

(11) Número de Publicação: **PT 1911458 E**

(51) Classificação Internacional:

**A61K 38/17** (2014.01) **C07K 14/47** (2014.01)

**A61P 9/10** (2014.01) **A61P 27/16** (2014.01)

**A61P 1/18** (2014.01) **A61P 37/06** (2014.01)

**A61P 27/10** (2014.01)

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

(22) Data de pedido: **2003.06.09**

(30) Prioridade(s): **2002.06.07 US 165250**

(43) Data de publicação do pedido: **2008.04.16**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.03.19**  
**087/2014**

(73) Titular(es):

**XIGEN INFLAMMATION LTD.**

**ARCH. MAKARIOU III 195 NEOCLEOUS HOUSE**  
**3030 LIMASSOL** **CY**

(72) Inventor(es):

**CHRISTOPHE BONNY**

**CH**

(74) Mandatário:

**ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO**  
**RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA** **PT**

(54) Epígrafe: **INIBIDORES PEPTÍDICOS DA VIA DE TRANSDUÇÃO DE SINAL DA JNK, PERMEÁVEIS EM CÉLULAS**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO PROPORCIONA PÉPTIDOS PERMEÁVEIS EM CÉLULAS QUE SE LIGAM A PROTEÍNAS JNK E INIBEM OS EFEITOS MEDIADOS POR JNK, EM CÉLULAS EXPRESSANDO A JNK.

## RESUMO

### **"INIBIDORES PEPTÍDICOS DA VIA DE TRANSDUÇÃO DE SINAL DA JNK, PERMEÁVEIS EM CÉLULAS"**

A invenção proporciona péptidos permeáveis em células que se ligam a proteínas JNK e inibem os efeitos mediados por JNK, em células expressando a JNK.

## **DESCRIÇÃO**

### **"INIBIDORES PEPTÍDICOS DA VIA DE TRANSDUÇÃO DE SINAL DA JNK, PERMEÁVEIS EM CÉLULAS"**

#### **CAMPO DA INVENÇÃO**

Esta invenção refere-se, de um modo geral, a inibidores de proteína cinases e, mais especificamente, a inibidores da proteína cinase, cinase do terminal amina de c-Jun.

#### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

A cinase do terminal amina de c-Jun (JNK) é um membro do grupo activado pelo stress das proteína cinases activadas por mitogénio (MAP). Estas cinases têm sido implicadas no controlo do crescimento e na diferenciação celular e, de um modo mais geral, na resposta de células a estímulos ambientais. A via de transdução de sinal da JNK é activada em resposta a stress ambiental e pelo envolvimento de várias classes de receptores da superfície celular. Estes receptores podem incluir receptores das citocinas, receptores serpentina e receptores das tirosina cinases. Em células de mamífero, a JNK foi implicada em processos biológicos, tais como a transformação oncogénica e em mediação de respostas adaptativas a stress ambiental. A JNK tem sido, também, associada à modulação de respostas imunitárias, incluindo maturação e diferenciação de células imunitárias,

assim como na efectivação da morte celular programada, em células identificadas para a destruição pelo sistema imunitário.

O documento WO 98/49188 divulga inibidores peptídicos da proteína JNK1 para tratamento de distúrbios neuronais, *i. e.*, doença de Parkinson/Alzheimer ou danos devidos a isquemia/reperfusão.

O documento W001/27268 divulga inibidores peptídicos da proteína JNK1 para tratamento da isquemia e reperfusão e prevenção de morte de células pancreáticas.

O documento W098/44106 divulga a utilização dos polipéptidos IB1 para tratar *inter alia* diabetes, isquemia e doenças neurológicas, tal como a doença de Parkinson.

## **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A presente invenção é baseada, em parte, na descoberta de péptidos que são inibidores eficazes de proteínas JNK. Os péptidos, aqui designados como inibidores de péptidos JNK, reduzem os efeitos, a jusante, de proliferação celular da cinase do terminal amina de c-Jun (JNK).

Consequentemente, a invenção inclui a utilização de novos péptidos inibidores da JNK ("péptidos JNKI"), como definida na reivindicação 1.

Os péptidos inibidores da JNK podem estar presentes como polímeros de L-aminoácidos. Alternativamente, os péptidos podem estar presentes como polímeros de D-aminoácidos.

