

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2003.10.15	(73) Titular(es): PURDUE PHARMA L.P.
(30) Prioridade(s): 2002.10.16 US 418828 P 2003.07.10 US 485986 P	ONE STAMFORD FORUM 201 TRESSER
(43) Data de publicação do pedido: 2005.07.13	BOULEVARD STAMFORD, CT 06901-3431 US
(45) Data e BPI da concessão: 2011.03.16 120/2011	(72) Inventor(es): EARL F. ALBONE US DANIEL A. SOLTIS US
	(74) Mandatário: JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE PÉPTIDOS MIMÉTICOS DO ÁCIDO POLIALFA- 2,8-SIÁLICO PARA REGULAR FUNÇÕES DE MACN**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO TEM POR OBJECTO A UTILIZAÇÃO DE UM PÉPTIDO QUE CONSISTE EM 5 A 30 RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS, PREFERENCIALMENTE 9 A 15, AINDA MAIS PREFERENCIALMENTE CERCA DE 12 RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS, EM QUE O REFERIDO PÉPTIDO COMPREENDE UM EPÍTOPO B DE UM ÁCIDO POLI-2,8- SIÁLICO LIGADO A MACN, QUE É RECONHECIDO POR UM ANTICORPO CONTRA O ÁCIDO POLI-2,8-SIÁLICO (APS), PARA A PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA A REGULAÇÃO DAS FUNÇÕES DE MACN, PARA SER ADMINISTRADO PARA A PREVENÇÃO E/OU O TRATAMENTO DE DOENÇAS NEURO-DEGENERATIVAS, LESÕES DO CÉREBRO E DA ESPINAL MEDULA, PROBLEMAS DE APRENDIZAGEM E DE MEMÓRIA RELACIONADOS COM A IDADE E CANCRO.

DESCRIÇÃO

UTILIZAÇÃO DE PÉPTIDOS MIMÉTICOS DO ÁCIDO POLI- ALFA-2,8-SIÁLICO PARA REGULAR FUNÇÕES DE MACN

A presente invenção tem por objecto a utilização de péptidos miméticos do ácido poli- α 2,8-siálico (APS) para regular especificamente funções de MACN dependentes de APS *in vitro* e *in vivo* e a sua aplicação para o tratamento de doenças neurodegenerativas, lesões cerebrais e da medula espinhal, problemas de aprendizagem e de memória relacionados com a idade e cancro.

A capacidade da célula para modificar as interacções da sua superfície celular com outras células, incluindo neurónios e células gliais, é um componente crítico do desenvolvimento, remodelação e reparação do tecido nervoso, bem como da formação de tumores e metástases. Entre muitas moléculas candidatas, que estão potencialmente envolvidas em tal processo, são de particular interesse as isoformas de moléculas de adesão de células nervosas (MACN), um membro da super-família das IgG, comportando um polímero de hidrato de carbono não convencional, o ácido poli- α 2,8-siálico (APS).

O APS é um polímero de resíduos de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico), de carga negativa, com uma ligação alfa-2,8. A cadeia simples de APS comportada pela MACN, geralmente consiste em pelo menos 30 unidades de repetição com o comprimento da cadeia variando bastante nas MACN isoladas de várias fontes (von Der Ohe et al. *Glycobiology*, 2002, 12, 47-63; Rougon et al. *Eur. J. Cell. Biol.*, 1993a, 61, 197-207). Por comparação, o ácido poli- α 2,8-siálico, que se encontra na cápsula de bactérias tais

como o grupo B de *Neisseria meningitidis* e K1 de *E. coli* forma polímeros mais longos com cerca de 200 unidades de repetição. Estudos utilizando microscopia de RMN indicam que o APS tem uma estrutura helicoidal em solução composta por oito ou mais unidades contíguas de ácido siálico (Rougon et al., 1993a, citado antes; Yamasaki et al 1991). O APS hidratado tem um grande volume e uma densidade elevada de carga negativa e, portanto, está bem colocado para atenuar as forças de adesão e para regular negativamente as interacções da superfície das células (Rutishauser et al. Science, 1988, 240, 53-57). Todas as isoformas conhecidas combinadas alternativamente da MACN podem ser polisializadas no quinto domínio semelhante a Ig (Rougon et al. 1993a, citado antes) e a MACN é o único veículo claramente identificado de ácido polisiálico no sistema nervoso (Rougon et al. J. Cell. Biol., 1986, 103, 2429-2437). Embora exista um relatório descrevendo a associação do APS com a cadeia α do canal de Na (Zuber et al. J. Biol. Chem., 1992, 267, 9965-9971), a ausência de imuno-reactividade de APS em MACN de murganhos nocaute (Cremer et al. Nature, 1994, 367, 455-457) sugere que a MACN é um dos principais, se não o único veículo de APS no cérebro de vertebrados.

A ligação do APS à MACN é um processo de desenvolvimento regulado; a MACN com elevado teor de APS está associada a alterações morfogénicas durante o desenvolvimento, tal como migração celular, sinaptogénese e crescimento axonal e ramificações, enquanto no cérebro adulto poucas formas de MACN sialiladas são dominantes (Rougon et al, Polysialic Acid, 1993b, Roth, JR; Rutishauser, U. e Troy FA (eds), Birkhauser-Verlag: Basel, 323-333; Rutishauser et al, 1998, citado antes; Edelman et al. Annu. Rev. Cell. Biol., 1986, 2, 81-116). No entanto,

APS-MACN persiste nas estruturas do cérebro de adultos que apresentam um elevado grau de plasticidade (Rougon et al. 1993a, citado antes). Por exemplo, APS-MACN é necessário para duas formas essenciais da plasticidade sináptica induzida pela actividade, potenciação a longo prazo (PLP) e depressão a longo prazo (DLP), que se acredita ser fundamental para a aprendizagem e a memória, bem como a formação de padrões dependentes da actividade durante o desenvolvimento. (Muller et al Neuron, 1996, 17, 413-422). Na verdade, o tecido do hipocampo preparado a partir de MACN de murganhos mutantes exibiu uma capacidade muito reduzida de PLP, bem como de DLP e este defeito pode ser imitado pela destruição enzimática da parte de APS de MACN. Estas observações indicam que a APS, em vez da proteína da MACN é necessário para a plasticidade. A plasticidade morfológica que ocorre no sistema hipotálamo-neuro-hipofisário (Theodosius et al. J. Neurosci. 1999, 19, 10228-10236) também é dependente da presença de APS já que a injeção *in vivo* de endoneuraminidase o impede.

APS-MACN é novamente expressa em diversas situações patológicas, tais como a regeneração muscular, a regeneração axonal e os tumores cerebrais (Figarella-Branger et al. Cancer Res. 1990, 50, 6364-6370; Dubois et al. Neuromuscul. Disord., 1994, 4, 171-182; Aubert et al. Comp. Neurol., 1998, 399, 1-19; Muller et al. Neuroscience, 1994, 61, 441-445) ou em doenças cerebrais neuro-degenerativas (Le Gal La Salle et al. J. Neurosci., 1992, 12, 872-882). Com base nestas observações, APS-MACN emergiu como um importante factor permissivo para mudanças dinâmicas nas interacções da superfície celular requeridas para a morfogénese e a remodelação de tecidos (Rougon et al, 1993b, citado antes;. Figarella-Branger, 1993; Rutishauser, Development, 1992, 99-104).

Muitos tumores com características neurais e endócrinas expressaram APS-MACN. Por exemplo, APS-MACN tinha sido detectada em neuroblastomas e meduloblastomas (Figarella-Branger et al., citado antes), carcinoma de células pequenas do pulmão (Patel et al. Int. J. Cancer, 1989, 44, 573-578) e rabdomiossarcomas e, possivelmente, está relacionada com o potencial invasivo e metastásico destes tumores (Rougon et al. 1993b, citado antes). Recentemente, a injeção de neuraminidase num modelo de murganho pelado para metástases mostrou que a eliminação de APS no tumor primário retardava as metástases. (Daniel et al Oncogene, 2001, 20, 997-1004).

Assim, a molécula de APS-MACN e, mais precisamente, o hidrato de carbono APS representa um dos alvos potenciais de futuras abordagens terapêuticas para promover a plasticidade e a recuperação funcional após dano cerebral ou para evitar a formação de metástases.

Assim, têm sido desenvolvidas várias estratégias para regular as funções do APS:

- manipulações genéticas: MACN ou polilsialiltransferase de murganhos nocaute (Cremer et al, citado antes): esta estratégia não abre perspectivas terapêuticas,
- digestão enzimática: endoneuraminidase (al. Theodosis al, citado antes, Daniel et al citado antes): o seu potencial terapêutico é bastante limitado devido à sua grande dimensão e à difusão restrita *in vivo* e à possibilidade de induzir uma resposta imunitária,
- anticorpos monoclonais anti-APS (Monnier et al. Developmental Biology, 2001, 229, 1-14); o seu potencial terapêutico é bastante limitada devido à sua natureza de anticorpo,

- ácido colomínico, um análogo do APS isolado da cápsula bacteriana; o seu potencial terapêutico é bastante limitado devido à sua instabilidade a um pH ácido e à impossibilidade de controlar a sua composição exacta em termos de pureza e homogeneidade (calibração do comprimento da cadeia do ácido siálico, de um lote para outro),
- N-butanoilmanosamina (ManBut), uma pequena molécula capaz de inibir a biossíntese de APS *in vitro* (Mahal et al. Science, 2001, 294, 380-382); a sua actividade não foi demonstrada *in vivo*.

No entanto, até à data, estas estratégias que têm sido usadas para desvendar os mecanismos de acção ou as funções do APS, não levaram à descoberta de novos fármacos capazes de regularem as funções APS *in vivo*.

Portanto, há uma necessidade de novas moléculas capazes de regular especificamente as funções de MACN *in vivo*, dependentes de APS, que possam ser usadas como composições farmacêuticas para promover a plasticidade e a recuperação funcional após lesões no cérebro ou na espinal medula ou para a prevenção de metástases.

Os péptidos que representam moléculas miméticas de epítomos de hidratos de carbono de microrganismos, incluindo epítomos específicos de APD do grupo B de *Neisseria meningitidis* foram descritos tendo em vista o desenvolvimento seguro e eficaz de candidatos a vacinas contra esses microrganismos (Shin et al. Infection and Immunity, 2001, 69, 3335-3342); os péptidos específicos de APS do grupo B de *Neisseria meningitidis* descritos em Shin et. al representam epítomos que são diferentes dos epítomos de ASP das células de vertebrados (neurónios) e, portanto,

não induzem anticorpos que se ligam ao referido APS dos neurónios (APS ligado a MACN) e pode causar danos neurológicos. Além disso, Shin et al. descrevem apenas dois péptidos (DHQRFFV (SEQ ID NO: 31) e AHQASFV (SEQ ID NO: 32) representando miméticos de epítomos de MACN ligados a APS, que são usados como controlo para demonstrar a especificidade dos péptidos miméticos de APS do grupo B de *Neisseria meningitidis*.

Os requerentes isolaram outros péptidos, que são miméticos moleculares de epítomos de MACN ligados a APS e demonstraram que estes péptidos miméticos de APS são capazes de regular (aumentar ou inibir), *in vivo*, de uma maneira dependente de APS, os processos celulares que são normalmente afectados pela polisililação de MACN. Por exemplo, os requerentes demonstraram um efeito significativo dos péptidos miméticos de APS, *in vivo*, sobre o crescimento, a orientação e a fasciculação dos axónios, bem como sobre a migração dos neurónios. Além disso, a administração dos péptidos miméticos de APS resulta na recuperação funcional, após lesão da medula espinhal e também é acompanhada por gliose reactiva reduzida no próprio local da lesão.

No contexto da presente invenção, o ácido poli- α 2,8-siálico ou APS significa APS ligado a MACN, em oposição a outros APS tal como o APS de cápsulas de bactérias.

Estes péptidos miméticos de APS, que são activos *in vivo* em doses baixas (concentração de μ M) e não apresentam qualquer citotoxicidade, são úteis para:

- o tratamento de doenças neurodegenerativas (Parkinson, coreia de Huntington, Alzheimer, esclerose múltipla):

são úteis como adjuvantes para a terapia celular; enxerto de células progenitoras neuronais (que expressam APS) em combinação com péptidos miméticos de APS aumentaria significativamente a migração de progenitores e o crescimento axonal nas áreas danificadas do cérebro,

- o tratamento da lesão cerebral e medular: promoveriam a recuperação funcional após lesões cerebrais ou medulares por aumentar a sobrevivência e a regeneração axonal,
- a prevenção e tratamento de problemas de aprendizagem e de memória relacionados com a idade: iriam promover a plasticidade do sistema nervoso, aumentando a neurogénese e/ou a plasticidade sináptica,
- o tratamento do cancro: iriam impedir a formação de metástases por meio da inibição da migração de células de tumores que expressam APS, por exemplo, tumores neuroectodérmicos.

Além da utilização terapêutica referida, os péptidos miméticos de APS são úteis como ferramentas complementares para desvendar os mecanismos de acção e funções desconhecidas do hidrato de carbono ASP.

A presente invenção tem por objecto um péptido para ser usado como um medicamento para regular as funções de MACN, compreendendo o referido péptido um epítipo B de um ácido poli- α 2,8-siálico ligado a MACN, que é reconhecido por um anticorpo anti-(ácido poli- α 2,8-siálico) e sendo o referido péptido seleccionado no grupo que consiste em:

- péptidos lineares com até 30 resíduos de aminoácidos, de preferência cerca de 12 resíduos de aminoácidos, incluindo pelo menos uma das sequências de SEQ ID NO:

- 1 a 12, 14 e 15, correspondendo respectivamente a:
DSPLVPFIDFHP, LWQPPLIPGIDF, QIEPWFTPEDFP,
TRLAPLVFPLDY, SWLQMPWALVRT, EIHLRMIKQITI,
WHLEYMWRWPRL, LIEQRLPKHILT, YETSSSRLLAYA,
TLASQLSNTSAY, SDQGVNGSWSNP, WHNWNLWAPASPT,
IKSPLTWLVPPD e SHLDLSTGHRTS e
- péptidos cíclicos com até 30 resíduos de aminoácidos, de preferência cerca de 12 resíduos de aminoácidos, incluindo pelo menos uma das sequências de SEQ ID NO: 16 a 26, correspondendo, respectivamente, a:
CYPLNPEVYHCG, CWPLSHSVIVCG, CSSVTAWTTGCG, CYMASGVFLCG,
CWPLGPPSTYICG, CSLIASMETGCG, CSKIASMETGCG,
CYIGDPPFNPCG, CWPLGDSTVICG CPLRLAFTFGCG e
CTRMSHGYWICG.

O "epítipo B reconhecido por um anticorpo anti-APS" refere-se a um péptido que reage especificamente e de forma selectiva, *in vitro* e *in vivo*, com o paratopo de um anticorpo produzido por células linfóides em resposta a uma estimulação com ácido poli- α 2,8-siálico como imunogénio. Os anticorpos anti-APS preparados por técnicas padronizadas, seguindo os protocolos descritos, por exemplo, em Antibodies : A Laboratory Manual, Howell E. Lane e D, do Laboratório Cold Spring Harbor, 1988) são bem conhecidos na técnica; incluem, sem limitação, anticorpos monoclonais 735 (Frosch et al, P.N.A.S.;. 1985, 82, 1194-1198), 30H12 (Coquillat et al. Infect. Immun. 2001, 69, 7130-7139) ou MenB (ABCYS AbC0019; Rougon et al. J. Cell. Biol., 1986, 103, 2429-2437).

A presente invenção inclui o uso de péptidos cíclicos e lineares. Os péptidos cíclicos preferidos, tal como definidos na presente invenção compreendem péptidos em que a cadeia lateral de um aminoácido na cadeia do péptido está

ligada covalentemente à cadeia lateral de outro aminoácido na cadeia do péptido, por via da formação de uma ligação covalente, tal como uma ligação de dissulfureto entre dois resíduos de cisteína.

