



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0718679-7 A2



* B R P I 0 7 1 8 6 7 9 A 2 *

(22) Data de Depósito: 08/11/2007

(43) Data da Publicação: 04/02/2014

(RPI 2248)

(51) Int.Cl.:

A61K 38/00

C07K 17/00

(54) Título: COMPOSTO, MOLÉCULA DE DNA, E, MÉTODOS PARA TRATAR UM PACIENTE COM TECIDO CARDÍACO DANIFICADO, PARA TRATAR UM PACIENTE PARA REPARAR CARTILAGEM DANIFICADA E PARA TRATAR UM PACIENTE PARA REPARAR TECIDO DO NERVO DANIFICADO

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 07/11/2007 US 11/979708, 13/11/2006 US 60/858406

(73) Titular(es): The Brigham And Women's Hospital, INC.

(72) Inventor(es): Richard Lee

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & Cia.

(86) Pedido Internacional: PCT US2007023527 de 08/11/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/063424de 29/05/2008

“COMPOSTO, MOLÉCULA DE DNA, E, MÉTODOS PARA TRATAR UM PACIENTE COM TECIDO CARDÍACO DANIFICADO, PARA TRATAR UM PACIENTE PARA REPARAR CARTILAGEM DANIFICADA E PARA TRATAR UM PACIENTE PARA REPARAR
5 TECIDO DO NERVO DANIFICADO”

Referência Cruzada aos Pedidos Relacionados

O presente pedido reivindica prioridade ao, e o benefício do, pedido provisório dos Estados Unidos 60/858.406, depositado em 13 de novembro de 2006, os conteúdos do qual são por meio deste incorporados por
10 referência em sua totalidade.

Campo da Invenção

A presente invenção está direcionada à proteínas em que um polipeptídeo que promove o crescimento e/ou a sobrevivência de células é fundido a um peptídeo que se liga à heparina. Estas proteínas podem ser
15 ligadas aos cardiomiócitos e administrados ao tecido cardíaco danificado para ajudar a promover o reparo.

Fundamentos da Invenção

O fator de crescimento tipo insulina 1 (IGF-1) é uma proteína que promove o crescimento e sobrevivência de cardiomiócitos. Camundongos deficientes em IGF-1 exibem apoptose aumentada a seguir da infartação
20 miocárdica (Palmen, *et al.*, Cardiovasc. Res. 50: 516-524 (2001)), ao passo que a super expressão de IGF-1 cárdio-específicos protege contra a apoptose de miócito e a dilatação ventricular a seguir da infartação (Li, *et al.*, J. Clin. Invest. 100: 1991-1999 (1997); Torella, *et al.*, Circ. Res. 94: 514-524 (2004)).
25 A super expressão de IGF-1 também aumenta o número e o crescimento de células tronco cardíacas, levando a um aumento na metabolização e função de miócito no coração envelhecido. A seguir da infartação, IGF-1 promove enxerto, diferenciação e melhora funcional de células tronco embrionárias transplantadas no miocárdio (Kofidis, *et al.*, Stem Cells 22: 1239-1245

(2004)). Além disso, níveis séricos de IGF-1 correlacionam-se inversamente com o risco de insuficiência cardíaca congênita em um subconjunto de pacientes idosos (Vasan, *et al.*, Ann. Intern. Med 139: 642-648 (2003)).

As características descritas acima tornam IGF-1 um agente terapêutico atrativo para pacientes que experienciaram dano ao tecido cardíaco, por exemplo, pacientes que sofreram uma infartação miocárdica. Entretanto, IGF-1 é uma proteína pequena que difunde facilmente através dos tecidos. Como um resultado, é difícil manter uma alta concentração deste fator em um sítio de dano tecidual por um período prolongado de tempo. Um método que foi aceito para manter uma alta concentração local é ligar IGF-1 a uma membrana biológica auto-montável (ver a US20060088510). Usando um modelo de rato de infartação miocárdica, foi verificado que quando esta membrana é implantada junto com cardiomiócitos neonatais, a sobrevivência e crescimento das células implantadas é melhorada em relação às células implantadas com IGF-1 não ligado. Assim, a capacidade das células para colonizar o coração danificado e melhorar a função é aumentada. Usando um método similar, resultados positivos também foram obtidos usando PDGF (US20060148703). Embora estes resultados sejam promissores, procedimentos alternativos que evitassem a necessidade de construir e implantar membranas seriam desejáveis.

Sumário da Invenção

A presente invenção está fundamentada no desenvolvimento de um procedimento para ligar IGF-1 aos cardiomiócitos antes da sua implantação em tecido cardíaco danificado. Foi verificado que é possível unir IGF-1 a um peptídeo de ligação de heparina (HBP) e obter uma proteína de fusão que mantenha um efeito benéfico sobre a sobrevivência de células cultivadas. A proteína de fusão liga-se aos cardiomiócitos (presumivelmente à heparina da superfície celular) melhor do que IGF-1 sozinho. Visto que muitos tipos de célula diferentes têm heparina na superfície celular, não é

esperado que simplesmente injetando a proteína IGF-1HBP sistemicamente seria de muito benefício para os pacientes cardíacos. Entretanto, o alveijamento pode ser obtido incubando-se cardiomiócitos com IGF1/HBP antes da implantação. A um grau menor, a localização também pode ser obtido injetando-se a proteína diretamente em tecido cardíaco. Métodos similares devem ser úteis no tratamento de outras condições (por exemplo, ferimentos) que respondem a fatores de crescimento (com ou sem o transplante de células).

Neste primeiro aspecto, a invenção é direcionada a um composto tendo a fórmula: $B-(J)_n-(Z)_q$ ou $(Z)_q-(J)_n-B$, onde n é um número inteiro de 0 a 10; q é um número inteiro de 1 a 5; B é um peptídeo que promove o crescimento e/ou sobrevivência de cardiomiócitos (como determinado, por exemplo, usando células privadas de soro) e Z é um peptídeo de ligação de heparina. Qualquer um dos peptídeos de ligação de heparina conhecidos na técnica podem ser usados incluindo todos os peptídeos aqui descritos. J é um aminoácido proteinogênico ou compostos tais como biotina/avidina que podem ser usados para ligar peptídeos juntos. Para o propósito da presente invenção, todas as sequências de peptídeo são escritas a partir do término N (à esquerda) para o término C (à direita) e a menos que de outro modo indicado, todos os peptídeos são compostos de aminoácidos “proteinogênicos”, isto é, eles são os isômeros L de: alanina (A); arginina (R); asparagina (N); ácido aspártico (D); cisteína (C); ácido glutâmico (E); glutamina (Q); glicina (G); histidina (H); isoleucina (I); leucina (L); lisina (K); metionina (M); fenilalanina (F); prolina (P); serina (S); treonina (T); triptofano (W); tirosina (Y); ou valina (V).

Em formas de realização preferidas, o composto das fórmulas mostradas acima é uma proteína de fusão em que L é um aminoácido proteinogênico e A é fator de crescimento derivado de insulina 1 (IGF-1) ou fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF). A sequência de tamanho

natural para o IGF-1 humano (Acesso do GenBank Nº NM00618) é como segue:

MGKISSLPTQLFKCCFCDFLKVKMHTMSSSHLFYALCLLTFTSSATA
GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDEC
CFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNA
 SRGSAGNKNYRM (SEQ ID NO:1).

