



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

(21) PI 0714383-4 A2



(22) Data de Depósito: 10/07/2007
(43) Data da Publicação: 30/04/2013
(RPI 2208)

(51) Int.Cl.:
A61K 38/00

(54) Título: MÉTODOS PARA TRATAR E LIMITAR
DESORDENS FIBRÓTICAS E QUELOIDES

(30) Prioridade Unionista: 12/07/2006 US 60830279,
01/10/2006 US 60849041, 01/10/2006 US 60849041, 12/07/2006 US
60830279

(73) Titular(es): The Arizona Board Of Regents, A Body Corporate
Acting For And On Behalf Of Arizona State

(72) Inventor(es): Alyssa Panitch, Charles Robert Flynn, Colleen
M. Brophy, Elizabeth J. Furnish, Luciana Biagini Lopes, Padmini
Komalavilas

(74) Procurador(es): Mirian Oliveira da Rocha Pitta

(86) Pedido Internacional: PCT US2007073144 de
10/07/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/008772de
17/01/2008

(57) Resumo: A presente invenção fornece métodos para e/ou
limitar desordens fibróticas e/ou tratar ou cicatrizes selecionado do
grupo composto de quelóides e cicatrizes hipertróficas compreendendo
administrar para um indivíduo que disto necessite uma quantidade
efetiva para tratar e/ou limitar cicatrizes selecionadas do grupo
composto de quelóide e cicatrizes hipertróficas de um
polipeptídeo,compreendendo um relatado polipeptídeo HSP20.

MÉTODO PARA TRATAR E LIMITAR DESORDEM FIBRÓTICA E QUELÓIDES

5 REFERÊNCIAS CRUZADAS PARA APLICAÇÕES RELATIVAS

Esta aplicação reivindica a prioridade para com aplicações de patentes provisórias U. S. números 60/830,279, depositada em 12 de julho de 2006, e 60/849,041, depositada em 2 de outubro de 2006, ambas das quais são incorporadas inteiramente por referência neste documento.

10 Declaração de Apoio do Governo

Este trabalho foi apoiado pelo menos em parte por NIH concessão K25HL074968 e NIH STTR concessão 6 R42 HL071309-03. O Governo dos Estados Unidos possui seguramente direitos na invenção.

Antecedentes

15 Quelóides e cicatrizes hipertróficas são fibras proliferativas anormais na tentativa de cicatrização, acontece uma desordem deste mecanismo devido à excessiva produção, depósito e contração da matriz extracelular, a qual resulta na deformidade funcional e cosmética (Leask e Abraham, 2004). Não existe de uso comum tratamento efetivo para estas condições.

20

Resumo da Invenção

Em um primeiro aspecto, a presente invenção fornece métodos para tratamento e/ou limitação de desordens fibróticas que compreende administrar para um indivíduo, com necessidade disto, uma quantidade efetiva para tratar e/ou limitar desordens fibróticas de um polipeptídeo compreendendo a sequência de acordo com a fórmula geral I: polipeptídeo

25 X1-A(X2)APLP-X3 (**SEQ ID NO: 302** e **SEQ ID NO: 316**)

caracterizado por: X1 ser 0-14 ácidos de amino da sequência da quebra por calor da proteína 20 entre resíduos 1 e 14 de **SEQ ID NO: 298**;

30 X2 ser selecionado do grupo composto de S, T, Y, D, E, hidroxilisine, hidroxiprolina, análogo de fosfoserines, e análogos de fosfotirosine; e

X3 ser selecionado do grupo composto de (a) 0-140 ácidos de amino de resíduos 21 e 160 de **SEQ ID NO:298**; e (b) 0, 1, 2, ou 3 ácidos de amino de uma sequência de gêneros Z1-Z2-Z3, caracterizado por: Z1 ser selecionado do grupo composto de G e D;

5 Z2 ser selecionado do grupo composto de L e K; e

 Z3 ser selecionado do grupo composto de S, T, e K.

 Em um segundo aspecto, a presente invenção fornece métodos para tratamento e/ou limitação da cicatriz selecionada do grupo composto de quelóides e cicatrizes hipertróficas compreendendo administrar para um

10 indivíduo com necessidade disto uma quantidade efetiva para tratar e/ou limitar cicatrizes selecionadas do grupo composto de quelóides e cicatrizes hipertróficas de um polipeptídeo compreendendo a sequência de acordo com a fórmula geral I:

 X1-A(X2)APLP-X3 (**SEQ ID NO: 302** e **SEQ ID NO: 316**)

15 caracterizado por:

X1 ser 0-14 ácidos de amino da sequência de quebra de proteína por calor 20 entre resíduos 1 e 14 de **SEQ ID NO: 298**;

X2 ser selecionado do grupo composto de S, T, Y, D, E, hidroxilisine, hidroxiprolina, análogo de fosfoserines, e análogos de fosfotirosine; e

20 X3 ser selecionado do grupo composto de (a) 0-140 ácidos de amino de resíduos 21 e 160 de **SEQ ID NO:298**; e (b) 0, 1, 2, ou 3 ácidos de amino de uma sequência de gêneros Z1-Z2-Z3, caracterizado por: Z1 ser selecionado do grupo composto de G e D;

 Em várias concretizações o primeiro e/ou segundo aspecto da invenção,

25 o indivíduo em necessidade disto é descendente Asiático ou Africano, e/ou o indivíduo com necessidade disto possui um elevado nível em um tecido alvo de uma ou mais biomarcas selecionado do grupo composto de expressão de TGFβ1; expressão de TGFβ2; expressão de CTGF; cofilinas fosforilada; HSP27 fosforilada; e expressão da actina α - músculo liso

Descrição Detalhada da Invenção

A designação de letra simples para ácidos de amino é usada predominantemente neste documento. Como é bem conhecida para um experiente na matéria, tal designação de letras simples são como segue:

5 A é alanina; C é cisteína; D é ácido aspártico; E é ácido glutâmico; F é fenilalanina; G é glicina; H é histidina; I é isoleucina; K é lisina; L é leucina; M é metionina; N é asparagina; P é prolina; Q é glutamina; R é arginina; S é serine; T é treonina; V é valina; W é triptofan; e Y é tirosina.

10 Como usado neste documento, as formas singulares "um", "uma", "o" e "a" incluem plurais, a menos que o contexto claramente expresse de outra maneira. Por exemplo, referência para um "polipeptídeo" significa um ou mais polipeptídeos.

15 O descrito neste documento demonstra que os polipeptídeos usados nos métodos da invenção diminuem a transformação do fator de crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)-induzindo conectiva expressão de fator de crescimento do tecido (CTGF) e reduzindo a síntese associada de colágeno. O efeito foi associado com troca na morfologia da célula (morfologia estrelada e rompimento de fibras de stress). Uma vez que o citoesqueleto de actina pode ficar intacto por expressa de CTGF, isto indica que a habilidade do polipeptídeos da invenção
20 para alterar a dinâmica de citoesqueleto tem importantes implicações para a redução de níveis de CTGF nos fibroblastos de quelóide. Uma vez que atividade de CTGF, apresenta uma regra central no desenvolvimento e manutenção da resposta fibrótica, os métodos da invenção são largamente aplicáveis para tratamento de quelóides e um largo número de desordens
25 fibróticas.

Então, em um aspecto, a presente invenção fornece métodos para tratamento e/ou limitar desordens fibróticas e/ou cicatrizes selecionadas do grupo composto de quelóides e cicatrizes hipertróficas, compreendendo administrar para um indivíduo com necessidade disto uma quantidade efetiva
30 para tratar e/ou limitar desordens fibróticas e/ou cicatrizes selecionadas do grupo composto de quelóides e cicatrizes hipertróficas de um polipeptídeo

compreendendo ou composto de uma sequência de acordo com a fórmula geral I:

X1-A(X2)APLP-X3 (**SEQ ID NO: 302** e **SEQ ID NO: 316**)

caracterizado por:

- 5 X1 ser 0-14 ácidos de amino da sequência de quebra de proteínas por calor
20 entre resíduos 1 e 14 de **SEQ ID NO: 298**;

X2 ser selecionado do grupo composto de S, T, Y, D, E, hidroxilisine, hidroxiprolina, análogo de fosfoserines e análogos de fosfotirosine; e

- 10 X3 é selecionado do grupo composto de (a) 0-140 ácidos de amino de
resíduos 21 e 160 de **SEQ ID NO: 298**; e (b) 0, 1, 2, ou 3 ácidos de amino de
uma sequência de gêneros Z1-Z2-Z3, caracterizado por:

Z1 é selecionado do grupo composto de G e D;

Z2 ser selecionado do grupo composto de L e K; e

Z3 ser selecionado do grupo composto de S, T, e K.

- 15 Em uma preferencial concretização, X1 é WLRR (**SEQ ID NO: 1**); Z1 é
G; Z2 é L; e Z3 é K. Nesta concretização, é deste modo preferencial que o
polipeptídeo da fórmula geral compreender ou consistir de um ácido amino
sequência, de acordo com a **SEQ ID NO: 300** (WLRRAPAPLPGLK),
caracterizado por o "pS" representar um resíduo de serina fosforilada. Em uma
20 também preferencial concretização, o polipeptídeo para uso no método da
invenção compreende ou consiste de um ácido amino sequência de acordo
com a fórmula B1-WLRRAPAPLPGLK-B2 (**SEQ ID NO: 317**),
caracterizado por, pelo menos, um de B1 e B2 são selecionados do grupo
composto de YARAAARQARA (**SEQ ID NO: 281**) e YGRKKRRQRRR (**SEQ ID**
25 **NO: 299**).

- 30 Em um exemplo, um "indivíduo em necessidade disto" é um indivíduo
que sofre ou sofrerá (por exemplo, via um procedimento cirúrgico) uma ferida a
qual poderá resultar em formação de cicatriz selecionada do grupo composto
de quelóides e cicatrizes hipertróficas e/ou uma desordem fibrótica, ou
resultando de formação de cicatriz selecionada do grupo composto de
quelóides e cicatrizes hipertróficas e/ou uma desordem fibrótica. Como usado
neste documento, o termo "ferida" refere-se largamente para ferimento da pele

e tecido subcutâneo. Tais feridas incluem, mas não são limitadas para lacerações; queimaduras; punções; úlceras de pressão; úlceras de leito; aftas; trauma, mordidas; fistulas; úlceras; lessões causadas por infecções; feridas periodontal; feridas periodontal de endodontia; síndrome de boca queimada; feridas de laparotomia; feridas cirúrgicas; feridas incisional contraturas depois de queimaduras; e feridas resultantes de procedimentos cirúrgicos cosméticos.