Os péptidos, tal como definidos na presente invenção referem-se a péptidos que têm as seguintes actividades:

- actividade de ligação ao anticorpo: são reconhecidas especificamente por um anticorpo monoclonal ou policlonal anti-APS e
- actividade biológica: têm a actividade de regulação (aumento ou inibição) das funções de MACN dependentes de APS.

Os péptidos, tal como definidos na presente invenção são denominados a partir daqui por péptidos mimético de APS, péptidos miméticos ou péptidos. Salvo disposição em contrário, os referidos péptidos ou são lineares ou cíclicos.

A actividade de ligação ao anticorpo dos péptidos miméticos é verificada por imunoensaios padrão que são bem conhecidos por um especialista nesta técnica; por exemplo, observa-se uma ligação 100 % péptica em concentrações de 10^4 M e superiores, num ensaio de ELISA, com um anticorpo monoclonal anti-ASP, a uma concentração de 2,5 µg/poço e esta actividade de ligação do anticorpo é especificamente inibida por um análogo de APS, como o ácido colomínico.

A actividade biológica dos péptidos miméticos é verificada pelo crescimento padrão das células e ensaios de migração das células *in vitro* ou *in vivo*, que são bem conhecidas pelos especialistas na técnica; por exemplo,

ensaios em neurónios primários de diferentes fontes (gânglio da raiz dorsal, neurónios cerebelares, retina, ...) mostram os seguintes efeitos:

- um aumento significativo, dependente da dose, do comprimento da neurite *in vivo* e *in vitro*,
- um efeito significativo na orientação axonal *in vivo* e *in vitro* (desfasciculação de axónios) e
- um aumento significativo ou inibição da migração celular.

-

Além disso, os ensaios funcionais, incluindo o estudo da recuperação funcional da hemi-secção da medula espinhal, por meio de ensaios bem conhecidos (BBB test: Basso, Beattie and Bresnahan test; Basso et al. Restor. Neurol. Neurosci, 2002, 5, 189-218; ensaio de rota-rod) mostram uma significativa recuperação locomotora e uma recuperação fina da coordenação motora nos animais tratados com péptidos miméticos, em comparação com os animais tratados com um péptido não relevante.

A actividade biológica do péptido mimético é especificamente inibida pela digestão enzimática com endoneuraminidase e está ausente em MACN de ratos nocaute.

Preferencialmente, o referido péptido consiste numa sequência seleccionada no grupo que consiste nas SEQ ID NO: 1 a 12 e nas SEQ ID NO: 14 a 26.

Mais preferivelmente, o referido péptido selecciona-se no grupo constituído por:

- um péptido linear apresentando a SEQ ID NO: 1 (DSPLVPFIDFHP) doravante denominado p21 e

- um péptido cíclico em que a cadeia lateral do resíduo de cisteína na posição 1 de SEQ ID NO: 18 (CSSVTAWTTGCG) ou a SEQ ID NO: 22 (CSKIASMETGCG) está ligado covalentemente ao resíduo de cadeia lateral da cisteína na posição 11 da SEQ ID NO: 18 ou na SEQ ID NO: 22 através de uma ligação de dissulfureto; os referidos péptidos são denominados daqui para a frente, respectivamente, por p65 e p66.

De acordo com uma modalidade vantajosa da presente invenção, o referido péptido está associado com outra molécula de péptido e/ou sem ser de péptido, incorporadas num suporte adequado, incluindo, por exemplo, polímeros, vesículas lipídicas, microesferas, proteínas e similares. Preferencialmente, a outra molécula de péptido e/ou sem ser de péptido e/ou o suporte, tal como definidos antes, permitem que o péptido mimético achesse a barreira hemato-encefálica.

Essa associação, que pode melhorar a solubilidade, a absorção, a biodisponibilidade, o semi-período de vida biológico do péptido, é formada, utilizando técnicas bem conhecidas na técnica; embora não seja limitativo, pode ser através de uma ligação covalente (*por exemplo*, ligação de amida, ligação de dissulfureto...) ou por meio de quelação, interacções electrostáticas, interacções hidrofóbicas, pontes de hidrogénio, interacções ião-dipolo, interacções dipolo-dipolo ou qualquer combinação dos itens anteriores.

De acordo com outra modalidade vantajosa da presente invenção, o referido péptido é incorporado num complexo formado por uma pluralidade de péptidos idênticos ou diferentes, de acordo com a presente invenção, ligados por ligações covalentes ou não covalentes.

O péptido, tal como definido na presente invenção, pode estar associado com um marcador, tal como um marcador fluorescente, para facilitar a detecção do referido péptido ou pode estar incluído numa proteína de fusão, para permitir a expressão do referido péptido.

De acordo com outra modalidade vantajosa da presente invenção, o referido péptido destina-se à prevenção e/ou ao tratamento de um estado clínico patológico seleccionado no grupo que consiste em: doenças neurodegenerativas, lesões cerebrais e da medula espinhal, problemas da aprendizagem e de memória relacionados com a idade.

De acordo com outra modalidade vantajosa da presente invenção, o referido péptido destina-se à prevenção e/ou ao tratamento de cancro.

Os péptidos, tal como definidos na presente invenção, podem ser preparados por qualquer processo adequado. De preferência, obtêm-se por síntese química em fase líquida ou sólida por ligações sucessivas dos diferentes resíduos de aminoácidos a serem incorporados (a partir da extremidade do terminal N até à extremidade do terminal C em fase líquida ou a partir da extremidade do terminal C até à extremidade do terminal N em fase sólida) em que as extremidades do terminal N e as cadeias laterais reactivas são bloqueadas previamente por grupos convencionais. Para a síntese em fase sólida utiliza-se a técnica descrita por Merrifield (J. Am. Chem. Soc. 1964, 85, 2149-2154).

Os péptidos, conforme definido na presente invenção, também podem ser obtidos por tecnologia de engenharia genética. Os ácidos nucleicos de codificação dos péptidos da presente invenção podem ser obtidos por processos bem

conhecidos da tecnologia do ADN recombinante e/ou síntese química do ADN. Um exemplo típico compreende fazer uma cultura de uma célula hospedeira contendo um vector de expressão compreendendo uma sequência de ácidos nucleicos que codifica o referido péptido, em condições adequadas para a expressão do péptido e recuperar o péptido a partir da cultura da célula hospedeira. O péptido pode ser incluído numa proteína de fusão por clonagem de um ADNc num vector de expressão em quadro com um polinucleótido que codifica para o péptido da presente invenção. Alternativamente, múltiplos de péptidos idênticos ou diferentes também podem ser produzidos por expressão de um polinucleótido que codifica para várias cópias de um monómero ou que codifica para monómeros diferentes.

O medicamento, de acordo com a presente invenção, compreende uma quantidade eficaz do péptido ou do complexo de péptido, tal como definido anteriormente, em combinação com um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

Os veículos do medicamento da presente invenção podem ser qualquer veículo para a administração parentérica, intratecal, oral, com aerossóis, nasal ou ocular de fármacos que actuam sobre o sistema nervoso. Por exemplo, o medicamento, de acordo com a presente invenção é administrado por via intratecal, que permite a penetração da composição directamente no sistema nervoso central. Alternativamente administra-se através do nariz, o que permite a penetração da composição, sob a forma de aerossol, no sistema nervoso central através do nervo olfactivo ou por via ocular ou por qualquer outro processo adequado de administração, conforme descrito em W.M. Pardridge Peptide drug Delivery, Raven Press, NY, 1991.

A quantidade de péptido no medicamento está num intervalo de concentração de cerca de 0,1 μ M a 10 μ M. A frequência preferida de administração e a dosagem eficaz irão variar de um indivíduo para outro.

Os péptidos, tal como definidos na presente invenção, têm as seguintes vantagens:

- são activos *in vivo* em doses baixas (0,5 μ M de concentração),
- são estáveis *in vivo*,
- são muito eficientes *in vivo* desde que actuem extracelularmente; portanto, a sua actividade não está limitada pela sua capacidade para penetrar dentro da célula,
- não são tóxicos, e
- podem ser facilmente produzidos em grandes quantidades.

A presente invenção será melhor ilustrada pela descrição adicional e pelos desenhos que se seguem, que se referem a exemplos que ilustram o isolamento, a especificidade da ligação e os efeitos biológicos dos péptidos miméticos de APS, de acordo com a presente invenção. Deve entender-se, porém, que estes exemplos são dados apenas a título de ilustração da presente invenção e não constituem de forma alguma uma limitação da mesma.

- A figura 1 ilustra a estrutura de APS-MACN.
- A figura 2 ilustra o efeito dos péptidos miméticos de APS p65 e p66, no crescimento de neurites *in vitro*: fez-se uma cultura de transplantes de gânglios da raiz dorsal de murganhos (E13,5) na ausência (A, D) ou na presença dos péptidos p65 e p66 péptidos revestidos

nas microplacas como conjugado de ASB (B, E) ou sob a forma solúvel (C, F). A quantificação (G) dos efeitos dos péptidos miméticos no comprimento médio da neurite mais longa. *** $P < 0,001$ comparado com o teste t de Student de controlo. (H) Gráfico da distribuição cumulativa da frequência do comprimento médio da neurite mais longa.

- A figura 3 ilustra o efeito do péptido mimético de APS p65 na fasciculação e na orientação *in vivo*: A preparação (A) montada da retina completa de pinto E9 e o seu desenho esquemático demonstrando a posição do cristal Dil (B). O rectângulo a tracejado indica a área da qual foram tiradas as fotografias. As setas apontam para a fissura óptica. Os axónios da retina de pinto E9 injectados em E3 com o péptido inverso (C, F) ou o péptido p65 (D, G, E, H). As pontas das setas mostram exemplos de axónios que deixam os seus fascículos e correm perpendicularmente a eles.
- As figuras 4-7 ilustram o efeito de péptidos miméticos de APS na migração celular *in vitro*, analisados a partir de transplantes da zona subventricular (P1) de ratos normais (MACN +/+), murganhos heterozigotos (MACN +/-) ou murganhos nocaute (MACN -/-), cultivados na presença de péptidos miméticos (p65, p21, p66), diferentes dos referidos péptidos (cíclico, linear e linear acetilado), os péptidos de controlo (p65 inverso e p66 inverso e p22) ou endosialidase N:
- a figura 4 ilustra o efeito do péptido inverso p65 (A, D), a endosialidase N (B, E) ou os péptidos miméticos p65 e p66 (C, F). (G) a quantificação dos efeitos dos péptidos miméticos na distância média da migração celular. *** $P < 0,001$ comparado com o controlo com o teste t de Student. (H) gráfico da distribuição da frequência cumulativa da distância média de migração.

- (I) Efeito, dependente da dose, do péptido p65 na distância média de migração celular,
- a figura 5 ilustra o efeito de diferentes formas do péptido mimético p65 (cíclico, linear, linear e acetilado) na distância média de migração celular, em comparação com o péptido inverso p65 de controlo. *** $P < 0,001$ comparado com o controlo com o teste t de Student,
 - a figura 6 ilustra o efeito do péptido mimético p65 na distância média de migração celular em murganhos nocaute (MACN -/-) ou murganhos heterozigóticos (MACN +/-). As células tratadas com endo N de MACN +/- de ratos e as células inversas p65 tratadas são incluídas para comparação. *** $P < 0,001$ comparado com o controlo com teste t de Student e
 - a figura 7 ilustra o efeito dos péptidos miméticos p65 e p21 na distância média da migração celular. Incluíram-se células tratadas com Endo N e células tratadas com péptidos de controlo (p65 inverso e p22) para comparação. *** $P < 0,001$ comparado com o controlo com o teste t de Student.
 - A figura 8 ilustra o efeito do péptido mimético p65 do APS na migração celular *in vivo*: (A) desenho esquemático do transplante. (B) fotografia de microscopia confocal de uma secção que mostra a CMT (corrente de migração talâmica) de ratos enxertados, na presença do péptido p65. As pontas de setas mostram exemplos de células positivas a GFP e APS. Os transplantes das ZSV (PI) foram enxertados na presença do péptido inverso (C, D) ou do péptido p65 (E, F) e os cérebros foram analisados três dias após o enxerto (C, E) ou quatro dias após o enxerto (D, F). (G) Quantificação do efeito do péptido p65 no número de células positivas a GFP que chegam ao bolbo olfativo

- três dias após o enxerto. * $P < 0,05$ comparado com o controlo através do teste t de Student.
- A figura 9 ilustra o protocolo usado para analisar a recuperação funcional da lesão da medula espinhal após a injeção do péptido p65 ou péptido p65 inverso, tomado como controlo.
 - A figura 10 ilustra a recuperação funcional da lesão da medula espinhal após a injeção do péptido p65 (p65) ou do péptido p65 inverso (Inv) tomado como controlo. R: Teste de Basso, Beattie e Bresnahan (teste de BBB). B: teste do rota-rod. $n = 11$ para p65 e $n = 8$ para Inv. *** $P < 0,01$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$, comparados com o controlo por meio do teste t de Student.
 - A figura 11 ilustra a diminuição da gliose reactiva após a lesão medular em ratos tratados com o péptido p65 ou o péptido p65 inverso tomado como controlo. A: análise de imunofluorescência utilizando anticorpos anti-GFAP e anti-APS isoladamente ou em conjunto (dupla marcação). B: quantificação da coloração de GFAP. * $P < 0,05$, comparado com o controlo com o teste t de Student.
 - A figura 12 ilustra a especificidade de ligação dos péptidos miméticos cíclicos:
 - figura 12a: ELISA usando placas revestidas com o anticorpo monoclonal anti-APS 30H12. Os números de 1 a 16 correspondem às sequências de péptido conforme apresentado no quadro IV.
 - figuras 12B, 12C e 12D: ligação competitiva para as células que expressam APS-MACN. B: pré-incubação de p65 (1 mM) ou p66 (1 mM) com o anticorpo anti-APS MenB. C: anticorpo anti-APS 30H12 sem o péptido. D: pré-incubação de p65 (1 mM) ou p66 (1 mM) com o anticorpo anti-APS 30H12.

EXEMPLO 1: RASTREIO DA BIBLIOTECA DE PÉPTIDOS COM O ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-APS

1) Materiais e Processos

1.1) Materiais

- Biblioteca de exibição de fagos de 12 monómeros de péptidos

Rastrearam-se duas bibliotecas. A primeira biblioteca (12th Phage Display peptide Library, New England Biolabs) compreende 12 monómeros de péptidos lineares presentes na superfície de partículas de fago semelhantes a M13 como a proteína de fusão para o terminal N da proteína menor de revestimento pIII (5 cópias/partícula de fago). A variância da biblioteca difere de 10^8 a 10^9 péptidos com um comprimento de sequência constante.

A segunda biblioteca, preparada como descrito em Felici et al. (J. Mol. Biol., 1991, 222, 301-301), compreende 12 monómeros de péptidos cíclicos, incluindo 2 resíduos de cisteína nas posições 1 e 11 ligados por uma ligação de dissulfureto, presentes na superfície de partículas de fagos semelhantes a M13 como a proteína de fusão para o terminal N da proteína revestida maior pVIII (100 cópias/fago). A biblioteca dispõe de cerca de 10^8 péptidos com comprimento de sequência constante.

- Anticorpo monoclonal (Acm) anti-APS

Utilizam-se anticorpos monoclonais anti-APS, preparados por técnicas padrão, conforme descrito em Antibodies: A Laboratory Manual, E. Howell e D. Lane, Cold

Spring Harbor Laboratory, 1988. Por exemplo, podem utilizar-se os anticorpos monoclonais 735 (Frosch et al, P.N.A.S.;. 1985, 82, 1194-1198), 30H12 (IgG 2a; Coquillat et al. Infect. Immun. 2001, 69, 7130-7139) ou MenB (IgM; AbCYS AbC0019).

