneo, estreita o lúmen, constringe o fluxo sanguíneo, predispõe a coágulos sanguíneos focais e conduz por fim à obstrução e ao enfarte. Os tratamentos da aterosclerose incluem enxertos de bypass; enxertos artificiais; angioplastia com revascularização, curetagem, radiação, laser ou outro tipo de remoção; farmacoterapia para inibir a aterosclerose através da redução de lípidos, terapêuticas anticoagulantes e medidas gerais dietéticas, de exercício e do estilo de vida. É necessário um método para a remoção de lesões ateroscleróticas sem o risco e os efeitos secundários dos procedimentos cirúrgicos.

Outros exemplos de elementos celulares indesejáveis onde é desejável uma remoção celular selectiva incluem massas induzidas por vírus, como as verrugas. Outro exemplo são as massas inflamatórias hipertróficas que há em estados

inflamatórios e cicatrizes hipertróficas ou quelóides. Ainda há outros exemplo em termos cosméticos, como a remoção de pêlos indesejáveis, por exemplo, pêlos faciais, ou a redução de áreas de tecido indesejável para fins cosméticos, como nos tecidos conjuntivos e derme facial ou nas dermes e nos tecidos conjuntivos das extremidades.

Há ainda outros exemplos que serão evidentes àqueles com experiência na arte. Em todos ou na maioria destes exemplos existe a necessidade de tratamentos que possam remover ou destruir os elementos celulares indesejáveis sem os riscos e efeitos secundários das terapêuticas convencionais. Também existe uma necessidade de remover elementos celulares indesejáveis com mais precisão.

As proteínas de filamento neural (NTP) são uma família de proteínas do cérebro, recentemente caracterizadas. Um membro desta família, a AD7C-NTP, é uma fosfoproteína associada à membrana de ~41 kD com funções associadas ao crescimento neurítico (De la Monte et al., J. Clin. Invest., 100: 3093-3104(1997); De la Monte et al., Alz. Rep., 2: 327-332 (1999); De la Monte SM e Wands JR, Journal of Alzheimer's Disease, 3: 345-353 (2001)). O gene que codifica a AD7C-NTP e a sequência proteica prevista da AD7C-NTP foi identificada e descrita (De la Monte et al., J. Clin. Invest., 100 : 3093-3104 (1997)). Além da espécie de ~41 kD, foram identificadas outras espécies de proteínas de filamento neural (~26 kD, ~21 kD, ~17 kD e ~15 kD) e associadas a tumores neuroectodérmicos, astrocitomas e glioblastomas e com lesão devido a hipóxia, isquemia ou enfarte cerebral (Xu et al., Cancer Research, 53: 3823-3829 (1993); De la Monte et al., J. Neuropathol. Exp. Neuro., 55

(10): 1038-50 (1996), De la Monte et al., J. Neurol. Sci., 138 (1-2): 26-35 (1996); De la Monte et al., J. Neurol. Sci., 135 (2): 118-25 (1996); De la Monte et al., J. Clial. Invest., 100: 3093-3104 (1997); e De la Monte et al., Alz. Rep., 2: 327-332 (1999)).

Foram descritas espécies da proteína de filamento neural e reivindicadas nas patentes US n.º 5,948,634, 5,948,888, e 5,830,670, todas de «Neural Thread Protein Gene Expression and Detection of Alzheimer's Disease» («Expressão do Gene da Proteína de Filamento Neural e Detecção da Doença de Alzheimer») e na patente US n.º 6,071,705 de «Method of Detecting Neurological Disease or Dysfunction» («Método de Detecção de Doença ou Disfunção Neurológica»). Como aqui descrito, a NTP está aumentada e é produzida durante a morte celular. Por conseguinte, células nervosas mortas e moribundas são descritas com uma produção aumentada de NTP, e de acordo com isso, a sua presença indica a morte de células nervosas e o início da doença de Alzheimer (DA).

Foram identificadas outras espécies da proteína de filamento neural como outros produtos do gene da AD7C-NTP (por exemplo, uma proteína de 112 aminoácidos descrita no NCBI Entrez-Protein database Accession #XP_032307 PID gl5928971) ou como similar a proteínas de filamento neural (por exemplo, uma proteína de 106 aminoácidos descrita no NCBI Entrez-Protein database Accession #AAH14951 PID gl5928971, uma outra proteína de 106 aminoácidos descrita no NCBI Entrez-Protein database Accession #XP_039102 PID gl8599339 e uma proteína de 61 aminoácidos descrita no NCBI Entrez-Protein database Accession #AAH02534 PID gl2803421).

A proteína de filamento neural está associada a DA e a NTP está aumentada em associação com a morte celular na DA. O ARNm da AD7C-NTP está aumentado no cérebro com DA quando comparado com controles; os níveis proteicos da AD7C-NTP no cérebro e no LCR são mais elevados na DA do que nos controles; e encontra-se imunoreactividade para a AD7C-NTP em placas senis, em emaranhados neurofibrilares (NFT - neurofibrillary tangles), em neurónios degenerados, filamentos do neurópilo e em crescimentos neuríticos distróficos nos cérebros com DA e nos cérebros com síndrome de Down (Ozturk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 419-423 (1989); De la Monte et al., J. Clin. Invest., 96 (3): 1004-13 (1990); De la Monte et al., J. Neurol. Sci., 113 (2): 152-64 (1992); De la Monte et al., Ann. Neurol., 32 (6): 733-42 (1992); De la Monte et al., J. Neuropathol. Exp. Neuro., 55 (10): 1038-50 (1996), De la Monte et al., J. Neurol. Sci., 138 (1-2): 26-35 (1996); De la Monte et al., J. Neurol. Sci., 135 (2): 118-25 (1996); De la Monte et al., J. Clin. Invest., 100: 3093-3104 (1997); e De la Monte et al., Alz. Rep., 2: 327-332 (1999)). A NTP está localizada dentro de células, dentro de processos finos dentro do neurópilo, ou é extracelular em ambos os cérebros com DA e síndrome de Down (De la Monte et al., Ann. Neurol., 32 (6): 733-42 (1992)).

Encontraram-se níveis elevados da proteína AD7C-NTP quer no LCR, quer na urina de doentes com a DA (De la Monte e Wands, Front Biosci, 7: 989-96 (2002); De la Monte e Wands, Journal of Alzheimer's Disease, 3: 345-353 (2001); Munzar et al., Alzheimer's Reports, 4: 61-65 (2001); Kahle et al., Neurology, 54: 1498-1504 (2000) e Averback Neurology, 55: 1068 (2000); Munzar et al., Alzheimer

Reports, 3: 155-159 (2000); De la Monte et al., Alzheimer's Reports 2: 327-332 (1999); Ghanbari et al., J. Clin. Lab. Anal., 12: 28288 (1998); Ghanbari et al., J. Clin. Lab. Anal., 12: 223-226 (1998); Ghanbari et al., Journal of Contemporary Neurology, 1998; 4A: 2-6 (1998); e De la Monte et al., J. Clin. Invest., 100: 3093-3104 (1997)).

A expressão excessiva da NTP também foi associada ao processo de morte celular na doença de Alzheimer (De la Monte e Wands, J. Neuropatho. and Exp. Neuro., 60: 195-207 (2001); De la Monte e Wands, Cell. Mol. Life. Sci., 58: 844-49 (2001)). A AD7C-NTP também foi identificada no tecido cerebral com síndrome de Down (Wands et al., Pedido de Patente Internacional N.º WO 90/06993; De la Monte et al., J. Neurol. Sci., 135: 118-25 (1996); De la Monte et al., Alz. Rep., 2: 327-332 (1999)). Alguns indícios sugerem que a expressão excessiva de NTP também pode estar associada ao glaucoma de tensão normal (Golubnitschaja-Labudova et al., Curr. Eye Res., 21: 867-76 (2000)). O WO 00/63230 descreve um polipéptido de 47-meros compreendendo a SEQ ID NO: 35 da presente invenção que poderá ser útil para um grande leque de doenças (cancro, doenças neurológicas, etc.). O WO 00/58495 descreve um polipéptido de 47-meros compreendendo as SEQ ID NO: 11 e 12 da presente invenção que poderão ser úteis para um grande leque de doenças (cancro, doenças neurológicas, etc.). Sijts, A. J. A. M. et al. (J. Imun., vol. 152, 106-116) descrevem o péptido SSWDYITV, que poderá ser útil em estratégias de vacinação de péptidos contra tumores. O WO 99/19347 descreve o péptido ISGPCPK para o tratamento do cancro.

A NTP provou ser um agente eficaz para causar a morte celular quer in vitro em culturas celulares de glioma e de neuroblastoma, quer in vivo em tecido muscular, tecido conjuntivo subcutâneo e na derme de roedores normais, e numa variedade de diferentes tumores de origem humana e não humana, incluindo o carcinoma mamário, o carcinoma e o papiloma da pele, o carcinoma do cólon, o glioma do cérebro e outros em modelos de roedores.

RESUMO DA INVENÇÃO

Continua a existir actualmente a necessidade de haver na arte tratamentos novos e menos tóxicos para tratar elementos celulares indesejados. Esta invenção diz respeito à descoberta surpreendente de que péptidos que contenham sequências de aminoácidos que correspondem a parte da sequência de aminoácidos de proteínas de filamento neural também são agentes desses.

A presente invenção também diz respeito à utilização desses péptidos para a produção de um medicamento para o tratamento de um estado seleccionado de entre o grupo que consiste de: um tumor benigno ou maligno; uma hiperplasia, hipertrofia ou um crescimento excessivo; um tecido alterado por um vírus, bactéria ou parasita; uma malformação de um tecido; hipertrofia amigdalina; hiperplasia prostática; uma alteração cosmética ao tecido; uma doença vascular; hemorróidas, veias varicosas; aterosclerose ou arteriosclerose; uma doença inflamatória; uma doença auto-imune; uma doença metabólica; uma doença hereditária/genética; uma doença traumática; uma doença de

deficiência nutricional; uma doença infecciosa; doença amilóide; uma doença fibrótica; uma malformação congênita; uma doença de uma deficiência enzimática; doença de radiação; uma doença endócrina e uma doença degenerativa. Essa utilização compreende a administração a um mamífero que dela precise de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um péptido que consiste das sequências de aminoácidos correspondentes a parte da sequência de aminoácidos da proteína de filamento neural (NTP).

Esse péptido («péptido de NTP») pode ser administrado isoladamente ou conjugado com um excipiente. O péptido NTP pode ser administrado por via intramuscular, oral, endovenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intratumoral, intralesional, intradérmica, intratecal, intranasal, intra-ocular, intra-arterial, tópica, transdérmica, através de um aerossol, uma infusão, uma injeção de um bolos, um dispositivo implantado, um sistema de libertação contínua, etc., ou isoladamente ou conjugado com um excipiente.

Além disso, o péptido de NTP pode ser utilizado em conjugação com outras terapêuticas para tratar tumores benignos e malignos e outros crescimentos celulares indesejados ou nocivos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: Apresenta a sequência de aminoácidos completa e a sequência de ácidos nucleicos do gene de AD7C-NTP e o produto proteico AD7C-NTP desse gene (Sequências 120 e 121 das patentes US 5,830,670, 5,948,634 e 5,948,888; De la Monte et al., *J. Clin. Invest.*, 100: 3093-3104 (1997); NCBI

Entrez-Protein Accession #AAC08737; PID g3002527) [SEQ ID NO. 1].

Figura 2: Apresenta as sequências de aminoácidos completas da proteína de filamento neural de 122 aminoácidos (Sequência 40 das patentes US 5,830,670, 5,948,634 e 5,948,888; NCBI Entrez-Protein Accession #AAE25447 PID g10048540) [SEQ ID NO. 2].

Figura 3: Apresenta as sequências de aminoácidos completas da proteína de filamento neural de 112 aminoácidos (NCBI Entrez-Protein Accession #XP_032307 PID g15928971) [SEQ ID NO. 3].

Figura 4: Apresenta as sequências de aminoácidos completas de uma proteína do tipo proteína de filamento neural de 106 aminoácidos (NCBI Entrez-Protein Accession #AAH14951 PID g15928971) [SEQ ID NO. 4].

Figura 5: Apresenta as sequências de aminoácidos completas de uma proteína do tipo proteína de filamento neural de 106 aminoácidos (NCBI Entrez-Protein Accession #XP_039102 PID g18599339) [SEQ ID NO. 5].

Figura 6: Apresenta as sequências de aminoácidos completas da proteína de filamento neural de 98 aminoácidos (Sequência 30 das patentes US 5,830,670, 5,948,634 e 5,948,888; NCBI Entrez-Protein Accession # AAE25445, PID g10048538) [SEQ ID NO. 6].

Figura 7: Apresenta as sequências de aminoácidos completas da proteína de filamento neural de 75 aminoácidos (Sequência 48 das patentes US 5,830,670, 5,948,634 e 5,948,888; NCBI Entrez-Protein Accession #AAE25448, PID

g10048541) [SEQ ID NO. 7].

Figura 8: Apresenta as sequências de aminoácidos completas da proteína de filamento neural de 68 aminoácidos (Sequência 36 das patentes US 5,830,670, 5,948,634 e 5,948,888; NCBI Entrez-Protein Accession # AAE25446, PID g10048539) [SEQ ID NO. 8].

Figura 9: Apresenta as sequências de aminoácidos completas da proteína do tipo proteína de filamento neural de 61 aminoácidos (NCBI Entrez-Protein Accession # AAH02534, PID g12803421) [SEQ ID NO. 9].

DESCRIÇÃO DETALHADA DOS MODOS DE REALIZAÇÃO PREFERIDOS

O termo «AD7C-NTP» diz respeito à proteína de ~41 kD e ao gene e às sequências de ácidos nucleicos que a codificam descritas em De la Monte et al., *J. Clin. Invest.*, 100: 3093-104 (1997), nas Sequências 120 e 121 das patentes US 5,948,634, 5,948,888 e 5,830,670 e no #AF010144 do GenBank, cujos ácidos nucleicos e sequências de aminoácidos estão ilustrados na Figura 1. O termo «AD7C-NTP» também inclui fragmentos, variantes, derivados, homólogos e miméticos biologicamente activos da AD7C-NTP.

O termo «NTP» ou a expressão «proteína de filamento neural» diz respeito a proteínas de filamento neural e moléculas relacionadas (incluindo a proteína de filamento pancreático) e sequências de ácidos nucleicos que codificam essas proteínas, e incluem (mas não se limitam) as seguintes proteínas e sequências de aminoácidos que codificam as sequências de aminoácidos para estas

proteínas:

(a) AD7C-NTP;

(b) as espécies de proteína de filamento neural de ~42, ~26, ~21, ~17, ~14, e de ~8 kD descritas nas patentes US 5,948,634, 5,948,888, 5,830,670 e 6,071,705 e em De la Monte et al., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55 (10): 1038-50 (1996), De la Monte et al., *J. Neurol. Sci.*, 138 (1-2): 26-35 (1996); De la Monte et al., *J. Neurol. Sci.*, 135 (2): 118-25 (1996), De la Monte et al., *J. Clin. Invest.*, 100: 3093-3104 (1997) e em De la Monte et al., *Alz. Rep.*, 2: 327-332 (1999);

(c) proteínas reconhecidas especificamente pelo anticorpo monoclonal #2 depositado na American Type Culture Collection, Manassas, Va., com o número de acesso HB-12546 ou o anticorpo monoclonal #5 depositado na American Type Culture Collection, Manassas, Va., com o número de acesso HB-12545;

(d) proteínas codificadas pelo gene da AD7C-NTP;

(e) a proteína de filamento neural de 122 aminoácidos descrita na Sequência 40 das patentes US 5,830,670, 5,948,634 e 5,948,888 e listada no NCBI Entrez-Protein Accession #AAE25447, PID gl0048540, cujas sequências de aminoácidos estão ilustradas na Figura 2;

(f) a proteína de filamento neural de 112 aminoácidos listada no NCBI.