Como usado neste documento, uma "quelóide" é uma cicatriz que resulta em um crescimento excessivo de tecido do lado de uma lesão de cicatriz de pele. Quelóides são usualmente acompanhadas por várias coceiras (sarna), sofrimento severo e troca na textura. Em vários casos, pode afetar movimento da pele. Como usado neste documento, "cicatrices hipertróficas" são cicatrizes aumentadas que não crescem além dos limites da ferida original e podem reduzir com o tempo.

Como usado neste documento, a frase "reduzir formação de cicatriz selecionada do grupo composto de quelóides e cicatrizes hipertróficas" significa qualquer redução em quelóide ou formação de cicatriz hipertrófica que forneça um benefício terapêutico ou cosmético para o paciente. Desta maneira, benefício terapêutico ou cosmético pode ser conseguido, por exemplo, por decréscimo do tamanho e/ou profundidade de uma quelóide ou cicatriz hipertrófica relativa para quelóide ou formação de cicatriz hipertrófica na ausência de tratamento com os métodos da invenção, ou por redução do tamanho de uma quelóide existente ou cicatriz hipertrófica.

A presente invenção, por prover métodos para redução de formação de cicatriz selecionada do grupo composto de quelóides e cicatrizes hipertróficas, será clinicamente utilizada para tratamento de todos os tipos de feridas para reduzir quelóide e formação de cicatriz hipertrófica, ambas para redução inicial de quelóide ou formação de cicatriz hipertrófica, e para terapêutico tratamento de existentes quelóides ou cicatrizes hipertróficas (i.e.: retirando quelóide ou cicatriz hipertrófica depois de sua formação, tratamento com os compostos da invenção, e permitindo a quelóide ou cicatriz hipertrófica cicatrizar mais lentamente).

Em uma preferencial concretização, indivíduos com necessidade de tratamento ou limitação de cicatrizes selecionadas do grupo composto de quelóides e cicatrizes hipertróficas são indivíduos altamente pigmentados, incluindo, mas não limitando para indivíduos de descendência asiática ou africana, que são suscetíveis para quelóides e cicatrizes hipertróficas, e então podem ser beneficiados dos métodos da invenção para terapia profilática para limitar desenvolvimento de quelóides ou cicatrizes hipertróficas, tanto quanto para tratamento de quelóides ou cicatrizes hipertróficas.

Em várias outras preferenciais concretizações, indivíduos com necessidade de terapia para tratamento ou limitar desordens fibróticas são aqueles que sofrem de ou em risco de uma ou mais das desordens fibróticas associado com expressão TGF β -induzindo CTGF, incluindo, mas não limitando para tecidos fibrosos (incluindo mas não limitando para fibrose pulmonar idiopática, fibrose hepática, fibrose, fibrose retroperitoneal, fibrose cística, fibrose dos vasos sanguíneos e tecidos fibrosos do coração); nefropatia de diabetes, glomerulosclerose, e nefropatia de IgA (causas de insuficiência do ventre e a necessidade para diálises e retransplante); retinopatia de diabetes e degeneração da mácula (doenças fibróticas do olho e causas derivadas de cegueira); cirrose e atresia biliar (causa derivada de fibrose e deficiência do fígado); deficiência de coração congestivo; fibrose de pulmão; escleroderma; aderência abdominal; e fibrose intestinal.

Em várias outras preferenciais concretizações de todas as concretizações descritas neste documento, indivíduos com necessidade de terapia para tratamento e/ou limitar desordens fibróticas e/ou cicatrizes selecionadas do grupo composto de quelóides e cicatrizes hipertróficas são estas com níveis elevados de um ou mais das seguintes biomarcas:

Expressão de transformação crescimento fator beta 1 ("TGF β 1");

Expressão de transformação crescimento fator beta 2 ("TGF β 2");

Expressão de conectivo crescimento do tecido fator ("CTGF");

Cofilina fosforilada;

HSP27 fosforilada; e

expressão da actina α - músculo liso.

Como descrito acima, os polipeptídeos da invenção inibem TGF β 1-induzindo expressão de CTGF, TGF β 1-induzida expressão de α -SMA e fosforilação de cofilinas e HSP27 em fibroblastos de quelóide humana, todos os quais são elevados em condições fibróticas, indicando que estes indivíduos com elevados níveis destas biomarcas podem especialmente beneficiar-se dos métodos da presente invenção. Como usado neste documento, um "elevado" nível de uma ou mais biomarcas significa qualquer acréscimo acima do normal para o indivíduo ou similarmente situada em um relevante tecido alvo. Esses tais tecidos alvos são afetados por condições fibróticas, incluindo, mas não limitando para sangue, ferida exudante, e biópsias feitas de tecidos afetados por fibrose incluindo, mas não limitando para esses descritos acima (pele, ventre, pulmão, fígado, peritônio, vaso sanguíneo, coração, retina, etc.) Em várias concretizações, um indivíduo com necessidade disto é um que possui um nível de uma ou mais das biomarcas relatadas 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50%, 75%, 100%, ou mais acima do nível normal. Determinar o nível de uma ou mais biomarcas pode ser feita usando técnicas padrões na matéria para medir proteína e/ou expressão de gene, incluindo, mas não limitando, para estas descritas acima.

Um nível "normal" de uma ou mais destas biomarcas pode ser estabilizado por qualquer maneira adequada incluindo, mas não limitando para determinar um nível normal no indivíduo ou similarmente estabelecer indivíduos na ausência de condições fibróticas e/ou quelóides, ou qualquer maneira adequada para estabilizar um padrão para referência.

Como usado neste documento, "tratar" ou "tratamento" significa realizar um ou mais dos seguintes: (a) reduzir a severidade do distúrbio; (b) limitar ou prevenir desenvolvimento de sintomas característicos do(s) distúrbio(s) sendo tratado; (c) inibir piora de sintomas característico do(s) distúrbio(s) sendo tratado; (d) limitar ou prevenir recorrência do(s) distúrbio(s) em pacientes que possuem previsibilidade do(s) distúrbio(s); e (e) limitar ou prevenir recorrência de sintomas em pacientes que possuem sintomática previsão para o(s) distúrbio(s).

Como usado neste documento, o termo "limitação" ou "limitar" significa limitar o distúrbio em indivíduos com risco de desenvolver o distúrbio.

Em outro aspecto, a presente invenção fornece métodos para monitorar a eficiência dos métodos de tratamento da invenção, compreendendo tratar o indivíduo como descrito neste documento, e subsequentemente determinar níveis de um ou mais das seguintes biomarcas:

expressão de TGF β 1;

expressão de TGF β 2;

expressão de CTGF;

cofilina fosforilada;

HSP27 fosforilada; e

expressão da actina α - músculo liso.

Nestas concretizações, é preferencial que o nível de uma ou mais biomarcas sejam determinadas antes do tratamento para determinar um nível pré-tratamento, seguindo por determinar os níveis de biomarcas pós-tratamento. O tempo para tal subsequente determinação de nível de biomarca pode ser qualquer que é determinado correntemente para um atendimento médico (isto é, tratamento uma vez por semana; duas vezes por semana; uma vez em semanas alternadas, etc.). Enquanto a eficiência do tratamento pode ser verificada por efeitos dos sintomas experimentados pelo indivíduo, monitorando os níveis da biomarca pode-se obter informações adicionais sobre a eficiência do tratamento que é benéfica para um atendimento médico ao determinar a continuidade de um regime de tratamento. Por exemplo, se o regime de tratamento ainda não produziu uma melhora notável nos sintomas do indivíduo, mas os níveis de biomarcas indicam que o tratamento vem reduzindo os níveis de biomarcas, então o médico pode decidir por continuar o regime de tratamento com a mesma dosagem e frequência. Alternativamente, se ainda os sintomas ou os níveis de biomarca não são impactados pelo tratamento, o atendimento médico pode decidir por incrementar a dosagem e/ou frequência, ou por determinar uma combinação de tratamento (incluindo, mas não limitando para, terapia de anticorpos TGF- β e/ou terapias designadas

para inibir a expressão de actina α - músculo liso e/ou HSP27 fosforilada e/ou cofilinas).

Referências anteriores para a fórmula geral, resíduos 15-21 de HSP20, com possíveis substituições de resíduo 16 de HSP20 da forma do núcleo
5 estrutural do polipeptídeos de acordo para fórmula geral I (A(X2)APLP) (**SEQ ID NO: 2**). A sequência completa de HSP20 é apresentada como SEQ ID NO: 298, e é mostrada abaixo:

Met Glu Ile Pro Val Pro Val Gln Pro Ser Trp Leu Arg Arg Ala Ser Ala Pro
Leu Pro Gly Leu Ser Ala Pro Gly Arg Leu Phe Asp Gln Arg Phe Gly Glu Gly
10 *Leu Leu Glu Ala Glu Leu Ala Ala Leu Cys Pro Thr Thr Leu Ala Pro Tyr Tyr*
Leu Arg Ala Pro Ser Val Ala Leu Pro Val Ala Gln Val Pro Thr Asp Pro Gly
His Phe Ser Val Leu Leu Asp Val Lys His Phe Ser Pro Glu Glu Ile Ala Val
Lys Val Val Gly Glu His Val Glu Val His Ala Arg His Glu Glu Arg Pro Asp
Glu His Gly Phe Val Ala Arg Glu Phe His Arg Arg Tyr Arg Leu Pro Pro Gly
15 *Val Asp Pro Ala Ala Val Thr Ser Ala Leu Ser Pro Glu Gly Val Leu Ser Ile*
Gln Ala Ala Pro Ala Ser Ala Gln Ala Pro Pro Pro Ala Ala Ala Lys.

Os resíduos realçados representam ácidos de amino 15-21.

X1 é 0-14 ácidos de amino de SEQ ID NO: 298 entre resíduos 1 e 14 de
20 **SEQ ID NO:298** (mostrada em itálico acima). Então, se X1 é 5 ácidos de amino de resíduos 1 e 14 de **SEQ ID NO:298**, então X1 pode ser o 5 ácidos de amino adjacentes para resíduos 15-21, exemplo: SWLRR (**SEQ ID NO:303**).
Similarmente, onde X1 tem o seguinte número de ácidos de amino de resíduos 1-14 de **SEQ ID NO:298**, identificado como mostrado abaixo:

1 ácido amino de **SEQ ID NO:298**: R
25 2 ácidos de amino de **SEQ ID NO:298**: RR
3 ácidos de amino de **SEQ ID NO:298**: LRR (**SEQ ID NO: 304**)
4 ácidos de amino de **SEQ ID NO:298**: WLRR (**SEQ ID NO: 1**)
6 ácidos de amino de **SEQ ID NO:298**: PSWLRR (**SEQ ID NO: 305**)
7 ácidos de amino de **SEQ ID NO:298**: NPSWLRR (**SEQ ID NO: 306**)
30 8 ácidos de amino de **SEQ ID NO:298**: VNPSWLRR (**SEQ ID NO: 307**)
9 ácidos de amino de **SEQ ID NO:298**: PVNPSWLRR (**SEQ ID NO: 308**)

10 ácidos de amino de **SEQ ID NO:298:VPVNPSWLRR (SEQ ID NO: 309)**

11 ácidos de amino de **SEQ ID NO:298:PVPVNPSWLRR (SEQ ID NO: 310)**

5 12 ácidos de amino de **SEQ ID NO:298:IPVPPVNPSWLRR (SEQ ID NO: 311)**

13 ácidos de amino de **SEQ ID NO:298:EIPVPPVNPSWLRR (SEQ ID NO: 312)**

10 14 ácidos de amino de **SEQ ID NO:298:MEIPVPPVNPSWLRR (SEQ ID NO: 313)**

Também em uma concretização, X1 é 0, 1, 2, 3, ou 4 ácidos de amino da sequência WLRR (**SEQ ID NO:1**).