Entretanto, a sequência sublinhada é suficiente para a promoção do crescimento e sobrevivência de cardiomiócito de acordo com os procedimentos aqui descritos. Assim, para o propósito da presente invenção, IGF-1 é definido como tendo a seqüência de núcleo:

PETLCGAELVDALQFVCGPRGFYFNKPTGYGSSIRRAPQTGIVDECCF
 RSCDLRRLEMYCAPLKPTKSA (SEQ ID NO:2)

e pode opcionalmente incluir qualquer porção adicional da sequência da SEQ ID NO: 1. Por exemplo, o término C pode começar com G, AG, TAG etc. Similarmente o término N da SEQ ID NO: 2 pode ser estendido de acordo com a SEQ ID NO: 1. Assim, o peptídeo pode terminar em R, RS, RSV etc. A sequência de aminoácido de tamanho natural de PDGF também é bem conhecida na técnica (ver, Rao, *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83: 2392-2396 (1986)) e pode ser encontrada, *inter alia*, como Acesso do GenBank número P01127. Nas fórmulas apresentadas acima, n é preferivelmente 0 e q é preferivelmente 1.

Os peptídeos de ligação de heparina preferidos, isto é, Z nas fórmulas, são:

KKKRKGKGLGKKRDPCLKKYKG (SEQ ID NO:3);

RIQNLLKITNLRIKFVK (SEQ ID NO:4);

PYVVLPRPVCFEKGMNYTVR (SEQ ID NO:5);

KQNCLSSRASFRGCVRLRLSR (SEQ ID NO:6);

KDGRKICLDLQAPLYKKIHKLLS (SEQ ID NO:7);

CKNGGFFLRIAPDGRVDGVREK (SEQ ID NO:8);

YSSWYVALKRTGQYKLGPKTGPGQKAILFLP (SEQ ID NO:9);
 AKLNCRLYRKANKSSKLVSANRLFGDK (SEQ ID NO:10);
 LRKLRKRLLRDADDLQKRLAVYQ (SEQ ID NO:11);
 PLQERAQAAWQERLRARMEEMGSRTDRDLDEVKEQVAERAKL (SEQ
 ID NO:12);
 KGKMHKTCYY (SEQ ID NO:13);
 MGKMHKTCYN (SEQ ID NO:14);
 PPTIIWKHKGRDVILKKDVRFIVLSNNY (SEQ ID NO:15);
 KKHEAKNWFVGLKKNNGSCKRGP (SEQ ID NO:16);
 KGGRGTPGKPGPRGQRGPTGRGERGPRGITGK (SEQ ID NO:17);
 GEFYDLRLKGDK (SEQ ID NO:18);
 HRHHPREMKKRVEDL (SEQ ID NO:19);
 EKTLRKWLKMFKKR (SEQ ID NO:20); e
 AEAAARAAARRAARRAAAR (SEQ ID NO:21).

A invenção também inclui moléculas de DNA que codificam qualquer uma das proteínas de fusão descritas acima, vetores contendo estas moléculas de DNA e células hospedeiras transformadas com os vetores. As células hospedeiras podem ser usadas para produzir as proteínas de fusão para o uso nos métodos terapêuticos aqui descritos. O DNA também pode ser usado para transformar células que secretam a proteína de fusão no sítio de dano tecidual. Uma vez secretadas, as proteínas devem ligar-se a outras células na proximidade, mantendo deste modo uma concentração localizada relativamente alta.

A invenção também inclui métodos de tratar pacientes para qualquer condição responsiva ao IGF-1 ou PDGF usando uma ou mais das proteínas de fusão ou compostos. Em uma forma de realização, os compostos ou proteínas de fusão são administradas diretamente ao sítio de tratamento para permitir que eles se liguem às superfícies de células endógenas. Mais preferivelmente, estes são usados no tratamento de condições onde o

crescimento ou reparo de tecido é necessário e existam células disponíveis que possam ser usadas para ajudar neste processo. Nestes casos, os compostos ou proteínas de fusão serão pré incubadas com as células para permitir que elas se liguem antes da implantação. Em um método particularmente preferido, um paciente é tratado quanto ao tecido cardíaco danificado (por exemplo, devido a uma infartação miocárdica) pela incubação de cardiomiócitos com os compostos ou proteínas de fusão por um período de tempo e sob condições suficientes para permitir que eles se liguem. As células são depois injetadas ou implantadas no tecido cardíaco do paciente.

Os compostos e proteínas de fusão também podem ser usados para reparar cartilagem danificada. Normalmente, IGF-1 espalha-se para fora da cartilagem e seu efeito sobre os condrócitos transplantados é portanto reduzido ou perdido. Pela incubação dos condrócitos com IGF-1 de ligação de heparina antes da implantação, a concentração local do fator de crescimento será aumentada e, como um resultado, os condrócitos fabricarão mais cartilagem.

Fatores de crescimento engendrados para ligar heparina, particularmente IGF-1, também podem ser ligados às células que são implantadas para reparar e regenerar neurônios, por exemplo, em pacientes com doenças neurodegenerativas tais como ALS, que tiveram um acidente vascular cerebral, ou que perderam a função de nervo como o resultado de uma lesão. IGF-1 é um candidato para testes clínicos em ALS e foram verificados promover o crescimento axonal em neurônios motores corticospinais (Ozdinler, *et al.*, Nature Neurosci. 9: 1371-1381 (2006)). Pela ligação do IGF-1 aos neurônios antes da implantação, o seu crescimento *in vivo* será realçado.

Descrição da Invenção

A presente invenção está fundamentada no conceito de que a recuperação de tecido depois da lesão é promovida pela manutenção de altas

concentrações locais de fatores de crescimento tais como IGF-1 ou PDGF. Os experimentos descritos na técnica têm sustentado este método usando membranas biologicamente compatíveis para reter agentes terapêuticos no sítio de administração (ver a US20060088510 e US20060148703). Foi agora
5 verificado que fatores de crescimento podem ser fundidos aos peptídeos de ligação de heparina e ligados aos cardiomiócitos antes da sua implantação no tecido cardíaco. A proteína fundida mantém a sua capacidade para promover crescimento e sobrevivência celulares e é mantida no sítio de implantação sem a necessidade de fabricar e usar uma membrana biologicamente
10 compatível.

Fabricação de Peptídeos

Um modo de unir o peptídeo de ligação de heparina ao agente terapêutico é através do uso de um ligador não peptídico. Por exemplo, o uso de biotina e avidina para ligar moléculas é bem conhecido na técnica e a
15 metodologia padrão pode ser usada para ligar peptídeos de ligação de heparina aos fatores de crescimento tais como IGF-1. De modo a prevenir a interferência estérica entre os grupos de biotina/avidina e peptídeos, um espaçador pode ser incluído entre os dois. O espaçador pode tomar a forma de 1 a 15 (preferivelmente 1 a 10) ácidos graxos ou 1 a 15 (preferivelmente 1 a
20 10) aminoácidos. A metodologia para incorporar espaçadores deste tipo é bem conhecida na técnica.