Entrez-Protein Accession #XP_032307, PID gl4725132, cujas sequências de aminoácidos estão ilustradas na Figura 3;

(g) uma proteína do tipo proteína de filamento neural de 106 aminoácidos listada no NCBI Entrez-Protein Accession #AAH14951 PID gl5928971, cujas sequências de aminoácidos estão ilustradas na Figura 4;

(h) uma proteína do tipo proteína de filamento neural de 106 aminoácidos listada no NCBI Entrez-Protein Accession #XP_039102, PID gl8599339, cuja sequência de aminoácidos está ilustrada na Figura 5;

(i) a proteína de filamento neural de 98 aminoácidos descrita na Sequência 30 das patentes US 5,830,670, 5,948,634 e 5,948,888 e listada no NCBI Entrez-Protein Accession #AAE25445, PID gl0048538, cujas sequências de aminoácidos estão ilustradas na Figura 6;

(j) a proteína de filamento neural de 75 aminoácidos descrita na Sequência 48 das patentes US 5,830,670, 5,948,634, e 5,948,888 e listada no NCBI Entrez-Protein Accession #AAE25448, PID gl0048541, cujas sequências de aminoácidos estão ilustradas na Figura 7;

(k) a proteína de filamento neural de 68 aminoácidos descrita na Sequência 36 das patentes US 5,830,670, 5,948,634 e 5,948,888 e listada no NCBI Entrez-Protein Accession #AAE25446, PID gl0048539, cujas sequências de aminoácidos estão ilustradas na Figura 8;

(l) a proteína do tipo proteína de filamento neural de 61 aminoácidos listada no NCBI Entrez-Protein Accession #AAH02534, PID gl2803421, cujas sequências de aminoácidos estão ilustradas na Figura 9;

(m) proteína de filamento pancreático;

(n) a proteína de filamento pancreático neural (nPTP) descrita na patente US 6,071,705; e

(o) proteínas reconhecidas especificamente pelos anticorpos produzidos por um hibridoma de entre o grupo que consiste de HB 9934, HB 9935 e HB 9936 depositado na American Type Culture Collection.

Os aminoácidos e os resíduos de aminoácidos descritos aqui podem ser referidos de acordo com o código aceite de uma letra ou o código aceite de três letras fornecidos na tabela abaixo:

Tabela 1

Aminoácido	Símbolo de uma letra	Símbolo de três letras
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Ácido aspártico	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Glutamina	Q	Gln
Ácido glutâmico	E	Glu
Glicina	G	Gly

Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Fenilalanina	F	Phe
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptofano	W	Trp
Tirosina	Y	Tyr
Valina	V	Val

A expressão «péptido de NTP» diz respeito aos seguintes péptidos derivados da sequência de aminoácido para AD7C-NTP como descrito pelas sequências de aminoácidos listadas abaixo:

Péptido de NTP #1 [SEQ ID NO. 10], AD7C-NTP p1-15
MEFSLLLPRLECNGA

Met-Glu-Phe-Ser-Leu-Leu-Leu-Pro-Arg-Leu-Glu-Cys-Asn-Gly-Ala

Péptido de NTP #2 [SEQ ID NO. 11], AD7C-NTP p14-28
GAISAHNRNLRLLPGSS

Gly-Ala-Ile-Ser-Ala-His-Arg-Asn-Leu-Arg-Leu-Pro-Gly-Ser-Ser

Péptido de NTP #3 [SEQ ID NO. 12], AD7C-NTP p29-45

DSPASASPVAGITGMCT

Asp-Ser-Pro-Ala-Ser-Ala-Ser-Pro-Val-Ala-Gly-Ile-Thr-Gly-

Met-Cys-Thr

Péptido de NTP #4 [SEQ ID NO. 13], AD7C-NTP p43-58

MCTHARLILYFFLVEM

Met-Cys-Thr-His-Ala-Arg-Leu-Ile-Leu-Tyr-Phe-Phe-Leu-Val-

Glu-Met

Péptido de NTP #5 [SEQ ID NO. 14], AD7C-NTP p52-62

YFFLVEMEFLH

Tyr-Phe-Phe-Leu-Val-Glu-Met-Glu-Phe-Leu-His

Péptido de NTP #6 [SEQ ID NO. 15], AD7C-NTP p63-73

VGQAGLELPTS

Val-Gly-Gln-Ala-Gly-Leu-Glu-Leu-Pro-Thr-Ser

Péptido de NTP #7 [SEQ ID NO. 16], AD7C-NTP p74-90

DDPSVSASQSARYRTGH

Asp-Asp-Pro-Ser-Val-Ser-Ala-Ser-Gln-Ser-Ala-Arg-Tyr-

Arg-Thr-Gly-His

Péptido de NTP #8 [SEQ ID NO. 17], AD7C-NTP p88-101

TGHHARLCLANFCG

Thr-Gly-His-His-Ala-Arg-Leu-Cys-Leu-Ala-Asn-Phe-Cys-Gly

Péptido de NTP #9 [SEQ ID NO. 18], AD7C-NTP p97-113

ANFCGRNRVSLMCPSWS

Ala-Asn-Phe-Cys-Gly-Arg-Asn-Arg-Val-Ser-Leu-Met-Cys-Pro-

Ser-Trp-Ser

Péptido de NTP #10 [SEQ ID NO. 19], AD7C-NTP p114-132

PELKQSTCLSLPKCWDYRR

Pro-Glu-Leu-Lys-Gln-Ser-Thr-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Lys-Cys-

Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg

Péptido de NTP #11 [SEQ ID NO. 20], AD7C-NTP p116-132

LKQSTCLSLPKCWDYRR

Leu-Lys-Gln-Ser-Thr-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-Asp-

Tyr-Arg-Arg

Péptido de NTP #12 [SEQ ID NO. 21], AD7C-NTP p119-132

STCLSLPKCWDYRR

Ser-Thr-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg

Péptido de NTP #13 [SEQ ID NO. 22], AD7C-NTP p122-132

LSLPKCWDYRR

Leu-Ser-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg

Péptido de NTP #14 [SEQ ID NO. 23], AD7C-NTP p126-138

KCWDYRRRAAVPGL

Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Gly-Leu

Péptido de NTP #15 [SEQ ID NO.241, AD7C-NTP p126-144

KCWDYRRRAAVPGLFILFFL

Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Gly-Leu-Phe-

Ile-Leu-Phe-Phe-Leu

Péptido de NTP #16 [SEQ ID NO. 25], AD7C-NTP p126-149

KCWDYRRRAAVPGLFILFFLRHRC

Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Gly-Leu-Phe-

Ile-Leu-Phe-Phe-Leu-Arg-His-Arg-Cys-Pro

Péptido de NTP #17 [SEQ ID NO. 26], AD7C-NTP p126-163

KCWDYRRRAAVPGLFILFFLRHRCPTLTQDEVQWCDHSS

Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Gly-Leu-Phe-

Ile-Leu-Phe-Phe-Leu-Arg-His-Arg-Cys-Pro-Thr-Leu-Thr-Gln-

Asp-Glu-Val-Gln-Trp-Cys-Asp-His-Ser-Ser

Péptido de NTP #18 [SEQ ID NO. 27], AD7C-NTP p128-132,
p241-245

WDYRR

Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg

Péptido de NTP #19 [SEQ ID NO. 28], AD7C-NTP p139-151

FILFFLRHRCPTL

Phe-Ile-Leu-Phe-Phe-Leu-Arg-His-Arg-Cys-Pro-Thr-Leu

Péptido de NTP #20 [SEQ ID NO. 29], AD7C-NTP p139-163

FILFFLRHRCPTLTQDEVQWCDHSS

Phe-Ile-Leu-Phe-Phe-Leu-Arg-His-Arg-Cys-Pro-Thr-Leu-Th Gln-
Asp-Glu-Val-Gln-Trp-Cys-Asp-His-Ser-Ser

Péptido de NTP #21 [SEQ ID NO. 30], AD7C-NTP p146-174

HRCPTLTQDEVQWCDHSSLQPSTPEIKHP

His-Arg-Cys-Pro-Thr-Leu-Thr-Gln-Asp-Glu-Val-Gln-Trp-
Cys-Asp-His-Ser-Ser-Leu-Gln-Pro-Ser-Thr-Pro-Glu-Ile-Lys-
His-Pro

Péptido de NTP #22 [SEQ ID NO. 31], AD7C-NTP p175-188

PASASQVAGTKDMH

Pro-Ala-Ser-Ala-Ser-Gln-Val-Ala-Gly-Thr-Lys-Asp-Met-
His

Péptido de NTP #23 [SEQ ID NO. 31], AD7C-NTP p186-203

DMHHYTWLIFIFIFNFLR

Asp-Met-His-His-Tyr-Thr-Trp-Leu-Ile-Phe-Ile-Phe-Ile-Phe-
Asn-Phe-Leu-Arg

Péptido de NTP #24 [SEQ ID NO. 33], AD7C-NTP p189-207

HYTWLIFIFIFNFLRQSLN

His-Tyr-Thr-Trp-Leu-Ile-Phe-Ile-Phe-Ile-Phe-Asn-Phe-Leu-
Arg-Gln-Ser-Leu-Asn

Péptido de NTP #25 [SEQ ID NO. 34], AD7C-NTP p208-252

SVTQAGVQWRNLGSLQPLPPGFKLFSCPSLLSSWDYRRPPRLANF

Ser-Val-Thr-Gln-Ala-Gly-Val-Gln-Trp-Arg-Asn-Leu-Gly-Ser-
Leu-Gln-Pro-Leu-Pro-Pro-Gly-Phe-Lys-Leu-Phe-Ser-Cys-Pro-
Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Pro-Pro-Arg-Leu-
Ala-Asn-Phe

Péptido de NTP #26 [SEQ ID NO. 35], AD7C-NTP p227-245

PGFKLFSCPSLLSSWDYRR

Pro-Gly-Phe-Lys-Leu-Phe-Ser-Cys-Pro-Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-
Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg

Péptido de NTP #27 [SEQ ID NO. 36], AD7C-NTP p229-252

FKLFSCPSLLSSWDYRRPPRLANF

Phe-Lys-Leu-Phe-Ser-Cys-Pro-Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-Asp-
Tyr-Arg-Arg-Pro-Pro-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe

Péptido de NTP #28 [SEQ ID NO. 37],AD7C-NTP p232-245

FSCPSLLSSWDYRR

Phe-Ser-Cys-Pro-Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg

Péptido de NTP #29 [SEQ ID NO. 38],AD7C-NTP p236-245

SLLSSWDYRR

Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg

Péptido de NTP #30 [SEQ ID NO. 39], AD7C-NTP p239-243,

p339-343

SSWDY

Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr

Péptido de NTP #31 [SEQ ID NO. 40], AD7C-NTP p239-245

SSWDYRR

Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg

Péptido de NTP #32 [SEQ ID NO. 41], AD7C-NTP p239-263

SSWDYRRPPRLANFFVFLVEMGFTM

Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Pro-Pro-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe-

Phe-Val-Phe-Leu-Val-Glu-Met-Gly-Phe-Thr-Met

Péptido de NTP #33 [SEQ ID NO. 42], AD7C-NTP p253-263

FVFLVEMGFTM

Phe-Val-Phe-Leu-Val-Glu-Met-Gly-Phe-Thr-Met

Péptido de NTP #34 [SEQ ID NO. 43], AD7C-NTP p259-281

MGFTMFARLILISGPCDLPASAS

Met-Gly-Phe-Thr-Met-Phe-Ala-Arg-Leu-Ile-Leu-Ile-Ser-Gly-

Pro-Cys-Asp-Leu-Pro-Ala-Ser-Ala-Ser

Péptido de NTP #35 [SEQ ID NO. 44], AD7C-NTP p270-274

ISGPC

Ile-Ser-Gly-Pro-Cys

Péptido de NTP #36 [SEQ ID NO. 45], AD7C-NTP p275-291

DLPASASQSAGITGVSH

Asp-Leu-Pro-Ala-Ser-Ala-Ser-Gln-Ser-Ala-Gly-Ile-Thr-Gly-
Val-Ser-His

Péptido de NTP #37 [SEQ ID NO. 46], AD7C-NTP p288-304
GVSHHARLIFNFCLFEM

Gly-Val-Ser-His-His-Arg-Leu-Ile-Phe-Asn-Phe-Cys-Leu-
Phe-Glu-Met

Péptido de NTP #38 [SEQ ID NO. 47], AD7C-NTP p298-307
NFCLFEMESH
Asn-Phe-Cys-Leu-Phe-Glu-Met-Glu-Ser-His

Péptido de NTP #39 [SEQ ID NO. 48], AD7C-NTP p308-353
SVTQAGVQWPNLGSLQPLPPGLKRFSCSLPSSWDYGHLP
PHPANF
Ser-Val-Thr-Gln-Ala-Gly-Val-Gln-Trp-Pro-Asn-Leu-Gly-Ser-
Leu-Gln-Pro-Leu-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Arg-Phe-Ser-Cys-Leu-
Ser-Leu-Pro-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Gly-His-Leu-Pro-Pro-His-
Pro-Ala-Asn-Phe

Péptido de NTP #40 [SEQ ID NO. 49], AD7C-NTP p326-344
PPGLKRFSCSLPSSWDYG
Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Arg-Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Ser-
Ser-Trp-Asp-Tyr-Gly

Péptido de NTP #41 [SEQ ID NO. 50], AD7C-NTP p332-345
 FSCLSLPSSWDYGH
 Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Gly-His

Péptido de NTP #42 [SEQ ID NO. 51], AD7C-NTP p335-343
 LSLPSSWDY
 Leu-Ser-Leu-Pro-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Gly

Péptido de NTP #43 [SEQ ID NO. 52], AD7C-NTP p339-375
 SSWDYGHLPPHPANFCIFIRGGVSPYLSGWSQTPDLR
 Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Gly-His-Leu-Pro-Pro-His-Pro-Ala-Asn-
 Phe-Cys-Ile-Phe-Ile-Arg-Gly-Gly-Val-Ser-Pro-Tyr-Leu-Ser-
 Gly-Trp-Ser-Gln-Thr-Pro-Asp-Leu-Arg

englobados nesta invenção podem ser preparados utilizando os métodos conhecidos daqueles com experiência na arte, como tecnologia de ADN recombinante, síntese e isolamento de proteínas de péptidos de NTP naturais.

Pode-se preparar um péptido de NTP utilizando métodos da tecnologia de ADN recombinante conhecidos, como aqueles apresentados por Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. [1989]) e/ou Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishers Inc. e Wiley and Sons, Nova Iorque (1994).

Pode-se obter um gene ou um ADNc que codifique um péptido de NTP, por exemplo, através do rastreio de uma biblioteca genómica ou de ADNc, ou através de amplificação por PCR. As sondas ou os primers úteis para rastrear a biblioteca podem ser gerados com base em informação sobre

sequências de outros genes ou fragmentos de genes conhecidos da mesma família de genes ou de famílias de genes relacionadas, como, por exemplo, motivos conservados encontrados noutras proteínas de NTP. Além disso, quando se identificou um gene que codifica um péptido de NTP a partir de uma espécie, todo ou parte desse gene pode ser utilizado como sonda para identificar genes homólogos de outras espécies. As sondas ou os primers podem ser utilizados para rastrear bibliotecas de ADNc de várias origens de tecidos que se pensam expressar um gene de NTP. Geralmente, empregar-se-ão condições de elevado rigor no rastreio para minimizar o número de falsos positivos obtidos no rastreio.