Em outra concretização, X3 é 0-140 ácidos de amino entre resíduos 21 e 160 de **SEQ ID NO:298**. De acordo com esta concretização, X3 pode ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 ou 140 ácidos de amino entre resíduos 21 e 160 de **SEQ ID NO:298**.

Por exemplo, se X3 é 5 ácidos de amino entre resíduos 21 e 160 de **SEQ ID NO:298**, então X3 pode ser o 5 ácidos de amino adjacente para resíduos 15-21, exemplo: GLSAP (**SEQ ID NO: 314**). Outra possível sequência X3 pode ser evidente para um experiente na matéria baseada em ensinamentos apresentados neste documento.

Em outra concretização, X3 é 0, 1, 2, ou 3 ácidos de amino de uma sequência de gêneros Z1-Z2-Z3, caracterizado por: Z1 ser selecionado do grupo composto de G e D;

Z2 ser selecionado do grupo composto de L e K; e

Z3 ser selecionado do grupo composto de S, T, e K.

Por exemplo, se X3 é 2 ácidos de amino de uma sequência do gêneros Z1-Z2-Z3, então a possibilidades para X3 ser GL, GK, DL e DK. Outra possível X3 sequências nesta concretização pode ser evidente para um experiente na matéria baseado nos ensinamentos apresentados neste documento.

5 De acordo para várias concretizações do polipeptídeos de fórmula geral I, X2 é S, T, Y, D E, um simulado de fosfoserina ou um simulado de fosfotirosina. É preferencial que X2 seja S, T, ou Y; mais preferencial que X2 seja S ou T, e melhor ainda que X2 seja S. Nesta concretizações onde X2 é S, T, ou Y, é mais preferencial que X2 seja fosforilada. Quando X2 é D ou E,
10 estes resíduos têm uma carga negativa que simula um estado fosforilado. Os polipeptídeos da fórmula geral I são favoravelmente efetivos em métodos da invenção quando X2 é fosforilada, é um similar de fosfoserina ou fosfotirosina, ou é um outro similar de um resíduo fosforilado de ácido amino, tal como um resíduo D ou E. Exemplos de similares de fosfoserina incluem, mas não são
15 limitados para, sulfoserina, similar de ácido amino contendo um metileno substituição para o oxigênio fosfato, 4-fosfono(difluorometil)fenilalanina, e L-2-amino-4-(fosfono)-4,4-ácido difuorobutanoico. Outro similar de fosfoserina pode ser feita por estes experientes na matéria. Exemplos de similares fosfotirosina incluem, mas não são limitados para, fosfonometilfenilalanina,
20 difluorofosfonometilfenilalanina, fluoro-O-maloniltirosina e O-maloniltirosina.

Então, de acordo com estas várias concretizações, uma amostra representativa de polipeptídeos, de acordo com fórmula geral I para uso em métodos da invenção incluem, mas não são limitados para polipeptídeos, compreendendo ou consistindo de composto das seguintes sequências:
25 (ASAPLP) (**SEQ ID NO:3**); (ATAPLP) (**SEQ ID NO:4**); (RASAPLP) (**SEQ ID NO:5**); (RATAPLP) (**SEQ ID NO:6**); (AYAPLP) (**SEQ ID NO:7**); (RAYAPLP) (**SEQ ID NO:8**); (RRASAPLP) (**SEQ ID NO:9**); (LRRASAPLP) (**SEQ ID NO:10**); (WLRRASAPLP); (**SEQ ID NO:11**) (RRATAPLP) (**SEQ ID NO:12**); (LRRATAPLP) (**SEQ ID NO:13**); (WLRRATAPLP) (**SEQ ID NO:14**);
30 (RRAYAPLP) (**SEQ ID NO:15**); (LRRAYAPLP) (**SEQ ID NO:16**); (WLRRAYAPLP) (**SEQ ID NO:17**); (RRASAPLPG) (**SEQ ID NO:18**); (RRASAPLPD) (**SEQ ID NO:19**); (RRASAPLPGL) (**SEQ ID NO:20**);

(RRASAPLPGK) (SEQ ID NO:21); (RRASAPLPDL) (SEQ ID NO:22);
 (RRASAPLPDK) (SEQ ID NO:23); (RRASAPLPGLS) (SEQ ID NO:24);
 (RRASAPLPGLT) (SEQ ID NO:25); (RRASAPLPGKS) (SEQ ID NO:26);
 (RRASAPLPGKT) (SEQ ID NO:27); (RRASAPLPDLS) (SEQ ID NO:28);
 5 (RRASAPLPDLT) (SEQ ID NO:29); (RRASAPLPDKS) (SEQ ID NO:30);
 (RRASAPLPDKT) (SEQ ID NO:31); (LRRASAPLPG) (SEQ ID NO:32);
 (LRRASAPLPD) (SEQ ID NO:33); (LRRASAPLPGL) (SEQ ID NO:34);
 (LRRASAPLPGK) (SEQ ID NO:35); (LRRASAPLPDL) (SEQ ID NO:36);
 (LRRASAPLPDK) (SEQ ID NO:37); (LRRASAPLPGLS) (SEQ ID NO:38);
 10 (LRRASAPLPGLT) (SEQ ID NO:39); (LRRASAPLPGKS) (SEQ ID NO:40);
 (LRRASAPLPGKT) (SEQ ID NO:41); (LRRASAPLPDLS) (SEQ ID NO:42);
 (LRRASAPLPDLT) (SEQ ID NO:43); (LRRASAPLPDKS) (SEQ ID NO:44);
 (LRRASAPLPDKT) (SEQ ID NO:45); (WLRRASAPLPG) (SEQ ID NO:46);
 (WLRRASAPLPD) (SEQ ID NO:47); (WLRRASAPLPGL) (SEQ ID NO:48);
 15 (WLRRASAPLPGK) (SEQ ID NO:49); (WLRRASAPLPDL) (SEQ ID NO:50);
 (WLRRASAPLPDK) (SEQ ID NO:51); (WLRRASAPLPGLS) (SEQ ID NO:52);
 (WLRRASAPLPGLT) (SEQ ID NO:53); (WLRRASAPLPGKS) (SEQ ID NO:54);
 (WLRRASAPLPGKT) (SEQ ID NO:55); (WLRRASAPLPDLS) (SEQ ID NO:56);
 (WLRRASAPLPDLT) (SEQ ID NO:57); (WLRRASAPLPDKS) (SEQ ID NO:58);
 20 (WLRRASAPLPDKT) (SEQ ID NO:59); (RRATAPLPG) (SEQ ID NO:60);
 (RRATAPLPD) (SEQ ID NO:61); (RRATAPLPGL) (SEQ ID NO:62);
 (RRATAPLPGK) (SEQ ID NO:63); (RRATAPLPDL) (SEQ ID NO:64);
 (RRATAPLPDK) (SEQ ID NO:65); (RRATAPLPGLS) (SEQ ID NO:66);
 (RRATAPLPGLT) (SEQ ID NO:67); (RRATAPLPGKS) (SEQ ID NO:68);
 25 (RRATAPLPGKT) (SEQ ID NO:69); (RRATAPLPDLS) (SEQ ID NO:70);
 (RRATAPLPDLT) (SEQ ID NO:71); (RRATAPLPDKS) (SEQ ID NO:72);
 (RRATAPLPDKT) (SEQ ID NO:73); (LRRATAPLPG) (SEQ ID NO:74);
 (LRRATAPLPD) (SEQ ID NO:75); (LRRATAPLPGL) (SEQ ID NO:76);
 (LRRATAPLPGK) (SEQ ID NO:77); (LRRATAPLPDL) (SEQ ID NO:78);
 30 (LRRATAPLPDK) (SEQ ID NO:79); (LRRATAPLPGLS) (SEQ ID NO:80);
 (LRRATAPLPGLT) (SEQ ID NO:81); (LRRATAPLPGKS) (SEQ ID NO:82);
 (LRRATAPLPGKT) (SEQ ID NO:83); (LRRATAPLPDLS) (SEQ ID NO:84);