Preferivelmente, os peptídeos de ligação de heparina e os fatores de crescimento tais como IGF-1 e PDGF são unidos entre si na forma de uma proteína de fusão. As proteínas de fusão podem ser quimicamente
25 sintetizadas ou fabricadas usando técnicas de DNA recombinante. Os métodos químicos incluem a síntese de peptídeo de fase sólida usando a química do N-terc-butoxicarbonila (t-Boc) padrão e ciclos usando a química da n-metilpirrolidona. Uma vez que os peptídeos tenham sido sintetizados, eles podem ser purificados usando procedimentos tais como a cromatografia

líquida de alta pressão nas colunas de fase reversa. A pureza também pode ser avaliada pela HPLC e a presença de uma composição correta pode ser determinada pela análise de aminoácido.

Ligação às Células

5 Os cardiomiócitos ou outras células podem ser obtidas usando procedimentos padrão e podem ser depois incubadas com composições ou proteínas de fusão por um período suficiente para permitir que as proteínas de fusão se ligassem às superfícies celulares. A incubação pode durar em qualquer lugar de cerca de uma hora a vários dias e deve ser realizada sob
10 condições que permitam a sobrevivência celular, por exemplo, de cerca de 37° C, pH neutro e em um meio de cultura que garanta a sobrevivência da célula. A quantidade de proteína presente no geral deve ser suficiente para revestir as células mas a quantidade exata não é crítica. As células podem ser administradas por seringa ou cateter ao tecido cardíaco. A quantidade exata de
15 células usadas não é crítica mas, no geral, entre 1×10^5 e 1×10^7 serão usadas.

Composições e Dosagens Farmacêuticas

As proteínas de fusão podem ser incorporadas em uma composição farmacêutica contendo um carregador tal como solução salina, água, solução de Ringer e outros agentes ou excipientes e células podem ser
20 mantidos em meios padrão para manter a viabilidade. As preparações no geral serão planejadas para implantação, infusão ou injeção, particularmente em tecido cardíaco mas tratamentos tópicos também serão úteis, por exemplo, no tratamento de ferimentos. Todas as composições farmacêuticas podem ser
25 preparadas usando métodos que são padrão na técnica (ver por exemplo, Remington's Pharmaceutics Sciences, 16^a ed. A. Oslo. ed., Easton, PA (1980)).

É esperado que o técnico habilitado ajustará as dosagens em uma base de caso para caso usando métodos bem estabelecidos na medicina

clínica. A dosagem ótima será determinada pelos métodos conhecidos na técnica e serão influenciadas pelos fatores tais como a idade do paciente, estado de doença e outros fatores clinicamente relevantes.

Exemplos

5 Exemplo 1: Sobrevivência de Cardiomiócitos

O presente exemplo demonstra que IGF-1 melhora a sobrevivência de cardiomiócitos derivados de ES e descreve o desenvolvimento de uma nova proteína de fusão (HB)-IGF-1 de ligação de heparina engendrada para melhorar a sobrevivência de células injetadas.

10 Métodos e Resultados

Para minimizar a formação de teratoma, nós estudamos células ES comprometidas com a linhagem de cardiomiócito. As células ES de camundongo, estavelmente transfectadas com proteína fluorescente verde (EGFP) realçada induzida ao promotor de cadeia pesada de miosina cardíaca α , foram diferenciadas em cardiomiócitos pelo método da gota suspensa e células positivas em EGFP foram purificadas pela classificação de célula fluorescente. Nestes cardiomiócitos derivados de ES, IGF-1 reduziu a morte celular induzida pela privação de soro (13,6 +/- 1,9 % vs 25,9 +/- 2,5 % no controle, $p < 0,05$) e diminuiu a apoptose induzida pela privação de soro (células positivas em TUNEL 8,0 +/- 1,5 % a 4,3 +/- 0,5 % respectivamente, $p < 0,05$). Além disso, IGF-1 diminuiu a apoptose induzida pela Doxorrubicina (1 μ M, 24 horas) ou queleritrina (3 μ M, 1 hora) ($p < 0,01$). O inibidor da fosfoinositida-3 quinase, LY294002 (10 μ M), inibiu o efeito protetor de IGF-1 na apoptose induzida pela Doxorrubicina ($p < 0,05$). Visto que IGF-1 espalha-se rapidamente para fora dos sítios injetados, nós então planejamos e expressamos uma nova proteína de fusão de IGF-1 recombinante com um domínio do terminal N domínio HB. A proteína foi purificada pela cromatografia de afinidade de níquel e depois submetida à redobra oxidativa para restaurar a atividade biológica. HB-IGF-1 ligou-se às superfícies

celulares dramaticamente melhor do que IGF-1 e HB-IGF-1 ativou Ala em miócitos cardíacos neonatais e fibroblastos 3T3 tão potentemente quanto o IGF-1 nativo.

Conclusões

5 Porque IGF-1 melhora a sobrevivência de cardiomiócitos derivados de ES *in vitro*, este novo IGF-1 de ligação de heparina deve melhorar a terapia celular pela ligação às superfícies de células injetadas. Isto demonstra o potencial para mudar o microambiente celular através das proteínas terapêuticas localmente liberadas.

10 **Exemplo 2: Reparo de Cartilagem**

Neste exemplo, nós planejamos e purificamos uma nova proteína, IGF-1 de ligação de heparina (HB-IGF-1), que é uma proteína de fusão de IGF-1 nativo com o domínio de ligação de heparina do fator de crescimento semelhante ao fator de crescimento epidérmico de ligação de heparina. HB-IGF-1 ligou-se seletivamente à heparina assim como às superfícies celulares de fibroblastos 3T3, miócitos cardíacos neonatais e células tronco embrionárias diferenciadoras. HB-IGF-1 ativou o receptor de IGF-1 e Akt com as cinéticas e dependência de dose idênticas do IGF-1, não indicando nenhum comprometimento da atividade biológica devido ao domínio de ligação de heparina. Porque a cartilagem é um ambiente rico em proteoglicano e IGF-1 é um estímulo conhecido para a biossíntese de condrocito, nós depois estudamos a eficácia de HB-IGF-1 em cartilagem. HB-IGF-1 foi seletivamente retido pelos explantes de cartilagem e levou à biossíntese de proteoglicano condrocítica sustentada comparado ao IGF-1.

25 Estes dados mostram que a estratégia de engendrar um fator de crescimento de “longa distância” como IGF-1 para a liberação local pode ser útil para o reparo de tecido e minimizar os efeitos sistêmicos.