Outros meios para preparar um gene que codifica um péptido NTP são o emprego da síntese química utilizando métodos bem conhecidos por qualquer pessoa experiente na arte, como aqueles descritos por Engels et al. (Angew. Chem. Intl. Ed., 28: 716-734 [1989]). Estes métodos incluem, entre outros, métodos de fosfotriéster, fosforamidito e de H-fosfonato para a síntese de ácidos nucleicos. Um método preferido para essa síntese química é a síntese baseada em polímeros utilizando química de fosforamidito padrão. Geralmente, o ADN que codifica um péptido de NTP terá um tamanho de várias centenas de nucleótidos. Os ácidos nucleicos maiores que cerca de 100 nucleótidos podem ser sintetizados como vários fragmentos que utilizam estes métodos. Os fragmentos podem ser ligados uns aos outros para formar o péptido de NTP inteiro. Habitualmente, o fragmento de ADN que codifica a extremidade amino-terminal da proteína terá um ATG que codifica um resíduo de metionina. Esta metionina poderá ou não estar presente na forma madura do péptido de NTP,

dependendo se a proteína produzida na célula hospedeira for concebida para ser secretada dessa célula.

O gene, o ADNc ou o fragmento derivado que codifica o péptido de NTP pode ser inserido num vector de expressão ou de amplificação apropriado utilizando técnicas de ligação padrão. O vector é geralmente seleccionado para ser funcional na célula hospedeira empregada (i. e., o vector é compatível com o mecanismo da célula hospedeira de modo que a amplificação do gene e/ou a expressão do gene possam ocorrer). O gene, o ADNc ou o fragmento derivado que codifica o péptido de NTP pode ser amplificado/expressado em células hospedeiras procarióticas, de levedura, de insecto (sistemas de baculovírus) e/ou células hospedeiras eucarióticas. A selecção da célula hospedeira dependerá, em parte, de o péptido de NTP vir a ser glicosilado e/ou fosforilado. Se esse for o caso, são preferíveis células hospedeiras de levedura, insecto ou mamífero.

Geralmente, os vectores utilizados em qualquer uma das células hospedeiras conterão pelo menos uma sequência flanqueadora 5' (também denominada «promotor») e outros elementos de regulação assim como um potenciador(es), um elemento de replicação de origem, um elemento de terminação da transcrição, uma sequência de intrão completa contendo um sítio de splice dador e aceitador, uma sequência de péptido de sinal, um elemento do sítio de ligação ao ribossoma, uma sequência de poliadenilação, uma região poliligadora para inserir o ácido nucleico que codifica o polipéptido a ser expressado e um elemento marcador seleccionável. Cada um destes elementos é discutido abaixo. O vector pode conter, opcionalmente, uma sequência «tag»,

i. e., uma molécula de oligonucleótido localizada na extremidade 5' ou 3' da sequência que codifica a proteína de NTP; a molécula de oligonucleótido codifica poli-His (como o hexaHis) ou outra «tag» como a FLAG, HA (hemaglutinina do vírus influenza) ou myc para os quais existem anticorpos comercialmente disponíveis. Esta tag funde-se ao polipéptido na altura da expressão do polipéptido e pode servir como meio para purificação de afinidade do péptido de NTP a partir da célula hospedeira. A purificação de afinidade pode ser realizada, por exemplo, através de cromatografia em coluna utilizando anticorpos contra a tag como matriz de afinidade. Opcionalmente, a tag pode ser subsequentemente removida da proteína de NTP purificada ou do péptido de NTP através de vários meios, como a utilização de certas peptidases.

A região de dobra e a região Fc da imunoglobulina humana poderiam ser fundidas ou na extremidade N-terminal ou na extremidade C-terminal do péptido de NTP por alguém com experiência na arte. A proteína de fusão-Fc subsequente poderia ser purificada através da utilização de uma coluna de afinidade de Proteína A. A Fc é conhecida por exibir uma longa semivida farmacocinética in vivo e descobriu-se que as proteínas fundidas à Fc exibem uma semivida substancialmente maior in vivo que o homólogo não fundido. A fusão da região Fc também permite a dimerização/multimerização da molécula, o que pode ser útil para a bioactividade de algumas moléculas.

A sequência flanqueadora 5' pode ser homóloga (i. e., da mesma espécie e/ou estirpe da célula hospedeira), heteróloga (i. e., de outra estirpe ou espécie que não a da

espécie da célula hospedeira), híbrida (i. e., uma combinação de sequências flanqueadoras 5' com mais de uma origem), sintética, ou pode ser a sequência flanqueadora 5' do gene do péptido ou proteína de NTP nativo. Como tal, a origem da sequência flanqueadora 5' pode ser qualquer organismo unicelular procariótico ou eucariótico, qualquer organismo vertebrado ou invertebrado, ou qualquer planta, desde que a sequência flanqueadora 5' seja funcional e possa ser activada pelo mecanismo da célula hospedeira.

As sequências flanqueadoras 5' úteis nos vectores podem ser obtidas através de qualquer um de vários métodos bem conhecidos na arte. Normalmente, as sequências flanqueadoras 5' úteis neste caso, além da sequência flanqueadora do gene de NTP, terão sido identificadas previamente através de mapeamento e/ou através de digestão com endonuclease de restrição e podem ser assim isoladas a partir da fonte de tecido apropriada, utilizando as endonucleases de restrição apropriadas. Em alguns casos, pode ser conhecida toda a sequência de nucleótidos da sequência flanqueadora 5'. Aqui, a sequência flanqueadora 5' pode ser sintetizada utilizando os métodos descritos acima para a síntese ou clonagem de ácidos nucleicos.

Nos casos em que se conhece toda ou apenas uma porção da sequência flanqueadora 5', ela pode ser obtida utilizando PCR e/ou através do rastreio de uma biblioteca genómica com fragmentos de sequências flanqueadoras 5' e/ou de oligonucleótidos adequados da mesma ou de outra espécie.

Nos casos em que a sequência flanqueadora 5' não é conhecida, pode-se isolar um fragmento de ADN contendo uma

sequência flanqueadora 5' a partir de uma porção maior de ADN que possa conter, por exemplo, uma sequência codificante ou mesmo outro gene ou outros genes. O isolamento pode ser realizado através de digestão por endonuclease de restrição utilizando uma ou mais enzimas cuidadosamente seleccionadas para isolar o fragmento de ADN apropriado. Após digestão, o fragmento desejado pode ser isolado através de purificação em gel de agarose, coluna de Qiagen® ou outros métodos conhecidos pelo especialista. A selecção das enzimas adequadas para alcançar este objectivo será evidente a alguém com experiência na arte.

A origem do elemento de replicação é normalmente uma parte de vectores de expressão procarióticos adquiridos comercialmente, e ajudas na amplificação do vector na célula hospedeira. A amplificação do vector até um determinado número de cópias pode, em alguns casos, ser importante para expressão óptima do péptido de NTP. Se o vector escolhido não contiver uma origem do sítio de replicação, pode-se sintetizar quimicamente uma com base numa sequência conhecida e ligada ao vector. O elemento de terminação da transcrição está normalmente localizado na extremidade 3' da sequência que codifica o péptido de NTP e serve para terminar a transcrição da proteína ou do péptido de NTP. Normalmente, o elemento de terminação da transcrição em células procarióticas é um fragmento rico em G-C seguido por uma sequência poli T. Apesar de ser facilmente clonado a partir de um biblioteca ou adquirido comercialmente como parte de um vector, o elemento pode ser rapidamente sintetizado utilizando métodos para a síntese de ácidos nucleicos como aqueles descritos acima.

Um elemento de gene marcador seleccionável codifica uma proteína necessária para a sobrevivência e o crescimento de uma célula hospedeira cultivada num meio de cultura selectivo. Os genes marcadores de selecção normais codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, por exemplo, a ampicilina, a tetraciclina ou a canamicina para células hospedeiras procarióticas; (b) complementam carências auxotróficas da célula; ou (c) fornecem nutrientes importantes não disponíveis a partir de meios complexos. Os marcadores de selecção preferidos são o gene de resistência à canamicina, o gene de resistência à ampicilina e o gene de resistência à tetraciclina.

O elemento de ligação ao ribossoma, denominado habitualmente sequência Shine-Dalgarno (procariotas) ou a sequência Kozak (eucariotas), é habitualmente necessário para a iniciação da tradução do ARNm. O elemento está normalmente localizado 3' ao promotor e 5' à sequência que codifica a proteína de NTP ou o péptido de NTP a ser sintetizado. A sequência Shine-Dalgarno é variada mas é normalmente uma polipurina (i. e., tendo um elevado conteúdo em A-G). Muitas sequências Shine-Dalgarno têm sido identificadas, podendo cada uma das quais ser rapidamente sintetizada utilizando métodos apresentados acima e utilizadas num vector procariótico.

Nos casos em que é desejável que o péptido seja secretado de uma célula hospedeira, pode ser utilizada uma sequência de sinal para dirigir a proteína de NTP para fora da célula hospedeira onde é sintetizada, e a parte carboxi-terminal da proteína pode ser apagada, de modo a prevenir a

ancoragem na membrana. Normalmente, a sequência de sinal está posicionada na região codificante do ADNc ou do gene de NTP, ou directamente na extremidade 5' da região que codifica o gene de NTP. Têm sido identificadas muitas sequências de sinal, e qualquer uma delas que é funcional na célula hospedeira seleccionada pode ser utilizada em conjugação com o gene ou ADNc de NTP. Por isso, a sequência de sinal pode ser homóloga ou heteróloga do gene ou ADNc de NTP, e pode ser homóloga ou heteróloga do gene ou ADNc de NTP. Além disso, a sequência de sinal pode ser sintetizada quimicamente utilizando os métodos apresentados acima. Na maioria dos casos, a secreção do polipéptido da célula hospedeira através da presença de um péptido de sinal resultará na remoção da metionina amino-terminal do polipéptido.

Em muitos casos, a transcrição do gene ou do ADNc de NTP pode ser aumentada pela presença de um ou mais intrões no vector; isto é particularmente verdadeiro nos casos em que o péptido de NTP é produzido em células hospedeiras eucarióticas, especialmente em células hospedeiras de mamífero. Os intrões utilizados podem ocorrer naturalmente no gene de NTP, especialmente nos casos em que o gene utilizado é uma sequência genómica inteira ou um fragmento derivado. Nos casos em que o intrão não ocorre naturalmente dentro do gene (como na maioria dos ADNc), o(s) intrão(ões) pode(m) ser obtido(s) a partir de uma outra origem. A posição do intrão em relação à sequência flanqueadora e ao gene de NTP é relativamente importante, pois o intrão tem de ser transcrito para ser eficaz. Como tal, nos casos em que o gene de NTP inserido no vector de expressão for uma molécula de ADNc, a posição preferida para o intrão é 3' ao

sítio do início da transcrição e é 5' à sequência de terminação da transcrição poli-A. Para o ADNc de NTP, o intrão ou os intrões estarão localizados, preferencialmente, num lado ou no outro (i. e., 5' ou 3') do ADNc de modo a não interromper esta sequência codificante. Pode ser utilizado qualquer intrão de qualquer origem, incluindo qualquer organismo viral, procariótico e eucariótico (planta ou animal) para realizar esta invenção, desde que seja compatível com a(s) célula(s) hospedeira(s) na(s) qual(is) forem inseridos. Também se incluem aqui intrões sintéticos. Em opção, pode-se utilizar mais do que um intrão no vector.

Nos casos em que um ou mais dos elementos apresentados acima não estejam já presentes no vector a utilizar, podem ser obtidos individualmente e ligados ao vector. Os métodos utilizados para obter cada um dos elementos são bem conhecidos pelos especialistas e são comparáveis aos métodos apresentados acima (i. e., síntese do ADN, rastreio de biblioteca, etc.).

Os vectores finais utilizados para realizar esta invenção podem ser construídos a partir de vectores iniciais como um vector disponível comercialmente. Esses vectores podem ou não conter alguns dos elementos a ser incluídos no vector completo. Se não houver nenhum dos elementos desejados no vector inicial, cada elemento pode ser ligado individualmente ao vector através da secção do vector com a(s) endonuclease(s) de restrição apropriada(s), de modo que as extremidades do elemento a ser ligado e as extremidades do vector sejam compatíveis para a ligação. Em alguns casos, pode ser necessário «aparafusar» as extremidades

a serem ligadas uma à outra para obter uma ligação satisfatória. O aparo é alcançado em primeiro lugar pela introdução de «extremidades adesivas» utilizando a ADN polimerase de Klenow ou a ADN polimerase de T4 na presença de todos os 4 nucleótidos. Este processo é bem conhecido na arte e é descrito por exemplo em Sambrook et al., supra. Em alternativa, pode-se, em primeiro lugar, ligar um ao outro dois ou mais dos elementos a ser inseridos no vector (se se quiser que sejam posicionados adjacentes um ao outro) e podem depois ser ligados ao vector.

Outro método para construir o vector é dirigir todas as ligações dos vários elementos simultaneamente numa mistura de reacção. Neste caso, serão gerados muitos vectores sem sentido ou não funcionais devido a ligação ou inserção imprópria dos elementos; no entanto pode-se identificar e seleccionar o vector funcional através de digestão por endonuclease de restrição.

Os vectores preferidos para realizar esta invenção são todos os que sejam compatíveis com células hospedeiras bacterianas, de insecto e de mamífero. Esses vectores incluem, entre outros, pCRII, pCR3 e pCDNA3.1 (Invitrogen Company, San Diego, Calif.), pBSII (Stratagene Company, La Jolla, Calif.), pET15b (Novagen, Madison, Wis.), PGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, N. J.), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, Calif.), pETL (BlueBacII; Invitrogen) e pFastBacDual (Gibco/BRL, Grand Island, N. Iorque).

Após ter sido construído o vector e ter sido inserida uma molécula de ácidos nucleicos que codifique um péptido de NTP no sítio apropriado do vector, o vector completo

pode ser inserido numa célula hospedeira adequada para amplificação e/ou expressão de polipéptidos. As células hospedeiras podem ser células hospedeiras procarióticas (como a *E. coli*) ou células hospedeiras eucarióticas (como uma célula de levedura, uma célula de insecto ou uma célula de um vertebrado). Quando é cultivada sob condições apropriadas, a célula hospedeira pode sintetizar o péptido de NTP, que pode ser subsequentemente recuperado a partir do meio de cultura (se a célula hospedeira o secretar para o meio) ou directamente a partir da célula hospedeira que a produz (se não for segregado).

Depois da recolha, o péptido de NTP pode ser purificado utilizando métodos como a cromatografia de filtro molecular, cromatografia de afinidade, etc. A selecção da célula hospedeira para a produção do péptido de NTP vai depender, em parte, de o péptido de NTP vir a ser glicosilado ou fosforilado (caso em que se preferem células eucarióticas), e da maneira em que a célula hospedeira conseguir «dobrar» a proteína na sua estrutura terciária nativa (por exemplo, orientação adequada das pontes dissulfeto, etc.), de modo a preparar uma proteína biologicamente activa pela proteína ou pelo péptido de NTP que tem actividade biológica, o péptido de NTP pode ser «dobrado» após a síntese utilizando condições químicas apropriadas como analisado abaixo. As células ou linhagens celulares adequadas podem ser as células de mamífero, como as células de ovário de hamster chinês (CHO), células de rim embrionário humano (HEK) 293 ou 293T ou células 3T3. A selecção de células hospedeiras adequadas de mamífero e os métodos para a transformação, a cultura, a amplificação, o rastreio e a produção do produto e a purificação são

conhecidos na arte. Outras linhagens de células de mamífero adequadas são as linhagens de células de macaco COS-1 e COS-7 e a linhagem de células CV-1. Outras células hospedeiras de mamífero que servem como exemplo incluem linhagens de células de primata e linhagens de células de roedores, incluindo linhagens de células transformadas. Também são adequadas células diplóides, estirpes celulares derivadas da cultura in vitro de tecidos primários, assim como explantes primários. As células candidatas podem ser genotipicamente deficientes na selecção do gene ou podem conter um gene de selecção que actue dominantemente. Outras linhagens de células adequadas de mamíferos incluem, mas não se limitam a, células N2A de neuroblastoma de rato, HeLa, células L-929 de rato, linhagens 3T3 derivadas de linhagens de células de ratos Swiss, Balb-c ou NIH, e de hamster BHK ou HaK.