(LRRATAPLPDLT) (SEQ ID NO:85); (LRRATAPLPDKS) (SEQ ID NO:86);
 (LRRATAPLPDKT) (SEQ ID NO:87); (WLRRATAPLPG) (SEQ ID NO:88);
 (WLRRATAPLPD) (SEQ ID NO:89); (WLRRATAPLPGL) (SEQ ID NO:90);
 (WLRRATAPLP GK) (SEQ ID NO:91); (WLRRATAPLPDL) (SEQ ID NO:92);
 5 (WLRRATAPLPDK) (SEQ ID NO:93); (WLRRATAPLPGLS) (SEQ ID NO:94);
 (WLRRATAPLPGLT) (SEQ ID NO:95); (WLRRATAPLP GKS) (SEQ ID NO:96);
 (WLRRATAPLP GK T) (SEQ ID NO:97); (WLRRATAPLPDLS) (SEQ ID NO:98);
 (WLRRATAPLPDLT) (SEQ ID NO:99); (WLRRATAPLPDKS) (SEQ ID NO:100);
 (WLRRATAPLPDKT) (SEQ ID NO:101); (RRAYAPLPG) (SEQ ID NO:102);
 10 (RRAYAPLPD) (SEQ ID NO:103); (RRAYAPLPGL) (SEQ ID NO:104);
 (RRAYAPLP GK) (SEQ ID NO:105); (RRAYAPLPDL) (SEQ ID NO:106);
 (RRAYAPLPDK) (SEQ ID NO:107); (RRAYAPLPGLS) (SEQ ID NO:108);
 (RRAYAPLPGLT) (SEQ ID NO:109); (RRAYAPLP GKS) (SEQ ID NO:110);
 (RRAYAPLP GK T) (SEQ ID NO:111); (RRAYAPLPDLS) (SEQ ID NO:112);
 15 (RRAYAPLPDLT) (SEQ ID NO:113); (RRAYAPLPDKS) (SEQ ID NO:114);
 (RRAYAPLPDKT) (SEQ ID NO:115); (LRRAYAPLPG) (SEQ ID NO:116);
 (LRRAYAPLPD) (SEQ ID NO:117); (LRRAYAPLPGL) (SEQ ID NO:118);
 (LRRAYAPLP GK) (SEQ ID NO:119); (LRRAYAPLPDL) (SEQ ID NO:120);
 (LRRAYAPLPDK) (SEQ ID NO:121); (LRRAYAPLPGLS) (SEQ ID NO:122);
 20 (LRRAYAPLPGLT) (SEQ ID NO:123); (LRRAYAPLP GKS) (SEQ ID NO:124);
 (LRRAYAPLP GK T) (SEQ ID NO:125); (LRRAYAPLPDLS) (SEQ ID NO:126);
 (LRRAYAPLPDLT) (SEQ ID NO:127); (LRRAYAPLPDKS) (SEQ ID NO:128);
 (LRRAYAPLPDKT) (SEQ ID NO:129); (WLRRAYAPLPG) (SEQ ID NO:130);
 (WLRRAYAPLPD) (SEQ ID NO:131); (WLRRAYAPLPGL) (SEQ ID NO:132);
 25 (WLRRAYAPLP GK) (SEQ ID NO:133); (WLRRAYAPLPDL) (SEQ ID NO:134);
 (WLRRAYAPLPDK) (SEQ ID NO:135); (WLRRAYAPLPGLS) (SEQ ID
 NO:136); (WLRRAYAPLPGLT) (SEQ ID NO:137); (WLRRAYAPLP GKS) (SEQ
 ID NO:138); (WLRRAYAPLP GK T) (SEQ ID NO:139); (WLRRAYAPLPDLS)
 (SEQ ID NO:140); (WLRRAYAPLPDLT) (SEQ ID NO:141);
 30 (WLRRAYAPLPDKS) (SEQ ID NO:142); e (WLRRAYAPLPDKT) (SEQ ID
 NO:143); ((F/Y/W)RRASAPLP) (SEQ ID NO:144); ((F/Y/W)LRRASAPLP) (SEQ
 ID NO:145); ((F/Y/W)WLRRASAPLP); (SEQ ID NO:146) ((F/Y/W)RRATAPLP)

(SEQ ID NO:147); ((F/Y/W)LRRATAPLP) (SEQ ID NO:148);
 ((F/Y/W)WLRRATAPLP) (SEQ ID NO:149); ((F/Y/W)RRAYAPLP) (SEQ ID
 NO:150); ((F/Y/W)LRRAYAPLP) (SEQ ID NO:151); ((F/Y/W)WLRRAYAPLP)
 (SEQ ID NO:152); ((F/Y/W)RRASAPLP) (SEQ ID NO:153);
 5 ((F/Y/W)RRASAPLPD) (SEQ ID NO:154); ((F/Y/W)RRASAPLPGL) (SEQ ID
 NO:155); ((F/Y/W)RRASAPLPKG) (SEQ ID NO:156); ((F/Y/W)RRASAPLPDL)
 (SEQ ID NO:157); ((F/Y/W)RRASAPLPDK)₁ (SEQ ID NO:158);
 ((F/Y/W)RRASAPLPGLS) (SEQ ID NO:159); ((F/Y/W)RRASAPLPGLT) (SEQ
 ID NO:160); ((F/Y/W)RRASAPLPKGS); (SEQ ID NO:161);
 10 ((F/Y/W)RRASAPLPGKT) (SEQ ID NO:162); ((F/Y/W)RRASAPLPDLS) (SEQ
 ID NO:163); ((F/Y/W)RRASAPLPDLT) (SEQ ID NO:164);
 ((F/Y/W)RRASAPLPDKS) (SEQ ID NO:165); ((F/Y/W)RRASAPLPDKT) (SEQ
 ID NO:166); ((F/Y/W)LRRASAPLP) (SEQ ID NO:167);
 ((F/Y/W)LRRASAPLPD) (SEQ ID NO:168); ((F/Y/W)LRRASAPLPGL) (SEQ ID
 15 NO:169); ((F/Y/W)LRRASAPLPKG) (SEQ ID NO:170);
 ((F/Y/W)LRRASAPLPDL) (SEQ ID NO:171); ((F/Y/W)LRRASAPLPDK) (SEQ ID
 NO:172); ((F/Y/W)LRRASAPLPGLS) (SEQ ID NO:173);
 ((F/Y/W)LRRASAPLPGLT) (SEQ ID NO:174); ((F/Y/W)LRRASAPLPKGS)
 (SEQ ID NO:175); ((F/Y/W)LRRASAPLPGKT) (SEQ ID NO:176);
 20 ((F/Y/W)LRRASAPLPDLS) (SEQ ID NO:177); ((F/Y/W)LRRASAPLPDLT) (SEQ
 ID NO:178); ((F/Y/W)LRRASAPLPDKS) (SEQ ID NO:179);
 ((F/Y/W)LRRASAPLPDKT) (SEQ ID NO:180); ((F/Y/W)WLRRASAPLP) (SEQ
 ID NO:181); ((F/Y/W)WLRRASAPLPD) (SEQ ID NO:182);
 ((F/Y/W)WLRRASAPLPGL) (SEQ ID NO:183); ((F/Y/W)WLRRASAPLPKG)
 25 (SEQ ID NO:184); ((F/Y/W)WLRRASAPLPDL) (SEQ ID NO:185);
 ((F/Y/W)WLRRASAPLPDK) (SEQ ID NO:186); ((F/Y/W)WLRRASAPLPGLS)
 (SEQ ID NO:187); ((F/Y/W)WLRRASAPLPGLT) (SEQ ID NO:188);
 ((F/Y/W)WLRRASAPLPKGS) (SEQ ID NO:189); ((F/Y/W)WLRRASAPLPGKT)
 (SEQ ID NO:190); ((F/Y/W)WLRRASAPLPDLS) (SEQ ID NO:191);
 30 ((F/Y/W)WLRRASAPLPDLT) (SEQ ID NO:192); ((F/Y/W)WLRRASAPLPDKS)
 (SEQ ID NO:193); ((F/Y/W)WLRRASAPLPDKT) (SEQ ID NO:194);
 ((F/Y/W)RRATAPLP) (SEQ ID NO:195); ((F/Y/W)RRATAPLPD) (SEQ ID

NO:196); ((F/Y/W)RRATAPLPGL) (SEQ ID NO:197); ((F/Y/W)RRATAPLP GK
 (SEQ ID NO:198); ((F/Y/W)RRATAPLPDL) (SEQ ID NO:199);
 ((F/Y/W)RRATAPLPDK) (SEQ ID NO:200); ((F/Y/W)RRATAPLPGLS) (SEQ ID
 NO:201); ((F/Y/W)RRATAPLPGLT) (SEQ ID NO:202);
 5 ((F/Y/W)RRATAPLP GKS) (SEQ ID NO:203); ((F/Y/W)RRATAPLP GKT) (SEQ
 ID NO:204); ((F/Y/W)RRATAPLPDLS) (SEQ ID NO:205);
 ((F/Y/W)RRATAPLPDLT) (SEQ ID NO:206); ((F/Y/W)RRATAPLPDKS) (SEQ ID
 NO:207); ((F/Y/W)RRATAPLPDKT) (SEQ ID NO:208); ((F/Y/W)LRRATAPLP G)
 (SEQ ID NO:209); ((F/Y/W)LRRATAPLPD) (SEQ ID NO:210);
 10 ((F/Y/W)LRRATAPLPGL) (SEQ ID NO:211); ((F/Y/W)LRRATAPLP GK) (SEQ ID
 NO:212); ((F/Y/W)LRRATAPLPDL) (SEQ ID NO:213);
 ((F/Y/W)LRRATAPLPDK) (SEQ ID NO:214); ((F/Y/W)LRRATAPLPGLS) (SEQ
 ID NO:215); ((F/Y/W)LRRATAPLPGLT) (SEQ ID NO:216);
 ((F/Y/W)LRRATAPLP GKS) (SEQ ID NO:217); ((F/Y/W)LRRATAPLP GKT)
 15 (SEQ ID NO:218); ((F/Y/W)LRRATAPLPDLS) (SEQ ID NO:219);
 ((F/Y/W)LRRATAPLPDLT) (SEQ ID NO:220); ((F/Y/W)LRRATAPLPDKS) (SEQ
 ID NO:221); ((F/Y/W)LRRATAPLPDKT) (SEQ ID NO:222);
 ((F/Y/W)WLRRATAPLP G) (SEQ ID NO:223); ((F/Y/W)WLRRATAPLPD) (SEQ
 ID NO:224); ((F/Y/W)WLRRATAPLPGL) (SEQ ID NO:225);
 20 ((F/Y/W)WLRRATAPLP GK) (SEQ ID NO:226); ((F/Y/W)WLRRATAPLPDL)
 (SEQ ID NO:227); ((F/Y/W)WLRRATAPLPDK) (SEQ ID NO:228);
 ((F/Y/W)WLRRATAPLPGLS) (SEQ ID NO:229); ((F/Y/W)WLRRATAPLPGLT)
 (SEQ ID NO:230); ((F/Y/W)WLRRATAPLP GKS) (SEQ ID NO:231);
 ((F/Y/W)WLRRATAPLP GKT) (SEQ ID NO:232); ((F/Y/W)WLRRATAPLPDLS)
 25 (SEQ ID NO:233); ((F/Y/W)WLRRATAPLPDLT) (SEQ ID NO:234);
 ((F/Y/W)WLRRATAPLPDKS) (SEQ ID NO:235); ((F/Y/W)WLRRATAPLPDKT)
 (SEQ ID NO:236); ((F/Y/W)RRAYAPLP G) (SEQ ID NO:237);
 ((F/Y/W)RRAYAPLPD) (SEQ ID NO:238); ((F/Y/W)RRAYAPLPGL) (SEQ ID
 NO:239); ((F/Y/W)RRAYAPLP GK) (SEQ ID NO:240); ((F/Y/W)RRAYAPLPDL)
 30 (SEQ ID NO:241); ((F/Y/W)RRAYAPLPDK) (SEQ ID NO:242);
 ((F/Y/W)RRAYAPLPGLS) (SEQ ID NO:243); ((F/Y/W)RRAYAPLPGLT) (SEQ
 ID NO:244); ((F/Y/W)RRAYAPLP GKS) (SEQ ID NO:245);