Material e Métodos

Construção de Vetor

O cDNA do IGF-1 de rato foi amplificado pela reação da cadeia da polimerase (PCR) usando os iniciadores (5' para 3') GGACCAGAGGACCCTTTGCG (avancado, SEQ ID NO: 22) e AGCTGACTTTGTAGGCTTCAGC (reverso, SEQ ID NO: 23). Nós usamos

5 peptídeo IGF-1 maduro (70 aminoácidos), que codificam os exons 3 e 4 (Hameed, *et al.*, *Physiol.* 547: 247-254 (2003); Shavlakadze, *et al.*, *Growth Horm IGF Res* 15: 4-18 (2005); Musaro, *et al.*, *Exp Gerontol.* 42: 76-80 (2007)). O produto foi subclonado no vetor pTrcHis-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) com a adição de um códon de parada (TAG)

10 no término C de IGF-1, codificando assim um IGF-1 rotulado com Xpress (Xpress-IGF-1). Para codificar HB-IGF-1, a sequência de ligação de heparina (AA 93 a 113) de HB-EGF de rato (AAAAAGAAGAGGAAAGGCAAGGGGTTAGGAAAGAAGAGAGATC CATGCCTTAAGAAATACAAG (SEQ ID NO: 24)) foi inserida entre o

15 rótulo X-press e a sequência de IGF-1 através da mutagênese.

A amplificação foi realizada com PfuUltra HF DNA Polimerase (Stratagene, Cedar Creek, TX, USA) e o plasmídeo padrão foi digerido com *DpnI* (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) antes da transformação na *E. coli*. Todas as sequências foram confirmadas pelo

20 sequenciamento de DNA.

Purificação de proteína

Xpress-IGF-1 e HB-IGF-1 foram expressados em células BL21 da *E. coli* e cultivadas em meio LB em lotes de 4 litros. A síntese da proteína foi induzida com 1 mM de isopropil β -D-tiogalactosídeo por 4 horas

25 e as células foram depois colhidas pela centrifugação, lisadas em tampão de lise (6 M de cloridreto de guanidina, 20 mM de fosfato de sódio, 500 mM de NaCl, pH 7,8) e homogeneizadas. A primeira etapa de purificação consistiu de purificação por afinidade pelo rótulo de poli-histidina nas proteínas de fusão com Ni-NTA (Invitrogen). A resina Ni-NTA foi lavada com tampão de

lavagem (8 M de uréia, 500 mM de NaCl, 20 mM de fosfato, pH 6,2) e a proteína ligada foi eluída no pH 4. As proteínas eluídas foram depois submetidas à redobra oxidativa para restaurar a atividade biológica. As proteínas foram incubadas durante a noite a 4° C com tampão de redobra (50 mM de Tris, 75 mM de NaCl, 100 µM de glutathione oxidada e 100 µM de glutathione reduzida, pH 7,8). Depois da redobra, as amostras foram ajustadas para 0,1 % de ácido trifluoroacético e carregada em uma coluna de cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa C18 (RP-HPLC) (Delta-Pak C18, Waters, Milford, MA, USA) como uma etapa de purificação final. A coluna foi submetida a um gradiente linear de 25 % a 40 % de acetonitrila em 0,1 % de ácido trifluoroacético.

Cultura de célula

As culturas primárias de miócitos cardíacos foram preparadas a partir dos ventrículos de ratos Sprague Dawley recém-nascidos e cultivados em meio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Invitrogen) com 7 % de soro bovino fetal (Invitrogen); o meio foi substituído depois de 24 horas com meio isento de soro. Células de fibroblasto 3T3 foram cultivadas em DMEM com 10 % de soro de bezerro recém-nascido (Invitrogen) e o meio foi substituído com meio isento de soro 24 horas antes dos experimentos. As células tronco embrionárias de camundongo (ES) foram cultivadas em placas revestidas com gelatina sem células alimentadoras em Meio Essencial Mínimo de Glasgow (Invitrogen) suplementado com 15 % de KNOCKOUT SR (Invitrogen) e fator inibidor de leucemia (Chemicon, Billerica, MA, USA). As células foram passadas a cada três dias. Para induzir a diferenciação, as células foram primeiro enzimaticamente dissociadas e cultivadas como gotas suspensas para a formação de corpo embrióide como descrito anteriormente (Takahashi, *et al.*, Circulation 107: 1912-1916 (2003)). O meio de diferenciação com 10 % de soro bovino fetal qualificado em célula ES (Invitrogen) sem fator inibidor de leucemia foi adicionado. Estas células

ES tornam-se positivas em proteína fluorescente verde (GFP) depois da diferenciação em miócitos cardíacos, porque eles foram estavelmente transfectados com um vetor GFP realçado induzido pelo promotor da cadeia pesada de alfa-Miosina. Depois da formação do corpo embrióide (7 dias), as

5 células foram plaqueadas em placas revestidas com gelatina.

Colheita e cultura de cartilagem

Os explantes de cartilagem articular bovina (3 mm de diâmetro, discos de 1 mm de espessura) foram colhidos das ranhuras femoropatelar de bezerros de 1 a 2 semanas de idade e cultivados em DMEM

10 de baixa glicose com 10 mM de HEPES, 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 0,4 mM de L-prolina, 20 µg/ml de ascorbato, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina a 37° C em uma atmosfera a 5 % de CO₂.

Análise de Proteína

15 Os miócitos cardíacos neonatais e fibroblastos 3T3 foram lisados usando solução salina tamponada com fosfato (PBS) com 1 % de Triton-X, 0,25 % de Na-desoxicolato, 1 mM de ácido etilenodiamino-tetraacético (EDTA), 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), 1 mM de NaF, 1 mM de Na₃VO₄ e 1:1000 de coquetel de inibidor de protease

20 (Sigma, St. Louis, MD, USA). os discos de cartilagem foram pulverizados e lisados com 100 mM de NaCl, 50 mM de Tris, 0,5 % de Triton-X, 5 mM de EDTA, 1 mM de PMSF e 1:1000 de coquetel de inibidor de proteinase (Sigma). A concentração de proteína foi medida pelo ensaio de Bradford e 10 µg de proteína foi carregada em cada reservatório para a análise de Western

25 blot. Similarmente o teor de GAG foi observado em todas as amostras como medido pela ligação de corante DMMB. O anticorpo anti-Xpress (Invitrogen), anticorpo IGF-1 anti-policlonal (Abcam, Cambridge, MA, USA), anticorpo receptor anti-fosfo-IGF-1 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), anticorpo anti-fosfo-Akt (Cell Signaling) e anticorpo anti-Actina (Sigma) foram usados.

IGF-1 foi adquirido da Sigma como uma proteína de controle.

Para detectar as proteínas de fusão pelos ensaios imunossorventes ligados a enzima (ELISA), placas de 96 reservatórios foram revestidas com um anticorpo anti-Xpress (10 µg/ml) durante a noite.

5 Quantidades idênticas de proteína de extratos de cartilagem foram adicionadas a cada reservatório. Anticorpo de IGF-1 policlonal foi usado como o anticorpo primário e peroxidase de rábano anti-coelho (BioRad, Hercules, CA, USA) foi usado como o anticorpo secundário. Depois da adição de Substrato de Peroxidase ABTS (KPL, Gaithersburg, MD, USA), as
10 placas foram lidas a 405 nm.