As células bacterianas são similarmente úteis como células hospedeiras para a presente invenção. Por exemplo, as várias estirpes de *E. coli* (por exemplo, HB101, DH5.alfa, DH10 e MC1061) são bem conhecidas como células hospedeiras no campo da biotecnologia. Várias estirpes de *B. subtilis*, *Pseudomonas* spp., outras *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., etc. também podem ser empregues neste método. Muitas estirpes de células de leveduras conhecidas daqueles com experiência na arte também estão disponíveis como células hospedeiras para a expressão dos polipéptidos da presente invenção.

Além disso, podem ser utilizados, se desejado, sistemas de células de insectos. Esses sistemas são descritos por exemplo em Kitts et al., (Biotechniques, 14:

810-817 [1993]), Lucklow (Curr. Opin. Biotechnol., 4: 564-572 [1993]) e Lucklow et al., (Virol., 67: 4566-4579 [1993]). As células de insecto preferidas são as Sf-9 e as Hi5 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.).

A inserção (também designada por «transformação» ou «transfecção») do vector na célula hospedeira seleccionada pode ser alcançada utilizando métodos como o método de cloreto de cálcio, electroporação, microinjecção, lipofecção ou o método de DEAE-dextrano. O método seleccionado será em parte em função do tipo de célula hospedeira utilizada. Estes métodos e outros métodos adequados são bem conhecidos dos especialistas e são descritos, por exemplo, em Sambrook et al., supra.

As células hospedeiras que contêm o vector (i. e., transformadas ou transfectadas) podem ser cultivadas utilizando meios de cultura padrão conhecidos pelos especialistas. Os meios de cultura conterão todos os nutrientes necessários ao crescimento e à sobrevivência das células. Os meios de cultura apropriados para cultivar células de E. coli são, por exemplo, o meio de Luria Broth (LB) e/ou o meio de Terrific Broth (TB). Meios de cultura apropriados para cultivar células eucarióticas são RPMI 1640, MEM, DMEM, todos os quais podem ser suplementados com soro e/ou factores de crescimento, conforme seja necessário pela linhagem celular a ser cultivada. Um meio de cultura apropriado para culturas de insectos é o meio de Grace suplementado conforme necessário com extracto de levedura, hidrolisado de lactalbumina e/ou soro fetal bovino. Normalmente, um antibiótico ou um outro composto útil para o crescimento selectivo unicamente das células

transformadas é adicionado como suplemento ao meio de cultura. O composto a ser utilizado será ditado pelo elemento marcador seleccionável presente no plasmídeo com o qual a célula hospedeira foi transformada. Nos casos em que o elemento marcador seleccionável é a resistência à canamicina, por exemplo, o composto adicionado ao meio de cultura será a canamicina.

A quantidade de péptido de NTP produzido nas células hospedeiras pode ser determinada utilizando métodos-padrão conhecidos na arte. Esses métodos incluem, sem limitação, a análise por Western blot, electroforese de gel de poliacrilamida-SDS, electroforese de gel não desnaturante, separação por HPLC, espectroscopia de massa, imunoprecipitação e/ou testes de actividade como o ensaio da alteração da mobilidade do ADN.

Se o péptido de NTP foi concebido para ser segregado a partir das células hospedeiras, a maior parte do péptido de NTP pode ser encontrada no meio de cultura celular. As proteínas preparadas desta maneira não terão normalmente uma metionina amino-terminal, pois ela é removida durante a (sua) secreção a partir da célula. No entanto, se o péptido de NTP não for segregado a partir das células hospedeiras, ele estará presente no citoplasma e/ou no núcleo (para células hospedeiras eucarióticas) ou no citosol (para células hospedeiras de bactérias gram-negativas) e pode ter uma metionina amino-terminal.

Para o péptido de NTP situado no citoplasma e/ou no núcleo da célula hospedeira, as células hospedeiras são, em primeiro lugar, geralmente rebentadas mecanicamente ou com

detergente, para libertar os conteúdos intracelulares numa solução tamponada. O péptido de NTP pode depois ser isolado a partir desta solução.

A purificação do péptido de NTP a partir da solução pode ser realizada utilizando uma variedade de técnicas. Se a proteína tiver sido sintetizada de modo a conter uma tag como a hexa-Histidina (proteína de NTP/hexa-His) ou um outro pequeno péptido, como FLAG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI) ou um péptido que se liga à calmodulina (Stratagene, La Jolla, CA) ou na sua extremidade carboxi-terminal ou na sua extremidade amino-terminal, ela pode, essencialmente, ser purificada num processo de uma só fase, fazendo passar a solução através de uma coluna de afinidade em que a matriz da coluna tem uma elevada afinidade para a tag ou directamente para a proteína (i. e., um anticorpo monoclonal que reconhece especificamente o péptido de NTP). Por exemplo, a poli-histidina liga-se com grande afinidade e especificidade ao níquel, zinco e cobalto; por conseguinte, a cromatografia de afinidade de ião metálico imobilizado que utiliza uma resina de afinidade baseada em níquel (como utilizada no sistema Qiagen QIAexpress ou no sistema Invitrogen Xpress) ou uma resina de afinidade baseada em cobalto (como utilizada no sistema BD Biosciences-CLONTECH Talon) pode ser utilizada para a purificação da proteína de NTP/Poli-His (ver, por exemplo, Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, Section 10.11.8, John Wiley & Sons, Nova Iorque [1993]).

Nos casos em que o péptido de NTP é preparado sem uma tag a ele ligada, e não estarem disponíveis nenhuns

anticorpos, podem-se utilizar outros procedimentos de purificação muito conhecidos. Esses procedimentos incluem, sem limitação, a cromatografia de troca de iões, cromatografia de hidroxapatite, cromatografia de interacção hidrofóbica, cromatografia de filtros moleculares, HPLC, electroforese de gel nativo em combinação com eluição de gel e focagem isoeléctrica preparativa (máquina/técnica de «Isoprime», Hoefer Scientific). Em alguns casos podem-se combinar duas ou mais destas técnicas para alcançar uma pureza aumentada.

Se se antecipar que o péptido de NTP será encontrado principalmente num meio intracelular, o material intracelular (incluindo os corpos de inclusão para bactérias gram-negativas) pode ser extraído da célula hospedeira utilizando qualquer técnica-padrão conhecida pelos especialistas. Por exemplo, as células hospedeiras podem ser lisadas para libertar os conteúdos do periplasma/citoplasma através da prensa francesa, homogeneização e/ou sonicação seguida de centrifugação. Se o péptido de NTP tiver formado corpos de inclusão no citosol, os corpos de inclusão podem-se ligar com frequência às membranas celulares internas/externas e serão, por conseguinte, encontrados primariamente no pellet após centrifugação. Este material pellet pode depois ser tratado nos extremos do pH ou com um agente caotrópico, como um detergente, guanidina, derivados da guanidina, ureia ou derivados da ureia na presença de um agente redutor, como o ditiotreitól num pH alcalino ou a tris-carboxietilfosfina num pH ácido para libertar, fraccionar e solubilizar os corpos de inclusão. O péptido de NTP na sua forma agora solúvel pode depois ser analisado utilizando

electroforese em gel, imunoprecipitação, etc.

Se for desejável isolar o péptido de NTP, o isolamento pode ser realizado utilizando métodos-padrão como os descritos abaixo e em Marston et al., (Meth. Enz., 182: 264-275 [1990]). Em alguns casos, o péptido de NTP pode não ser biologicamente activo após o isolamento. Para restaurar a actividade biológica, podem ser utilizados vários métodos para «redobrar» ou converter o polipéptido à sua estrutura terciária e gerar ligações de dissulfeto. Esses métodos incluem a exposição do polipéptido solubilizado a um pH normalmente acima de 7 e na presença de uma determinada concentração de um agente caotrópico. A selecção do agente caotrópico é muito semelhante às escolhas utilizadas para a solubilização dos corpos de inclusão mas normalmente a uma concentração mais baixa e não é necessariamente utilizado o mesmo agente caotrópico utilizado na solubilização. Na maioria dos casos, a solução de redobragem/oxidação também irá conter um agente redutor ou o agente redutor mais a sua forma oxidada numa razão específica para gerar um determinado potencial redox permitindo que a ocorrência de mistura de dissulfeto na formação da(s) ponte(s) de cisteína da proteína. Alguns dos pares de redox utilizados mais habitualmente incluem o par cisteína/cistamina, glutathione (GSH)/ditiobis GSH, cloreto cúprico, ditiotreitól (DTT)/ditiano DTT, 2-mercaptoetanol (bME)/ditio-b(ME). Em muitos casos, é necessário um co-solvente para aumentar a eficácia da redobragem, sendo que os reagentes mais comuns utilizados para este fim incluem o glicerol, o polietilenoglicol de vários pesos moleculares e a arginina.

Se não se formarem corpos de inclusão de péptido de NTP num grau significativo na célula hospedeira, o péptido de NTP será encontrado primariamente no sobrenadante após a centrifugação do homogenato da célula e o péptido de NTP pode ser isolado a partir do sobrenadante, utilizando métodos como aqueles descritos abaixo.

Nessas situações em que é preferível isolar parcialmente ou completamente o péptido de NTP, a purificação pode ser alcançada utilizando métodos-padrão por demais conhecidos pelos especialistas. Esses métodos incluem, sem limitação, a separação por electroforese seguida de electroeluição, vários tipos de cromatografia (imunoafinidade, filtros moleculares e/ou trocas de iões) e/ou cromatografia líquida de alta pressão. Nalguns casos, pode ser preferível utilizar mais do que um destes métodos para completar a purificação.

Além de preparar e purificar o péptido de NTP utilizando técnicas de ADN recombinante, os péptidos de NTP podem ser preparados por métodos de síntese química (como a síntese de péptidos de fase sólida) utilizando técnicas conhecidas na arte como as descritas por Merrifield et al. (J. Am. Chem. Soc., 85: 2149 [1963]), Houghten et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 5132 [1985]) e Stewart e Young (Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, 111 [1984]). Esses polipéptidos podem ser sintetizados com ou sem uma metionina na extremidade amino-terminal. Os péptidos de NTP sintetizados quimicamente podem ser oxidados utilizando métodos descritos nestas referências para formar pontes de dissulfeto. Espera-se que os péptidos de NTP tenham actividade biológica comparável

aos péptidos de NTP produzidos recombinantemente ou purificados a partir de fontes naturais, podendo ser, por conseguinte, utilizados alternadamente com péptido de NTP natural ou recombinante.

Os péptidos de NTP podem ser produzidos utilizando técnicas convencionais de síntese de péptidos conhecidas por qualquer pessoa com experiência na arte. Estas técnicas incluem métodos de ligação química [cf. Wunsch, E.: «Methoden der organischen Chemie», Volume 15, Band 1+2, Synthese von Peptiden, Thieme Verlag, Stuttgart (1974), e Barrany, G.; Marrifield, R. B.: «The Peptides», eds. E. Gross, J. Meienhofer, Volume 2, Capítulo 1, pp. 1-284, Academic Press (1980)], métodos de ligação enzimática [cf. Widmer, F. Johansen, J. T., Carlsberg Res. Commun., Vol. 44, pp. 37-46 (1979), e Kullmann, W.: «Enzymatic Peptide Synthesis», CRC Press Inc. Boca Raton, Fla. (1987), e Widmer, F., Johansen, J. T. em «Synthetic Peptides in Biology and Medicines»:., eds. Alitalo, K., Partanen, P., Vattieri, A., pp.79-86, Elsevier, Amsterdam (1985)] ou uma combinação de métodos químicos e enzimáticos se esta for vantajosa para o desenvolvimento e economia do processo. Utilizando as directrizes e os ensinamentos aqui fornecidos, aqueles com experiência na arte são capazes de variar a sequência de péptidos do péptido de NTP para gerar um homólogo que tem a mesma actividade biológica (bioactividade) ou uma similar em relação ao péptido de NTP original ou nativo.

A presente invenção também diz respeito à utilização de péptidos de NTP para tratar estados que necessitam de remoção de células, como tumores benignos e malignos,

hiperplasia glandular (por exemplo, próstata), pêlos faciais indesejados, verrugas e tecido adiposo indesejável. Essa utilização compreende a administração a um mamífero de que dela necessite de uma quantidade terapeuticamente eficaz do péptido de NTP.

O estado pode ser, por exemplo, tumores do pulmão, mama, estômago, pâncreas, próstata, bexiga, osso, ovário, pele, rim, seios, cólon, intestino, estômago, recto, esófago, sangue, cérebro e das suas meninges, espinhal medula e das suas meninges, músculo, tecido conjuntivo, glândulas supra-renais, paratiróide, tiróide, útero, testículo, hipófise, órgãos reprodutivos, fígado, vesícula biliar, olho, ouvido, nariz, garganta, amígdalas, boca, nódulos linfáticos e sistema linfático e outros órgãos.

A expressão «tumor maligno», tal como é aqui utilizada, engloba todas as formas de carcinomas, sarcomas e melanomas humanos que ocorrem nas formas pouco diferenciadas, moderadamente diferenciadas e bem diferenciadas.

Esta invenção satisfaz a necessidade na arte para tratamentos que possam remover tumores benignos com menor risco e menores efeitos secundários indesejáveis da cirurgia. É particularmente necessária a remoção de tumores benignos em áreas perigosas do ponto de vista cirúrgico como em localizações profundas do corpo (por exemplo, o cérebro, o coração, os pulmões e outros).

A utilização de péptidos de NTP para tratar estados em que se tenham de remover células pode ser feita em conjugação com métodos convencionais para tratar esses

estados, como a excisão cirúrgica, quimioterapia e radioterapia. Os péptidos de NTP podem ser administrados antes, durante ou depois desses tratamentos convencionais.

O estado a ser tratado também pode ser uma hiperplasia, uma hipertrofia ou um sobredesenvolvimento de tecido seleccionado de entre o grupo que consiste de pulmão, mama, estômago, pâncreas, próstata, bexiga, osso, ovário, pele, rim, seios, cólon, intestino, estômago, recto, esófago, sangue, cérebro e das suas meninges, espinhal medula e das suas meninges, músculo, tecido conjuntivo, glândulas supra-renais, paratiróide, tiróide, útero, testículo, hipófise, órgãos reprodutivos, fígado, vesícula biliar, olho, ouvido, nariz, garganta, amígdalas, boca, nódulos linfáticos e sistema linfático.

Um outro estado que também pode ser tratado pelos péptidos de NTP da invenção é um tecido alterado por vírus, bactérias ou parasitas, seleccionado de entre o grupo que consiste de pulmão, mama, estômago, pâncreas, próstata, bexiga, osso, ovário, pele, rim, seios, cólon, intestino, estômago, recto, esófago, sangue, cérebro e das suas meninges, espinhal medula e das suas meninges, músculo, tecido conjuntivo, glândulas supra-renais, paratiróide, tiróide, útero, testículo, hipófise, órgãos reprodutivos, fígado, vesícula biliar, olho, ouvido, nariz, garganta, amígdalas, boca, nódulos linfáticos e sistema linfático.

O estado a ser tratado também pode ser uma malformação de um tecido seleccionado de entre o grupo que consiste de pulmão, mama, estômago, pâncreas, próstata, bexiga, osso, ovário, pele, rim, seios, cólon, intestino, estômago,

recto, esófago, sangue, cérebro e das suas meninges, espinhal medula e das suas meninges, músculo, tecido conjuntivo, glândulas supra-renais, paratiróide, tiróide, útero, testículo, hipófise, órgãos reprodutivos, fígado, vesícula biliar, olho, ouvido, nariz, garganta, amígdalas, boca, nódulos linfáticos e sistema linfático.