((F/Y/W)RRAYAPLPGKT) (SEQ ID NO:246); ((F/Y/W)RRAYAPLPDLS) (SEQ
 ID NO:247); ((F/Y/W)RRAYAPLPDLT) (SEQ ID NO:248);
 ((F/Y/W)RRAYAPLPDKS) (SEQ ID NO:249); ((F/Y/W)RRAYAPLPDKT) (SEQ
 ID NO:250); ((F/Y/W)LRRAYAPLPG) (SEQ ID NO:251);
 5 ((F/Y/W)LRRAYAPLPD) (SEQ ID NO:252); ((F/Y/W)LRRAYAPLPGL) (SEQ ID
 NO:253); ((F/Y/W)LRRAYAPLP GK) (SEQ ID NO:254);
 ((F/Y/W)LRRAYAPLPDL) (SEQ ID NO:255); ((F/Y/W)LRRAYAPLPDK) (SEQ ID
 NO:256); ((F/Y/W)LRRAYAPLPGLS) (SEQ ID NO:257);
 ((F/Y/W)LRRAYAPLPGLT) (SEQ ID NO:258); ((F/Y/W)LRRAYAPLPGKS)
 10 (SEQ ID NO:259); ((F/Y/W)LRRAYAPLPGKT) (SEQ ID NO:260);
 ((F/Y/W)LRRAYAPLPDLS) (SEQ ID NO:261); ((F/Y/W)LRRAYAPLPDLT) (SEQ
 ID NO:262); ((F/Y/W)LRRAYAPLPDKS) (SEQ ID NO:263);
 ((F/Y/W)LRRAYAPLPDKT) (SEQ ID NO:264); ((F/Y/W)WLRRAYAPLPG) (SEQ
 ID NO:265); ((F/Y/W)WLRRAYAPLPD) (SEQ ID NO:266);
 15 ((F/Y/W)WLRRAYAPLPGL) (SEQ ID NO:267); ((F/Y/W)WLRRAYAPLP GK)
 (SEQ ID NO:268); ((F/Y/W)WLRRAYAPLPDL) (SEQ ID NO:269);
 ((F/Y/W)WLRRAYAPLPDK) (SEQ ID NO:270); ((F/Y/W)WLRRAYAPLPGLS)
 (SEQ ID NO:271); ((F/Y/W)WLRRAYAPLPGLT) (SEQ ID NO:272);
 ((F/Y/W)WLRRAYAPLPGKS) (SEQ ID NO:273); ((F/Y/W)WLRRAYAPLP GKT)
 20 (SEQ ID NO:274); ((F/Y/W)WLRRAYAPLPDLS) (SEQ ID NO:275);
 ((F/Y/W)WLRRAYAPLPDLT) (SEQ ID NO:276); ((F/Y/W)WLRRAYAPLPDKS)
 (SEQ ID NO:277); e ((F/Y/W)WLRRAYAPLPDKT) (SEQ ID NO:278)
 caracterizado por: (F/Y/W) significa que o resíduo é selecionado de F, Y, e W.
 Outros específicos polipeptídeos surgidos dentro do escopo da fórmula geral I
 25 será evidente para um experiente na matéria baseado nos ensinamentos deste
 documento.

Os polipeptídeos da fórmula geral I pode estar presente em múltiplas
 combinações para apresentar aumento da eficiência para uso em métodos da
 invenção. Por exemplo, os polipeptídeos podem estar presentes em 1, 2, 3, 4,
 30 ou 5 combinações. Também em outra concretização, os polipeptídeos
 compreendendo a sequência de acordo com fórmula geral I incluem uma
 combinação de diferentes sequências da região X1-A(X2)APLP-X3 (SEQ ID

NO: 302 e SEQ ID NO: 316). Nesta concretização, por exemplo, o polipeptídeo pode consistir de uma combinação de SEQ ID NO: 9 e 1 combinação de SEQ ID NO: 143. Em um exemplo diferente, o polipeptídeo poderá consistir de duas combinações de SEQ ID NO: 200 e três combinações de SEQ ID NO: 62. Será evidente para um experiente na matéria que muitas outras combinações são possíveis baseadas nos ensinamentos da presente invenção.

Em uma concretização preferencial, os polipeptídeos de acordo com fórmula geral I também compreendem um ou mais domínios de transdução. Como usado neste documento, o termo “domínio de transdução” significa uma sequência de ácido amino que pode conduzir o polipeptídeo através de membranas da célula. Estes domínios podem ser ligados para outros polipeptídeos por movimento direto do polipeptídeo ligado através das membranas da célula. Em alguns casos, moléculas de transdução não têm necessidade de ser ligada covalentemente para o polipeptídeo ativo. Em uma concretização preferencial, o domínio de transdução é ligado para o resto do polipeptídeo via ligação de peptídeo. Exemplos de tais domínios de transduções incluem, mas não são limitados para (R)₄₋₉ (**SEQ ID NO:279**); GRKKRRQRRRPPQ (**SEQ ID NO:280**); YARAAARQARA

(**SEQ ID NO:281**); DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVE (**SEQ ID NO:282**); GWTLSAGYLLGLINLKALAALAKKIL (**SEQ ID NO:283**); PLSSIFSRIGDP (**SEQ ID NO:284**); AAVALLPAVLLALLAP (**SEQ ID NO:285**); AAVLLPVLLAAP (**SEQ ID NO:286**); VTVLALGALAGVGVG (**SEQ ID NO:287**); GALFLGWLGAAGSTMGAWSQP (**SEQ ID NO:288**); GWTLSAGYLLGLINLKALAALAKKIL (**SEQ ID NO:289**); KLALKLALKALKAALKLA (**SEQ ID NO:290**); KETWWETWWTEWSQPKKKRKV (**SEQ ID NO:291**); KAFAKLAARLYRKAGC (**SEQ ID NO:292**); KAFAKLAARLYRAAGC (**SEQ ID NO:293**); AAFAKLAARLYRKAGC (**SEQ ID NO:294**); KAFAALAARLYRKAGC (**SEQ ID NO:295**); KAFAKLAAQLYRKAGC (**SEQ ID NO:296**), GGGGYGRKKRRQRRR (**SEQ ID NO:297**), e YGRKKRRQRRR (**SEQ ID NO:299**).

Em uma outra concretização, também os polipeptídeos compreendem ou consistem de polipeptídeos da fórmula:

B1-X1-A(X2)APLP-X3-B2 (**SEQ ID NO: 318** e **SEQ ID NO: 319**)

5 caracterizado por: X1, X2, e X3 serem como definido acima, e caracterizado por: B1 e B2 serem independentemente ausentes ou incluir um domínio de transdução, como descrito acima.

Em uma concretização preferencial, um ou ambos de B1 e B2 compreendem ou consistem do ácido amino sequência de YGRKKRRQRRR (**SEQ ID NO:299**) e/ou YARAAARQARA (**SEQ ID NO:281**). Em uma
10 concretização mais preferencial, os polipeptídeos de acordo com as fórmulas gerais descritas neste documento compreendem ou consistem de um polipeptídeo YGRKKRRQRRRWLRRAPsAPLPGLK (**SEQ ID NO:301**) ou YARAAARQARAWLRRAPsAPLPGLK (**SEQ ID NO:315**), caracterizado por: "pS" representar um resíduo de serina fosforilada.

15 Em uma concretização dos métodos da presente invenção, os polipeptídeos compreendem ou consistem de polipeptídeos da fórmula:

J2-X1-A(X2)APLP-X3-J3 (**SEQ ID NO: 320** e **SEQ ID NO: 321**)

caracterizados por: X1, X2, e X3 serem como definidos acima, caracterizados por: J2 e J3 serem independentemente ausente ou
20 compreender um domínio de transdução, como descrito acima.

Os polipeptídeos para uso em métodos da invenção podem também ser derivados para prover o aumento da meia-vida, por exemplo, por ligação para glicol de polietileno. Os polipeptídeos da invenção podem compreender L-ácidos de amino, D-ácidos de amino (que são resistentes para L-ácido amino específico proteases *in vivo*), uma combinação de D- e L-ácidos de amino, e
25 vários "desenhos" ácidos de amino (exemplo., β -metil ácidos de amino, α -metil ácidos de amino, e $N\alpha$ -metil ácidos de amino, etc.) para propagar propriedades especiais. Ácidos sintéticos de amino incluem ornitina para lisina, e norleucina para leucina ou isoleucina.

30 Em adição, os polipeptídeos podem ter ligações peptidomiméticas, tais como ligação de éter, para preparar polipeptídeos com novas propriedades por exemplo, um peptídeo pode ser gerado de tal modo que incorpore uma

reduzida ligação de peptídeo, isto é., $R_1\text{-CH}_2\text{-NH-R}_2$, onde R_1 e R_2 são resíduos ou sequências ácido amino. Uma reduzida ligação de peptídeo pode ser introduzida como uma subunidade de dipeptídeo. Tais polipeptídeos são resistentes para atividade de protease e influência na extensão da meia-vida *in vivo*.

O termo "polipeptídeo" é usado em sentido amplo para referir-se a uma sequência de subunidade de ácidos de amino, análogos de ácido amino ou peptidomiméticos. As subunidades são ligadas por ligação de peptídeo, embora o polipeptídeo possa compreender também misturas que não são necessariamente ligadas para os polipeptídeos por uma ligação de peptídeo. Por exemplo, como descrito acima, o polipeptídeo pode também compreender uma molécula de ácido não amino que contenha um anel aromático.

Os polipeptídeos descritos neste documento podem ser sintetizados quimicamente ou expressos por recombinação. A expressão de recombinação pode ser realizada usando métodos padrões na matéria, geralmente envolvendo a clonagem da sequência de ácido nucleico capaz de direcionar a expressão dos polipeptídeos no vetor de expressão, que pode ser usado para transfectar ou transduzir uma célula hospedeira com a finalidade de prover a célula mecanicamente para conduzir a expressão dos polipeptídeos. Tais vetores de expressão podem compreender vetor de expressão bacterial ou viral, e tais células hospedeiras podem ser procariótico ou eucariótico.

Preferencialmente, os polipeptídeos para uso nos métodos da presente invenção são sintetizados quimicamente. Polipeptídeos sintéticos preparados usando técnicas bem conhecidas de fase sólida, fase líquida, ou técnica de condensação de peptídeo ou qualquer combinação destes, podendo incluir ácidos de amino naturais e não naturais. Ácidos de amino usados para síntese de peptídeo pode ser padrão Boc ($N\alpha$ -amino protetor $N\alpha$ -t-butiloxicarbonil) resina de ácido amino com padrão não-protetor, neutralização, acoplamento e protocolos de lavagem de procedimento padrão de fase sólida, ou base instável $N\alpha$ -amino protetor 9-fluorenilmethoxycarbonil (Fmoc) ácidos de amino. Ambos Fmoc e Boc $N\alpha$ -amino protetor ácidos de amino podem ser obtidos de "Sigma, Cambridge Research Biochemical", ou outra companhia química conhecida por

estes experientes na matéria. Em adição, os polipeptídeos podem ser sintetizados com outro grupo N α -protetor que são conhecidos para aqueles experientes nesta matéria.