Ensaio de Ligação

Pérolas de heparina agarose (Sigma) foram incubadas com 300 pmol de HB-IGF-1 ou Xpress-IGF-1 por 2 horas e lavado 3 vezes com PBS. As proteínas de fusão ligadas com pérolas de agarose heparinizada foram
15 extraídas pela ebulição com tampão de amostra de SDS-PAGE (Invitrogen). As células de fibroblasto 3T3 ou cardiomiócitos de rato recém-nascido foram incubados com 100 nM de HB-IGF-1 ou IGF-1 de controle (Sigma) por 2 horas e depois lavados com PBS 3 vezes. As células foram lisadas com tampão de lise e depois submetida à análise de Western blot com um
20 anticorpo anti-IGF-1. Os corpos embrióides (10 dias depois da indução de diferenciação) foram incubados com proteínas de fusão por 2 horas, lavadas com PBS 3 vezes e fixadas com paraformaldeído antes da imunoistoquímica com um anticorpo anti-Xpress. Os discos de cartilagem foram cultivados em DMEM isento de soro suplementado com 500 nM de HB-IGF-1 ou 500 nM
25 de Xpress-IGF-1. Depois de 48 horas (no dia 0), os discos foram lavados 3 vezes com PBS depois incubados em DMEM sem nenhum IGF-1. Os discos foram coletados nos dias 0, 1, 2 e 4. A proteína remanescente nos extratos de cartilagem foi detectada pela análise de Western blot e ELISA.

Ensaio de biossíntese de cartilagem

A síntese de proteoglicano condrocítico foi medida pela incorporação de [^{35}S]sulfato (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) como previamente descrito (Sah, *et al.*, J Orthop. Res. 7: 619-636 (1989)). Os discos de cartilagem foram equilibrados em meio isento de soro por 1 dia e incubados em meio contendo 100 nM de HB-IGF-1, Xpress-IGF-1 ou IGF-1 de controle (Sigma) por 2 dias. Os discos foram depois lavados 3 vezes com PBS e mudados para meio isento de IGF-1. Os discos cultivados foram radiorrotulados com 5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ de [^{35}S]sulfato para as 24 horas finais de cultura. Depois da rotulação, cada disco foi lavado 3 vezes em 1,0 ml de PBS com 0,8 mM de prolina e 1 mM de Na_2SO_4 a 4° C para remover radiorrotulo livre. Os discos foram digeridos em 1,0 ml de proteinase K (125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ em 0,1 M de Na_2SO_4 , 5 mM de EDTA e 5 mM de cisteína no pH 6,0). As amostras foram analisadas quanto ao teor de DNA pela análise fluorimétrica pela reação de 20 μl de digerido com 180 μl de corante Hoechst 33258(24). O teor de [^{35}S]sulfato dos digeridos foi depois medido em um contador de cintilação (Wallac MicroBeta TriLux, PerkinElmer, Waltham, MA, USA), com correções quanto ao derramamento e extinção.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste t de Student com nível de aceitação $\alpha = 0,05$. Os testes t foram corrigidos quanto as comparações múltiplas usando $\alpha = 1-(1-\alpha_0)^{1/n}$, onde $\alpha_0 = 0,05$ e n = número total de comparações. Todos os dados foram expressados como média \pm SE.

Resultados

Purificação de HB-IGF-1

IGF-1 tem 3 ligações de dissulfeto e inclui 70 aminoácidos. As proteínas de fusão de IGF-1 contêm tanto rótulos de poli-histidina para a purificação de proteína quanto rótulos Xpress para a detecção de proteína. Os pesos moleculares de HB-IGF-1 e Xpress-IGF-1 são 14,018 Da e 11,548 Da, respectivamente. HB-IGF-1 tem o domínio HB no término N de IGF-1. O

domínio HB tem 21 aminoácidos e inclui 12 aminoácidos positivamente carregados. A purificação final das novas proteínas de fusão depois da redobra foi realizada com RP-HPLC. A identificação da proteína corretamente dobrada foi realizada como anteriormente descrita (Milner, *et al.*, Biochem. 308 (Pt 3): 865-871 (1995)) e confirmada com ensaios de bioatividade. O tingimento com azul de Coomassie e análise de Western com um anticorpo anti-Xpress das proteínas IGF-1 redobradas depois da RP-HPLC, revelou uma faixa única.

HB-IGF-1 liga-se à heparina e superfícies celulares

Nós primeiro testamos se HB-IGF-1 liga-se seletivamente à heparina. Depois de 2 horas de incubação de pérolas de heparina agarose com 300 pmol de HB-IGF-1 ou Xpress-IGF-1, as proteínas ligadas foram extraídas de pérolas pela ebulição. O tingimento com azul de Coomassie da proteína ligada com pérolas de agarose heparinizada mostrou que HB-IGF-1 liga-se seletivamente à heparina comparado com Xpress-IGF-1. Em seguida nós testamos a capacidade de HB-IGF-1 para ligar às superfícies celulares, que têm sulfato de heparina proteoglicanos, usando células de fibroblasto 3T3 e miócitos cardíacos de rato recém-nascido. Depois do pré tratamento com 0 a 100 nM de HB-IGF-1 por 2 horas, as células foram lavadas com PBS 3 vezes. Para estes experimentos, IGF-1 comercial foi usado como controle. HB-IGF-1 ligou-se às células de fibroblasto 3T3 quando tratadas com concentrações de 10 nM e 100 nM. A ligação de HBIGF-1 aos miócitos cardíacos neonatais mostrou claramente a ligação seletiva de HB-IGF-1 a 10 nM e 100 nM e uma faixa muito fraca de IGF-1 a 100 nM. Estes resultados são compatíveis com a ligação deste domínio HB à heparina na faixa submicromolar. Nós também estudamos a capacidade de HB-IGF-1 para ligar às células tronco embrionárias em corpos embrióides, que contém tipos de célula múltiplos. HB-IGF-1 foi facilmente detectado nas superfícies de células nos corpos embrióides pela imunofluorescência para o rótulo de epítipo Xpress,

indicando que HB-IGF-1 pode ligar-se a tipos de célula múltiplos.

Bioatividade de HB-IGF-1

Para determinar se o domínio HB interfere com a bioatividade, bioensaios quanto à fosforilação do receptor de IGF1 e ativação de Akt foram realizados. IGF-1 de controle, HB-IGF-1 e Xpress-IGF-1 todos ativaram o receptor de IGF-1 de miócitos cardíacos neonatais de modo dependente da dose e induziram a fosforilação de Akt de modo idêntico. IGF-1 de controle, HB-IGF-1 e Xpress-IGF-1 todos ativaram Akt dentro de um curso de tempo similar. Estes dados demonstram que a adição do domínio de ligação de heparina não interfere com a bioatividade de IGF-1.

Transporte de HB-IGF-1 em cartilagem

A cartilagem é um tecido rico em proteoglicano e os condrócitos respondem ao IGF-1 com a síntese de matriz extracelular aumentada. Por causa da estimulação local prolongada a sinalização de IGF-1 pôde assim ser benéfica para o reparo de cartilagem, nós estudamos a capacidade de HB-IGF-1 para ligar à cartilagem. De modo idêntico discos de cartilagem articular bovina de um determinado tamanho foram incubados com 500 nM de HB-IGF-1 ou Xpress-IGF-1 por 1 dia, 3 dias ou 6 dias e não houve nenhuma diferença na quantidade de proteína IGF-1 que se espalhou na cartilagem durante este período de tempo. Depois da pré-incubação com HB-IGF-1 ou Xpress-IGF-1 por 48 horas, os discos de cartilagem foram lavados com PBS no dia 0 e quantidades similares de IGF-1 foram detectadas. Entretanto, nos dias 1, 2 e 4 depois da remoção das proteínas IGF-1, apenas HB-IGF-1 permaneceu na cartilagem, sugerindo que HB-IGF-1 ligou-se à matriz extracelular rica em proteoglicano. Ao contrário Xpress-IGF1 foi indetectável mesmo 1 dia depois da lavagem. Nós também realizamos este experimento de ligação seletiva com extratos de cartilagem e medições de ELISA. Estes resultados confirmaram que HB-IGF-1 é seletivamente retido pela cartilagem, enquanto que Xpress-IGF-1 é rapidamente perdido.