- placas (Maxisorp™ NUNC)
- tubos (Maxisorp™, NUNC)
- estirpe ER2537 de *E. coli* (New England Biolabs)
- iniciador de sequenciação 96 gIII (New England Biolabs) :

5 'CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3' (SEQ ID NO: 27)

1.2) Tampões

- Solução de bloqueio: ASB a 0,5 % em SBF
- Solução de revestimento: 25 µg/ml de Acm anti-APS em SBF
- TBS: Tris-HCl 50 mM a pH 8,6, NaCl 150 mM.
- TBST: TBS contendo 0,1 % ou 0,5 % de Tween 20.
- PEG/NaCl: 20 % (p/v) de polietileno-glicol 8000, NaCl 2,5 M.
- Tampão de iodeto: Tris-HCl 10mM, a pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 4M.

1.3) Processo

Incubaram-se tubos Maxisorp™ durante a noite com 2 ml de solução de revestimento, a +4 °C, com agitação suave, de acordo com o manual de Ph.D. 12™ Phage Display peptide Library kit (New England Biolabs). A solução de revestimento foi retirada e utilizada para o revestimento de novos tubos para uma nova passagem do processo de

selecção (biopanning). Os tubos revestidos foram incubados com 2 ml de solução de bloqueio durante 1 hora e lavados 6 vezes com TBST. Os tubos foram cheios com 2 ml de solução de fagos ($7,5 \times 10^{10}$ ufp/ml em TBST contendo 0,1 % de Tween 20) e incubou-se com agitação suave, à temperatura ambiente, durante 1 h. Após a remoção da solução de fagos, os tubos foram lavados 10 vezes com TBST. Os fagos ligados ou são eluídos que especificamente com ácido colomínico 1 mM em TBS durante 1 h ou não especificamente com glicina HCl 0,2 M (a pH 2,2), durante 10 min, com neutralização imediata com Tris-HCl 1 M. Os produtos eluídos foram amplificados em 20 ml de uma cultura de ER2537 de *E. coli* (a partir de uma DO_{600} : 0,03), durante 4,5 horas, a 37 °C, com agitação vigorosa. As culturas foram centrifugadas durante 10 min., a 10.000 rpm, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e centrifugado durante mais de 10 minutos. Adicionou-se uma solução de PEG/NaCl ao sobrenadante (1 volume de PEG/NaCl para 6 volumes de sobrenadante) e o fago precipitou durante a noite, a 4 °C. A solução contendo o precipitado foi centrifugada durante 15 min a 10.000 rpm, a 4 °C. O sobrenadante foi decantado e o aglomerado foi suspenso em 1 ml de TBS e precipitou novamente com 1/6 do volume de PEG/NaCl durante 1 hora, em gelo. Após a centrifugação, o aglomerado foi finalmente suspenso em 200 ml de TBS, 0,02 % de NaN_3 .

Este produto eluído amplificado foi dissolvido em TBST e realizou-se um segundo e um terceiro ciclo de selecção ("biopanning") conforme descrito antes; para o segundo ciclo, o TBST utilizado para a lavagem e a incubação do fago continha 0,1 % de Tween 20; no terceiro ciclo o teor foi de 0,5 %.

O produto eluído não amplificado do terceiro ciclo foi posteriormente titulado em placas de LB/IPTG/X-gal. As placas azuis foram colhidas e o clone de fago ampliado em 2 ml da cultura de ER2537 de *E. coli* durante 4,5 horas, a 37 °C, com agitação vigorosa. Após centrifugação, durante 10 min, a 10.000 rpm, a 4 °C, misturou-se o sobrenadante com 1/6 do volume de PEG/NaCl e o fago precipitou a 4 °C, durante a noite. Centrifugou-se o precipitado durante 15 min, a 10.000 rpm, a 4 °C. Fez-se uma suspensão do aglomerado em 100 µl de TBS. Misturou-se 10 µl desta solução com 100 µl de tampão de iodeto e 250 µl de etanol para a precipitação do ADN do fago de hélice simples. Após a incubação, durante 10 minutos, à temperatura ambiente, a solução foi centrifugada durante 10 min, a 15.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o aglomerado lavado em etanol a 70 % e secou-se rapidamente em vácuo. O aglomerado foi suspenso em 10 µl de água destilada contendo o iniciador de sequenciação para sequenciação automática da inserção do péptido (ciclo de sequenciação Terminator BigDye com o iniciador padrão M13-40 num 877/377 da Applied Biosystem). Utilizou-se a solução remanescente de fago simples para as experiências de ELISA.

2) Resultados

Depois de três ciclos de selecção, isolaram-se os fagos com as seguintes sequências (quadros I, II, III e IV).

Quadro I: Sequências de péptidos lineares isoladas a partir de 17 fagos diferentes eluídos com ácido colomínico 1 mM

SEQ ID NO:	Sequência
5	SWLQMPWALVRT
5	SWLQMPWALVRT
4	TRLAPLVFPLDY
6	EIHLRMIKQITI
7	WHLEYMWRWPRL
5	SWLQMPWALVRT
5	SWLQMPWALVRT
8	LIEQRLPKHILT
9	YETSSSRLLAYA
5	SWLQMPWALVRT
10	TLASQLSNTSAY
5	SWLQMPWALVRT
11	SDQGVNGSWSNP
4	TRLAPLVFPLDY
5	TRLAPLVFPLDY
5	SWLQMPWALVRT
4	TRLAPLVFPLDY

Quadro II: Sequências de péptidos lineares isoladas a partir de 20 fagos diferentes eluídos com glicina 0,2 M.

SEQ ID NO:	Sequência
1	DSPLVPFIDFHP
2	LWQPPLIPGIDF
2	LWQPPLIPGIDF
12	WHNWNLWAPASPT
3	QIEPWFTPEDFP
1	DSPLVPFIDFHP
3	QIEPWFTPEDFP
13 ¹⁾	WHWQWTPWSIQP
2	LWQPPLIPGIDF
5	SWLQMPWALVRT

SEQ ID NO:	Sequência
2	LWQPPLIPGIDF
1	DSPLVPFIDFHP
15	SHLDLSTGHRTS
1	DSPLVPFIDFHP
1	DSPLVPFIDFHP
5	SWLQMPWALVRT
1	DSPLVPFIDFHP
14	IKSPLTWLVPPD
1	DSPLVPFIDFHP
1	DSPLVPFIDFHP
¹⁾ não fazem parte da presente invenção	

5 péptidos lineares têm uma elevada ocorrência nos fagos isolados após três ciclos de selecção (quadro III).

Quadro III: Alinhamento das cinco sequências lineares mais frequentes

Frequência	SEQ ID NO:	Sequência											
9 / 40	5	S	W	L	Q	M	P	W	A	L	V	R	T
8 / 40	1	D	S	P	L	V	P	F	I	D	F	H	P
4 / 40	4	T	R	L	A	P	L	V	F	P	L	D	Y
4 / 40	2	L	W	Q	P	P	L	I	I	G	I	D	F
2 / 40	3	Q	I	E	P	W	F	T	P	E	D	F	P

Um alinhamento da página inicial da corrente de genes com a sequência SEQ ID NO: 1, mostrou que a semelhança de sequências varia de 42,9 % para a SEQ ID NO: 2, 30,8 % para a SEQ ID NO: 3, 28,6 % para a SEQ ID NO: 4, até 8,3 % para a SEQ ID NO: 5.

34 Clones de fagos exibindo péptidos cíclicos ligaram-se a anticorpos de uma forma dependente da dose após três ciclos de selecção e não se ligaram a um anticorpo

irrelevante do mesmo isotipo. Os ADN de 16 destes clones que mostraram o valor mais alto no ensaio de ELISA foram preparados e sequenciados (quadro IV). 3 Clones apresentaram a mesma sequência (SEQ ID NO: 17) e o elemento dimérico WP foi encontrado em 5 clones.

Quadro IV: Sequências de péptidos cíclicos isoladas de fagos

SEQ ID NO:	Péptido nº	Sequência
SEQ ID NO: 16	2	CYPLNPEVYHCG
SEQ ID NO: 17	3	C <u>WP</u> LSHSVIVCG
SEQ ID NO: 17	5	C <u>WP</u> LSHSVIVCG
SEQ ID NO: 18	6 (p65)	CSSVTAWTTGCG
SEQ ID NO: 19	8	CYMASGVFLCG
SEQ ID NO: 17	9	C <u>WP</u> LSHSVIVCG
SEQ ID NO: 20	10	C <u>WP</u> LGPSTYICG
SEQ ID NO: 21	11 (p66)	CSLIASMETGCG
SEQ ID NO: 22		CSKIASMETGCG
SEQ ID NO: 16	12	CYPLNPEVYHCG
SEQ ID NO: 23	13	CYIGDPPFNPCG
SEQ ID NO: 24	14	CWPLGDSTVICG
SEQ ID NO: 25	15	CPLRLAFTFGCG
SEQ ID NO: 26	16	CTRM SHGYWICG

EXEMPLO 2: ANÁLISE DA ESPECIFICIDADE DE PÉPTIDOS POR ANÁLISE ELISA COMPARATIVA DE FAGOS

1) Materiais e Processos

1.1) Materiais

- Anticorpo monoclonal anti-APS 735 ou 30H 12
- Placas Maxisorp™ (NUNC) para o revestimento com anticorpos: placas ELISA

- placas microtituladoras (NUNC) para a diluição de fagos: placas de diluição
- Bacteriófagos M 13 apresentando péptidos dos quadros III e IV do exemplo 1
- Anticorpo anti-M13 conjugado com PRS (PHARMACIA 27-9411-01)
- ABTS [2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico), SIGMA]
- Ácido colomínico (SIGMA)
- Dextrano (SIGMA)

1.2) Tampões

- SBF a pH 7,4
- Solução de bloqueio: ASB a 0,5 % em SBF
- TBS
- TBST: TBS contendo Tween 20 a 0,05 %
- Solução de anticorpo anti-M13 conjugado com peroxidase de rábano-silvestre: 1/5000 em TBST
- Solução de substrato de peroxidase de rábano-silvestre (PRS): 22 mg de ABTS em 100 µl de citrato de sódio 50 mM a pH 4,0. Antes da reacção enzimática, adicione 36 ml de H₂O₂ a 30 % a 21 ml da solução de ABTS.
- solução concorrente: ácido colomínico 1 mM em TBST
- solução de controlo: dextrano 1 mM em TBST

1.3) Processo

Revestiram-se poços de placas Maxisorp™ com 100 µl de uma solução de Acm (25 µg/ml), durante 2 h, à temperatura ambiente. Os poços de controlo foram revestidos apenas com a solução de bloqueio. Em paralelo, as placas de diluição de fagos foram bloqueadas com 200 µl de solução de bloqueio, durante 2 h. Os poços revestidos com anticorpos e

os poços de controlo das placas de ELISA foram bloqueados com 200 µl de solução de bloqueio durante 1 h. Em paralelo, as placas de diluição de fagos foram lavadas 6 vezes com TBST e adicionou-se aos poços 120 µl de TBST. Adicionou-se um volume adequado de uma solução de fagos ao primeiro poço e ajustou-se o volume para 140 µl com TBST. Diluiu-se a solução de fagos no poço 1, na proporção de 1/7, retirando 20 µl do primeiro poço e transferindo para o segundo, também para atingir o volume total de 140 µl. Este procedimento foi repetido para os restantes poços. As diluições dos fagos para os poços de controlo foram feitas do mesmo modo. A placa de ELISA bloqueada foi lavada 6 vezes com TBST e adicionaram-se as diluições de fagos ou a solução comparativa. Após a incubação, durante 1 h, as placas foram lavadas 10 vezes com TBST. Após a incubação durante 1 h, os poços foram lavados 10 vezes com TBST. Adicionou-se aos poços 100 µl da solução de anticorpos M13 conjugados com PRS. Após a incubação de 1 h, lavaram-se os poços 10 vezes com TBST e adicionou-se aos poços 100 µl da solução de substrato de PRS (com H₂O₂). As placas foram lidas a 405 nm utilizando um leitor de microplacas.

2) Resultados

A especificidade de ligação dos péptidos das SEQ ID NO: 1 a 5, do exemplo I, foi analisada num ensaio comparativo de ELISA utilizando ácido colomínico como comparação. Os resultados apresentados nos quadros V a IX estão expressos em percentagem de ligação, por comparação com o fago apresentando a SEQ ID NO: 5, numa concentração de 710 ng/poço (100 %).

Quadro V: Ligação de fagos, que apresentam a SEQ ID NO: 5, a Acm 735

	Concentração de fagos (ng/poço)						
	710	109	18	3	1	0	0
fago	100 ± 3	102 ± 0	98 ± 0	73 ± 4	18 ± 2	4 ± 3	2 ± 1
fago + ácido colomínico	106 ± 0	103 ± 5	90 ± 0	36 ± 0	5 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
fago + dextrano	102 ± 2	103 ± 1	97 ± 1	62 ± 1	14 ± 0	5 ± 0	1 ± 0
fago + ASB	5 ± 1	3 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Quadro VI: Ligação de fagos, que apresentam a SEQ ID NO: 1, a Acm

	Concentração de fagos (ng/poço)						
	1003	154	26	4	1	0	0
fago + Acm735	108 ± 2	111 ± 7	111 ± 3	112 ± 12	86 ± 15	28 ± 2	7 ± 0
fago + ácido colomínico + Acm735	108 ± 0	109 ± 12	90 ± 3	42 ± 3	12 ± 1	2 ± 1	0 ± 0
fago + + dextrano Acm735	109 ± 6	110 ± 6	112 ± 5	107 ± 1	77 ± 4	24 ± 4	8 ± 0
fago + ASB	10 ± 1	4 ± 1	3 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Quadro VII: Ligação de fagos, que apresentam a SEQ ID NO: 4, a Acm

	Concentração de fagos (ng/poço)						
	870	134	22	4	1	0	0
fago + Acm735	107 ± 7	112 ± 10	109 ± 1	108 ± 2	67 ± 2	17 ± 0	4 ± 0
fago + ácido colomínico + Acm735	96 ± 7	106 ± 3	89 ± 1	29 ± 1	5 ± 0	1 ± 0	0 ± 0
fago + dextrano + Acm735	96 ± 12	108 ± 7	113 ± 0	105 ± 0	66 ± 3	16 ± 1	5 ± 0
fago + ASB	10 ± 1	4 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Quadro VIII: Ligação de fagos, que apresentam a SEQ ID NO: 2, a Acm

	Concentração de fagos (ng/poço)						
	796	122	20	3	1	0	0
fago + Acm735	108 ± 5	109 ± 3	112 ± 10	89 ± 11	27 ± 4	4 ± 2	2 ± 1
fago + ácido colomínico + Acm735	109 ± 6	114 ± 12	100 ± 6	48 ± 6	10 ± 1	1 ± 0	1 ± 0
Dextrano + fago + Acm735	109 ± 8	111 ± 6	110 ± 5	99 ± 1	27 ± 1	5 ± 1	1 ± 0
fago + ASB	12 ± 1	9 ± 1	4 ± 3	2 ± 1	1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Quadro IX: Ligação de fagos, que apresentam a SEQ ID NO: 3, a Acm

	Concentração de fagos (ng/poço)						
	859	132	22	4	1	0	0
fago + Acm735	111 ± 8	109 ± 16	114 ± 8	99 ± 10	50 ± 1	13 ± 1	6 ± 0
fago + ácido colomínico + Acm735	104 ± 2	107 ± 2	85 ± 7	27 ± 3	4 ± 1	1 ± 1	0 ± 0
dextrano fago + + Acm735	109 ± 2	108 ± 0	108 ± 3	107 ± 8	57 ± 3	13 ± 1	6 ± 0
fago + ASB	10 ± 0	5 ± 1	2 ± 1	1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

O fago que apresenta a sequência SEQ ID NO: 1 (DSPLVPFIDFHP) mostrou a melhor ligação a Acm 735 em comparação com os outros fagos. Esta ligação competiu com ácido colomínico, enquanto o dextrano não mostrou nenhum

efeito competitivo. O fago apresentando a sequência SEQ ID NO: 4 mostrou valores semelhantes. Devido à baixa ocorrência da sequência SEQ ID NO: 4, decidiu-se sintetizar a sequência SEQ ID NO: 1 (péptido p21) e uma variante aleatória da sequência SEQ ID NO: 1 (péptido p22: PDHIFVFSPDLP, SEQ ID NO: 28) como controlo.