5 Síntese de peptídeo de fase sólida pode ser obtida por técnicas conhecidas para aqueles experientes na matéria e incluindo, por exemplo por uso de sínteses automáticas.

10 Como usado neste documento, uma "quantidade efetiva" de um ou mais polipeptídeos é uma quantidade que é suficiente para obter o desejado benefício do tratamento. Uma quantidade efetiva dos polipeptídeos que pode ser empregada geralmente está no intervalo de entre cerca 0,01 $\mu\text{g/kg}$ por peso corporal e 10 mg/kg por peso corporal, preferencialmente no intervalo de cerca de 0,05 $\mu\text{g/kg}$ e 5 mg/kg por peso corporal. Entretanto, níveis de dosagem são baseados em uma variedade de fatores, incluindo o tipo de lesão, a idade, peso, sexo, condição médica do indivíduo, a severidade da
15 condição, a maneira de administrar e o composto particular empregado. Então, o regime de dosagem pode variar largamente, mas pode ser determinado rotineiramente por um médico usando métodos padrões.

Os polipeptídeos podem ser objetos de operações farmacêuticas convencionais, tais como esterilização e/ou pode conter adjuvantes
20 convencionais, tais como preservativos, estabilizantes, agentes umidificantes, emulsificadores, tampões, etc.

Para administração, os polipeptídeos são normalmente combinados com um ou mais adjuvantes apropriados de acordo com a maneira de administração indicada. Os compostos podem ser misturados com lactose, sucrose, pó de
25 amido, éter de celulose de ácido alcanóico, ácido esteárico, talco, magnésio estearato, óxido de magnésio, sais de sódio e cálcio de ácido fosfórico e sulfúrico, acácia, gelatina, alginato de sódio, polivinilpirrolidina, sulfato de dextran, gel contendo heparina e/ou álcool de polivinil e tablete ou encapsulado para convencional administração. Alternativamente, os compostos desta
30 invenção podem ser dissolvidos in salino, água polietileno glicol, glicol de propileno, solução coloidal celulose de carboximetil, etanol, óleo de milho, óleo de amendoim, óleo de semente de algodão, óleo de sesame, goma de

tragacante e/ou vários tampões. Outros adjuvantes e modos de administração são bem conhecidos no ramo farmacêutico. O transportador ou diluente pode incluir material de retardo de tempo, tal como monostearato de gliceril ou distearato de gliceril sozinhos ou com uma cera ou outros materiais bem conhecido na matéria.

Os polipeptídeos ou composições farmacêuticas destes podem ser administrados por qualquer maneira, desde que seja adequada, incluindo oralmente, parentalmente, por inalação de spray, retalmente, ou topicamente em formulações de dosagem unitária, contendo transportadores, adjuvantes e veículos convencionais, aceitáveis farmacêuticamente. O termo parenteral, como usado neste documento, inclu técnicas subcutâneas, intravenosa, intra-arterial, intramuscular, intraesternal, intratendinosos, intraespinal, intracranial, intratorácica, infusão ou intraperitonealmente. Concretizações preferenciais para administração variam de acordo com a condição a ser tratada. Em uma concretização preferencial, os polipeptídeos ou composições farmacêuticas são colocados sobre um curativo feito em uma ferida ou outra administração tópica. Tal curativo de ferida pode ter qualquer uso na matéria, incluindo, mas não limitando para filmes (e.g., filme de poliuretano), hidrocoloidais (partículas de ligação de hidrofílico coloidal para espuma de poliuretano), hidrogel (ligado através de polímeros contendo cerca de pelo menos 60% de água), ceras (hidrofílico ou hidrofóbico), alginatos de cálcio (composições de fibras não trançadas de alginato de cálcio), celofane, e polímeros biológicos tais como estes descritos na publicação de aplicação de patente US número 20030190364, publicada em 9 de outubro de 2003.

Os polipeptídeos podem ser feitos em uma forma sólida (incluindo granulados, pó ou supositórios) ou em uma forma líquida (*exemplo*, soluções, suspensões, ou emulsões). Os polipeptídeos da invenção podem ser aplicados em uma variedade de soluções. Soluções adequadas para uso de acordo com a invenção são estéreis, dissolvem quantidades suficientes dos polipeptídeos e não são prejudiciais para o propósito da aplicação.

Exemplo 1

Quelóides e cicatrizes hipertróficas são fibras proliferativas anormais na

tentativa de curar esse distúrbio caracterizado por excessiva produção, deposição e contração de matriz extra celular, que resulta em deformidade funcional e cosmética (“Leask e Abraham, 2004”). Não existe atualmente efetivo tratamento para estas condições.

- 5 Um dos principais fatores reguladores envolvidos na iniciação da “cascata” de ferida curadora é transformação do crescimento fator (TGF)- β . Existem três mamíferos isoformas, designados TGF- β 1, - β 2 e - β 3. TGF- β é a molécula multifuncional com efeitos que dependem do contexto celular e equilíbrio de isoformas representadas. TGF- β 1 é considerada para ser
10 envolvida na iniciação de resposta fibrótica, enquanto TGF- β 3 pode ter função anti-fibrótica (“Leask e Abraham, 2004, Miller e Nanchahal, 2005”).

- Nos fibroblastos, TGF- β estimula a expressão de fator de crescimento de tecido conectivo (CTGF). CTGF é um peptídeo rico de cisteína que atua como uma membrana novadora abaixadora de TGF- β , promovendo
15 proliferação de fibroblasto, produzindo matriz extracelular (incluindo colágeno e fibroconectina) e formação de tecido granular (“Duncan et al. 1999, Leask e Abraham, 2004”). A expressão de CTGF é super regulada por outro composto liberado do tecido ferido, tal como trombina e endotelina “(Chambers et al., 2000, Shi-Wen et al., 2004, Rodriguez-Vita et al, 2005)”, estes sugerem que
20 uma rede complexa de interações da matriz celular de citocina regula a iniciação do processo de cura da ferida bem como as desordens fibróticas patológicas (“Duncan et al., 1999”). Por que expressão de CTGF em quelóides e cicatrizes hipertróficas permitem a resposta pró fibrótica para TGF- β , CTGF e podendo participar na patogênese de cicatriz fibrosa (“Colwell et al., 2004”).
25 Consequentemente, é concebível que bloqueio da expressão de CTGF pode atenuar a resposta fibroproliferativa de feridas patológicas, por prevenir proliferação conectiva de célula de tecido e depósito de matriz.

- Em adição para citocinas e proteases, modificações no citoarquitetura afeta a expressão de CTGF. Adequadamente, agentes que rompem micro
30 tubos, ativa RhoA e estabiliza fibras de actina foram demonstrados para aumentar a expressão de CTGF em fibroblastos renais, considerando agentes

que permitem a depolimerização da actina (tal como latrunculina) diminuindo expressão de CTGF ("Ott et al., 2003").

5 Foi recentemente demonstrado que o peptídeo P20 (um fosfopeptídeo análogo para a quebra de proteínass por calor 20) ligado para um transportador de peptídeo chamado domínio de transdução de proteína (PTD) penetra na célula e inibe formação de fibra de stress para estimular com soro ou ácido lisofosfatídico ("Dreiza et al., 2004"). Este nos permite para hipótese que rompimento de citoesqueleto pelo formação de CTGF inibidor de peptídeo P20 e pode limitar condições fibroproliferativas. Para teste desta hipótese, nós
10 investigamos se tratamento com o PTD-P20 peptídeo poderá reduzir o CTGF e expressão de colágeno por TGF- β fibroblastos estimulador de quelóide.

Métodos

Cultura de Fibroblasto: fibroblastos de quelóide humana foram cultivados em prato de 10 cm² para 70% confluência em DMEM com 10% FBS
15 e adicional penicilina e estreptomicina (1%), a 37°C e 10% CO₂. Células foram privadas de soro em DMEM, contendo FBS 0,5% por 48h antes da experiência. No início do ensaio, membrana nova foi acrescentada para o prato, e células que não foram tratadas (controle) ou tratadas com TGF- β 1 (intervalo de dosagem de 0,6 a 5 ng/mL), P20 fosfopeptídeo (intervalo de dosagem de 50-
20 200 μ M), forskolin (FSK, 10 μ M) ou SNAP (500 μ M) por 24 h. para verificar a influência da privação de soro também tinham células em ambiente contendo 10% FBS (alto controle de soro).

Análise de "Western blot": No fim da experiência, células foram lavadas com PBS e homogenizadas usando tampão UDC. Lisados foram
25 misturados, centrifugados (6000 x g) por 20 min, e o sobrenadante foi usado para determinação de CTGF e expressão de colágeno. Amostras (20 μ g de proteína) foram carregadas em gel 15 ou 10% SDS-PAGE e as proteínas electroforéticas foram transferidas para membranas imóveis. Para bloquear ligações não especificadas, as membranas foram incubadas com 1:1(v/v) Três
30 ligações salinas (TBS): ligação de bloqueio (Odyssey), colorido com anticorpos contrários primários CTGF (Torrey Pines) e colágeno (Cortex) por 1 h à

temperatura ambiente e lavado três vezes com TBS. Depois, membranas foram incubadas com anticorpos anti-coelho e anti-rato secundários e lavados com TBS incluído. Proteína e complexo de anticorpos foram visualizados usando a “Odyssey direct infrared fluorescence imaging system” (Li-Cor, Lincoln, NE).

Imunocitoquímica: Fibroblastos de quelóide humana foram cultivadas em 6-pratos com lâminas de $2,5 \times 10^5$ células/boas. Elas foram privadas de soro por 24 h, e então tratadas com o estímulo. Não tratadas (controle) ou células tratadas com TGF- β 1 (1,2 ou 2,5 ng/mL) e/ou P20 fosfopeptídeo (50 μ M) foram fixadas com 4% de formoldeído e permeabilizadas com 0,1% Triton X. Células foram então coradas com Alexa 350 faloidina para visualizar filamentos de actina. Imagens fluorescentes foram obtidas usando um microscópio “Zeiss” equipado com filtro UV e software Zeiss.

Análise Estatística: Todos os dados numéricos são apresentados com significado \pm padrão desvio de 3-6 experiências. ANOVA seguido por teste “Tukkey post-hoc” foi usado para comparar grupos de experiências. O nível de significância foi o grupo $p < 0,05$.