O estado a ser tratado pode ser, nomeadamente, a hipertrofia amigdalina, a hiperplasia prostática ou hemorróidas. O estado a ser tratado pode ser uma doença vascular, como a aterosclerose ou a arteriosclerose, ou uma doença vascular, como veias varicosas. O estado a ser tratado também pode ser uma alteração cosmética de um tecido como o da pele, do olho, do ouvido, do nariz, da garganta, da boca, do músculo, do tecido conjuntivo, pêlos ou do tecido mamário.

As composições terapêuticas de péptidos de NTP estão no âmbito da presente invenção. Essas composições podem compreender uma quantidade terapeuticamente eficaz de péptido de NTP em mistura com um excipiente farmacologicamente aceitável. O material excipiente pode ser água para injeção, preferencialmente suplementada com outros materiais habituais em soluções para administrações em mamíferos. Normalmente, será administrado um péptido de NTP para utilização terapêutica sob a forma de uma composição compreendendo péptidos de NTP purificados em conjunção com um ou mais transportadores, excipientes ou diluentes farmacologicamente aceitáveis. Soro fisiológico tamponado neutro ou soro fisiológico misturado com albumina sérica são excipientes exemplares apropriados. De preferência, o produto é formulado como um liofilizado

utilizando excipientes apropriados (por exemplo, sacarose). Podem ser incluídos outros transportadores, diluentes e excipientes padrão conforme desejado. As composições compreendem tampões conhecidos daqueles com experiência na arte com um intervalo de valores de pH apropriado, incluindo o tampão Tris com um pH de aproximadamente 7,0 a 8,5, ou um tampão de acetato com um pH de aproximadamente 4,0 a 5,5, que pode ainda incluir sorbitol ou um substituto adequado derivado.

Os péptidos de NTP podem ser empregues isoladamente, juntos ou em combinação com outras composições farmacológicas, como citoquinas, factores de crescimento, antibióticos, agentes indutores da apoptose, agentes anti-inflamatórios e/ou agentes quimioterapêuticos conforme for apropriado para o estado a ser tratado.

Esta invenção também engloba composições terapêuticas de péptidos de NTP empregando dendrímeros, fulerenos e outras moléculas sintéticas, polímeros e macromoléculas em que o péptido de NTP está contido na molécula, no polímero ou macromolécula, por si mesmo ou em conjugação com outras espécies de moléculas, como um marcador tumoral específico. A patente US 5,714,166, *Bioactive and/or Targeted Dendimer Conjugates*, por exemplo, fornece um método para preparar e utilizar, entre outros, conjugados de polímero dendríticos compostos por pelo menos um dendrímero com um direccionador de alvo e pelo menos um agente bioactivo a ele conjugado.

Esta invenção também compreende composições terapêuticas de péptidos de NTP e excipientes de administração de fármacos como emulsões de lípidos, polímeros de micelas, microesferas de polímeros, hidrogéis

e lipossomas.

Formas de dosagem sólidas para a administração oral incluem, mas não estão limitadas a, cápsulas, comprimidos, pílulas, pós e grânulos. Nessas formas de dosagem, o composto activo é misturado com pelo menos um dos seguintes: (a) um ou mais excipientes (transportadores) inertes, como o citrato de sódio ou o fosfato dicálcico; (b) materiais de enchimento ou diluentes, como amidos, lactose, sacarose, glucose, manitol e o ácido silícico; (c) aglomerantes como a carboximetilcelulose, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarose e acácia; (d) humidificantes, como o glicerol; (e) agentes desintegradores, como o ágar-ágar, o carbonato de cálcio, o amido de batata ou de tapioca, o ácido algínico, certos silicatos complexos e carbonato de sódio; (f) retardadores de solução, como a parafina; (g) aceleradores da absorção, como compostos de amónio quaternário; (h) agentes molhante, como álcool de acetilo e monoestearato de glicerol; (i) absorventes, como o caulino e a bentonite e (j) lubrificantes, como o talco, o estearato de cálcio, o estearato de magnésio, glicóis de polietileno sólidos, o sulfato de laurilo de sódio ou misturas derivadas. Para as cápsulas, os comprimidos e as pílulas, as formas de dosagem também podem compreender agentes tampão.

Formas de dosagem líquidas para a administração oral incluem emulsões, soluções, suspensões, xaropes e elixires farmacologicamente aceitáveis. Além dos compostos activos, as formas de dosagem líquidas podem compreender diluentes inertes utilizados habitualmente na arte, como água ou outros solventes, agentes de solubilização ou

emulsionantes. O álcool etílico, o álcool de isopropilo, o carbonato de etilo, o acetato de etilo, o álcool de benzilo, o benzoato de benzilo, o propilenoglicol, o 1,3-butilenoglicol, a dimetilformamida, os óleos, como o óleo de semente de algodão, o óleo de amendoim, o óleo de gérmen de milho, o azeite, o óleo de rícino e o óleo de sésamo, o glicerol, o álcool de tetrahidrofurfurilo, polietilenoglicóis, ésteres de ácidos gordos de sorbitano ou misturas destas substâncias, etc. são emulsionantes exemplares.

Além desses diluentes inertes, a composição também pode incluir adjuvantes, como agentes molhantes, agentes emulsionantes e de suspensão, adoçantes, aromatizantes e agentes perfumantes.

Os níveis de dosagem reais dos ingredientes activos nas composições da invenção podem variar para obter uma quantidade terapeuticamente eficaz de péptido de NTP que é eficaz para obter uma resposta terapêutica desejada para uma composição e um modo de administração em particular. O nível de dosagem seleccionado depende assim do efeito terapêutico desejado, da via de administração, da duração desejada do tratamento, do tamanho do indivíduo ou animal tratado e de outros factores.

Nos mamíferos, incluindo os humanos, as quantidades eficazes podem ser administradas com base na área de superfície corporal. A inter-relação das dosagens para animais de vários tamanhos e espécies, e humanos (baseada em mg/M² de superfície corporal) é descrita por E. J. Freireich *et al.*, *Cancer Chemother. Rep.*, 50 (4): 219 (1966). A área de superfície corporal pode ser determinada

aproximadamente a partir da altura e do peso de um indivíduo (ver, por exemplo, *Scientific Tables*, Geigy Pharmaceuticals, Ardsley, Nova Iorque, pp. 537-538 (1970)). Utilizando as técnicas conhecidas por aqueles com experiência na arte e utilizando as directrizes e os ensinamentos aqui fornecidos, os especialistas serão capazes de determinar a quantidade terapêuticamente eficaz de péptido de NTP para utilização na presente invenção.

A dose diária total do péptido de NTP administrada a um hospedeiro pode ser dada numa dose única ou em doses divididas. As composições das unidades de dosagem podem conter tantas subquantidades derivadas quantas as necessárias para produzir a dose diária. Entende-se, no entanto que o nível de dose específica para qualquer doente em particular dependerá de uma variedade de factores que incluem o peso, estado de saúde, sexo, dieta, altura e via de administração, potência do fármaco administrado, taxas de absorção e de excreção, combinação com outros fármacos e a gravidade da doença a ser tratada.

A composição de péptido de NTP de acordo com a invenção pode ser administrada por via intramuscular, oral, endovenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intratumoral, intralesional, intradérmica, intratecal, intranasal, intra-ocular, intra-arterial, tópica, transdérmica, através de um aerossol, uma infusão, uma injeção de um bolus, um dispositivo implantado, um sistema de libertação contínua, etc.

O péptido de NTP da invenção também pode ser

administrado através de uma via transdérmica ou transcutânea. Um exemplo de um desses modos de realização é a utilização de um emplastro. Em particular, pode-se preparar um emplastro com uma suspensão fina do péptido de NTP em, por exemplo, dimetilsulfóxido (DMSO) ou uma mistura de DMSO com óleo de semente de algodão e é colocado em contacto com a pele do mamíferos portadores do tumor, longe da localização do tumor, dentro de uma bolsa na pele. Outros meios ou misturas derivadas com outros solventes e suportes sólidos também serviriam. O emplastro pode conter o composto do péptido de NTP na forma de uma solução ou de uma suspensão. O emplastro pode depois ser aplicado à pele do doente, por exemplo, através da sua inserção numa bolsa na pele do doente formada através da dobragem e da fixação da pele com pontos, cliques ou outros dispositivos de fixação. Esta bolsa deve ser empregue de tal maneira que o contacto contínuo com a pele seja assegurado sem interferência do mamífero. Além disso, ao utilizar uma bolsa na pele, pode-se utilizar qualquer dispositivo que assegure a firme colocação do emplastro em contacto com a pele. Pode-se, por exemplo, utilizar um adesivo para manter no lugar o emplastro sobre a pele.

O péptido de NTP pode ser administrado numa formulação ou preparação de libertação contínua. Exemplos apropriados de preparações de libertação contínua incluem matrizes de polímeros semipermeáveis na forma de artigos moldados, por exemplo, películas ou microcápsulas. Matrizes de libertação contínua incluem poliésteres, hidrogéis, poliláctidos (US 3,773,919, EP 58,481), copolímeros de ácido L-glutâmico e de gama etil-L-glutamato (Sidman et al., Biopolymers, 22: 547-556 [1983]), poli (2-hidroxietil-metacrilato) (Langer

et al., J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 [1981] e Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 [1982]), vinilacetato de etileno (Langer et al., supra) ou ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (EP 133,988). As composições de libertação contínua também podem incluir lipossomas que podem ser preparados através de qualquer um dos vários métodos conhecidos na arte (por exemplo, Eppstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688-3692 [1985]; EP 36,676; EP 88,046 e EP 143,949).

Uma outra via de administração para um péptido de NTP da invenção é através de infusão directa ou indirecta do péptido de NTP no tumor ou no tecido a ser tratado. Um exemplo de um desses modos de realização é a injeção directa do péptido de NTP no tumor ou no tecido a ser tratado. O tratamento pode consistir numa injeção única, em múltiplas injeções numa só ocasião ou numa série de injeções ao longo de um período de horas, dias ou meses com a regressão ou destruição do tumor ou tecido a ser tratado, sendo monitorizado através de biópsia, imagiologia ou outros métodos de monitorização do crescimento de tecidos. A injeção no tumor ou no tecido a ser tratado pode ser feita através de um dispositivo inserido num orifício como o nariz, a boca, o ouvido, a vagina, o recto ou a uretra ou através de uma incisão, de modo a alcançar o tumor ou o tecido in vivo, e pode ser realizada em conjugação com um sistema de imagem ou um sistema óptico, como o ultra-som, ou câmara de fibra óptica, de modo a identificar o sítio apropriado para a(s) injeção(ões). Outro exemplo de um desses modos de realização é a utilização de um dispositivo que pode proporcionar uma infusão constante do péptido de NTP no tecido ao longo do

tempo.

Uma outra via de administração para um péptido de NTP da invenção é a conjugação com um procedimento cirúrgico ou similar utilizado para excisar, extirpar ou matar ou destruir fisicamente o tumor ou o tecido ou os elementos celulares que se precisa ou deseja remover ou destruir em que o péptido de NTP da invenção é administrado na(s) área(s) imediata(s) que envolve(m) a(s) área(s) onde o tumor ou o tecido foi removido, de modo a destruir ou impedir o crescimento de quaisquer células tumorais ou outros elementos celulares que não foram removidos ou destruídos pelo procedimento.

Uma outra via de administração para um péptido de NTP da invenção é a implantação de um dispositivo dentro do tumor ou do tecido a ser tratado. Um exemplo de um desses modos de realização é a implantação de uma hóstia contendo o péptido de NTP no tumor ou no tecido a ser tratado. A hóstia liberta uma dose terapêutica do péptido de NTP no tecido ao longo do tempo. Em alternativa ou adicionalmente, a composição pode ser administrada localmente através da implantação na área afectada de uma membrana, esponja ou de um outro material apropriado no qual foi absorvido o péptido de NTP. Nos casos em que é utilizado um dispositivo de implantação, o dispositivo pode ser implantado em qualquer tecido ou órgão adequado, e a administração do péptido de NTP pode ser feita directamente pelo dispositivo através de um bolos ou da administração contínua ou de um catéter, utilizando uma infusão contínua.

Exemplo 1

O objectivo deste exemplo era determinar o efeito do péptido de NTP #43 sobre o tecido nos locais da injeção.

Injectou-se, em oito ratazanas normais, cutânea e subcutaneamente (em quatro locais diferentes cada uma) e no músculo esquelético das extremidades (em dois locais diferentes cada uma), o péptido de NTP #43 em soro fisiológico em quantidades de 100 a 400 mL em concentrações de 0,1 a 1 mg/mL administradas com seringas de plástico com agulhas de aço inoxidável de calibre 26.

Os animais foram observados durante 24 horas e foram sacrificados sem dor às 24 horas. Os 48 locais individuais de infiltração foram excisados, fixados em formalina a 10%, embebidos em parafina e corados e examinados através de métodos histopatológicos padrão.

Injectaram-se (1) albumina de soro bovino a 0,1% em soro fisiológico, (2) soro humano normal, (3) soro fisiológico, (4) proteínas bacterianas não infecciosas e (5) péptidos de controlo em grupos semelhantes de ratazanas de controlo, que foram depois purificados, examinados e sacrificados como acima, sendo os locais excisados da injeção tratados como acima.

Resultados

A injeção do péptido de NTP #43 produziu uma necrose abundante do tecido nos locais de injeção. A necrose era evidente no tecido muscular, no tecido conjuntivo subcutâneo e na derme nos locais onde se injectou o péptido de NTP #43. Às 24 horas as células tinham uma aparência pálida, encolhida e necrótica e havia uma infiltração de células inflamatórias. A necrose correlacionava-se com os

locais de injeção e não parecia estender-se muito além do local da injeção.

Além das ligeiras áreas de inflamação, os controlos não mostraram nenhum indício de necrose ou perda celular. Em contraste com as injeções de péptido de NTP #43 nas quais estavam campos inteiros de camadas de fibras musculares necróticas, os controlos mostraram poucas ou nenhuma alteração muscular. As injeções de controlo tiveram uma inflamação aguda ligeira ou mínima nos locais de injeção e microhemorragias focais devido às agulhas.

Exemplo 2

O objectivo deste exemplo era determinar o efeito do péptido de NTP #17 sobre o tecido nos locais da injeção.

Injectou-se, em oito ratas normais, cutânea e subcutaneamente (em quatro locais diferentes cada uma) e no músculo esquelético das extremidades (em dois locais diferentes cada uma), o péptido de NTP #17 em soro fisiológico em quantidades de 100 a 400 µL em concentrações de 0,1 a 1 mg/µL administradas com seringas de plástico com agulhas de aço inoxidável de calibre 26.

Os animais foram observados durante 24 horas e foram sacrificados sem dor às 24 horas. Os 48 locais individuais de infiltração foram excisados, fixados em formalina a 10%, embebidos em parafina e corados e examinados através de métodos histopatológicos padrão.

Os controlos foram os mesmos do Exemplo 1.

Resultados

A injeção do péptido de NTP #17 produziu uma necrose

abundante do tecido nos locais de injeção. A necrose era evidente no tecido muscular, no tecido conjuntivo subcutâneo e na derme nos locais onde se injectou o péptido de NTP #17. Às 24 horas as células tinham uma aparência pálida, encolhida e necrótica e havia uma infiltração de células inflamatórias. A necrose correlacionava-se com os locais de injeção e não parecia estender-se muito além do local da injeção.

Além das ligeiras áreas de inflamação, os controlos não mostraram nenhum indício de necrose ou perda celular. Em contraste com as injeções de péptido de NTP #17 nas quais estavam campos inteiros de camadas de fibras musculares necróticas, os controlos mostraram poucas ou nenhuma alteração muscular. As injeções de controlo tiveram uma inflamação aguda ligeira ou mínima nos locais de injeção e microhemorragias focais devido às agulhas.

Exemplo 3

O objectivo deste exemplo era determinar o efeito do péptido de NTP #20 sobre o tecido nos locais da injeção.