HB-IGF-1 aumenta a biossíntese de condrócito

A retenção seletiva de HB-IGF-1 à cartilagem sugere que esta proteína de fusão poderia liberar um estímulo prolongado para a biossíntese de condrócito. Portanto, nós medimos a biossíntese de condrócito de proteoglicanos de matriz extracelular pela incorporação de [³⁵S]sulfato. Discos de cartilagem foram incubados com 100 nM de HB-IGF-1, IGF-1 de controle ou Xpress-IGF-1 por 2 dias e lavados 3 vezes com PBS, seguido pela cultura em meio sem nenhum IGF-1. A incorporação de [³⁵S]sulfato foi medida por 24 horas começando no dia 0 (antes da lavagem), dia 2 (exatamente depois da lavagem), dia 4, dia 6 e dia 8. Durante a incubação com as construções de IGF-1 no dia 0, IGF-1 de controle, Xpress-IGF-1 e HB-IGF-1 todos estimularam a síntese de proteoglicano como esperado. Entretanto, depois de lavar, nem o IGF-1 de controle nem o Xpress IGF-1 estimularam a síntese de proteoglicano no dia 4 ou além. Ao contrário, HB-IGF-1 levou à estimulação prolongada da síntese de proteoglicano por 6 dias. A síntese de proteoglicano foi significativamente mais alta na cartilagem incubada com HB-IGF-1 vs. Xpress-IGF-1 nos dias 2, 4 e 6. Estes dados demonstram que HB-IGF-1, que é seletivamente retida na cartilagem, estimula a biossíntese de condrócito em um período mais prolongado.

20 Debate

A liberação local de IGF-1 tem o potencial para melhorar o reparo e a regeneração de tecido enquanto minimiza efeitos adversos sistêmicos. Neste exemplo, nós descrevemos uma nova proteína IGF-1, HB-IGF-1, que se liga ao tecido rico em proteoglicano e superfícies celulares mas tem a mesma bioatividade como IGF-1. Nossos dados indicam que HB-IGF-1 pode ativar o receptor de IGF-1 e Ala e assim que o domínio de ligação de heparina não interfere com as interações de IGF-1 e seu receptor. IGF-1 tem quatro domínios: domínio B (AA1-29), domínio C (AA30-41), domínio A (AA42-62) e domínio D (AA63-70), com o domínio C desempenhando o

papel mais importante na ligação ao receptor de IGF-1. A substituição do domínio C inteiro causa uma diminuição de 30 vezes na afinidade para o receptor de IGF-1. Assim, a adição do domínio de ligação de heparina ao término N de IGF-1 não foi esperado interferir com as interações com o domínio C de IGF-1.

Tanto a matriz extracelular quanto as superfícies celulares são ricas em proteoglicanos e podem servir como reservatórios para os fatores de crescimento que ligam proteoglicano. Um exemplo clássico é o sistema do fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF-2), onde uma afinidade baixa, reunião de capacidade alta de receptores de proteoglicanos serve como um reservatório de FGF-2 para o seu receptor de afinidade alta. Nossos experimentos sugerem que HB-IGF-1 poderiam funcionar em algumas circunstâncias em uma maneira similar, visto que HB-IGF-1 é seletivamente retido nas superfícies celulares. IGF-1 também pode ligar-se com a matriz extracelular por intermédio das proteínas que ligam IGF (IGFBP); na circulação, pelo menos 99 % do IGF-1 são ligados aos IGFBPs (IGFBP-1 a -6).

IGF-1 pode promover a síntese de matriz extracelular de cartilagem e inibem a degradação da cartilagem (Bonassar, *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 379: 57-63 (2000)); entretanto, um modo prático de liberar IGF-1 para a cartilagem tem que ser ainda desenvolvido (Schmidt, *et al.*, Osteoarthritis Cartilage 14: 403-412 (2006)). Proteoglicanos de sulfato de heparano são predominantes na matriz pericelular da cartilagem, particularmente como cadeias no perlecan e sindecan-2 e são conhecidos ligar outros ligandos tais como FGF-2. Nossos experimentos sugerem que a proteína HB-IGF-1 pode ligar com matriz e aumentar a biodisponibilidade local, de longa duração aos condrócitos e assim melhorar o reparo de cartilagem.

Além da cartilagem, HB-IGF-1 tem potencial para o uso em

outros tecidos. Por exemplo, IGF-1 induz o crescimento de axônio de células PC12 e neurônios motores corticospinais e assim IGF-1 pode beneficiar as doenças de degeneração de neurônio motor. Na cicatrização de ferimento dérmico, IGF-1 também é eficaz porque o IGF-1 estimula a síntese de colágeno e a mitogenicidade de fibroblastos e queratinócitos. A capacidade de HB-IGF-1 para ligar-se às superfícies de células pode realçar as terapias celulares e outras estratégias regenerativas.

Todas as referências aqui citadas são totalmente incorporadas por referência. Tendo agora totalmente descrita a invenção, deve ser entendido por aqueles de habilidade na técnica que a invenção pode ser praticada dentro de uma faixa ampla e equivalente de condições, parâmetros e outros, sem afetar o espírito ou escopo da invenção ou qualquer forma de realização desta.

LISTAGEM DE SEQUENCIAS

<110> The Brigham and Women's Hospital, Inc.
 Lee, Richard T.

<120> MÉTODOS DE PROMOVER REPARO CARDÍACO USANDO FATORES DE CRESCIMENTO
 FUNDIDOS ÀS SEQUÊNCIAS DE LIGAÇÃO DE HEPARINA

<130> 7570/11900

<150> 60/858,406
 <151> 2006-11-13

<160> 24

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Lys Ile Ser Ser Leu Pro Thr Gln Leu Phe Lys Cys Cys Phe
 1 5 10 15

Cys Asp Phe Leu Lys Val Lys Met His Thr Met Ser Ser Ser His Leu
 20 25 30

Phe Tyr Leu Ala Leu Cys Leu Leu Thr Phe Thr Ser Ser Ala Thr Ala
 35 40 45

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe
 50 55 60

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly
 65 70 75 80

Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys
 85 90 95

Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu
 100 105 110

Lys Pro Ala Lys Ser Ala Arg Ser Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp
 115 120 125

Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly
 130 135 140

Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg Met
 145 150

<210> 2
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val
 1 5 10 15

Cys Gly Pro Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser
 20 25 30

Ser Ile Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe
 35 40 45

Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys
 50 55 60

Pro Thr Lys Ser Ala
 65

<210> 3
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Lys Lys Lys Arg Lys Gly Lys Gly Leu Gly Lys Lys Arg Asp Pro Cys
 1 5 10 15