Os fagos que apresentam péptidos cíclicos correspondendo à sequência CSSVTAWTTGCG (SEQ ID NO: 18) e CSKIASMETGCG (SEQ ID NO: 22), respectivamente, em que os dois resíduos de cisteína estão ligados, através de uma ponte de dissulfureto, mostrou a melhor ligação ao Acm 30H12, em comparação com os outros fagos. Assim, decidiu-se sintetizar os péptidos cíclicos correspondentes (p65 e p66).

EXEMPLO 3: ANÁLISE DA ESPECIFICIDADE DE p21, p65 e p66 POR ENSAIO COMPARATIVO DE PÉPTIDOS POR ELISA, ELISA E LIGAÇÃO COMPETITIVA COM AS CÉLULAS QUE EXPRESSAM APS-MACN

1) Preparação de conjugados de péptido-ASB com biotina

1.1) Materiais

- éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccimida (MBS, SIGMA M2786, Pierce 22311)
- éster de biotinamidocaproato-N-hidroxisuccimida (NHS-biotina, SIGMA 02643, Pierce 20217)
- dimetilformamida (DMF, SIGMA)
- ASB (Calbiochem 122605)
- péptidos sintéticos contendo cisteína provenientes de p21 (DSPLVPFIDFHPC, SEQ ID NO: 29), p65 e p66 e correspondentes aos péptidos de controlo contendo

- cisteína derivados de p22 (PDHIFVFSPDLPC, SEQ ID NO: 30), péptidos inversos de p65 e p66, respectivamente.
- coluna de exclusão por dimensão PD-10 (AMERSHAM-PHARMACIA 17-0851-01)
 - Filtros da centrífugadora Ultrafree-4 e membrana de tubo Biomax 50K NMWL, volume de 4 ml (MILLIPORE UFV4BQK25)
 - L-cisteína (SIGMA)

1.2) Tampões

- solução concentrada de MBS: 13 mg/ml em DMF
- solução concentrada de NHS-biotina: 2,5 mg/ml em DMF (estas concentrações levam moléculas de ASB altamente activadas com cerca de 5 moléculas de biotina/molécula de ASB)
- tampão de conjugação: NaH_2PO_4 0,083 M, NaCl 0,9 M, a pH 7,2.
- SBF a pH 7,4
- solução de cisteína: 100 mg/ml de L-cisteína em tampão de conjugação

1.3) Processo

Dissolveu-se 10 mg de ASB em 2 ml de tampão de conjugação e adicionou-se 140 μl de solução concentrada de MBS/NHS-biotina. A solução foi incubada durante 1 h, à temperatura ambiente, com agitação suave. Equilibrou-se a coluna PD-10 com 50 ml de tampão de conjugação. Após a adição de 2,14 ml da solução à coluna, eluiu-se a ASB activada com alíquotas de 0,5 ml de tampão de conjugação. A eluição da proteína foi monitorizada a 280 nm. Dissolveu-se uma quantidade adequada do péptido contendo cisteína em 1 ml de tampão de conjugação. Para um de 5 isómeros (PM 1500,

adicionou-se 1,14 mg de péptido a 10 mg ASB). Adicionou-se esta solução de péptido ao conjunto de fracções contendo maleimida activada/ASB biotinilada. Após 2 h de incubação, à temperatura ambiente, adicionou-se 100 ml de uma solução de cisteína para bloquear os grupos maleimida que não reagiram. Após 1 h, dialisou-se a solução reaccional 5 vezes com 1 ml de SBF, numa unidade de ultrafiltração. O conjugado biotinilado foi dissolvido em SBF e armazenaram-se as alíquotas a -20 °C.

2) Ensaio comparativo por ELISA dos conjugados de péptido biotinilado - ASB no Acm anti-APS

2.1) Materiais, tampões e processo

2.1.1) Materiais

- Acm 735 e 30H12
- Placas Maxisorp™ (NUNC) para o revestimento com o anticorpo: placas de ELISA
- placas microtituladoras (NUNC) para a diluição de péptidos: placas de diluição
- Conjugados de péptido biotinilado - ASB preparados como antes descrito
- Conjugado de fosfatase alcalina de extravidina - avidina (SIGMA E2636)
- substrato de p-nitrofenilo - fosfatase alcalina (SIGMA 104-105)

2.1.2) Tampões

- SBF a pH 7,4
- Solução de bloqueio: ASB em SBF a 0,5 %
- TBS

- TBST: TBS contendo Tween 20 a 0,05 %
- Solução de conjugado de extravidina-fosfatase alcalina - avidina: 1/5000 em TBST
- Solução de substrato de fosfatase alcalina; 1 comprimido em 5 ml de NaHCO₃ 50 mM, solução de MgCl₂ 1 mM, a pH 9,6.
- solução mista de comparação: ácido colomínico 1 mM com um gradiente de conjugado de ASB-péptido em TBST

2.1.3) Processo

Revestiram-se poços da placa Maxisorp™ com uma solução de 100 µl de Acm (25 µg/ml), durante 2 h, à temperatura ambiente. Os poços de controlo das placas de ELISA foram apenas revestidos com a solução de bloqueio. Em paralelo, as placas de diluição do conjugado de péptido - ASB foram bloqueadas com 200 µL de solução de bloqueio, durante 2 h. Os poços revestidos de anticorpos e os poços de controlo foram bloqueados com 200 µl de solução de bloqueio durante 1 h. Em paralelo, as placas diluição de conjugado de péptido - ASB foram lavadas 6 vezes com TBST e adicionou-se aos poços 120 µl de TBST. Adicionou-se, ao primeiro poço, um volume adequado de solução de conjugado de péptido - ASB e ajustou-se o volume para 140 µl com TBST. Diluiu-se o conjugado de ASB - péptido nos poços, na proporção de 1/7, retirando 20 µl do primeiro poço e transferindo para o segundo, para se atingir também o volume total de 140 µl. Este procedimento foi repetido para os poços restantes. As diluições do conjugado de ASB-péptido para os poços de controlo foram feitas da mesma maneira. As placas de ELISA bloqueadas foram lavadas 6 vezes com TBST e adicionou-se aos poços diluições do conjugado de ASB - péptido ou 100 µl da solução mista comparativa. Após a incubação, durante 1 h, lavaram-se os poços 10 vezes com TBST e adicionou-se aos

poços 100 µl da solução de substrato de fosfatase alcalina. As placas foram lidas a 405 nm, após 10 a 60 minutos, utilizando um leitor de microplacas.

2.2) Resultados

A especificidade do péptido p21 (SEQ ID NO: 1) foi investigada num ensaio comparativo por ELISA usando o conjugado de p21 biotinilado - ASB e uma variante aleatória de conjugado de p21 (p22) como controlo. Os resultados, apresentados nos quadros X e XI, estão expressos em percentagem de ligação, por comparação com o péptido p21 na mais elevada concentração ($9,45 \cdot 10^{-5}$ M), que corresponde a 100 % de ligação.

Quadro X: Ligação do p21 a Acm 735 num ensaio comparativo por

Concentração de péptido (M)									
	9,45	1,67	2,94	5,20	9,27	1,62	2,86	5,04	8,89
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹
Péptido + Acm 735	100±11	93±10	95±1	91±2	93±9	56±4	13±1	2±0	0±0
Péptido + ácido colomínico + Acm 735	43±3	34±3	23±1	15±3	5±2	0±1	0±0	0±0	0±0
Péptido + sulfato de condroitina + Acm 735	96±8	99±4	99±8	94±7	92±2	50±1	11±2	3±0	2±0
Péptido + ASB	3±1	1±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

Quadro XI: Ligação de p22 ao Acm 735 num ensaio comparativo por

	Concentração de péptido (M)								
	9,45	1,67	2,94	5,20	9,27	1,62	2,86	5,04	8,89
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹
Péptido + Acm 735	32 ± 1	9 ± 0	1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Péptido + ácido colomínico + Acm 735	27 ± 0	5 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Péptido + sulfato de condroitina + Acm 735	29 ± 0	8 ± 1	3 ± 1	2 ± 0	2 ± 1	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0
Péptido + ASB	3 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

O quadro X mostra uma clara inibição da ligação de p21 na presença do ácido colomínico. Por comparação, o sulfato de condroitina C não teve influência na ligação do péptido B. O quadro XI mostra não haver ligação com Acm 735 para a variante aleatória do conjugado p21 (p22); não se observaram diferenças quando o ácido colomínico ou o

sulfato condroitico C estavam presentes. Estes resultados levam à conclusão de que a sequência SEQ ID NO: 1 (péptido p21) se liga especificamente a Acm 735 de uma forma dependente da concentração.

3) Ensaio por ELISA com conjugado de péptido - ASB

A especificidade dos péptidos cíclicos foi investigada num ensaio por ELISA utilizando placas revestidas com anticorpo 30H12, seguindo o protocolo descrito antes para o ELISA comparativo, com a ressalva de que o concorrente foi omitido. Os resultados, apresentados na figura 12a, demonstraram que os péptidos cíclicos se ligam ao anticorpo de uma forma específica do antigénio. Os péptidos p65 e p66 que exibiram a mais elevada ligação foram escolhidos para estudos posteriores.

4) Ligação comparativa com células que expressam APS-MACN

A especificidade dos péptidos p65 e p66 péptidos foi analisada num ensaio comparativo utilizando anticorpos anti-APS e APS-MACN. A pré-incubação do anticorpo monoclonal 30H12 com 0,1 mM de cada péptido p65 e p66 impediu a sua ligação às células que expressam APS-MACN (figura 12D versus 12B). A especificidade de ligação foi examinada com mais detalhe por meio de ensaios de reconhecimento de péptidos por meio de um outro anticorpo mononclonal anti-APS (MenB). Os resultados, apresentados na figura 12C, demonstraram que os péptidos p65 e p66 só se ligam a 30H12; a pré-incubação dos péptidos com MenB não impediu o reconhecimento da APS-MACN (figura 12 C). Assim, os mimotopes (moléculas que simulam a estrutura de epítomos) de p65 e p66 parecem ser específicos para um único determinante (idiotípico).

EXEMPLO 8: ANÁLISE DA BIOATIVIDADE DE PÉPTIDOS MIMÉTICOS DE APS

1) Materiais e processos

1.1) Animais

Murganhos transgênicos GFP foram descritos previamente em Hadjantonakis et al. (Biotechnol., 2002, 2, 11-) e todas as análises foram realizadas em ratos com antecedentes dos Swiss. MACN de murganhos nocaute (MACN -/-) já foram previamente descritas em Cremer et al, citado antes.

1.3) Cultura de transplantes de gânglios da raiz dorsal (GRD)

Dissecaram-se GRDs de E13,5 de embriões de murganhos em meio HBSS e semearam-se em lâminas de vidro revestidas com polilissina ou com péptidos ligados a ASB. Os transplantes foram cultivados na presença ou na ausência dos péptidos sob a forma solúvel (40 µM) em dois ml de meio neurobasal (DMEM/F12 de Ham, a 3:1 (V/V), GIBCO, tamponado com Hepes 20mM), completado como descrito em Faivre-Sarrailh et al. J. Cell. Sci., 1999, 18, 3015-3027 e Chazal et al. J. Neurosci. 2000, 20, 1446-1457.

1.4) Cultura de transplante da zona subventricular (ZSV).

Realizaram-se culturas de transplantes da ZSV conforme descrito em Chazal et al., citado antes. Resumidamente, os murganhos com 1 dia de idade foram mortos por decapitação rápida. Os cérebros foram dissecados e seccionados com um

Vibratome (Leica). A ZSV da parede lateral do corno anterior do ventrículo lateral foi dissecada em meio HBSS (LIFE TECHNOLOGIES) e cortou-se em explantes com um diâmetro de 200-300 µm. Misturaram-se os transplantes com Matrigel (BECKTON DICKINSON) e fez-se a sua cultura em pratos de quatro poços. Após a polimerização, o gel foi coberto com 400 µl de meio isento de soro contendo o suplemento B-27 (LIFE TECHNOLOGIES), na presença ou na ausência de 40 µm de péptidos (p65, p66, p65 inverso, p21 ou p22) e 70 U de Endo N por mililitro.

1.5) Imuno-histoquímica)

Fixaram-se os transplantes de GRDs (*gânglios da raiz dorsal*) e incubaram-se as secções, a 4 °C, 2 h, respectivamente, com um anticorpo anti-neurofilamento (SMI-31, diluição a 1:800, STERNBERGER MONOCLONALS) e durante a noite com um anticorpo anti-APS (diluição a 1:200 ,Rougon et al, J. Cell. Biol., 1986, 103, 2429-2437). A revelação foi feita por meio de uma hora de incubação com o anticorpo secundário correspondente marcado por fluorescência (IgM ou IgG anti-murganho de cabra conjugado com vermelho do Texas, IMMUNOTECH)

1.6) Distância de migração das células (transplantes da ZSV) e crescimento neuronal (transplantes de GRD).

Após 48 h de cultura, examinaram-se os transplantes directamente (ZSV) ou após a sua fixação durante a noite com uma solução de paraformaldeído a 4 % em SBF e imunocoloração (GRDs). A observação foi feita utilizando objectivas de 2,5 X, 5X, 10X e 32X (Axiovert 35M, ZEISS). As imagens foram obtidas com uma câmara de vídeo (Cool View, PHOTONIC SCIENCE) e analisadas utilizando o programa

informático de tratamento de imagem (Visiolab 1000, BIOCUM). A distância média de migração (calculada em cinco experiências diferentes, incluindo pelo menos cinco transplantes por condição) ou o comprimento médio da neurite mais longa (calculado em duas experiências diferentes, incluindo pelo menos oito transplantes por condição) foi a distância, em micrómetros, entre a borda do transplante e a borda da frente da migração celular. Fizeram-se quatro medições para cada transplante. A significância das diferenças entre o controle e as diferentes condições experimentais foi calculada pelo teste t de Student.

1.7) Transplante

Fez-se a incubação de transplantes de 100 μm de diâmetro da ZSV de murganhos GFP com 1 dia de idade, durante quinze minutos, em DMEM complementado com soro bovino fetal a 10%, na presença de p65 0,01 M ou péptido inverso e enxertado estereotáxicamente (0,5 μl) em ZSV de murganhos com seis semanas, conforme descrito em Lois e Alvarez-Buylla (Science, 1994, 264, 1145-1148). Três ou quatro dias após o enxerto, os animais foram perfundidos intracardicamente com uma solução de paraformaldeído a 4 % em SBF. Dissecaram-se os cérebros, foram fixados, crioprotetidos e congelados em isopentano. Cortaram-se secções sagitais em série (12 μm) com um micrótomo Leica e corou-se, como descrito antes. As células GFP que chegaram ao bulbo olfativo, após três dias, foram observadas utilizando fluorescência UV com uma objectiva de 40X (Axioscope, ZEISS) e foram contadas em duas experiências diferentes (quatro animais por condição). A significância da diferença entre as duas condições foi calculada pelo teste t de Student.

1.8) Injecções intravítreas e suporte global da retina.