Injectou-se, em oito ratas normais, cutânea e subcutaneamente (em quatro locais diferentes cada uma) e no músculo esquelético das extremidades (em dois locais diferentes cada uma), o péptido de NTP #20 em soro fisiológico em quantidades de 100 a 400 mL em concentrações de 0,1 a 1 mg/mL administradas com seringas de plástico com agulhas de aço inoxidável de calibre 26.

Os animais foram observados durante 24 horas e foram sacrificados sem dor às 24 horas. Os 48 locais individuais de infiltração foram excisados, fixados em formalina a 10%,

embebidos em parafina e corados e examinados através de métodos histopatológicos padrão.

Os controlos foram os mesmos do Exemplo 1.

Resultados

A injeção do péptido de NTP #20 produziu uma morte celular e necrose do tecido nos locais de injeção. A morte celular era evidente no tecido muscular, no tecido conjuntivo subcutâneo e na derme nos locais onde se injectou o péptido de NTP #20. Às 24 horas, as células nessas áreas tinham uma aparência pálida, encolhida e necrótica e havia uma infiltração de células inflamatórias. A morte celular e a necrose estava nos locais de injeção e não parecia estender-se muito além do local da injeção.

Além das ligeiras áreas de inflamação, os controlos não mostraram nenhum indício de necrose ou perda celular. Em contraste com as injeções de péptido de NTP #20 nas quais estavam campos inteiros de camadas de fibras musculares necróticas, os controlos mostraram poucas ou nenhuma alteração muscular. As injeções de controlo tiveram uma inflamação aguda ligeira ou mínima nos locais de injeção e microhemorragias focais ocasionais devido às agulhas.

Exemplo 4

O objectivo deste exemplo era determinar o efeito do péptido de NTP #19 sobre o tecido nos locais da injeção.

Injectou-se, em oito ratas normais, cutânea e subcutaneamente (em quatro locais diferentes cada uma) e no músculo esquelético das extremidades (em dois locais diferentes cada uma), o péptido de NTP #19 em soro

fisiológico em quantidades de 100 a 400 mL em concentrações de 0,1 a 1 mg/mL administradas com seringas de plástico com agulhas de aço inoxidável de calibre 26.

Os animais foram observados durante 24 horas e foram sacrificados sem dor às 24 horas. Os 48 locais individuais de infiltração foram excisados, fixados em formalina a 10%, embebidos em parafina e corados e examinados através de métodos histopatológicos padrão.

Os controlos foram os mesmos do Exemplo 1.

Resultados

Tal como nos exemplos acima, a injeção do péptido de NTP #19 produziu morte celular e necrose do tecido nos locais da injeção. Os controlos mostraram poucas ou nenhuma alteração, que consistiam em inflamação aguda nos locais da injeção e microhemorragias focais devido às agulhas.

Exemplo 5

O objectivo deste exemplo era determinar o efeito do péptido de NTP #16 sobre o tecido nos locais da injeção.

Injectou-se, em oito ratas normais, cutânea e subcutaneamente (em quatro locais diferentes cada uma) e no músculo esquelético das extremidades (em dois locais diferentes cada uma), o péptido de NTP #16 em soro fisiológico em quantidades de 100 a 400 mL em concentrações de 0,1 a 1 mg/mL administradas com seringas de plástico com agulhas de aço inoxidável de calibre 26.

Os animais foram observados durante 24 horas e foram sacrificados sem dor às 24 horas. Os 48 locais individuais de infiltração foram excisados, fixados em formalina a 10%, embebidos em parafina e corados e examinados através de métodos histopatológicos padrão.

Os controlos foram os mesmos do Exemplo 1.

Resultados

Tal como nos exemplos acima, a injeção do péptido de NTP #16 produziu morte celular e necrose do tecido nos locais da injeção. Os controlos mostraram poucas ou nenhuma alteração, que consistiam em inflamação aguda nos locais da injeção e microhemorragias focais devido às agulhas.

Exemplo 6

O objectivo deste exemplo era determinar o efeito do péptido de NTP #15 sobre o tecido nos locais da injeção.

Injectou-se, em oito ratas normais, cutânea e subcutaneamente (em quatro locais diferentes cada uma) e no músculo esquelético das extremidades (em dois locais diferentes cada uma), o péptido de NTP #15 em soro fisiológico em quantidades de 100 a 400 mL em concentrações de 0,1 a 1 mg/mL administradas com seringas de plástico com agulhas de aço inoxidável de calibre 26.

Os animais foram observados durante 24 horas e foram sacrificados sem dor às 24 horas. Os 48 locais individuais de infiltração foram excisados, fixados em formalina a 10%, embebidos em parafina e corados e examinados através de métodos histopatológicos padrão.

Os controlos foram os mesmos do Exemplo 1.

Resultados

Tal como nos exemplos acima, a injeção do péptido de NTP #15 produziu morte celular e necrose do tecido nos locais da injeção. Os controlos mostraram poucas ou nenhuma alteração, que consistiam em inflamação aguda nos locais da injeção e microhemorragias focais devido às agulhas.

Exemplo 7

O objectivo deste exemplo era determinar o efeito do péptido de NTP #14 sobre o tecido nos locais da injeção.

Injectou-se, em oito ratas normais, cutânea e subcutaneamente (em quatro locais diferentes cada uma) e no músculo esquelético das extremidades (em dois locais diferentes cada uma), o péptido de NTP #14 em soro fisiológico em quantidades de 100 a 400 µL em concentrações de 0,1 a 1 mg/mL administradas com seringas de plástico com agulhas de aço inoxidável de calibre 26.

Os animais foram observados durante 24 horas e foram sacrificados sem dor às 24 horas. Os 48 locais individuais de infiltração foram excisados, fixados em formalina a 10%, embebidos em parafina e corados e examinados através de métodos histopatológicos padrão.

Os controlos foram os mesmos do Exemplo 1.

Resultados

Tal como nos exemplos acima, a injeção do péptido de NTP #14 produziu morte celular e necrose do tecido nos locais da injeção. Os controlos mostraram poucas ou nenhuma alteração, que consistiam em inflamação aguda nos locais da injeção e microhemorragias focais devido às agulhas.

LISTA DE SEQUÊNCIA

<110> NYMOX CORPORATION

AVERBACK, Paul A.

<120> PÉPTIDOS EFICAZES NO TRATAMENTO DE TUMORES E OUTROS
ESTADOS QUE NECESSITAM DA REMOÇÃO OU DESTRUÇÃO DE CÉLULAS

<130> 10107-38

<140> PCT/CA02/00759

<141> 2002-05-24

<150> US 60/293, 156

<151> 2001-05-25

<160> 53

<170> Patentln Ver. 2.1

<210> 1

<211> 375

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Glu	Phe	Ser	Leu	Leu	Leu	Pro	Arg	Leu	Glu	Cys	Asn	Gly	Ala	Ile
1				5					10					15	
Ser	Ala	His	Arg	Asn	Leu	Arg	Leu	Pro	Gly	Ser	Ser	Asp	Ser	Pro	Ala
			20					25					30		
Ser	Ala	Ser	Pro	Val	Ala	Gly	Ile	Thr	Gly	Met	Cys	Thr	His	Ala	Arg
		35					40					45			
Leu	Ile	Leu	Tyr	Phe	Phe	Leu	Val	Glu	Met	Glu	Phe	Leu	His	Val	Gly
	50					55					60				
Gln	Ala	Gly	Leu	Glu	Leu	Pro	Thr	Ser	Asp	Asp	Pro	Ser	Val	Ser	Ala
65					70					75				80	
Ser	Gln	Ser	Ala	Arg	Tyr	Arg	Thr	Gly	His	His	Ala	Arg	Leu	Cys	Leu
				85					90					95	
Ala	Asn	Phe	Cys	Gly	Arg	Asn	Arg	Val	Ser	Leu	Met	Cys	Pro	Ser	Trp
			100					105					110		
Ser	Pro	Glu	Leu	Lys	Gln	Ser	Thr	Cys	Leu	Ser	Leu	Pro	Lys	Cys	Trp
	115						120					125			
Asp	Tyr	Arg	Arg	Ala	Ala	Val	Pro	Gly	Leu	Phe	Ile	Leu	Phe	Phe	Leu
	130					135					140				
Arg	His	Arg	Cys	Pro	Thr	Leu	Thr	Gln	Asp	Glu	Val	Gln	Trp	Cys	Asp
145					150					155				160	
His	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Ser	Thr	Pro	Glu	Ile	Lys	His	Pro	Pro	Ala
				165					170					175	

Ser Ala Ser Gln Val Ala Gly Thr Lys Asp Met His His Tyr Thr Trp
 180 185 190

Leu Ile Phe Ile Phe Ile Phe Asn Phe Leu Arg Gln Ser Leu Asn Ser
 195 200 205

Val Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp Arg Asn Leu Gly Ser Leu Gln Pro
 210 215 220

Leu Pro Pro Gly Phe Lys Leu Phe Ser Cys Pro Ser Leu Leu Ser Ser
 225 230 235 240

Trp Asp Tyr Arg Arg Pro Pro Arg Leu Ala Asn Phe Phe Val Phe Leu
 245 250 255

Val Glu Met Gly Phe Thr Met Phe Ala Arg Leu Ile Leu Ile Ser Gly
 260 265 270

Pro Cys Asp Leu Pro Ala Ser Ala Ser Gln Ser Ala Gly Ile Thr Gly
 275 280 285

Val Ser His His Ala Arg Leu Ile Phe Asn Phe Cys Leu Phe Glu Met
 290 295 300

Glu Ser His Ser Val Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp Pro Asn Leu Gly
 305 310 315 320

Ser Leu Gln Pro Leu Pro Pro Gly Leu Lys Arg Phe Ser Cys Leu Ser
 325 330 335

Leu Pro Ser Ser Trp Asp Tyr Gly His Leu Pro Pro His Pro Ala Asn
 340 345 350

Phe Cys Ile Phe Ile Arg Gly Gly Val Ser Pro Tyr Leu Ser Gly Trp

355

360

365

Ser Gln Thr Pro Asp Leu Arg

370

375

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Met Val Cys Trp Asn Arg Phe Gly Lys Trp Val Tyr Phe Ile Ser

1

5

10

15

Ala Ile Phe Asn Phe Gly Pro Arg Tyr Leu Tyr His Gly Val Pro Phe

20

25

30

Tyr Phe Leu Ile Leu Val Arg Ile Ile Ser Phe Leu Ile Gly Asp Met

35

40

45

Glu Asp Val Leu Leu Asn Cys Thr Leu Leu Lys Arg Ser Ser Arg Phe

50

55

60

Arg Phe Trp Gly Ala Leu Val Cys Ser Met Asp Ser Cys Arg Phe Ser

65

70

75

80

Arg Val Ala Val Thr Tyr Arg Phe Ile Thr Leu Leu Asn Ile Pro Ser

85

90

95

Pro Ala Val Trp Met Ala Arg Asn Thr Ile Asp Gln Gln Val Leu Ser

68

100

105

110

Arg Ile Lys Leu Glu Ile Lys Arg Cys Leu

115

120

<210> 3

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Gln Ser Arg Leu Thr Ala Thr Ser Ala Ser Arg Val Gln Ala

1

5

10

15

Ile Leu Leu Ser Gln Pro Pro Lys Gln Leu Gly Leu Arg Ala Pro Ala

20

25

30

Asn Thr Pro Leu Ile Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Gly Phe His His

35

40

45

Ile Cys Gln Ala Gly Leu Lys Leu Leu Thr Ser Gly Asp Pro Pro Ala

50

55

60

Ser Ala Phe Gln Ser Ala Gly Ile Thr Gly Val Ser His Leu Thr Gln

65

70

75

80

Pro Ala Asn Leu Asp Lys Lys Ile Cys Ser Asn Gly Gly Ser Cys Tyr

85

90

95

Val Ala Gln Ala Gly Leu Lys Leu Leu Ala Ser Cys Asn Pro Ser Lys

100

105

110

<210> 4

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Trp Thr Leu Lys Ser Ser Leu Val Leu Leu Leu Cys Leu Thr Cys

1

5

10

15

Ser Tyr Ala Phe Met Phe Ser Ser Leu Arg Gln Lys Thr Ser Glu Pro

20

25

30

Gln Gly Lys Val Pro Cys Gly Glu His Phe Arg Ile Arg Gln Asn Leu

35

40

45

Pro Glu His Thr Gln Gly Trp Leu Gly Ser Lys Trp Leu Trp Leu Leu

50

55

60

Phe Ala Val Val Pro Phe Val Ile Leu Lys Cys Gln Arg Asp Ser Glu

65

70

75

80

Lys Asn Lys Val Arg Met Ala Pro Phe Phe Leu His His Ile Asp Ser

85

90

95

Ile Ser Gly Val Ser Gly Lys Arg Met Phe

100

105

<210> 5

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met	Phe	Phe	Val	Leu	Tyr	Arg	Phe	Cys	Phe	Cys	Phe	Phe	Glu	Thr	Glu
1				5					10					15	

Ser	His	Ser	Leu	Thr	Gln	Ala	Gly	Val	Gln	Trp	Cys	Glu	Leu	Gly	Ser
			20					25					30		

Pro	Gln	Pro	Leu	Pro	Ser	Gly	Phe	Lys	Arg	Phe	Ser	Cys	Leu	Ser	Leu
		35					40					45			

Leu	Ser	Ser	Trp	Asp	Tyr	Ser	His	Glu	Pro	Pro	His	Pro	Val	Ile	Cys
	50					55					60				

Ser	Phe	Leu	Met	Glu	Lys	Cys	Leu	Ile	Leu	Tyr	Lys	Pro	Asn	Gly	Asp
65					70					75				80	

Thr	Ile	Gly	Pro	Ile	Leu	Val	Gln	Gln	Gly	Lys	Arg	Gln	Lys	Leu	Tyr
				85					90					95	

Ile	Ser	Ala	Asp	Leu	Val	His	Leu	Ile	Ala
		100					105		

<210> 6

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Glu Ala Tyr Tyr Thr Met Leu His Leu Pro Thr Thr Asn Arg Pro Lys
1 5 10 15

Ile Ala His Cys Ile Leu Phe Asn Gln Pro His Ser Pro Arg Ser Asn
20 25 30

Ser His Ser His Pro Asn Pro Leu Lys Leu His Arg Arg Ser His Ser
35 40 45

His Asn Arg Pro Arg Ala Tyr Ile Leu Ile Thr Ile Leu Pro Ser Lys
50 55 60

Leu Lys Leu Arg Thr His Ser Gln Ser His His Asn Pro Leu Ser Arg
65 70 75 80

Thr Ser Asn Ser Thr Pro Thr Asn Ser Phe Leu Met Thr Ser Ser Lys
85 90 95

Pro Arg

<210> 7

<211> 75

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ser Ser Ser Leu Gly Leu Pro Lys Cys Trp Asp Tyr Arg His Glu Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Ala Leu Met Ile Asn Phe Arg Val Met Ala Cys Thr Phe
 20 25 30

Lys Gln His Ile Glu Leu Arg Gln Lys Ile Ser Ile Val Pro Arg Lys
 35 40 45

Leu Cys Cys Met Gly Pro Val Cys Pro Val Lys Ile Ala Leu Leu Thr
 50 55 60

Ile Asn Gly His Cys Thr Trp Leu Pro Ala Ser
 65 70 75

<210> 8

<211> 68

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Phe Val Phe Cys Leu Ile Leu Asn Arg Glu Lys Ile Lys Gly Gly
 1 5 10 15

Asn Ser Ser Phe Phe Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ser Phe Gln Asn Cys
 20 25 30

Cys Gln Cys Phe Gln Cys Arg Thr Thr Glu Gly Tyr Ala Val Glu Cys
 35 40 45

Phe Tyr Cys Leu Val Asp Lys Ala Ala Phe Glu Cys Trp Trp Phe Tyr
 50 55 60

Ser Phe Asp Thr
 65

<210> 9

<211> 61

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Glu Pro His Thr Val Ala Gln Ala Gly Val Pro Gln His Asp Leu
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Gln Ser Leu Leu Pro Arg Phe Lys Arg Phe Ser Cys Leu
 20 25 30