São também incluídas na divulgação composições farmacêuticas que incluem os péptidos de ligação a JNK, assim como anticorpos que reconhecem especificamente os péptidos de ligação a JNK.

A invenção proporciona também um método para inibir a expressão de uma cinase de JNK numa célula.

Num outro aspecto, a divulgação proporciona um método para tratar um patofisiologia associada com a activação de JNK numa célula ou em células. Por exemplo, as células alvo podem ser, e. g., células animais, células humanas ou microrganismos cultivados. A distribuição pode ser realizada, *in vivo*, administrando o péptido quimérico a um indivíduo em quem este se destina a ser utilizado para fins de diagnóstico, preventivos ou terapêuticos. As células alvo podem ser células *in vivo*, i. e., células constituindo os órgãos ou os tecidos de animais ou humanos vivos ou microrganismos encontrados em animais ou humanos vivos.

A divulgação proporciona ainda um método para prevenir ou tratar a perda de audição num indivíduo. O método inclui a administração ao indivíduo de um péptido bioactivo permeável em células que previne os danos aos estereocílios das células ciliadas, a apoptose das células ciliadas ou a apoptose neuronal. Um péptido bioactivo permeável em células é, e. g., um péptido inibidor da JNK. De um modo preferido, o péptido bioactivo permeável em células é SEQ ID N°: 1, 2, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16.

A perda de audição é provocada por um traumatismo acústico. Deste modo, num aspecto, o péptido é administrado antes do indivíduo ser exposto a um traumatismo acústico. Num outro aspecto, o péptido é administrado após o indivíduo ter sido exposto a um traumatismo acústico. O traumatismo acústico pode ser, e. g., pelo menos, 90 dB SPL. Alternativamente, a perda de audição é causada por um tratamento com antibióticos. Deste modo, num aspecto, o péptido é administrado antes do indivíduo ser exposto a um antibiótico. Num outro aspecto, o péptido é administrado após o indivíduo ser exposto a um antibiótico. O antibiótico é, e. g., um aminoglicósido.

A perda de audição é causada por um agente quimioterapêutico. Deste modo, num aspecto, o péptido é administrado antes do indivíduo ser exposto a um agente quimioterapêutico. Num outro aspecto, o péptido é administrado após o indivíduo ser exposto a um agente quimioterapêutico.

A divulgação proporciona, ainda, um método para prevenir ou tratar morte neuronal ou lesões cerebrais num indivíduo. O método inclui a administração ao indivíduo de um péptido bioactivo permeável em células que previne os danos aos neurónios ou a apoptose neuronal. Um péptido bioactivo permeável em células é, e. g., um péptido inibidor da JNK ("JNKI"). De um modo preferido, o péptido bioactivo permeável em células é SEQ ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ou 21-28.

A morte neuronal ou lesões cerebrais são causadas por isquemia cerebral. Assim, num aspecto, o péptido é administrado antes do indivíduo sofrer um evento isquémico. Num outro aspecto, o péptido é administrado após o indivíduo sofrer um evento isquémico. O evento isquémico é, e. g., crónico ou agudo.

A morte neuronal ou as lesões cerebrais são causadas por outros mecanismos excitotóxicos. Deste modo, num aspecto, o péptido é administrado antes do indivíduo sofrer um mecanismo excitotóxico. Num outro aspecto, o péptido é administrado após o indivíduo sofrer um mecanismo excitotóxico. O mecanismo excitotóxico pode ser, e.g., danos cerebrais hipóxicos/isquémicos, danos cerebrais traumáticos, morte neuronal originada por crises epiléticas e diversos distúrbios neurodegenerativos, tal como a doença de Alzheimer.

A divulgação contempla também um método de inibição da morte das células dos ilhéus pancreáticos, em que o método inclui fazer contactar uma célula dos ilhéus pancreáticos com um péptido bioactivo permeável em células, de forma a que seja inibida a morte das células pancreáticas. Um péptido bioactivo permeável em células é, por exemplo, um péptido inibidor da JNK. De um modo preferido, o péptido bioactivo permeável em células é SEQ ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ou 21-28. O método pode ainda incluir fazer contactar a célula com collagenase.