Deram-se as injecções conforme descrito em Monnier et al. (Developmental Biology, 2001, 229, 1-14). Resumidamente, cortou-se uma janela de 2 x 2 cm, foi cortado na parte externa sobre os embriões E3 de galinha. Injectou-se um µl de Fast verde com 10 mM de p65 ou de péptido inverso no corpo vítreo do olho direito utilizando um capilar. Após uma incubação de cinco dias, a 37 °C, dissecaram-se as retinas (E8), distribuíram-se por filtros de nitrocelulose (MILLIPORE) e fixaram-se com uma solução de paraformaldeído a 4 % em SBF. Aplicaram-se dois cristais pequenos de Dil (perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina) dorsalmente à fissura óptica. As retinas foram armazenadas no escuro a 37 °C durante 10 dias até que o corante atingiu os cones de crescimento axonal na fissura óptica, montados em glicerol : SBF (9: 1, v:v) e analisaram-se por microscopia confocal.

2) Resultados

2.1) Efeito dos péptidos miméticos de APS no crescimento axonal e na fasciculação *in vitro* (figura 2)

Fez-se uma cultura dos transplantes de gânglios da raiz dorsal de murganho (E13,5), na presença dos péptidos miméticos cíclicos p65 e p66, tanto na forma solúvel como revestidos nas microplacas como conjugados com ASB. As células da cultura, na ausência de péptidos ou na presença de péptidos inversos (revestidos ou na forma solúvel), foram utilizadas como controlos.

O efeito dos péptidos no crescimento da neurite e na fasciculação foi analisado qualitativamente e quantitativamente (figura 2A a H).

p65 e p66, numa forma solúvel, induziram uma desfasciculação clara de feixes de axónios (C versus A e F versus D) e um aumento significativo no crescimento axonal (C versus A) por comparação com os controlos.

Curiosamente, p65 e p66, numa forma revestida, induziram um efeito contrário na fasciculação (B versus A e E versus D) e nenhum efeito no desenvolvimento de neurite.

Estes resultados foram confirmados através de análise quantitativa mostrando que p65 e p66, na forma solúvel, aumentaram o desenvolvimento de neurite em 34 % e 21 % respectivamente, em comparação com os controlos, ao passo que os mesmos péptidos, sob a forma revestida, não induziram qualquer aumento significativo no desenvolvimento de neurite (figura 2G e 2H).

Esses resultados demonstram que os péptidos miméticos de APS são capazes de regular o crescimento axonal e a fasciculação *in vitro*.

2.2) Efeito dos péptidos miméticos de APS na fasciculação e orientação axonal *in vivo* (figura 3)

Injectou-se p65 e p66 em olhos de embrião de galinha (E3) e observou-se a retina em E9. Os resultados, apresentados na figura 3, mostram que a presença de péptidos miméticos de APS, durante o desenvolvimento da

retina, induz a orientação de axónios orientação e defeitos de fasciculação; os axónios deixam os seus fascículos e correm perpendicularmente a ele (setas em D, G, E e H). Em comparação, não se observou nenhum defeito na orientação dos axónios e observa-se fasciculação após a injeção dos péptidos de controlo.

Estes resultados demonstram que os péptidos miméticos de APS são capazes de regular o crescimento axonal e a orientação *in vivo*.

2.3) Efeito de péptidos miméticos de APS na migração celular *in vitro* (figuras 4 a 7)

O efeito dos péptidos miméticos de APS na migração celular *in vitro* foi analisado a partir de transplantes subventriculare de ratos normais com 1 dia de idade (MACN +/+), ratos heterozigóticos (MACN +/-) ou murganhos nocaute (MACN -/-) de cultura em Matrigel, na presença de péptidos miméticos (p65, p21, p66), forma diferente do péptido p65 (cíclico, linear, linear e acetilado), péptidos de controlo (p65 inverso e p66 inverso e p22) ou endosialidase N. Os resultados estão ilustrados nas figuras 4 a 7.

- A figura 4 (A a I) mostra que a adição dos péptidos p65 e p66 à cultura aumenta a taxa de migração dos precursores neuronais e uma modificação do seu arranjo como semelhante a cadeias (C e F). Estes efeitos não foram encontrados com os péptidos inversos (A e D) e foram dependentes de APS, uma vez que foram abolidos pelo tratamento com endo N (B e E).

Estes resultados foram confirmados pela análise quantitativa (G e H), demonstrando que p65 e p66 induzem um

aumento significativo na taxa de migração dos precursores neuronais (+ 40% e + 26%, respectivamente, a 0,4 mM, em comparação com o controlo sem o péptido), enquanto endo N vai diminuí-lo (-21 %, em comparação com o controlo sem o péptido).

A curva de resposta à dose de p65 (I) mostra que o efeito óptimo na migração celular é observado a partir de péptido 0,4 μ m anterior.

- A figura 5 mostra que a ciclização de p65 é um pré-requisito para p65 promover o efeito desde que as correspondentes sequências de aminoácidos, na forma linear, N-acetiladas ou não sejam incapazes de estimular a migração celular.

- A figura 6 mostra que o efeito de p65 é dependente da expressão do APS dado que se observou uma redução significativa dos precursores da migração em MACN- de murganho, em comparação com MACN +/- de murganho, na presença de péptido inversor ou péptido p65; o efeito foi comparável em MACN +/- de murganho tratadas com endo N e MACN- de murganho e o p65 não foi capaz de reverter a migração prejudicada nas MACN -/- de murganhos.

- A figura 7 mostra que p65 induz um aumento significativo na taxa de migração de precursores neuronais, em comparação com o péptido de controlo correspondente (p65 inverso).

Em contrapartida, p21 induz uma redução significativa na taxa de migração dos precursores neuronais, em comparação com o péptido de controlo correspondente

(péptido p22); a redução é comparável à observada nas células tratadas com endo N.

Estes resultados demonstram que os péptidos miméticos são capazes de estimular (p65) ou inibir (p21) a migração celular de uma forma dependente de APS.

2.4) Efeito de péptidos miméticos de APS na migração celular *in vivo* (figura 8)

O efeito dos péptidos miméticos de APS na migração celular, *in vivo*, foi analisado por meio de enxerto de tecido e avaliação da migração de células da ZSV. Enxertaram-se pequenos pedaços de tecido da ZSV (100 µm de diâmetro) de murganhos GFP com 1 dia de idade na área ZSV de ratos adultos, na presença dos péptidos p65, p65 inverso ou na ausência de péptido. Os resultados estão ilustrados na figura 8.

A figura 8 mostra que a presença do péptido p65 aumenta significativamente o número de células positivas para GFP que migram até ao bolbo olfativo (através da corrente de migração talâmica ou CMT), por comparação com o controlo. Este efeito foi observado precocemente nos primeiros 3 dias pós-enxerto (figura 8E). Estes resultados foram confirmados pela análise quantitativa mostrando que o número de células positivas para GFP presentes no bolbo olfativo, 3 dias após o enxerto, é 17 vezes maior na presença de p65, em comparação com o controlo (figura 8G).

Estes efeitos foram dependentes do APS, uma vez que foram abolidos em MACN de murganhos nocaute.

Estes resultados demonstram que os péptidos miméticos são capazes de aumentar a migração de células positivas para APS.

EXEMPLO 9: ANÁLISE DA RECUPERAÇÃO FUNCIONAL DE LESÃO MEDULAR APÓS INJEÇÃO DE PÉPTIDOS MIMÉTICOS DE APS

1) Material e processos

1.1) Cirurgia da espinal medula e administração do péptido

Anestesiaram-se murganhos machos Swiss-CD1 (8 a 10 semanas de idade) com uma mistura de cetamina e xilazina. A medula espinhal foi exposta através de uma incisão mediana da pele e através da retracção da musculatura paravertebral. Realizou-se a laminectomia ao nível de T7-T8 e a espinal medula ficou exposta. Com uma tesoura de iridectomia, preparou-se uma semi-secção bilateral dorsal, transectando o funículo dorsal direito e esquerdo, os cornos dorsais, mas poupando a maior parte do funículo ventral, resultando numa transecção completa do tracto cortico-medular (TCM) dorsal médio. Para a série de murganhos que recebeu os péptidos aplicou-se uma compressa Surgicoll saturada com 10 µl quer de péptido p65 ou p65 inverso (10µM) sobre o local da transecção e cobriu-se com vaselina para evitar a difusão. Toda a camada muscular interna foi suturada com fio fino. A pele foi suturada com grampos cirúrgicos. Após a cirurgia, administrou-se 1 ml de solução salina por via subcutânea, para evitar a desidratação e os ratos foram colocados sob uma lâmpada de aquecimento até que recuperaram plenamente da narcose. Os murganhos voltaram então para as suas gaiolas e receberam uma injeção subcutânea diária de antibiótico Baitryl™ para

evitar infecções. Fez-se um esvaziamento manual da bexiga até à recuperação completa da função autónoma da bexiga.

1.2) Ensaio funcional (Figura 9)

A avaliação funcional dos animais foi realizada nos dias (D) D1, D4, D7, D14, D21, D28, D35, durante a primeira semana após a lesão da espinhal medula e, em seguida, numa base semanal até ao D35, por dois observadores que desconheciam a identidade do grupo. Avaliou-se a recuperação locomotora foi avaliada utilizando o teste BBB (Basso, Beattie e Bresnahan test; Basso et al. Restor. Neurol. Neurosci, 2002, 5, 189-218). A escala varia de 0 (nenhum movimento dos membros posteriores observado) a 21 (marcha normal) e pode ser subdividido em três intervalos. As pontuações de 0 a 7 correspondem a uma baixa recuperação (movimentos das articulações, nenhum suporte de peso, sem colocação da pata). As pontuações de 8 a 13 podem ser relacionadas com uma recuperação intermédia (colocação da pata, coordenação dos membros posteriores do antebraço). As pontuações de 14 a 21 podem ser relacionadas com uma recuperação muito boa. Finalmente, no último dia de teste (D35), os ratos foram submetidos ao teste rota-rod para avaliar a coordenação motora fina.

1.2) Histologia (figura 9)

No D5, os animais lesionados que receberam quer p65 (n = 3) ou p65 invertido (n = 3) foram perfundidos transcardiacamente. As medulas espinhais foram seccionadas no plano sagital a intervalos de 20 µm em blocos de 10 mm de comprimento no local da lesão. Para examinar a extensão da lesão, realizou-se a coloração de Nissl em séries de 1 em cada 6 secções em todos os animais. Séries de 1 em 3

secções foram coradas com anticorpo MenB anti-APS (IgM de murganho) e/ou anticorpos anti-GFAP (IgG de murganho). Os anticorpos ligados foram revelados por meio de anticorpos secundários adequados marcados por fluorescência.

2) Resultados

Após várias lesões, os axónios do cérebro e da medula espinal não avançam através do SNC de adulto. Em vez disso, estas fibras ficam presas no local da lesão e permanecem desligadas dos alvos sinápticos, levando a défices profundos e persistentes em muitos casos clínicos. A lesão medular (LM) é o exemplo mais claro de um estado clínico em que a desconexão axonal leva a uma incapacidade significativa apesar de morte neuronal mínima.

Assim, o efeito dos péptidos miméticos de APS, p65 (e da sua contraparte inversa, tomada como controlo) na recuperação funcional da lesão medular foi analisado em murganhos.

2.1) Melhoria da recuperação locomotora após lesão medular em ratos que receberam péptido p65 no local da lesão

Os resultados apresentados na figura 10 (A e B) demonstram que o tratamento com péptido mimético de APS está correlacionado com a recuperação funcional após a lesão da semi-secção dorsal do tórax médio. Mais precisamente, a recuperação foi avaliada através de uma medida de campo aberto padronizada da função locomotora após a lesão medular, a pontuação BBB. Nesta escala, 21 é a função normal e 0 é a paralisia bilateral total dos membros posteriores. Todos os murganhos tiveram pontuações de 0 no D1 após a lesão. Os murganhos tratados com p65 recuperaram

gradualmente a função parcial durante um período de observação de 45 dias (figura 10A). As pontuações dos ratos tratados com p65 foram significativamente maiores do que as dos controlos de p65 inverso desde o D14 após a lesão e durante todo o calendário seguinte. Considera-se que o período de tempo (14 dias), em que se observou essa melhoria é compatível com algum crescimento de longa distância das fibras TCM que se estendem desde o local da lesão até ao conjunto motor lombar. O desenvolvimento local na medula lombar, assim como os rearranjos de outros tractos descendentes, tal como o sistema rubroespinal ou de circuitos da medula espinhal distal intrínsecos também podem contribuir. Independentemente do mecanismo, a recuperação locomotora em ratos tratados com p65 foi significativamente maior do que nos animais de controlo. O efeito benéfico de p65 na recuperação foi ainda avaliado por um teste de rota-rod realizado no D35 (figura 10B).

2.2) Diminuição da gliose reactiva no D5

Para avaliar o efeito do péptido, fez-se a quantificação da expressão da proteína fibrilar glial ácida (PFGA) como um índice de gliose reactiva, num subconjunto de animais, no D5 após a cirurgia. Seleccionaram-se estes animais de forma cega para a quantificação. Analisaram-se 3 animais quanto a p65 (10 lâminas por animal) e 3 quanto a p65 inverso (10 lâminas por animal). Realizou-se uma dupla marcação com anticorpo MenB anti-APS. A quantificação foi realizada também de forma cega.

Observou-se uma diferença significativa entre os animais tratados com p65 e os tratados com p65 inverso (figura 11 A e B), demonstrando que o tratamento com p65 reduziu a gliose reactiva de 40 %, comparado com o tratamento com p65 inverso, possivelmente evitando a

migração dentro da cicatriz ou inibindo outros processos envolvidos, como a acção de citocinas inflamatórias. Em qualquer caso, estes resultados suportam o facto de a recuperação funcional ser melhor em ratos tratados com p65.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE AIX MARSEILLE II
SCHAFFER-N
UNIVERSITAET HAMBURG
ROUGON Geneviève
TORREGROSSA Pascal
SCHACHNER Melitta
SCHAFFER NIELSEN Claus

<120> Uso de péptidos miméticos de ácido poli-alfa-2,8-sialico para regular as funções de MACN

<130> F644PCT83

<160> 32

<170> PatentIn versão 3,1

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 1

Asp Ser Pro Leu Val Pro Phe Ile Asp Phe His Pro
1 5 10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 2

Leu Trp Gln Pro Pro Leu Ile Pro Gly Ile Asp Phe
1 5 10

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 3

Gln Ile Glu Pro Trp Phe Thr Pro Glu Asp Phe Pro
1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 4

Thr	Arg	Leu	Ala	Pro	Leu	Val	Phe	Pro	Leu	Asp	Tyr
1				5					10		

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 5

Ser	Trp	Leu	Gln	Met	Pro	Trp	Ala	Leu	Val	Arg	Thr
1				5					10		

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 6

Glu	Ile	His	Leu	Arg	Met	Ile	Lys	Gln	Ile	Thr	Ile
1				5					10		

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 7

Trp	His	Leu	Glu	Tyr	Met	Trp	Arg	Trp	Pro	Arg	Leu
1				5					10		

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 8

Leu	Ile	Glu	Gln	Arg	Leu	Pro	Lys	His	Ile	Leu	Thr
1				5					10		

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 9

Tyr	Glu	Thr	Ser	Ser	Ser	Arg	Leu	Leu	Ala	Tyr	Ala
1				5					10		

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 10

Thr	Leu	Ala	Ser	Gln	Leu	Ser	Asn	Thr	Ser	Ala	Tyr
1				5					10		

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 11

Ser	Asp	Gln	Gly	Val	Asn	Gly	Ser	Trp	Ser	Asn	Pro
1				5					10		

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 12

Trp	His	Asn	Trp	Asn	Leu	Trp	Ala	Pro	Ala	Ser	Pro	Thr
1				5					10			

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 13

Trp	His	Trp	Gln	Trp	Thr	Pro	Trp	Ser	Ile	Gln	Pro
1				5					10		

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 14

Ile	Lys	Ser	Pro	Leu	Thr	Trp	Leu	Val	Pro	Pro	Asp
1				5					10		

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 15

Ser His Leu Asp Leu Ser Thr Gly His Arg Thr Ser
1 5 10

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 16

Cys Tyr Pro Leu Asn Pro Glu Val Tyr His Cys Gly
1 5 10

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 17

Cys Trp Pro Leu Ser His Ser Val Ile Val Cys Gly
1 5 10

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 18

Cys	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Trp	Thr	Thr	Gly	Cys	Gly
1				5					10		