Leu Lys Lys Tyr Lys Gly
 20

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

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

Lys

<210> 5
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

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

Tyr Thr Val Arg
20

<210> 6
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Lys Gln Asn Cys Leu Ser Ser Arg Ala Ser Phe Arg Gly Cys Val Arg
1 5 10 15

Asn Leu Arg Leu Ser Arg
20

<210> 7
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Lys Asp Gly Arg Lys Ile Cys Leu Asp Leu Gln Ala Pro Leu Tyr Lys
1 5 10 15

Lys Ile Ile Lys Lys Leu Leu Glu Ser
20 25

<210> 8
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

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

Asp Gly Val Arg Glu Lys
20

<210> 9
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Tyr Ser Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu
 1 5 10 15

Gly Pro Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro
 20 25 30

<210> 10
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Ala Lys Leu Asn Cys Arg Leu Tyr Arg Lys Ala Asn Lys Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

<210> 11
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

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

Lys Arg Leu Ala Val Tyr Gln
 20

<210> 12
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Pro Leu Gln Glu Arg Ala Gln Ala Ala Trp Gln Glu Arg Leu Arg Ala
 1 5 10 15

Arg Met Glu Glu Met Gly Ser Arg Thr Arg Asp Arg Leu Asp Glu Val
 20 25 30

Lys Glu Gln Val Ala Glu Arg Ala Lys Leu
 35 40

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Lys Gly Lys Met His Lys Thr Cys Tyr Tyr
 1 5 10

<210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Met Gly Lys Met His Lys Thr Cys Tyr Asn
 1 5 10

<210> 15
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Pro Pro Thr Ile Ile Trp Lys His Lys Gly Arg Asp Val Ile Leu Lys
 1 5 10 15

Lys Asp Val Arg Phe Ile Val Leu Ser Asn Asn Tyr
 20 25

<210> 16
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

Lys Lys His Glu Ala Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly
 1 5 10 15

Ser Cys Lys Arg Gly Pro
 20

<210> 17
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

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

Gly Pro Thr Gly Arg Gly Glu Arg Gly Pro Arg Gly Ile Thr Gly Lys
 20 25 30

<210> 18
 <211> 12
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Gly Glu Phe Tyr Asp Leu Arg Leu Lys Gly Asp Lys
1 5 10

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

His Arg His His Pro Arg Glu Met Lys Lys Arg Val Glu Asp Leu
1 5 10 15

<210> 20

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Glu Lys Thr Leu Arg Lys Trp Leu Lys Met Phe Lys Lys Arg
1 5 10

<210> 21

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Ala Glu Ala Ala Ala Arg Ala Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg Ala
1 5 10 15

Ala Ala Arg

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 22

ggaccagagg accctttgcg

20

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 23

agctgacttt gtaggcttca gc

22

<210> 24
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 24

Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ala Gly Gly Ala Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Gly Cys Ala Ala Gly Gly Gly Gly Thr Thr Ala Gly Gly Ala Ala Ala
 20 25 30

Gly Ala Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Thr Cys Cys Ala Thr Gly Cys
 35 40 45

Cys Thr Thr Ala Ala Gly Ala Ala Ala Thr Ala Cys Ala Ala Gly
 50 55 60

REIVINDICAÇÕES

1. Composto, caracterizado pelo fato de que tem a fórmula: B-(J)_n-(Z)_q, ou (Z)_q-(J)_n-B, em que:

5 B é um peptídeo que promove o crescimento e/ou sobrevivência de cardiomiócitos;

J é um aminoácido proteinogênico ou um ligador;

Z é um peptídeo de ligação de heparina;

n é um número inteiro de 0 a 10; e

q é um número inteiro de 1 a 5.

10 2. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito composto é uma proteína de fusão em que J é um aminoácido proteinogênico e B é fator de crescimento derivado de insulina 1 (IGF-1) ou fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF).

15 3. Composto de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que Z é selecionado do grupo que consiste de:

KKKRKGKGLGKKRDPCLKKYKG (SEQ ID NO:3);

RIQNLLKITNLRIKFVK (SEQ ID NO:4);

PYVVLPRPVCFEKGMNYTVR (SEQ ID NO:5);

KQNCLSSRASFRGCVRNLRLSR (SEQ ID NO:6);

KDGRKICLDLQAPLYKKIIKKLLES (SEQ ID NO:7);

CKNGGFFLRIAPDGRVDGVREK (SEQ ID NO:8);

YSSWYVALKRTGQYKLGPKTGPGQKAILFLP (SEQ ID NO:9);

AKLNCRLYRKANKSSKLVSANRLFGDK (SEQ ID NO:10);

LRKLRKRLLRDADDLQKRLAVYQ (SEQ ID NO:11);

PLQERAQAAWQERLRARMEEMGSRTDRLDEVKEQVAERAKL
(SEQ ID NO:12);

KGKMHKTCYY (SEQ ID NO:13);

MGKMHKTCYN (SEQ ID NO:14);

PPTIIWKHKGRDVILKKDVRFIVLSNNY (SEQ ID NO:15);

KKHEAKNWFVGLKKNGSCKRGP (SEQ ID NO:16);
 KGGRGTPGKPGPRGQRGPTGRGERGPRGITGK (SEQ ID NO:17);
 GEFYDLRLKGDK (SEQ ID NO:18);
 HRHHPREMKKRVEDL (SEQ ID NO:19);
 EKTLRKWLKMFKKR (SEQ ID NO:20); e
 AEAAARAAARRAARRAAAR (SEQ ID NO:21).

4. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizado pelo fato de que $n = 0$.

5. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo fato de que $q = 1$.

5 6. Molécula de DNA, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de nucleotídeo que codifica a proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações de 2 a 5.

7. Método para tratar um paciente com tecido cardíaco danificado, caracterizado pelo fato de que compreende:

10 a) incubar cardiomiócitos com o composto como definido na reivindicação 1 por um período de tempo e sob condições suficientes para permitir que o dito composto se ligue aos ditos cardiomiócitos;

b) injetar ou implantar os cardiomiócitos incubados da etapa a) no tecido cardíaco do dito paciente.

15 8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o dito composto é uma proteína de fusão em que J é um aminoácido proteinogênico e B é fator de crescimento derivado de insulina 1 (IGF-1) ou fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF).