Ile Leu Pro Lys Ile Trp Asp Tyr Arg Asn Met Asn Thr Ala Leu Ile
 35 40 45

Lys Arg Asn Arg Tyr Thr Pro Glu Thr Gly Arg Lys Ser
 50 55 60

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met	Glu	Phe	Ser	Leu	Leu	Leu	Pro	Arg	Leu	Glu	Cys	Asn	Gly	Ala
1				5					10					15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Gly	Ala	Ile	Ser	Ala	His	Arg	Asn	Leu	Arg	Leu	Pro	Gly	Ser	Ser
1				5					10					15

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ala	Ser	Pro	Val	Ala	Gly	Ile	Thr	Gly	Met	Cys
1				5					10					15	

Thr

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met	Cys	Thr	His	Ala	Arg	Leu	Ile	Leu	Tyr	Phe	Phe	Leu	Val	Glu	Met
1				5					10				15		

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Tyr	Phe	Phe	Leu	Val	Glu	Met	Glu	Phe	Leu	His
1				5					10	

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Val Gly Gln Ala Gly Leu Glu Leu Pro Thr Ser
1 5 10

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Asp Asp Pro Ser Val Ser Ala Ser Gln Ser Ala Arg Tyr Arg Thr Gly
1 5 10 15

His

<210> 17

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Thr Gly His His Ala Arg Leu Cys Leu Ala Asn Phe Cys Gly
1 5 10

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Ala	Asn	Phe	Cys	Gly	Arg	Asn	Arg	Val	Ser	Leu	Met	Cys	Pro	Ser	Trp
1				5					10					15	

Ser

<210> 19

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Pro	Glu	Leu	Lys	Gln	Ser	Thr	Cys	Leu	Ser	Leu	Pro	Lys	Cys	Trp	Asp
1				5					10					15	

Tyr Arg Arg

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Leu	Lys	Gln	Ser	Thr	Cys	Leu	Ser	Leu	Pro	Lys	Cys	Trp	Asp	Tyr	Arg
1				5					10					15	

Arg

<210> 21

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Ser	Thr	Cys	Leu	Ser	Leu	Pro	Lys	Cys	Trp	Asp	Tyr	Arg	Arg
1				5					10				

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Leu	Ser	Leu	Pro	Lys	Cys	Trp	Asp	Tyr	Arg	Arg
1				5					10	

<210> 23
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23

Lys Cys Trp Asp Tyr Arg Arg Ala Ala Val Pro Gly Leu
 1 5 10

<210> 24
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

Lys Cys Trp Asp Tyr Arg Arg Ala Ala Val Pro Gly Leu Phe Ile Leu
 1 5 10 15

Phe Phe Leu

<210> 25
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25

Lys Cys Trp Asp Tyr Arg Arg Ala Ala Val Pro Gly Leu Phe Ile Leu
 1 5 10 15

Phe Phe Leu Arg His Arg Cys Pro
 20

<210> 26

<211> 38

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Lys Cys Trp Asp Tyr Arg Arg Ala Ala Val Pro Gly Leu Phe Ile Leu
 1 5 10 15

Phe Phe Leu Arg His Arg Cys Pro Thr Leu Thr Gln Asp Glu Val Gln
 20 25 30

Trp Cys Asp His Ser Ser
 35

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Trp Asp Tyr Arg Arg
1 5

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Phe Ile Leu Phe Phe Leu Arg His Arg Cys Pro Thr Leu
1 5 10

<210> 29

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Phe Ile Leu Phe Phe Leu Arg His Arg Cys Pro Thr Leu Thr Gln Asp
1 5 10 15

Glu Val Gln Trp Cys Asp His Ser Ser

82

20

25

<210> 30

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

His Arg Cys Pro Thr Leu Thr Gln Asp Glu Val Gln Trp Cys Asp His

1

5

10

15

Ser Ser Leu Gln Pro Ser Thr Pro Glu Ile Lys His Pro

20

25

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Pro Ala Ser Ala Ser Gln Val Ala Gly Thr Lys Asp Met His

1

5

10

<210> 32

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Asp	Met	His	His	Tyr	Thr	Trp	Leu	Ile	Phe	Ile	Phe	Ile	Phe	Asn	Phe
1				5					10					15	

Leu Arg

<210> 33

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

His	Tyr	Thr	Trp	Leu	Ile	Phe	Ile	Phe	Ile	Phe	Asn	Phe	Leu	Arg	Gln
1				5					10					15	

Ser Leu Asn

<210> 34

<211> 45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Ser Val Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp Arg Asn Leu Gly Ser Leu Gln

1 5 10 15

Pro Leu Pro Pro Gly Phe Lys Leu Phe Ser Cys Pro Ser Leu Leu Ser

20 25 30

Ser Trp Asp Tyr Arg Arg Pro Pro Arg Leu Ala Asn Phe

35 40 45

<210> 35

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Pro Gly Phe Lys Leu Phe Ser Cys Pro Ser Leu Leu Ser Ser Trp Asp

1 5 10 15

Tyr Arg Arg

<210> 36

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Phe Lys Leu Phe Ser Cys Pro Ser Leu Leu Ser Ser Trp Asp Tyr Arg
 1 5 10 15

Arg Pro Pro Arg Leu Ala Asn Phe
 20

<210> 37

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Phe Ser Cys Pro Ser Leu Leu Ser Ser Trp Asp Tyr Arg Arg
 1 5 10

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Ser Leu Leu Ser Ser Trp Asp Tyr Arg Arg
 1 5 10

<210> 39
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Ser Ser Trp Asp Tyr
1 5

<210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Ser Ser Trp Asp Tyr Arg Arg
1 5

<210> 41
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Ser Ser Trp Asp Tyr Arg Arg Pro Pro Arg Leu Ala Asn Phe Phe Val
 1 5 10 15

Phe Leu Val Glu Met Gly Phe Thr Met
 20 25

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Phe Val Phe Leu Val Glu Met Gly Phe Thr Met
 1 5 10

<210> 43

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Met Gly Phe Thr Met Phe Ala Arg Leu Ile Leu Ile Ser Gly Pro Cys
 1 5 10 15

Asp Leu Pro Ala Ser Ala Ser

20

<210> 44

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Ile Ser Gly Pro Cys

1 5

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Asp Leu Pro Ala Ser Ala Ser Gln Ser Ala Gly Ile Thr Gly Val Ser

1 5 10 15

His

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Gly	Val	Ser	His	His	Ala	Arg	Leu	Ile	Phe	Asn	Phe	Cys	Leu	Phe	Glu
1				5					10					15	

Met

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Asn	Phe	Cys	Leu	Phe	Glu	Met	Glu	Ser	His
1				5					10

<210> 48

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Ser Val Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp Pro Asn Leu Gly Ser Leu Gln

1 5 10 15
 Pro Leu Pro Pro Gly Leu Lys Arg Phe Ser Cys Leu Ser Leu Pro Ser
 20 25 30
 Ser Trp Asp Tyr Gly His Leu Pro Pro His Pro Ala Asn Phe
 35 40 45

<210> 49
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 49

Pro Pro Gly Leu Lys Arg Phe Ser Cys Leu Ser Leu Pro Ser Ser Trp
 1 5 10 15

Asp Tyr Gly

<210> 50
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 50

Phe Ser Cys Leu Ser Leu Pro Ser Ser Trp Asp Tyr Gly His

1 5 10

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Leu Ser Leu Pro Ser Ser Trp Asp Tyr

1 5

<210> 52

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Ser Ser Trp Asp Tyr Gly His Leu Pro Pro His Pro Ala Asn Phe Cys

1 5 10 15

Ile Phe Ile Arg Gly Gly Val Ser Pro Tyr Leu Ser Gly Trp Ser Gln

20 25 30

Thr Pro Asp Leu Arg

35

<210> 53

<211> 1442

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (15)..(1139)

<400> 53

```

tttttttttt tgag atg gag ttt tcg ctc ttg ttg ccc agg ctg gag tgc   50
      Met Glu Phe Ser Leu Leu Leu Pro Arg Leu Glu Cys
            1             5             10

aat ggc gca atc tca gct cac cgc aac ctc cgc ctc ccg ggt tca agc   98
Asn Gly Ala Ile Ser Ala His Arg Asn Leu Arg Leu Pro Gly Ser Ser
      15             20             25

gat tct cct gcc tca gcc tcc cca gta gct ggg att aca ggc atg tgc  146
Asp Ser Pro Ala Ser Ala Ser Pro Val Ala Gly Ile Thr Gly Met Cys
      30             35             40

acc cac gct cgg cta att ttg tat ttt ttt tta gta gag atg gag ttt  194
Thr His Ala Arg Leu Ile Leu Tyr Phe Phe Leu Val Glu Met Glu Phe
      45             50             55             60

ctc cat gtt ggt cag gct ggt ctc gaa ctc ccg acc tca gat gat ccc  242
Leu His Val Gly Gln Ala Gly Leu Glu Leu Pro Thr Ser Asp Asp Pro
            65             70             75

tcc gtc tcg gcc tcc caa agt gct aga tac agg act ggc cac cat gcc  290
Ser Val Ser Ala Ser Gln Ser Ala Arg Tyr Arg Thr Gly His His Ala

```

80	85	90	
cgg ctc tgc ctg gct aat ttt tgt ggt aga aac agg gtt tca ctg atg			338
Arg Leu Cys Leu Ala Asn Phe Cys Gly Arg Asn Arg Val Ser Leu Met			
95	100	105	
tgc cca agc tgg tct cct gag ctc aag cag tcc acc tgc ctc agc ctc			386
Cys Pro Ser Trp Ser Pro Glu Leu Lys Gln Ser Thr Cys Leu Ser Leu			
110	115	120	
cca aag tgc tgg gat tac agg cgt gca gcc gtg cct ggc ctt ttt att			434
Pro Lys Cys Trp Asp Tyr Arg Arg Ala Ala Val Pro Gly Leu Phe Ile			
125	130	135	140
tta ttt ttt tta aga cac agg tgt ccc act ctt acc cag gat gaa gtg			482
Leu Phe Phe Leu Arg His Arg Cys Pro Thr Leu Thr Gln Asp Glu Val			
145	150	155	
cag tgg tgt gat cac agc tca ctg cag cct tca act cct gag atc aag			530
Gln Trp Cys Asp His Ser Ser Leu Gln Pro Ser Thr Pro Glu Ile Lys			
160	165	170	
cat cct cct gcc tca gcc tcc caa gta gct ggg acc aaa gac atg cac			578
His Pro Pro Ala Ser Ala Ser Gln Val Ala Gly Thr Lys Asp Met His			
175	180	185	
cac tac acc tgg cta att ttt att ttt att ttt aat ttt ttg aga cag			626
His Tyr Thr Trp Leu Ile Phe Ile Phe Ile Phe Asn Phe Leu Arg Gln			
190	195	200	
agt ctc aac tct gtc acc cag gct gga gtg cag tgg cgc aat ctt ggc			674
Ser Leu Asn Ser Val Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp Arg Asn Leu Gly			
205	210	215	220
tca ctg caa cct ctg cct ccc ggg ttc aag tta ttc tcc tgc ccc agc			722
Ser Leu Gln Pro Leu Pro Pro Gly Phe Lys Leu Phe Ser Cys Pro Ser			
225	230	235	

```

ctc ctg agt agc tgg gac tac agg cgc cca cca cgc cta gct aat ttt 770
Leu Leu Ser Ser Trp Asp Tyr Arg Arg Pro Pro Arg Leu Ala Asn Phe
      240              245              250

ttt gta ttt tta gta gag atg ggg ttc acc atg ttc gcc agg ttg atc 818
Phe Val Phe Leu Val Glu Met Gly Phe Thr Met Phe Ala Arg Leu Ile
      255              260              265

ttg atc tct gga cct tgt gat ctg cct gcc tcg gcc tcc caa agt gct 866
Leu Ile Ser Gly Pro Cys Asp Leu Pro Ala Ser Ala Ser Gln Ser Ala
      270              275              280

ggg att aca ggc gtg agc cac cac gcc cgg ctt att ttt aat ttt tgt 914
Gly Ile Thr Gly Val Ser His His Ala Arg Leu Ile Phe Asn Phe Cys
285              290              295              300

ttg ttt gaa atg gaa tct cac tct gtt acc cag gct gga gtg caa tgg 962
Leu Phe Glu Met Glu Ser His Ser Val Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp
      305              310              315

cca aat ctc ggc tca ctg caa cct ctg cct ccc ggg ctc aag cga ttc 1010
Pro Asn Leu Gly Ser Leu Gln Pro Leu Pro Pro Gly Leu Lys Arg Phe
      320              325              330

tcc tgt ctc agc ctc cca agc agc tgg gat tac ggg cac ctg cca cca 1058
Ser Cys Leu Ser Leu Pro Ser Ser Trp Asp Tyr Gly His Leu Pro Pro
      335              340              345

cac ccc gct aat ttt tgt att ttc att aga ggc ggg gtt tca cca tat 1106
His Pro Ala Asn Phe Cys Ile Phe Ile Arg Gly Gly Val Ser Pro Tyr
      350              355              360

ttg tca ggc tgg tct caa act cct gac ctc agg tgaccacct gcctcagcct 1159
Leu Ser Gly Trp Ser Gln Thr Pro Asp Leu Arg
365              370              375

```

tccaaagtgc tgggattaca ggcgtgagcc acctcacca gccggctaatt ttagataaaa 1219
aaatatgtag caatgggggg tcttgctatg ttgccaggc tggctcctaaa cttctggctt 1279
catgcaatcc ttccaaatga gccacaacac ccagccagtc acatttttta aacagttaca 1339
tctttatctt agtatactag aaagtaatac aataaacatg tcaaacctgc aaattcagta 1399
gtaacagagt tcttttataa cttttaaaca aagctttaga gca 1442

Lisboa, 20/03/2007

REIVINDICAÇÕES

1. Um péptido de NTP que consiste numa sequência de aminoácidos seleccionada de entre o grupo que consiste em SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13, SEQ ID NO. 14, SEQ ID NO. 15, SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 18, SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 21, SEQ ID NO. 22, SEQ ID NO. 23, SEQ ID NO. 24, SEQ ID NO. 25, SEQ ID NO. 26, SEQ ID NO. 27, SEQ ID NO. 28, SEQ ID NO. 29, SEQ ID NO. 30, SEQ ID NO. 31, SEQ ID NO. 32, SEQ ID NO. 33, SEQ ID NO. 34, SEQ ID NO. 35, SEQ ID NO. 36, SEQ ID NO. 37, SEQ ID NO. 38, SEQ ID NO. 39, SEQ ID NO. 40, SEQ ID NO. 41, SEQ ID NO. 42, SEQ ID NO. 43, SEQ ID NO. 44, SEQ ID NO. 45, SEQ ID NO. 46, SEQ ID NO. 47, SEQ ID NO. 48, SEQ ID NO. 49, SEQ ID NO. 50, SEQ ID NO. 51, SEQ ID NO. 52.

2. Um péptido de NTP de acordo com a reivindicação 1 para utilização como medicamento.

3. Utilização de um péptido de NTP de acordo com a reivindicação 1 para a produção de um medicamento para o tratamento de um estado seleccionado de entre o grupo que consiste em: um tumor benigno ou maligno; uma hiperplasia, hipertrofia ou sobredesenvolvimento; um tecido alterado por vírus, bactérias ou parasitas; uma malformação de um tecido; hipertrofia amigdalina; hiperplasia prostática; uma alteração cosmética de um tecido; uma doença vascular; hemorróidas; veias varicosas; aterosclerose ou arteriosclerose; uma doença inflamatória; doença auto-imune; doença metabólica; doença hereditária/genética; doença traumática; doença de deficiência nutricional; doença infecciosa; doença amilóide; doença fibrótica; malformação congénita; doença de uma deficiência

enzimática; doença de radiação; doença endócrina e uma doença degenerativa.