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 19

Cys	Tyr	Met	Ala	Ser	Gly	Val	Phe	Leu	Cys	Gly
1				5					10	

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 20

Cys	Trp	Pro	Leu	Gly	Pro	Ser	Thr	Tyr	Ile	Cys	Gly
1				5					10		

<210> 21

<211> 12
<212> PRT
<213> sequência artificial

<220>
<223> péptido sintético

<400> 21

Cys	Ser	Leu	Ile	Ala	Ser	Met	Glu	Thr	Gly	Cys	Gly
1				5					10		

<210> 22
<211> 12
<212> PRT
<213> sequência artificial

<220>
<223> péptido sintético

<400> 22

Cys	Ser	Lys	Ile	Ala	Ser	Met	Glu	Thr	Gly	Cys	Gly
1				5					10		

<210> 23
<211> 12
<212> PRT
<213> sequência artificial

<220>
<223> péptido sintético
<400> 23

Cys	Tyr	Ile	Gly	Asp	Pro	Pro	Phe	Asn	Pro	Cys	Gly
1				5					10		

<210> 24
<211> 12
<212> PRT
<213> sequência artificial

<220>
<223> péptido sintético

<400> 24

Cys	Trp	Pro	Leu	Gly	Asp	Ser	Thr	Val	Ile	Cys	Gly
1				5					10		

<210> 25
<211> 12
<212> PRT
<213> sequência artificial

<220>
<223> péptido sintético

<400> 25

Cys	Pro	Leu	Arg	Leu	Ala	Phe	Thr	Phe	Gly	Cys	Gly
1				5					10		

<210> 26
<211> 12
<212> PRT
<213> sequência artificial

<220>
<223> péptido sintético

<400> 26

Cys	Thr	Arg	Met	Ser	His	Gly	Tyr	Trp	Ile	Cys	Gly
1				5					10		

<210> 27

<211> 20

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 27

tagcgtaacg ccctcatagt 20

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 28

Pro	Asp	His	Ile	Phe	Val	Phe	Ser	Pro	Asp	Leu	Pro
1				5					10		

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 29

```
Asp Ser Pro Leu Val Pro Phe Ile Asp Phe His Pro Cys
1           5           10
```

<210> 30

<211> 13

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 30

```
Pro Asp His Ile Phe Val Phe Ser Pro Asp Leu Pro Cys
1           5           10
```

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: péptido
mimético de APS

<400> 31

```
Asp His Gln Arg Phe Phe Val
1           5
```

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: péptido
mimético de APS

<400> 32

Ala	His	Gln	Ala	Ser	Phe	Val
1				5		

Lisboa, 4 de Março de 2011.

REIVINDICAÇÕES

1. Péptido para ser usado como um medicamento caracterizado pelo facto de se destinar a regular o crescimento, a regeneração e a plasticidade de células de vertebrados que expressam MACN, em que o referido péptido é um mimotopo do ácido poli- α 2,8-siálico ligado a MACN que se selecciona no grupo que consiste em: péptidos lineares com até 30 aminoácidos, compreendendo pelo menos uma das sequências SEQ ID NO: 1 a 12, 14 e 15 e péptidos cíclicos com até 30 aminoácidos, compreendendo pelo menos uma das sequências SEQ ID NO: 16 a 26.
2. Péptido cíclico, de acordo com a reivindicação 1, para se utilizar como um medicamento, caracterizado pelo facto de a cadeia lateral do resíduo de cisteína na posição 1 de uma das sequências SEQ ID NO: 16 a 26 estar ligada covalentemente ao resíduo da cadeia lateral de cisteína na posição 10 ou 11 da referida sequência.
3. Péptido, de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, para se utilizar como um medicamento, caracterizado pelo facto de estar incluído num complexo formado por vários péptidos idênticos ou diferentes, tal como definido na reivindicação 1 ou na reivindicação 2, ligados por ligações covalentes ou não covalentes.
4. Péptido, de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 3 para se utilizar como um medicamento, caracterizado pelo facto de estar associado a uma molécula que permite que o referido péptido acesse a barreira hemato-encefálica.

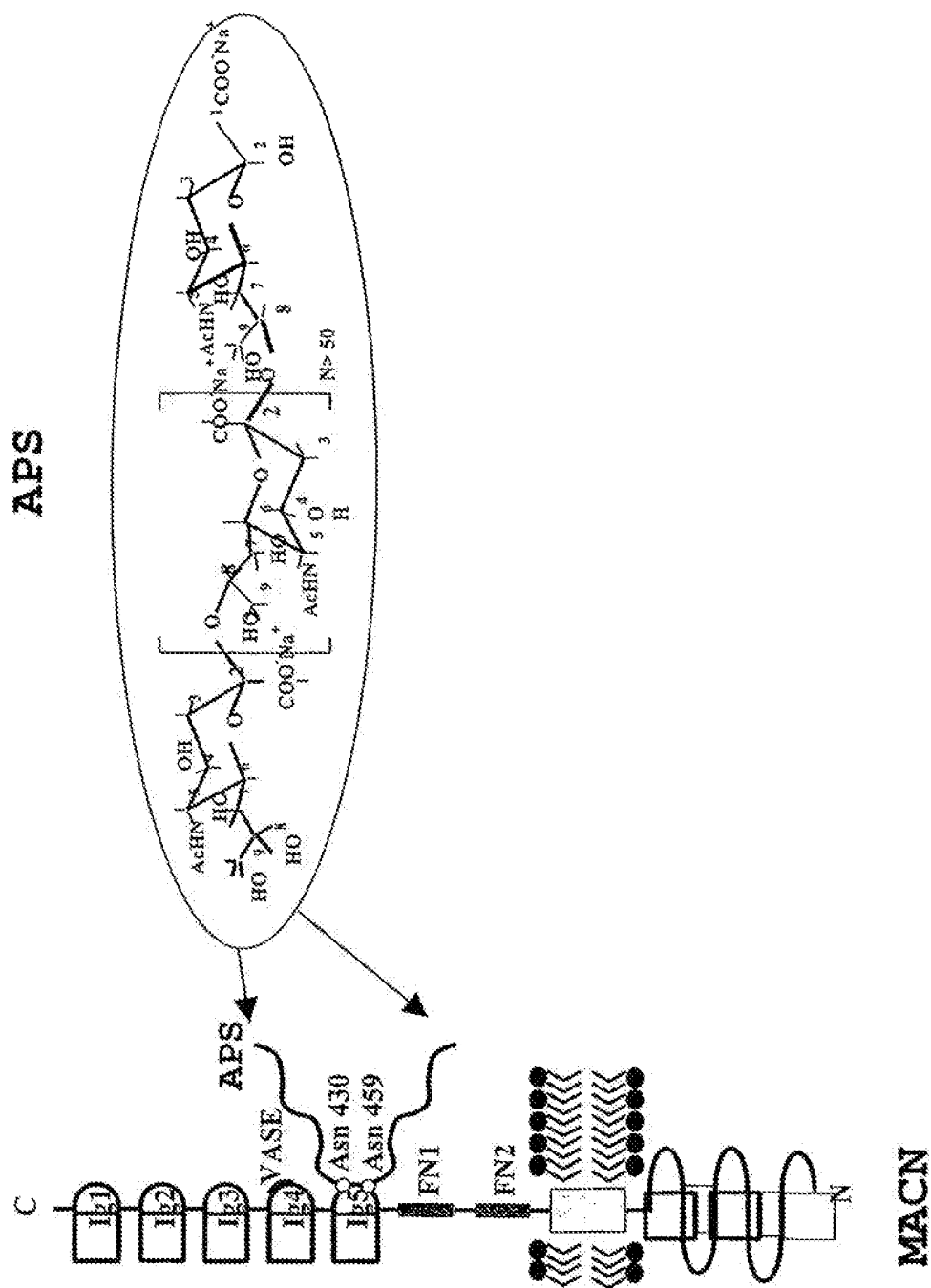
5. Péptido, de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo facto de se utilizar como um medicamento para o crescimento, a regeneração e a plasticidade de células de vertebrados que expressam MACN, para a prevenção ou o tratamento de um estado clínico patológico seleccionado no grupo que consiste em: doenças neurodegenerativas, lesões cerebrais e da medula espinhal, problemas de aprendizagem e de memória relacionados com a idade.
6. Péptido, de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo facto de se utilizar como um medicamento para inibir o crescimento, a regeneração e a plasticidade de células de vertebrados que expressam MACN, para a prevenção ou o tratamento de cancro.
7. Péptido, de acordo com a reivindicação 5, se utilizar como um medicamento, caracterizado pelo facto de ser um péptido cíclico que inclui a SEQ ID NO: 18 ou a SEQ ID NO: 22.
8. Péptido, de acordo com a reivindicação 6, para se utilizar como um medicamento, caracterizado pelo facto de ser um péptido linear contendo a SEQ ID NO: 1.

Lisboa, 4 de Março de 2011.

RESUMO

UTILIZAÇÃO DE PÉPTIDOS MIMÉTICOS DO ÁCIDO POLI- ALFA-2,8-SIÁLICO PARA REGULAR FUNÇÕES DE MACN

A presente invenção tem por objecto a utilização de um péptido que consiste em 5 a 30 resíduos de aminoácidos, preferencialmente 9 a 15, ainda mais preferencialmente cerca de 12 resíduos de aminoácidos, em que o referido péptido compreende um epítopo B de um ácido poli- α -2,8-siálico ligado a MACN, que é reconhecido por um anticorpo contra o ácido poli- α -2,8-siálico (APS), para a preparação de um medicamento para a regulação das funções de MACN, para ser administrado para a prevenção e/ou o tratamento de doenças neuro-degenerativas, lesões do cérebro e da espinal medula, problemas de aprendizagem e de memória relacionados com a idade e cancro.