Resultados

Expressão de TGF- β 1 e CTGF: Fibroblastos de quelóide humana foram privadas de soro em meio DMEM contendo 0,5% FBS por 48 horas e tratadas com diferentes doses de TGF-beta1 por 24 horas. Expressão de CTGF foi relatada para expressão GAPDH por densitometria de “western blots” para corrigir diferenças de cargas. A expressão de CTGF nas células controladas foi grupo 1 para comparação de diferentes “blots”. Os dados demonstram que TGF- β 1 tratado por 24 h aumenta dependentemente da dosagem (2,1- a 4,6- “fold”) expressão de CTGF em fibroblastos de quelóide humana.

Tratamento P20 e expressão de CTGF: Fibroblastos de quelóide humana foram privados de soro em meio DMEM, contendo 0,5% FBS por 48 horas, estimuladas com TGF-beta1, intervalo de dosagem de 1,2 a 5 ng/mL e concomitantemente tratados com o fosfopeptídeo P20 (50, 100 ou 200 μ M) por 24 horas. As aplicações de “Western blot bands” foram quantificadas por

densitometria e a expressão de CTGF foi relatada por expressão de GAPDH para corrigir diferenças de cargas. A expressão de CTGF em células controladas foi grupo 1 para comparação de diferentes “blots”. Os dados mostram que tratamento com PTD-P20 reduz significativamente ($p < 0,05$) expressão de TGF- β 1-induzido CTGF em fibroblastos de quelóides. Reduções de 53% e 29% foram observadas para 1,2 e 2,5 ng/mL TGF- β 1, respectivamente. De outra maneira, quando 5 ng/mL de TGF- β 1 foi usado para estimular as células, PTD-P20 tratado não reduziram a expressão de CTGF uniformemente, quando usado com dosagens altas (100 e 200 μ M).

Tratamento P20 e produção de colágeno: Foi observado que PTD-P20 tratado reduziu expressão CTGF em células estimuladas com 1,2 e 2,5 ng/mL de TGF- β 1, próxima investigação quando síntese de colágeno foi também reduzida. Fibroblastos de quelóide humana foram privadas de soro em meio de DMEM, contendo 0,5% FBS por 48 horas, estimulada com TGF-beta1 intervalo de dosagem de 1,2 a 2,5 ng/mL e concomitantemente tratadas com o fosfopeptídeo P20 (50 μ M) por 24 horas. “Western blot bands” foram quantificados por densitometria, e expressão de colágeno foi relatada por expressão de GAPDH para corrigir diferenças de cargas. A expressão de colágeno em células controladas foi grupo 1 para comparação de diferentes “blots”. Os dados demonstram que tratamento de PTD-P20 reduziu síntese de colágeno aproximadamente 48%.

Tratamento com compostos que eleva cAMP e cGMP: Em seguida, evoluímos a influência de compostos que elevam cAMP (Forskolin, FSK) ou cGMP (SNAP) em expressão de CTGF em fibroblastos de quelóide. Fibroblastos de quelóide humana foram privadas de soro em meio de DMEM contendo 0,5% FBS por 48 horas, estimulada com TGF-beta1 dosagem de 2,5 ng/mL e concomitantemente tratadas com o FSK (10 μ M) por 24 horas. “Western blot bands” foram quantificado por densitometria, e expressão de CTGF foi relatada por expressão de GAPDH para corrigir diferença de cargas. A expressão de CTGF em células controladas foi grupo 1 para comparação de diferentes “blots”. O tratamento de fibroblastos de TGF- β 1-estimulado (TGF- β 1

dosagem de 2,5 ng/mL) com FSK resulta em um decréscimo de aproximadamente 50% de expressão de CTGF. Diferença não foi observada na expressão de CTGF, quando fibroblastos não estimulados foram tratados com FSK comparados com células não tratadas. Por outro lado, tratamento de células de TGF- β 1-estimuladas com SNAP não diminuiu expressão de CTGF. Em adição, tratamento de células não estimuladas com SNAP resultou em um aumento significativo ($p < 0,05$, duas vezes aumentadas na expressão CTGF comparadas com células não tratadas (controle). Estes resultados estão de acordo com o previsto no relatório ("Duncan et al., 1999"), mostrando que a inibição afeta a expressão de CTGF apresentando-se para ser seletivo para elevação de agentes cAMP. Em adição, estudos recentes demonstraram que exposição de fibroblastos de quelóide para óxido nítrico exógeno resultou em aumento de expressão de colágeno, dependendo da maneira de dosagem ("Hsu et al., 2006").

Influência de tratamento PTD-P20 em células de citoesqueleto de actina: Fibroblastos de quelóides humanas foram privadas de soro em meio de DMEM contendo 0,5% FBS por 48 horas, estimulada com TGF-beta1 (1,2 ou 2,5 ng/mL) e/ou P20 (50 μ M) por 24 horas. As células foram então coradas com faloidina para verificar a influência do tratamento de PTD-P20 em citoesqueleto de actina. Tratamento PTD-P20 permite morfologia de célula estrelada e desbloqueio de citoesqueleto de actina em células não estimulada e estas estimuladas com TGF- β 1 a 1,2 ng/mL. Este efeito foi menos evidente quando a dosagem de TGF- β 1 foi 2,5 ng/mL.

Resumo

Atualmente, não existe tratamento efetivo para quelóides e outras desordens fibróticas. O maior alvo das investigações terapêuticas atuais receptores de superfície de célula ou enzimas com "cascata" de sinalização de TGF- β . A proposta apresentada aqui é inovadora uma vez que seus propósitos um uso terapêutico de um largo número proteína em "cascatas" de doenças que foi identificada por seu grupo. O resultado apresentado neste documento demonstra que a redução de PTD-P20 reduz o TGF- β 1-induzido, expressão de

CTGF (a um nível comparável para FSK) e reduz a síntese de colágeno associado. O efeito de PTD-P20 foi associado com troca na morfologia de célula (morfologia estrelada e rompimento de fibras de stress). Uma vez que o citoesqueleto de actina pode ficar intacto para expressão de CTGF, sugerimos
 5 que a habilidade de PTD-P20 para altera dinâmica de citoesqueleto tem importantes implicações para a redução de níveis de CTGF em quinóide de fibroblastos. Uma vez que CTGF usa uma regra central no desenvolvimento e manutenção da resposta fibrótica, O uso de PTD-P20 representa uma estratégia em potencial para tratar quelóides e outras desordens fibróticas.

10 **Referências para Exemplo 1**

Leask A, Abraham DJ. FASEB J., 18(7):816-27, 2004.

Miller MC, Nanchahal J. BioDrugs, 19(6):363-81, 2005.

Duncan MR, et al. FASEB J., 13(13):1774-86, 1999.

Chambers et al. J Biol Chem., 10;275(45):35584-91, 2000.

15 Shi-Wen X, et al. Mol Biol Cell., 15(6):2707-19, 2004.

Rodriguez-Vita Jet al. Circulation, 111(19):2509-17, 2005.

Colwell como et al. Plast Reconstr Surg., 116(5):1387-90, 2005.

Ott C et al. J Biol Chem., 278(45):44305-11, 2003.

Dreiza et al. FASEB J., 19(2):261-3, 2005.

20 Hsu et al. Nitric Oxide., 14(4):327-34, 2006.

Exemplo 2

Fibroblastos são largamente reconhecidas como uma célula crítica tipo envolvidas em fibrose, curativo de ferida e reparador de tecido. Menos apreciada é a noção que a transformação de fibroblastos para miofibroblastos é
 25 uma chave, talvez muito essencial, evento para a célula realizar suas funções ("Powell, et al., 1999 e Tomasek, et al., 2002"). Miofibroblastos são músculos lisos como fibroblastos que expressa a actina α - músculo liso (α -SMA) e contém um contrátil aparato composto de filamentos de actina e associado com proteínas organizadas dentro de fibras de stress proeminentes ("Tomasek, et
 30 al., 2002"). Em adição para suas regras normais em reparos e homeostases de tecidos, números alterados e funções de miofibroblastos podem implicar em doenças com acréscimo de depósito de matriz extracelular (ECM) e fibrose

resultante, tal como aquelas envolvendo pulmão (fibrose pulmonar), vasos sanguíneos (hiperplasia íntima), coração (fibrose cardíaca), e pele (quelóides) (“Desmouliere, et al., 2003, Desmouliere, et al., 2005, Hewitson, et al., 1995, Mitchell, et al, 1989, Zhang, et al., 1994, Naugle, et al., 2006, Chipev, et al., 2000, Pepper, et al., 1997, Heusinger-Ribeiro, et al., 2001”). Então, inibição do fibroblasto-to-miofibroblasto modulação fenotípica pode prover um significado para inibir fibrose em resposta para estímulo tal como TGF β 1 e outros membrana novadores.

Foi recentemente demonstrado que o peptídeo P20 (um fosfopeptídeo análogo para a quebra de proteínas por calor 20) ligado para um peptídeo transportador chamado proteína de transdução de domínio (PTD) penetrada dentro das células e inibindo formação de fibras de stress para estimulação com soro ou ácido lisofosfatídico (“Dreiza et al., 2004”). Como descrito acima, este peptídeo PTD-P20 também inibe TGF β 1-induzindo expressão de CTGF de fibroblastos de quelóide humana. Nessas experiências, a atividade anti-fibrótica de PTD-P20 pode também ser examinada por determinar o efeito em moléculas fibróticas adicionais: α -SMA e a actina acessória de proteínas cofilina e HSP27. As cofilinas são ativadas quando defosforiladas por filamento de actina depolimerizada, enquanto HSP27 é ativada sobre fosforilação e é associado com formação de fibra de stress. Então, um fenotipo fibrótico pode ser associado com acréscimo de fosforilação de cofilinas e HSP27. Este resultado indica que inibidor de PTD-P20 TGF β 1-induzindo expressão de α -SMA e fosforilação de cofilina e HSP27. Tal informação acrescenta para o entendimento do mecanismo de ação de PTD-P20 e identifica biomarcas potenciais que podem ser usadas para detectar estado da atividade de PTD-P20 ou doenças fibróticas.

Métodos

Cultura de Fibroblasto: Fibroblastos de quelóide humana foram cultivadas em pratos de 10 cm² para 70% de confluência em DMEM com 10% FBS e adicional penicilina e estreptomicina (1%), a 37°C e 10% CO₂. Células foram privadas de soro em DMEM contendo 0,5% FBS por 48h antes da experiência. No início do ensaio, membrana nova foi acrescentada no prato e

células foram não tratadas (controle) ou tratadas com TGF- β 1 (intervalo de dosagem de 0,6 a 5 ng/mL), P20 fosfopeptídeo (intervalo de dosagem de 50-200 μ M), forskolin (FSK, 10 μ M) ou SNAP (500 μ M) por 24 h. para verificar a influência de ausência de soro, tendo também células em meio contendo 10% FBS (alto controle de soro).