4. Uma composição que compreende um péptido de NTP de acordo com a reivindicação 1 e um seu excipiente.

Lisboa, 20/03/2007

Figura 1

AD7C-NTP [SEQ ID NO. 1]

1	1	ttttttttttttgag	ATG	GAG	TTT	TGG	CTC	TGG	TGG	CCC	AGG	CTG	GAG	TGG	AAT	GCG	GCA	ATC	62
1	1		M	E	F	S	L	L	L	P	R	L	E	C	H	G	A	Y	16
63	17	TCA GCT CAC GCG AAC CTC CGC CTC CCG GGT TCA AGC GAT TCT CCT GCG TCA GCC TCC CCA	122																
17	17	S A H R N L R L P G S S C D S P A S A S P A	36																
123	37	GTA GCT GGG ATT ACA GGC ATG TGC ACC CAC GCT CGS CTA ATT TTG TAT TTT TTT TTA GTA	182																
37	37	V A G I P G M C T H A R L I L Y F F F L V	56																
183	57	GAG ATG GAG TTT CTC CAT GTT GGT CAG GCT GGT CTC GAA CTC CCG ACC TCA GAT GAT CCC	242																
57	57	E M E F L H V G Q A G L E L P T S D D P	76																
243	77	TCC CTC TCG GCG TCC CAA AGT GCT AGA TAC AGG ACT GGC CAC CAT GCC CGS CTC TGC CTG	302																
77	77	S V S A S Q S A R Y R T G H H A R L C L	96																
303	97	GCT AAT TTT TGT GCT AGA AAC AGR GTT TCA CTG ATG TGC CCA AGC TGG TCT CCT GAG CTC	362																
97	97	A N F C G R N R V S L M C P S W S P E L	116																
363	117	AAG CAG TCC ACC TGC CTC AGC CTC CCA AAG TGC TGG GAT TAC AGG CGT CCA GCC GTG CCT	422																
117	117	K Q S T C L S L P K C W E Y R H A G V P	136																
423	137	GGC TTT TTT ATT TTA TTT TTT TTA AGA CAG AGG TGT CCC ACT CTT ACC CAG GAT GAA GTG	482																
137	137	G L F I L F F L R H R C F T L T Q D E V	156																
483	157	CAG TGG TGT GAT CAC AGC TCA CTG CAG CCT TCA ACT CCT GAG ATC AAG CAT CCT CCT GCC	542																
157	157	Q W C D H S S L Q P S T P E I K H P P A	176																
543	177	TCA GCC TCC CAA GTA GCT GGG ACC ARA GAC ATG CAC CAC TAC ACC TGG CTA ATT TTT ATT	602																
177	177	S A S Q V N G T K D M H H Y T W L I F I	196																
603	197	TTT ATT TTT AAT TTT TTG AGA CAG AGT CTC AAT TCT GTC ACC CAG GCT CCA GTC CAG TGG	662																
197	197	F I F N F L R Q S L N S V T Q A G V Q W	216																
663	217	CGC AAT CTT GGC TCA CTG CAA CCT CTG CCT CCC GGG TTC AAG TTA TTC TCC TCC CCC AGC	722																
217	217	R N L G S L Q P L P P G F K L P S C P S	236																
723	237	CTC CTG AGT AGC TGG GAC TAC AGS CTC CCA CCA CGC CTA GCT AAT TTT TTT GTA TTT TTA	782																
237	237	L L S S W D Y R R P P R L A N F F V F L	256																
783	257	GTA GAG ATG GGG TTC ACC ATG TTC GGC AGG TTG ATC TTG ATC TCT GGA CCT TGT GAT CTG	842																
257	257	V E M G F T H F A R L I L I S G P C D L	276																
843	277	GCT GCG TCG GCG TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA GGC GTG AGC CAC CAC GCT CGS CTT ATT	902																
277	277	P A S A S C A G I T G V S H H A R L I	296																
903	297	TTT AAT TTT TGT TTG TTT GAA TCT AAT TCT GTT ACC CAG GCT CCA GTC CAA TGG	962																
297	297	F N F C L F E M E S H S V T O A G V Q W	316																
963	317	CCA AAT CTC GGC TCA CTG CAA CCT CTG CCT CCC GGG CTC AAG CGA TTC TCC TGT CTC AGC	1022																
317	317	P N L G S L Q P L P P G L K R P S C L S	336																
1023	337	CTC CCA AGC AGC TGG GAT TAC GGG CAU CTG CCA CCA CAC CCC GCT AAT TTT TGT ATT TTC	1082																
337	337	L F S S W D Y C R L P P H P A N F C I F	356																
1083	357	ATT AGA GGC GGG GTT TCA CCA TAT TTG TCA GGC TGG TCT CAA ACT CCT GAC CTC AGC TGG	1143																
357	357	I R G G V S P Y L S G W S Q T P D L R	376																
1144		ccacctgccttcggccttccaaagtctgggattccggcggtgagccacctcaccacgagcgcgcttactttagatataaabaat	1223																
1224		atgtatgcgaatgggggggttatgtatggttgcccgagctgggtctcacaactcttctggtcttcattgcaatccttccaaagtgcga	1303																
1304		cacaccccgccagcttcaatttttttaaacagtttaacatctttatttttagtatatactagaaagtaatacaaatgaacatgacaa	1383																
1384		acctgcgaatttcagtagtaacagagttcttttttatatcctttttaaacaanaggttttagagca	1442																

Figura 2

NTP[122] [SEQ ID NO. 2]

1 Met-Met-Val-Cys-Trp-Asn-Arg-Phe-Gly-Lys-
M M V C W N R F G K

11 Trp-Val-Tyr-Phe-Ile-Ser-Ala-Ile-Phe-Asn-
W V Y F I S A I F N

21 Phe-Gly-Pro-Arg-Tyr-Leu-Tyr-His-Gly-Val-
F G P R Y L Y H G V

31 Pro-Phe-Tyr-Phe-Leu-Ile-Leu-Val-Arg-Ile-
P F Y F L I L V R I

41 Ile-Ser-Phe-Leu-Ile-Gly-Asp-Met-Glu-Asp-
I S F L I G D M E D

51 Val-Leu-Leu-Asn-Cys-Thr-Leu-Leu-Lys-Arg-
V L L N C T L L K R

61 Ser-Ser-Arg-Phe-Arg-Phe-Trp-Gly-Ala-Leu-
S S R F R F W G A L

71 Val-Cys-Ser-Met-Asp-Ser-Cys-Arg-Phe-Ser
V C S M D S C R F S

81 Arg-Val-Ala-Val-Thr-Tyr-Arg-Phe-Ile-Thr-
R V A V T Y R F I T

91 Leu-Leu-Asn-Ile-Pro-Ser-Pro-Ala-Val-Trp-
L L N I P S P A V W

101 Met-Ala-Arg-Asn-Thr-Ile-Asp-Gln-Gln-Val-
M A R N T I D Q Q V

111 Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-
L S R I K L E I K R

121 Cys-Leu
C L

Figura 3

NTP[112] [SEQ ID NO. 3]

1 Met-Ala-Gln-Ser-Arg-Leu-Thr-Ala-Thr-Ser-
M A Q S R L T A T S

11 Ala-Ser-Arg-Val-Gln-Ala-Ile-Leu-Leu-Ser-
A S R V Q A I L L S

21 Gln-Pro-Pro-Lys-Gln-Leu-Gly-Leu-Arg-Ala-
Q P P K Q L G L R A

31 Pro-Ala-Asn-Thr-Pro-Leu-Ile-Phe-Val-Phe-
P A N T P L I F V F

41 Ser-Leu-Glu-Ala-Gly-Phe-His-His-Ile-Cys-
S L E A G F H H I C

51 Gln-Ala-Gly-Leu-Lys-Leu-Leu-Thr-Ser-Gly-
Q A G L K L L T S G

61 Asp-Pro-Pro-Ala-Ser-Ala-Phe-Gln-Ser-Ala-
D P P A S A F Q S A

71 Gly-Ile-Thr-Gly-Val-Ser-His-Leu-Thr-Gln-
G I T G V S H L T Q

81 Pro-Ala-Asn-Leu-Asp-Lys-Lys-Ile-Cys-Ser-
P A N L D K K I C S

91 Asn-Gly-Gly-Ser-Cys-Tyr-Val-Ala-Gln-Ala-
N G G S C Y V A Q A

101 Gly-Leu-Lys-Leu-Leu-Ala-Ser-Cys-Asn-Pro-
G L K L L A S C N P

111 Ser-Lys
S K

Figura 4

NTP[106] [SEQ ID NO. 4]

1 Met-Trp-Thr-Leu-Lys-Ser-Ser-Leu-Val-Leu-
M W T L K S S L V L

11 Leu-Leu-Cys-Leu-Thr-Cys-Ser-Tyr-Ala-Phe-
L L C L T C S Y A F

21 Met-Phe-Ser-Ser-Leu-Arg-Gln-Lys-Thr-Ser-
M F S S L R Q K T S

31 Glu-Pro-Gln-Gly-Lys-Val-Pro-Cys-Gly-Glu-
E P Q G K V P C G E

41 His-Phe-Arg-Ile-Arg-Gln-Asn-Leu-Pro-Glu-
H F R I R Q N L P E

51 His-Thr-Gln-Gly-Trp-Leu-Gly-Ser-Lys-Trp-
H T Q G W L G S K W

61 Leu-Trp-Leu-Leu-Phe-Ala-Val-Val-Pro-Phe-
L W L L F A V V P F

71 Val-Ile-Leu-Lys-Cys-Gln-Arg-Asp-Ser-Glu-
V I L K C Q R D S E

81 Lys-Asn-Lys-Val-Arg-Met-Ala-Pro-Phe-Phe-
K N K V R M A P F F

91 Leu-His-His-Ile-Asp-Ser-Ile-Ser-Gly-Val-
L H H I D S I S G V

101 Ser-Gly-Lys-Arg-Met-Phe
S G K R M F

Figura 5

NTP [106] [SEQ ID NO. 5]

1 Met-Phe-Phe-Val-Leu-Tyr-Arg-Phe-Cys-Phe-
M F F V L Y R F C F

11 Cys-Phe-Phe-Glu-Thr-Glu-Ser-His-Ser-Leu-
C F F E T E S H S L

21 Thr-Gln-Ala-Gly-Val-Gln-Trp-Cys-Glu-Leu-
T Q A G V Q W C E L

31 Gly-Ser-Pro-Gln-Pro-Leu-Pro-Ser-Gly-Phe-
G S P Q P L P S G F

41 Lys-Arg-Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-Leu-Leu-Ser-
K R F S C L S L L S

51 Ser-Trp-Asp-Tyr-Ser-His-Glu-Pro-Pro-His-
S W D Y S H E P P H

61 Pro-Val-Ile-Cys-Ser-Phe-Leu-Met-Glu-Lys-
P V I C S F L M E K

71 Cys-Leu-Ile-Leu-Tyr-Lys-Pro-Asn-Gly-Asp-
C L I L Y K P N G D

81 Thr-Ile-Gly-Pro-Ile-Leu-Val-Gln-Gln-Gly-
T I G P I L V Q Q G

91 Lys-Arg-Gln-Lys-Leu-Tyr-Ile-Ser-Ala-Asp-
K R Q K L Y I S A D

100 Leu-Val-His-Leu-Ile-Ala
L V H L I A

Figura 6

NTP[98] [SEQ ID NO. 6]

1 Glu-Ala-Tyr-Tyr-Thr-Met-Leu-His-Leu-Pro-
 E A Y Y T M L H L P

11 Thr-Thr-Asn-Arg-Pro-Lys-Ile-Ala-His-Cys
 T T N R P K I A H C

21 Ile-Leu-Phe-Asn-Gln-Pro-His-Ser-Pro-Arg-
 I L F N Q P H S P R

31 Ser-Asn-Ser-His-Ser-His-Pro-Asn-Pro-Leu-
 S N S H S H P N P L

41 Lys-Leu-His-Arg-Arg-Ser-His-Ser-His-Asn-
 K L H R R S H S H N

51 Arg-Pro-Arg-Ala-Tyr-Ile-Leu-Ile-Thr-Ile-
 R P R A Y I L I T I

61 Leu-Pro-Ser-Lys-Leu-Lys-Leu-Arg-Thr-His-
 L P S K L K L R T H

71 Ser-Gln-Ser-His-His-Asn-Pro-Leu-Ser-Arg-
 S Q S H H N P L S R

81 Thr-Ser-Asn-Ser-Thr-Pro-Thr-Asn-Ser-Phe-
 T S N S T P T N S F

91 Leu-Met-Thr-Ser-Ser-Lys-Pro-Arg
 L M T S S K P R

Figura 7

NTP[75] [SEQ ID NO. 7]

1 Ser-Ser-Ser-Leu-Gly-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-
S S S L G L P K C W

11 Asp-Tyr-Arg-His-Glu-Leu-Leu-Ser-Leu-Ala-
D Y R H E L L S L A

21 Leu-Met-Ile-Asn-Phe-Arg-Val-Met-Ala-Cys
L M I N F R V M A C

31 Thr-Phe-Lys-Gln-His-Ile-Glu-Leu-Arg-Gln-
T F K Q H I E L R Q

41 Lys-Ile-Ser-Ile-Val-Pro-Arg-Lys-Leu-Cys-
K I S I V P R K L C

51 Cys-Met-Gly-Pro-Val-Cys-Pro-Val-Lys-Ile-
C M G P V C P V K I

61 Ala-Leu-Leu-Thr-Ile-Asn-Gly-His-Cys-Thr-
A L L T I N G H C T

71 Trp-Leu-Pro-Ala-Ser
W L P A S

Figura 8

NTP[68] [SEQ ID NO. 8]

```
1   Met-Phe-Val-Phe-Cys-Leu-Ile-Leu-Asn-Arg-  
    M   F   V   F   C   L   I   L   N   R  
  
11  Glu-Lys-Ile-Lys-Gly-Gly-Asn-Ser-Ser-Phe-  
    E   K   I   K   G   G   N   S   S   F  
  
21  Phe-Leu-Leu-Ser-Phe-Phe-Phe-Ser-Phe-Gln-  
    F   L   L   S   F   F   F   S   F   Q  
  
31  Asn-Cys-Cys-Gln-Cys-Phe-Gln-Cys-Arg-Thr-  
    N   C   C   Q   C   F   Q   C   R   T  
  
41  Thr-Glu-Gly-Tyr-Ala-Val-Glu-Cys-Phe-Tyr-  
    T   E   G   Y   A   V   E   C   F   Y  
  
51  Cys-Leu-Val-Asp-Lys-Ala-Ala-Phe-Glu-Cys-  
    C   L   V   D   K   A   A   F   E   C  
  
61  Trp-Trp-Phe-Tyr-Ser-Phe-Asp-Thr  
    W   W   F   Y   S   F   D   T
```

Figura 9

NTP[61] [SEQ ID NO. 9]

1 Met-Glu-Pro-His-Thr-Val-Ala-Gln-Ala-Gly-
M E P H T V A Q A G

11 Val-Pro-Gln-His-Asp-Leu-Gly-Ser-Leu-Gln-
V P Q H D L G S L Q

21 Ser-Leu-Leu-Pro-Arg-Phe-Lys-Arg-Phe-Ser-
S L L P R F K R F S

31 Cys-Leu-Ile-Leu-Pro-Lys-Ile-Trp-Asp-Tyr-
C L I L P K I W D Y

41 Arg-Asn-Met-Asn-Thr-Ala-Leu-Ile-Lys-Arg-
R N M N T A L I K R

51 Asn-Arg-Tyr-Thr-Pro-Glu-Thr-Gly-Arg-Lys-
N R Y T P E T G R K

61 Ser
S