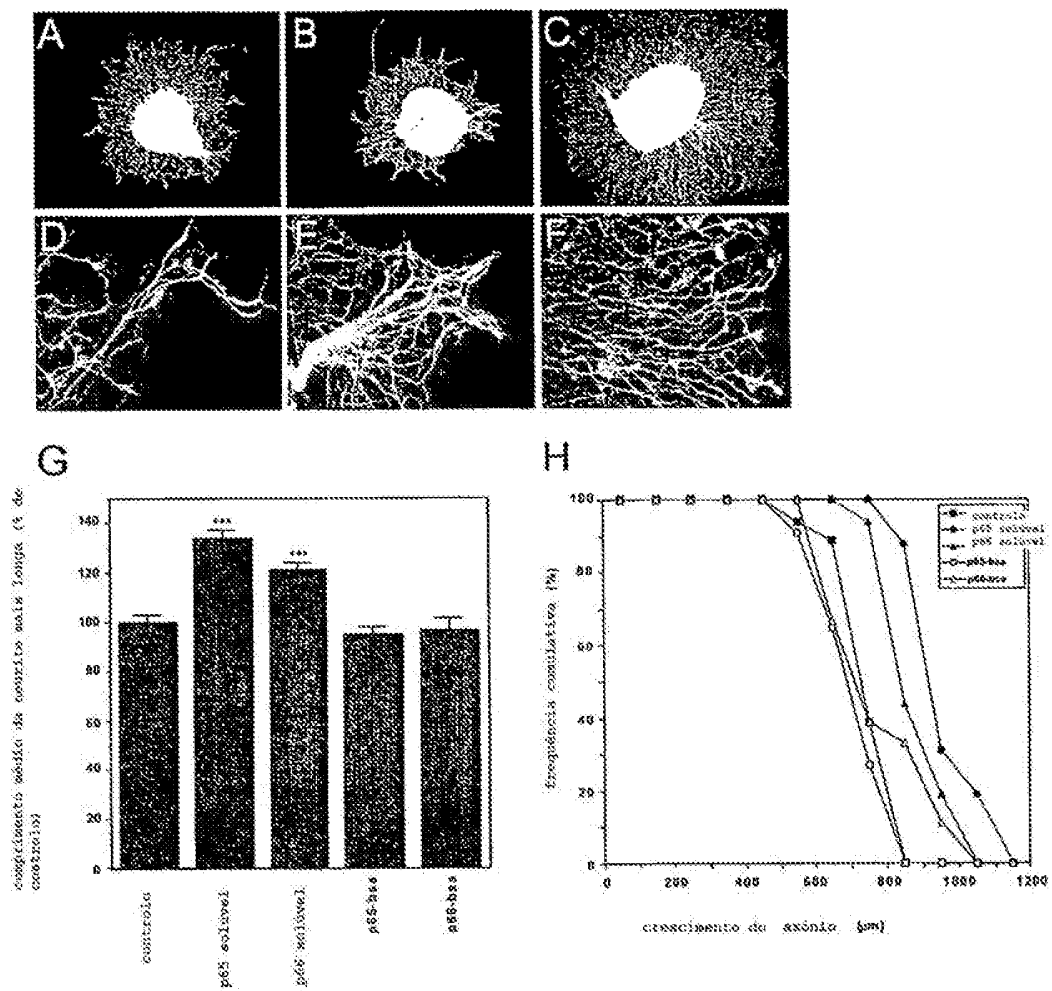


Figura 2

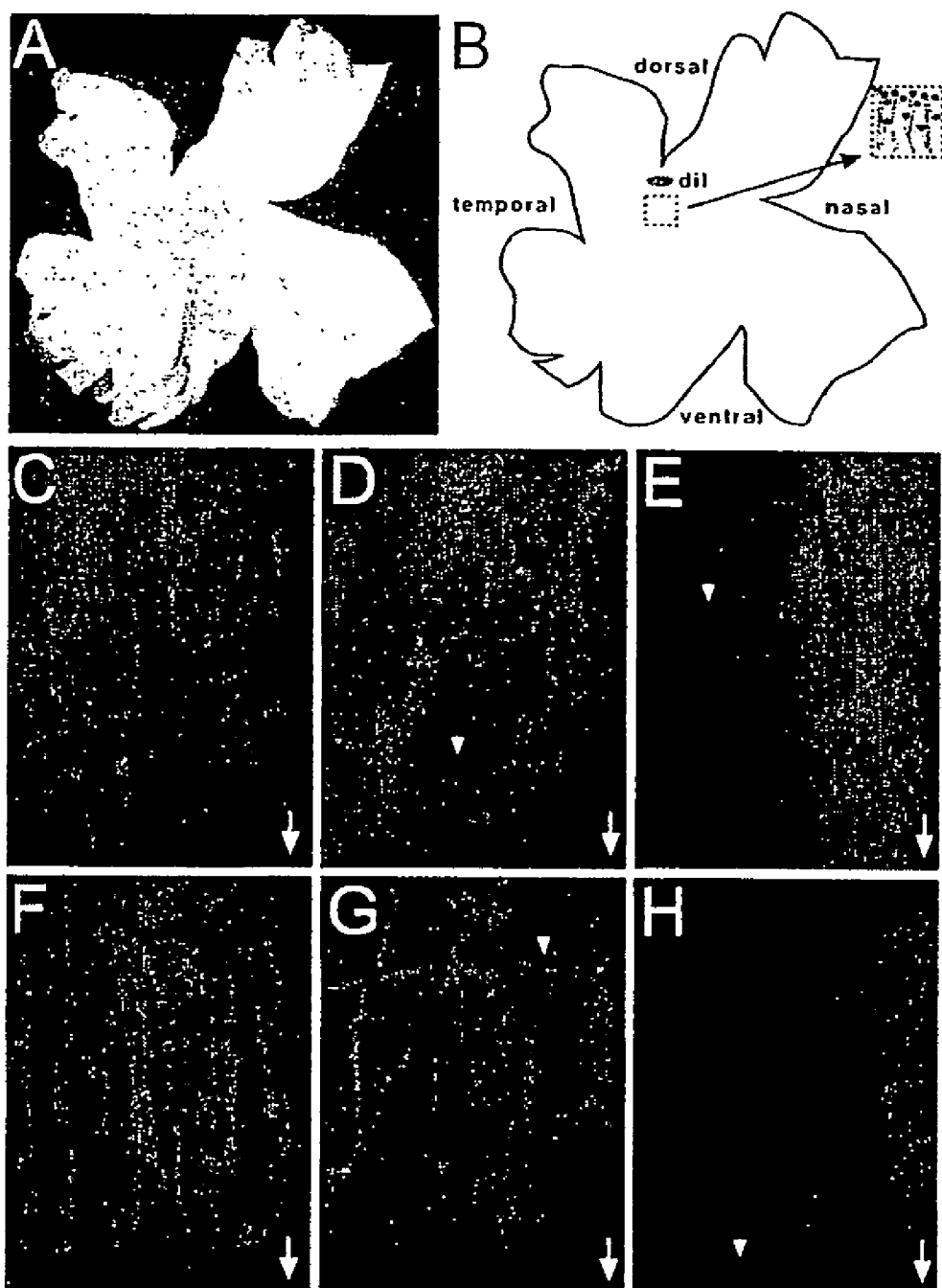


Figura 3

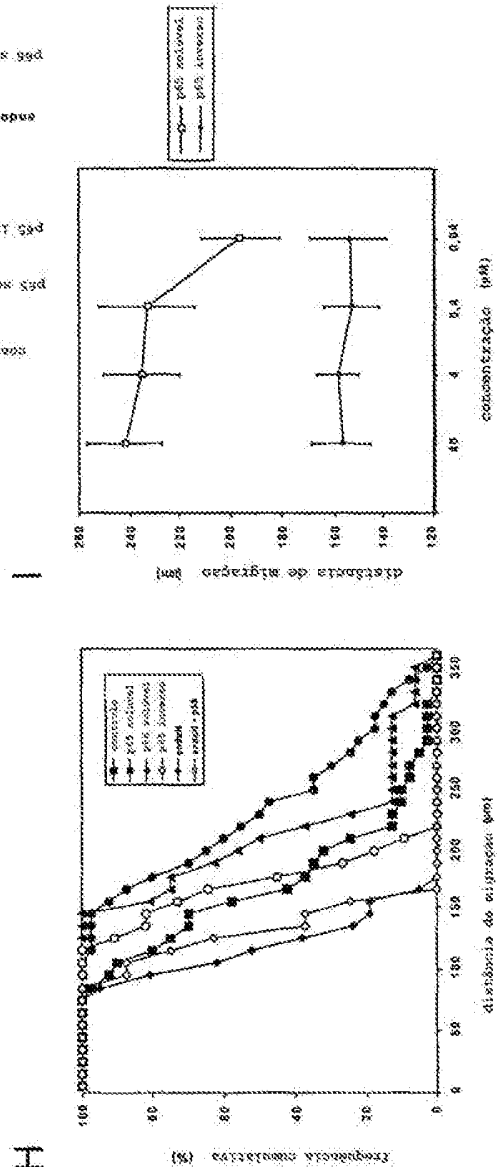
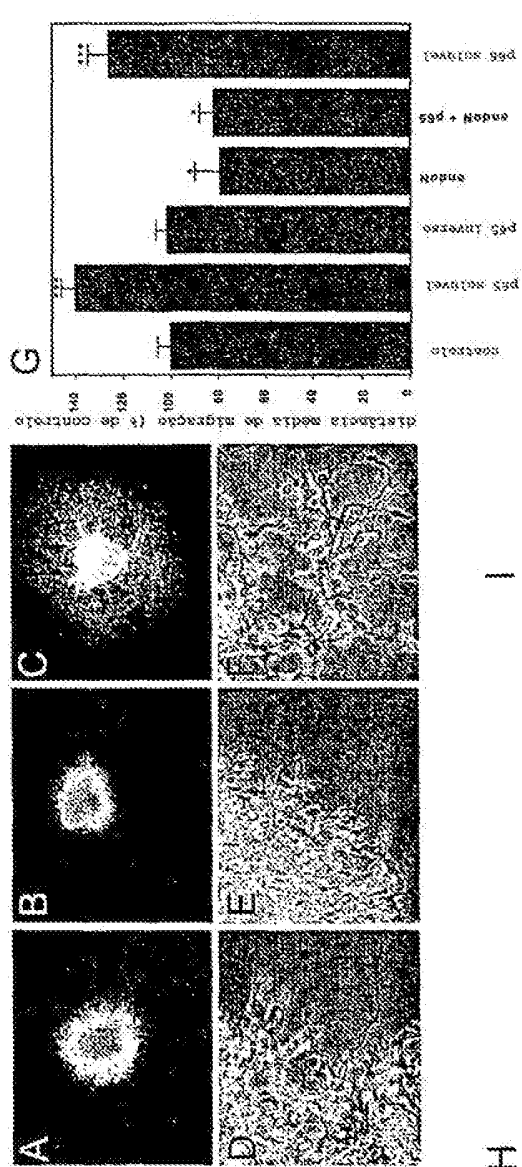