Análise de “Western blot”: No fim da experiência, células foram lavadas com PBS e homogenizadas usando tampão de UDC. Lisados foram misturados, centrifugados (6000 x g) por 20 min, e o sobrenadante foi usado para determinação de expressão de proteína. Amostras (20 μ g de proteína) foram carregada em gel 5 ou 10% SDS-PAGE e as proteínas foram de maneira electroforética transferidas para membranas imóveis. Para bloquear ligações não especificadas, as membranas foram incubadas com 1:1(v/v) Três ligações salinas (TBS):ligação de bloqueio (Odyssey), colorido com anticorpos primários contrários com expressão da actina α - músculo liso, fosforilada HSP27, e cofilina fosfolada por 1 h à temperatura ambiente e lavado três vezes com TBS. Depois, membranas foram incubadas com anticorpos anti-coelho e anti-rato secundários e lavados com TBS incluído. Proteína e complexo de anticorpos foram visualizados usando a “Odyssey direct infrared fluorescence imaging system” (Li-Cor, Lincoln, NE).

Análise Estatística: Todos os dados numéricos são apresentados com significado \pm padrão desvio de 3-6 experiências. ANOVA seguido por teste “Tukkey post-hoc” foi usado para comparar grupos de experiências. O nível de significância foi o grupo $p < 0,05$.

Resultados

Tratamento P20 e expressão de actina α - músculo liso: Fibroblastos de quelóide humana foram privadas de soro por 24 horas em meio DMEM contendo 0,5% FBS e tratadas com PTD-P20 (50 μ M) com ou sem TGF β 1 (2.5 ng/mL) para 24 horas. Níveis de expressão de α -SMA e beta-actina foram quantificados por densitometria de “western blots” e foram normalizados para expressão GAPDH para corrigir diferenças de cargas. Expressão de proteína nas células controladas foi grupo 1 para comparação de diferentes “blots”. Os

dados demonstram que tratamento com PTD-P20 significativamente ($p < 0,05$) reduziu a expressão α -SMA em fibroblastos de quelóide com ou sem tratamento de TGF β 1 (Figure 1). De outra maneira, PTD-P20 possuiu não efetiva expressão de beta-actina, mostrando que sua atividade é específica para α -SMA, uma chave de marcar fibrótica.

Tratamento P20 e HSP27 e fosforilação de cofilina: Fibroblastos de quelóide humana foram privadas de soro em meio de DMEM, contendo 0,5% FBS por 48 horas e tratadas com PTD-P20 (50 μ M) com ou sem TGF β 1 (2,5 ng/mL) por 24 horas. Níveis de expressão de cofilinas fosfoladas e HSP27 foram quantificadas por densitometria de "Western blots" e foram normalizadas para expressão de GAPDH para correção de diferença de cargas. Expressão de proteína em células controladas foi grupo 1 para comparação de diferentes "blots". Os dados demonstram que tratamento com PTD-P20 significativamente ($p < 0.05$) reduziu TGF β 1-induzindo aumento em cofilina e fosforilação de HSP27 em fibroblastos de quelóide. Níveis de total cofilina e HSP27 (fosforilada mas não fosforilada) não trocados. Estes dados sugerem que PTD-P20 inibe a resposta fibrótica TGF β 1 em vários níveis que impacta o citoesqueleto de actina .

Resumo

O resultado apresentado neste documento demonstra que PTD-P20 reduz TGF β 1-indução de expressão α -SMA e reduz a fosforilação de cofilina e HSP27. Resultado previsto mostra que o tratamento de PTD-P20 foi associado com troca em morfologia da célula (morfologia estrelada e rompimento de fibras de stress) e inibição de expressão de CTGF. Uma vez que citoesqueleto de actina intacta é importante para expressão de CTGF, estes dados sugerem que PTD-P20 inibe resposta fibrótica por alteração da dinâmica do citoesqueleto. Uma vez que o citoesqueleto de actina apresenta uma regra central no desenvolvimento e manutenção da resposta fibrótica, o uso de PTD-P20 representa um estratégico potencial para tratar quelóides e outras desordens fibróticas. Colocados juntos, estes resultados também identificam biomarcas potenciais (CTGF, α -SMA, cofilina, e HSP27) que podem ser usadas

para detectar se atividade de PTD-P20 ou estado de doença fibrótica.

O teste arquivado da sequência listada juntamente submetida, denominada “06-558-PCT_ST25.txt”, criada em 5 de julho de, 2007, e 86,964 bytes de tamanho, é incorporada neste documento por referência em seus inteiros..

5 Referências para Exemplo 2

Chipev et al. (2000) célula Death Differ 7, 166-176

Desmouliere et al. (2003) Lab Invest 83, 1689-1707

Desmouliere et al. ferida Repair Regen 13, 7-12

Heusinger-Ribeiro et al. (2001) J Am 28-37

10 Hewitson et al. (1995) Am J Nephrol 15, 411-417

Mitchell et al. (1989) Lab Invest 60, 643-650

Naugle et al. (2006) Am J Physiol Coração Circ Physiol 290, H323-330

Pepper, M. S. (1997) Citocina Growth Factor Rev 8, 21-43

Powell et al. (1999) Am J Physiol 277, C1-9

15 Tomasek et al. (2002) Nat Rev Mol célula Biol 3, 349-363

Zhang et al. (1994) Am J Pathol 145, 114-125

REIVINDICAÇÕES

1. Um método para tratamento e/ou limitação de desordens fibróticas compreendendo administrar, para um indivíduo que disto necessita, uma quantidade efetiva para tratar e/ou limitar desordens fibróticas de um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de acordo com a fórmula geral I:

X1-A(X2)APLP-X3

caracterizada por:

X1 ser 0-14 ácidos de amino da seqüência de quebra da proteína por calor 20 entre resíduos 1 e 14 da **SEQ N^o: 298**;

X2 ser selecionado do grupo composto de S, T, Y, D, E, hidroxilisine, hidroxiprolina, análogos de fosfoserina, e análogos de fosfotirosina; e

X3 ser selecionado do grupo composto de (a) 0-140 ácidos de amino de resíduos 21 e 160 de **SEQ N^o:298**; e (b) 0, 1, 2, ou 3 ácidos de amino de uma seqüência de descendência Z1-Z2-Z3, caracterizada por: Z1 ser selecionado do grupo composto de G e D;

Z2 ser selecionado do grupo composto de L e K; e

Z3 ser selecionado do grupo composto de S, T, e K.
2. Um método para tratar e/ou limitar cicatrizes selecionadas do grupo composto de quelóides e cicatrizes hipertróficas compreendendo administrar para um indivíduo, que disto necessita, uma quantidade efetiva para tratar e/ou limitar cicatrizes selecionadas do grupo composto de quelóides e cicatrizes hipertróficas de um polipeptídeo compreendendo seqüência de acordo com a fórmula geral I:

X1-A(X2)APLP-X3

caracterizada por:

X1 ser 0-14 ácidos de amino da seqüência de quebra da proteína por calor 20 entre resíduos 1 e 14 de **SEQ ID N^o: 298**;

X2 ser selecionado de grupo composto de S, T, Y, D, E, hidroxilisine, hidroxiprolina, análogos de fosfoserina, e análogos de fosfotirosina; e

X3 ser selecionado do grupo composto de (a) 0-140 ácidos de amino de resíduos 21 e 160 de **SEQ ID N°:298**; e (b) 0, 1, 2, ou 3 ácidos de amino de uma sequencia de descendência Z1-Z2-Z3, caracterizada por:

- Z1 ser selecionado do grupo composto de G e D;
 - 5 Z2 ser selecionado do grupo composto de L e K; e
 - Z3 ser selecionado do grupo composto de S, T, e K.
3. O método de reivindicação 1 ou 2 caracterizado por:
 - X1 ser WLRR (**SEQ ID N°: 1**).
4. O método de qualquer uma das reivindicações 1-3 caracterizado por:
 - 10 X3 ser GLK.
5. O método de qualquer uma das reivindicações 1-4 caracterizado por:
 - X1 ser 0-14 ácidos de amino da sequência quebra da proteína por calor
 - 20 entre resíduos 1 e 14 de **SEQ ID N°: 298**.
6. O método de qualquer uma das reivindicações 1-5 caracterizado por: o
 - 15 polipeptídeo compreender WLRRASAPLPGLK (**SEQ ID N°: 300**), caracterizado por:
 - o resíduo S ser fosforilado.
7. O método de qualquer uma das reivindicações 1-6, caracterizado por:
 - o polipeptídeo também compreender um domínio de transdução ligado
 - 20 covalentemente.
8. O método da reivindicação 7, caracterizado por:
 - o domínio de transdução compreender um polipeptídeo selecionado do
 - grupo composto de YARAAARQARA (**SEQ ID N°: 281**) e YGRKKRRQRRR
 - (**SEQ ID N°: 299**).
9. O método de qualquer uma das reivindicações 2-8 caracterizado por:
 - o método ser usado para limitar cicatrizes selecionadas do grupo
 - composto de quelóides e cicatrizes hipertróficas, e caracterizado por:
 - o indivíduo em necessidade disto ser de descendência asiática ou
 - africana.
10. O método de qualquer uma das reivindicações 1 e 3-8 caracterizado por:
 - o método ser usado para tratar ou limitar desordens fibróticas, e
 - caracterizado por:

o indivíduo em necessidade disto ter sofrimento ou risco de uma ou mais de: nefropatia e retinopatia causadas por diabetes, glomeruloesclerose, nefropatia de IgA, degeneração relativa a máculas, cirrose, atresia biliar, insuficiência cardíaca congestiva, esclerodermia e aderências abdominal.

- 5 11. O método de qualquer uma das reivindicações 1-10, caracterizado por:
o indivíduo em necessidade disto ter um elevado nível de um ou mais das seguintes biomarcas em um tecido alvo:
- 10 expressão de TGF β 1;
expressão de TGF β ;
expressão de CTGF;
cofilina fosforilada;
HSP27 fosforilada; e
expressão da actina α - músculo liso.
- 15 12. O método de qualquer uma das reivindicações 1-11, compreendendo também monitorar a eficiência do método por determinação dos níveis, depois de iniciação do método, de um ou mais das seguintes biomarcas em um tecido alvo:
- 20 expressão de TGF β 1;
expressão de TGF β 2;
expressão de CTGF ;
cofilina fosforilada;
HSP27 fosforilada; e
expressão da actina α - músculo liso.

Resumo

5 A presente invenção fornece métodos para tratar e/ou limitar desordens fibróticas e/ou tratar ou limitar cicatrizes selecionado do grupo composto de quelóides e cicatrizes hipertróficas compreendendo administrar para um indivíduo que disto necessite uma quantidade efetiva para tratar e/ou limitar cicatrizes selecionadas do grupo composto de quelóides e cicatrizes hipertróficas de um polipeptídeo, compreendendo um relatado polipeptídeo HSP20.