20 9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que Z na dita proteína de fusão é selecionado do grupo que consiste de:

KKKRKGKGLGKKRDPCLKKYKG (SEQ ID NO:3);
 RIQNLLKITNLRIKFVK (SEQ ID NO:4);

PYVVLPRPVCFEKGMNYTVR (SEQ ID NO:5);
 KQNCLSSRASFRGCVRNRLRSR (SEQ ID NO:6);
 KDGRKICLDLQAPLYKKIHKLLS (SEQ ID NO:7);
 CKNGGFFLRIAPDGRVDGVREK (SEQ ID NO:8);
 YSSWYVALKRTGQYKLGPKTGPGQKAILFLP (SEQ ID NO:9);
 AKLNCRLYRKANKSSKLVSANRLFGDK (SEQ ID NO:10);
 LRKLRKRLLRDADDLQKRLAVYQ (SEQ ID NO:11);
 PLQERAQAAWQERLRARMEEMGSRTDRLDEVKEQVAERAKL
 (SEQ ID NO:12);
 KGKMHKTCYY (SEQ ID NO:13);
 MGKMHKTCYN (SEQ ID NO:14);
 PPTIWKHKGRDVILKKDVRFIVLSNNY (SEQ ID NO:15);
 KKHEAKNWFVGLKKNNGSCKRGP (SEQ ID NO:16);
 KGGRGTPGKPGPRGQRGPTGRGERGPRGITGK (SEQ ID NO:17);
 GEFYDLRLKGDK (SEQ ID NO:18);
 HRHHPREMKKRVEDL (SEQ ID NO:19);
 EKTLRKWLKMFKKR (SEQ ID NO:20); e
 AEAAARAAARRAARRAAAR (SEQ ID NO:21).

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que $n = 0$ na dita proteína de fusão.

11. Método de acordo com as reivindicações 9 ou 10, caracterizado pelo fato de que $q = 1$ na dita proteína de fusão.

5 12. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que os ditos cardiomiócitos são derivados de células tronco embrionárias.

10 13. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o dito dano ao tecido cardíaco é o resultado de uma infartação miocárdica.

14. Método para tratar um paciente para reparar cartilagem

danificada, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) incubar condrócitos com o composto como definido na reivindicação 1 por um período de tempo e sob condições suficientes para permitir que o dito composto se ligue aos ditos condrócitos; e

5 b) injetar ou implantar os condrócitos incubados da etapa a) no sítio de dano à cartilagem.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o dito composto é uma proteína de fusão em que J é um aminoácido proteinogênico e B é fator de crescimento derivado de insulina 1 (IGF-1) ou fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF).

16. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que Z na dita proteína de fusão é selecionado do grupo que consiste de:

KKKRKGKGLGKKRDPCLKKYKG (SEQ ID NO:3);

RIQNLLKITNLRIKFVK (SEQ ID NO:4);

PYVVLPRPVCFEKGMNYTVR (SEQ ID NO:5);

KQNCLSSRASFRGCVRNLRLSR (SEQ ID NO:6);

KDGRKICLDLQAPLYKKIHKLLLES (SEQ ID NO:7);

CKNGGFFLRIAPDGRVDGVREK (SEQ ID NO:8);

YSSWYVALKRTGQYKLGPKTGPGQKAILFLP (SEQ ID NO:9);

AKLNCRLYRKANKSSKLVSANRLF GDK (SEQ ID NO:10);

LRKLRKRLLRDADDLQKRLAVYQ (SEQ ID NO:11);

PLQERAQAAWQERLRARMEEMGSRTDRLDEVKEQVAERAKL
(SEQ ID NO:12);

KGKMHKTCYY (SEQ ID NO:13);

MGKMHKTCYN (SEQ ID NO:14);

PPTIIWKHKGRDVILKKDVRFIVLSNNY (SEQ ID NO:15);

KKHEAKNWFVGLKKN GSCKRGP (SEQ ID NO:16);

KGGRGTPGKPGPRGQRGPTGRGERGPRGITGK (SEQ ID NO:17);

GEFYDLRLKGDK (SEQ ID NO:18);
 HRHHPREMKKRVEDL (SEQ ID NO:19);
 EKTLRKWLKMFKKR (SEQ ID NO:20); e
 AEAAARAAARRAARRAAAR (SEQ ID NO:21).

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que $n = 0$ na dita proteína de fusão.

18. Método de acordo com as reivindicações 16 ou 17, caracterizado pelo fato de que $q = 1$ na dita proteína de fusão.

5 19. Método para tratar um paciente para reparar tecido do nervo danificado, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) incubar neurônios com o composto como definido na reivindicação 1 por um período de tempo e sob condições suficientes para permitir que o dito composto se ligue aos ditos neurônios; e

10 b) injetar ou implantar os neurônios incubados da etapa a) no sítio de dano ao tecido do nervo.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o dito composto é uma proteína de fusão em que J é um aminoácido proteinogênico e B é fator de crescimento derivado de insulina 1 (IGF-1) ou fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF).

21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que Z na dita proteína de fusão é selecionado do grupo que consiste de:

KKKRKGKGLGKKRDPCLKKYKG (SEQ ID NO:3);
 RIQNLLKITNLRIKFVK (SEQ ID NO:4);
 PYVVLPRPVCFEKGMNYTVR (SEQ ID NO:5);
 KQNCLSSRASFRGCVRNLRLSR (SEQ ID NO:6);
 KDGRKICLDLQAPLYKKIIKKLLES (SEQ ID NO:7);
 CKNGGFFLRIAPDGRVDGVREK (SEQ ID NO:8);
 YSSWYVALKRTGQYKLGPKTGPGQKAILFLP (SEQ ID NO:9);

AKLNCRLYRKANKSSKLVSANRLFGDK (SEQ ID NO:10);
 LRKLRKRLLRDADDLQKRLAVYQ (SEQ ID NO:11);
 PLQERAQAAWQERLRARMEEMGSRTDRLDEVKEQVAERAKL
 (SEQ ID NO:12);
 KGKMHKTCYY (SEQ ID NO:13);
 MGKMHKTCYN (SEQ ID NO:14);
 PPTIIWKHKGRDVILKKDVRFIVLSNNY (SEQ ID NO:15);
 KKHEAKNWFVGLKKNNGSCKRGP (SEQ ID NO:16);
 KGGRGTPGKPGPRGQRGPTGRGERGPRGITGK (SEQ ID NO:17);
 GEFYDLRLKGDK (SEQ ID NO:18);
 HRHHPREMKKRVEDL (SEQ ID NO:19);
 EKTLRKWLKMFKKR (SEQ ID NO:20); e
 AEAAARAAARRAARRAAAR (SEQ ID NO:21).

22. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que $n = 0$ na dita proteína de fusão.

23. Método de acordo com as reivindicações 21 ou 22, caracterizado pelo fato de que $q = 1$ na dita proteína de fusão.

5 24. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o dito tecido do nervo danificado é o resultado de uma doença neurodegenerativa, acidente vascular cerebral ou lesão.

25. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o dito tecido do nervo danificado é o resultado de ALS.

10 26. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que os ditos neurônios são neurônios motores corticospinal.

RESUMO

“COMPOSTO, MOLÉCULA DE DNA, E, MÉTODOS PARA TRATAR
UM PACIENTE COM TECIDO CARDÍACO DANIFICADO, PARA
TRATAR UM PACIENTE PARA REPARAR CARTILAGEM
5 DANIFICADA E PARA TRATAR UM PACIENTE PARA REPARAR
TECIDO DO NERVO DANIFICADO”

A presente invenção está direcionada às proteínas em que um
peptídeo de ligação de heparina é fundido a um fator de crescimento que
promove o crescimento e a sobrevivência celulares. O composto assim
10 formado é ligado à superfície de células que são depois administradas ao
tecido danificado. O fator de crescimento é deste modo mantido no sítio de
administração onde o mesmo promove o reparo.