Figura 4

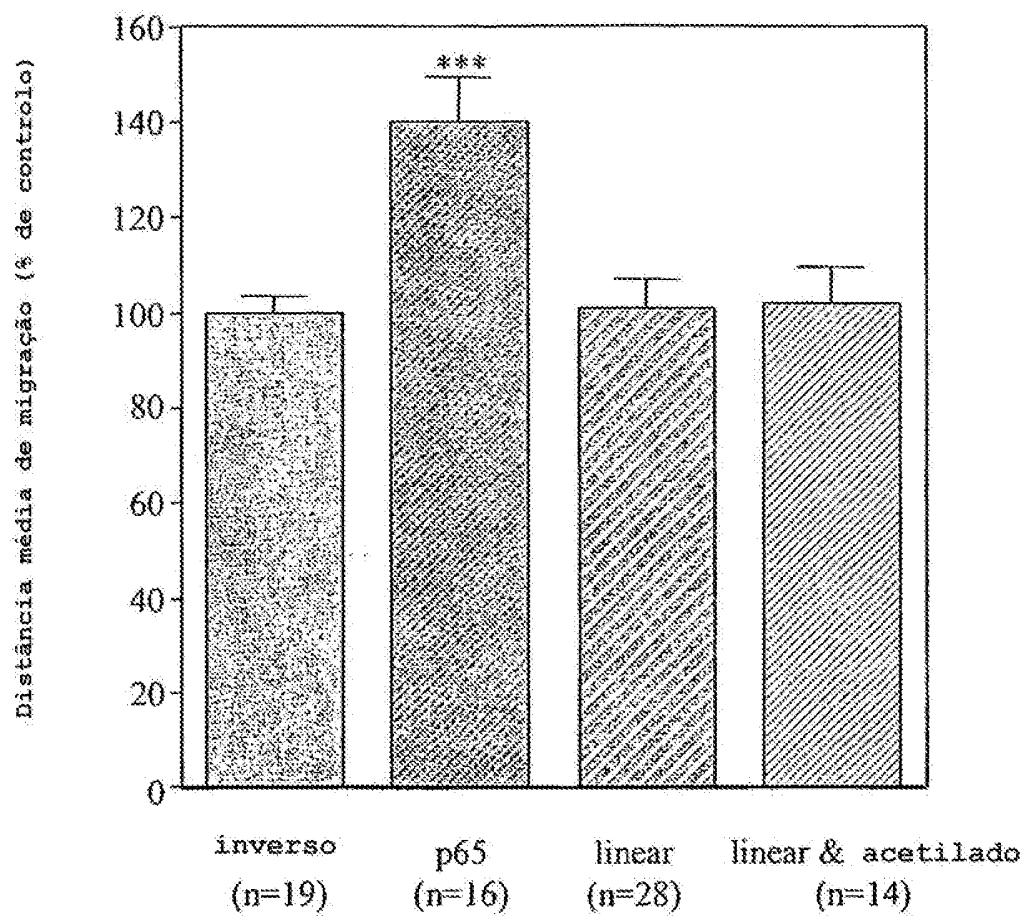


Figura 5

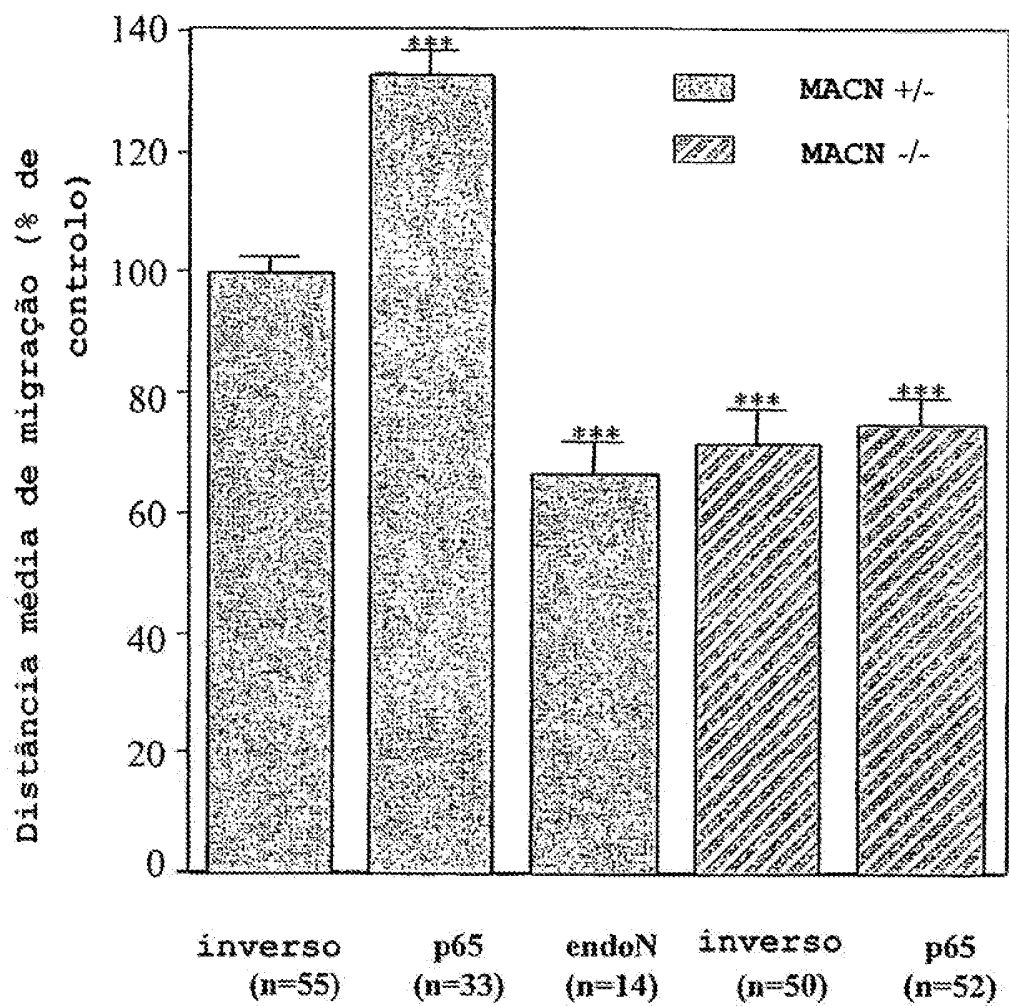


Figura 6

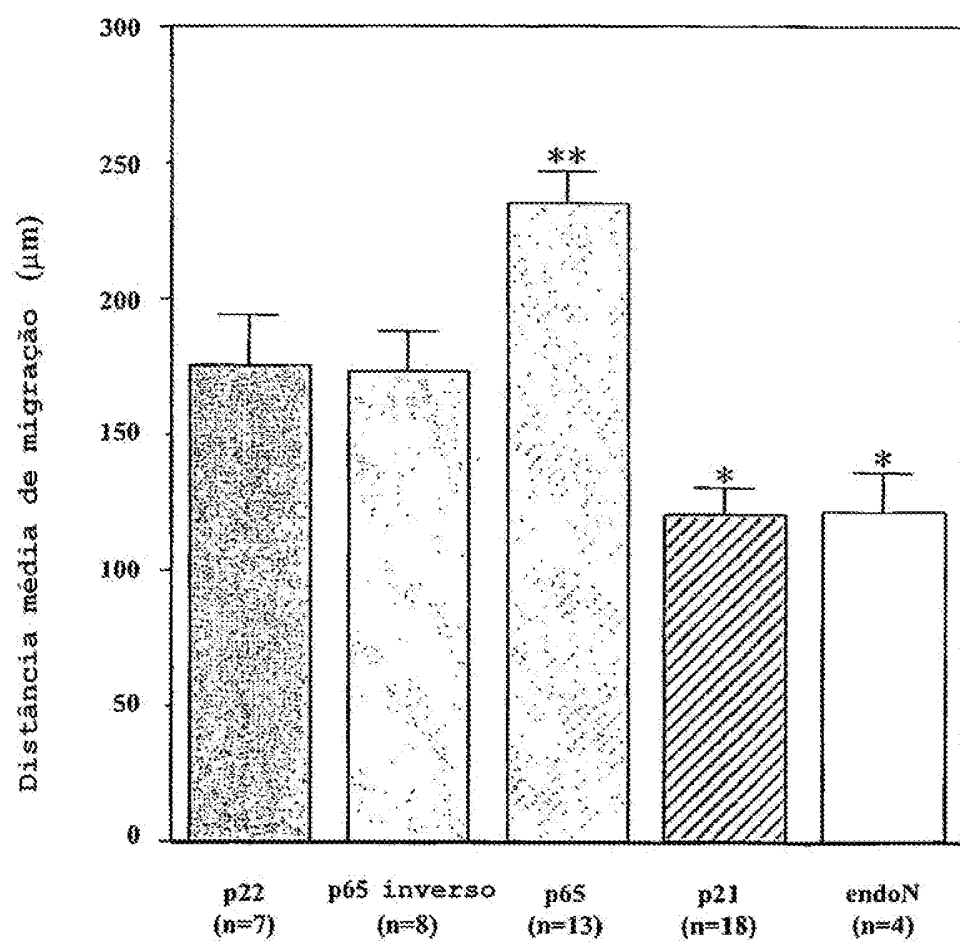


Figura 7

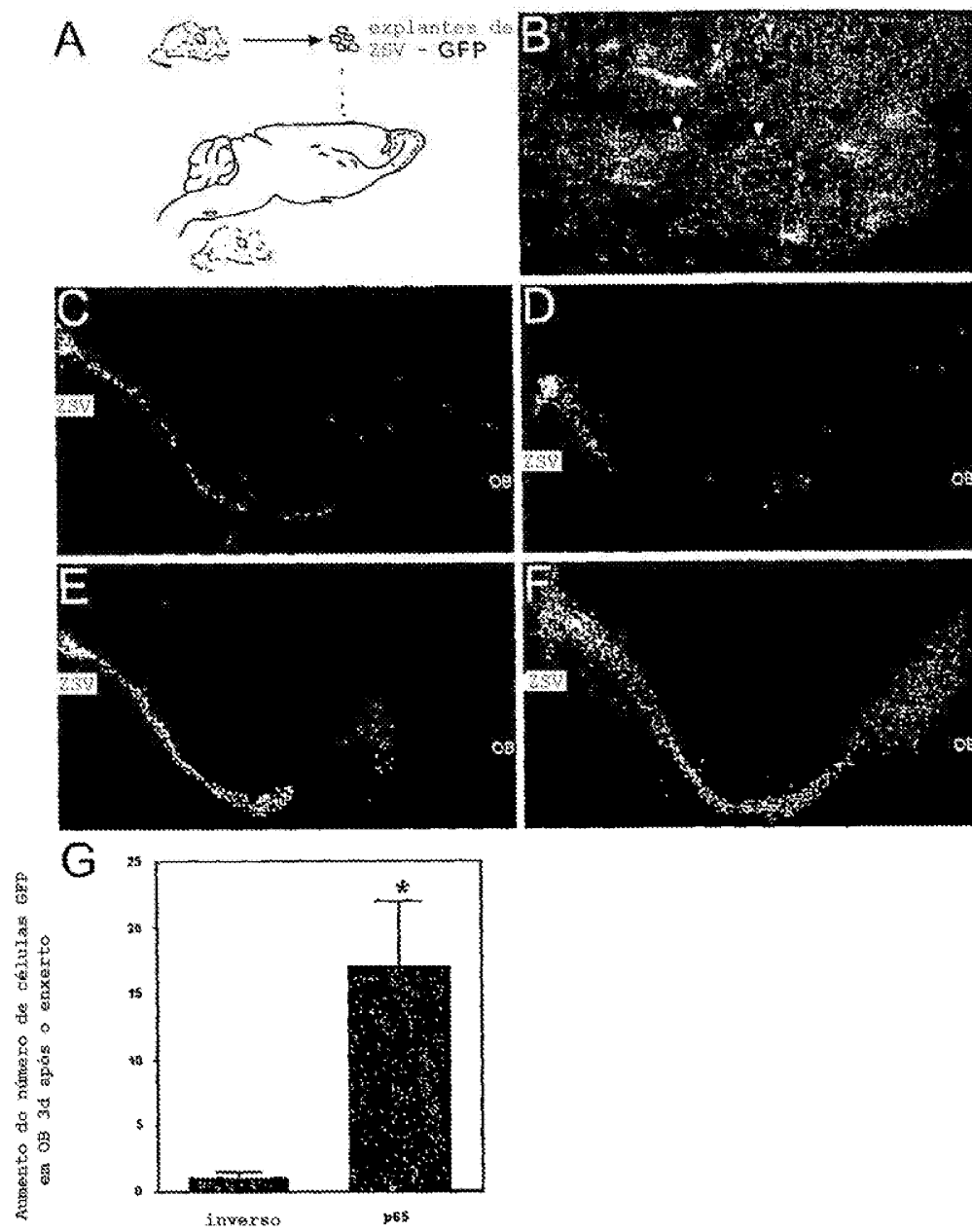
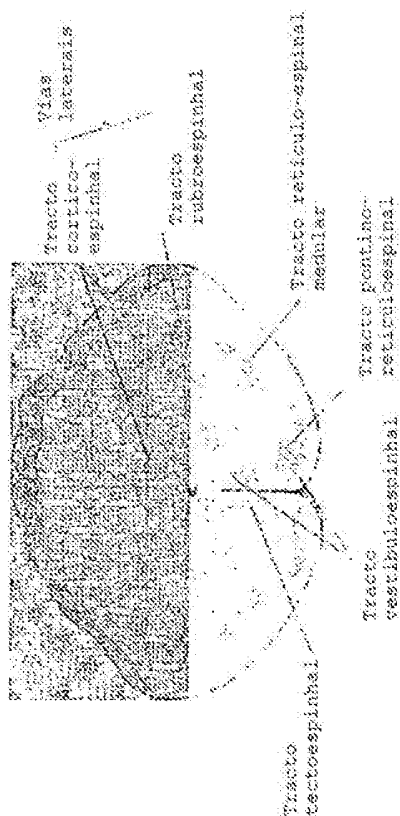


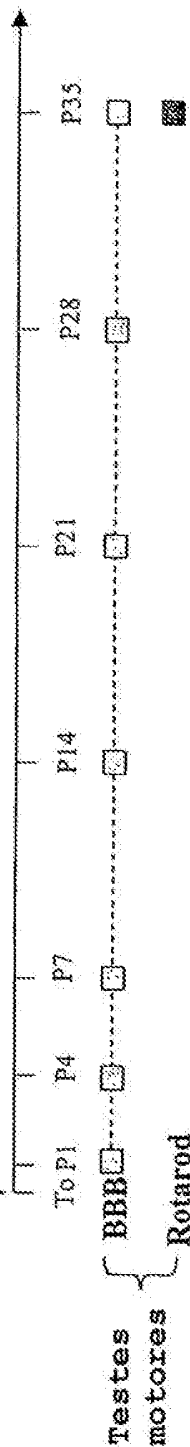
Figura 8

Semi-seção da medula espinal



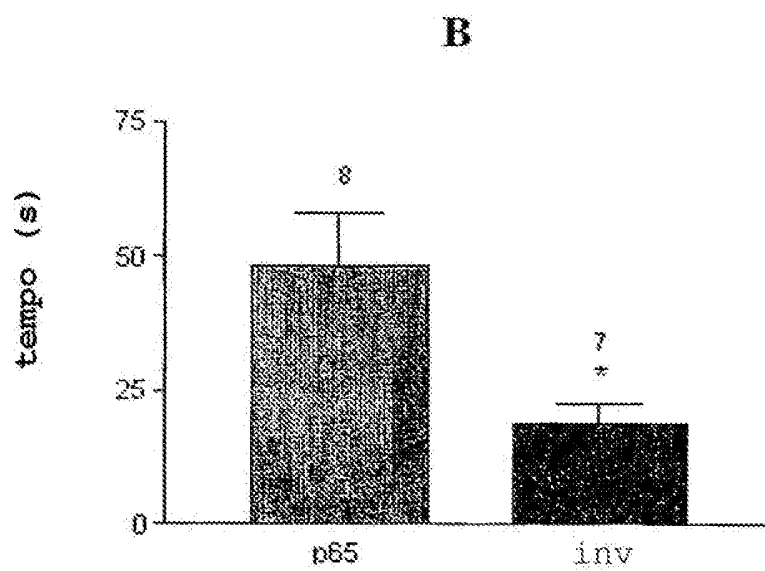
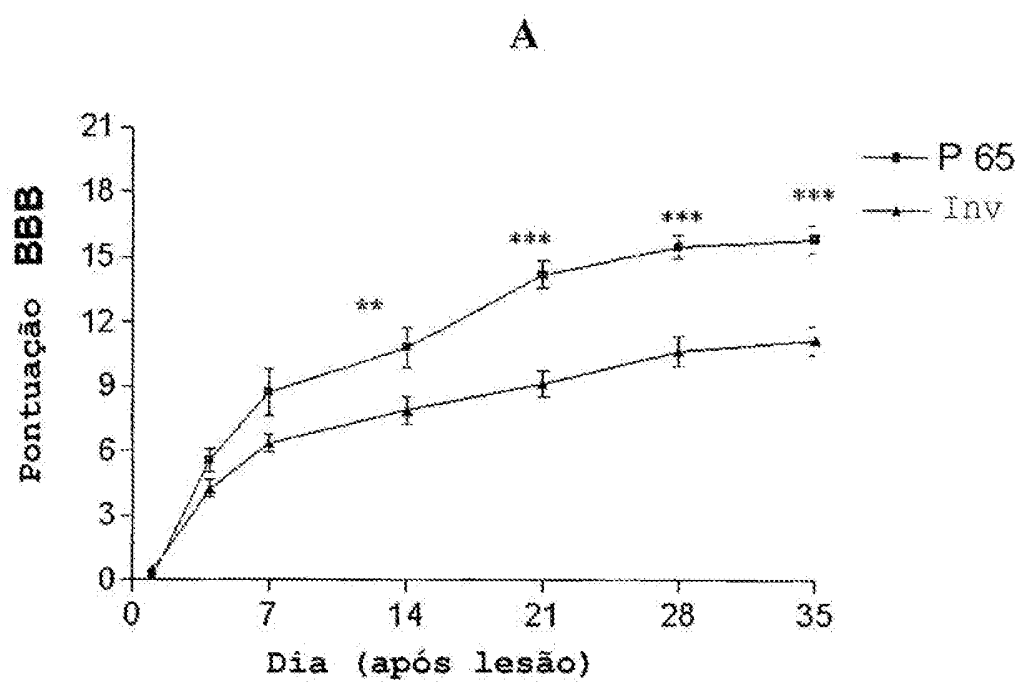
Lesão + p65/inverso

Dia após a lesão



Testes motores { BBB, Rotarod }
Histologia { IF, Tracado do TCM }

Figura 9



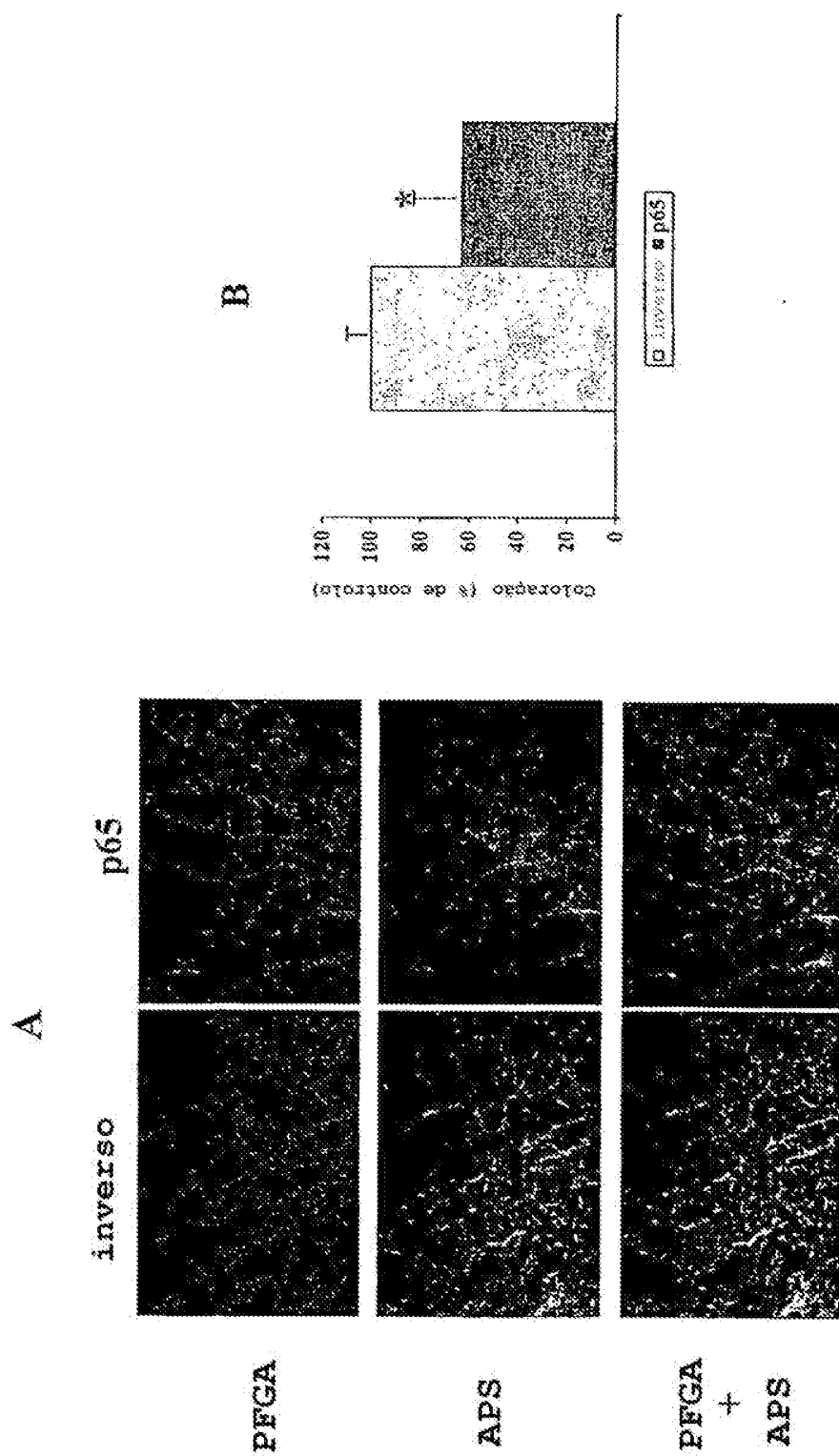


Figura 11

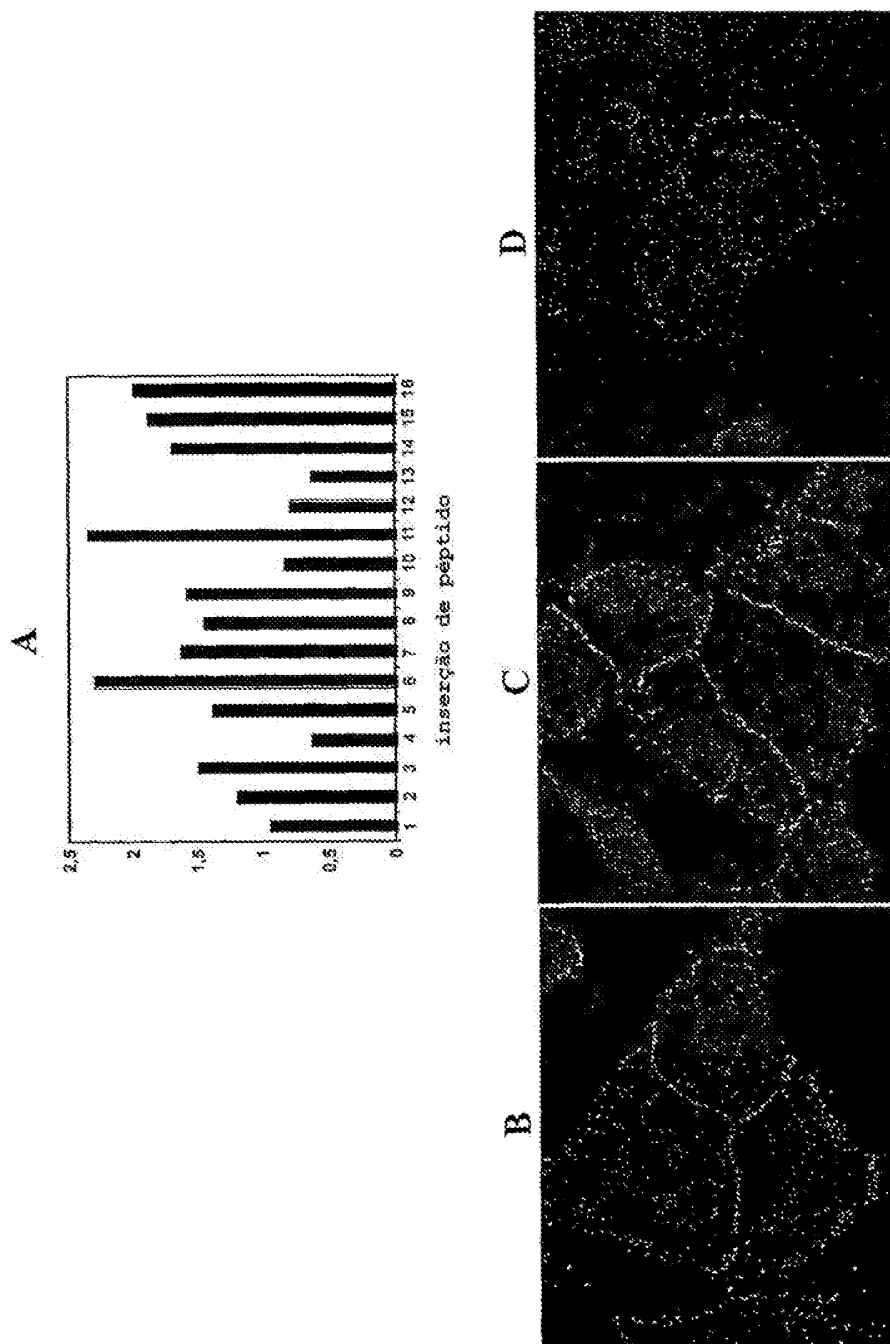


Figura 12