Adicionalmente, a divulgação contempla um método de inibição da morte das células dos ilhéus pancreáticos num indivíduo por administração ao indivíduo de um péptido bioactivo permeável em células, de forma a que seja inibida a morte das células pancreáticas. Um péptido bioactivo permeável em células é, por exemplo, um péptido inibidor da JNK. De um modo preferido, o péptido bioactivo permeável em células é SEQ ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ou 21-28. O método pode ainda incluir fazer contactar a célula com collagenase. Numa forma de realização, o péptido bioactivo

permeável em células é administrado antes que o indivíduo seja exposto a uma citocina pró-inflamatória. Numa outra forma de realização, o péptido bioactivo permeável em células é administrado após o indivíduo ser exposto a uma citocina pró-inflamatória

Em alguns aspectos, a administração dos péptidos da invenção pode ocorrer por qualquer via de administração seleccionada de: intrauricular, intraperitoneal, nasal, intravenosa, oral e distribuição por emplastro.

De entre as vantagens proporcionadas pela invenção está o facto dos péptidos inibidores da JNK serem pequenos e poderem ser produzidos, facilmente, em grandes quantidades e com pureza elevada. Os péptidos inibidores são, também, resistentes à degradação intracelular e são fracamente imunogénicos. Consequentemente, os péptidos estão bem adequados para aplicações *in vitro* e *in vivo*, em que é pretendida a inibição da expressão da JNK.

A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado que o normalmente entendido por um especialista na técnica à qual esta invenção pertence. Embora na realização ou no teste da presente invenção possam ser utilizados métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos aqui descritos, são descritos abaixo métodos e materiais adequados. Em caso de conflito, irá prevalecer a presente descrição, incluindo as definições. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são apenas ilustrativos e não pretendem ser limitantes.



Outras características e vantagens da invenção serão evidentes a partir da descrição detalhada e das reivindicações seguintes.

### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

As FIG. 1A-C são diagramas mostrando alinhamentos das regiões conservadas do domínio JBD nos factores de transcrição indicados.

A FIG. 2 é um diagrama mostrando alinhamentos dos péptidos de fusão TAT-IB genéricos.

A FIG. 3 é um histograma representando a inibição da morte de células  $\beta$  pelo domínio JBD mínimo do IB1, com 23 aminoácidos de comprimento, em comparação com o domínio JBD completo, com 280 aminoácidos.

A FIG. 4 é uma ilustração mostrando os efeitos dos péptidos TAT, TAT-IB1 e TAT-IB2 sobre a fosforilação de JNK recombinantes. O painel A mostra a inibição da fosforilação de c-Jun, ATF2 e Elk1 por JNK recombinantes, *in vitro*. O painel B mostra experiências de resposta à dose, semelhantes às do painel A.

A FIG. 5 é um histograma representando a inibição da fosforilação de L-TAT-IB por JNK recombinantes. O painel A mostra a inibição da fosforilação de c-Jun, ATF2 e Elk1 por JNK recombinantes, por L-TAT-IB, *in vitro*, na presença de MKK4. O painel B mostra experiências de resposta à dose semelhantes, com MKK7.

A FIG. 6 é uma ilustração mostrando a inibição da fosforilação de c-Jun por JNK activadas.

A FIG. 7 é um histograma representando a inibição a curto prazo da morte de células  $\beta$  pancreáticas, induzida pela IL-1 $\beta$ , pelos péptidos L-TAT-IB.

A FIG. 8 é um histograma representando inibição a curto prazo da morte de células  $\beta$  pancreáticas, induzida pela IL-1 $\beta$ , pelos péptidos D-TAT-IB.

A FIG. 9 é um histograma representando inibição a longo prazo da morte de células  $\beta$  pancreáticas, induzida pela IL-1 $\beta$ , pelos péptidos L-TAT-IB1 e D-TAT-IB1.

A Fig. 10 é um histograma representando a inibição da morte de células WiDr do cancro do colón humano, induzida por irradiação, pelos péptidos L-TAT-IB1 e D-TAT-IB1.

A Fig. 11 é uma ilustração mostrando a modulação da actividade da cinase JNK pelos péptidos L-TAT, TAT-IB1 e D-TAT-IB1.

A Fig. 12 são gráficos representando os efeitos protectores dos péptidos TAT-IB1 em murganhos. O painel A mostra o efeito da irradiação sobre o peso. O painel B mostra o efeito da irradiação sobre os estados de edema e eritema.

A Fig. 13 é uma figura representando o efeito protector de D-JNK1 na perda de audição induzida por ruído. O painel A mostra uma representação esquemática da experiência, o painel B mostra

um gráfico da perda de audição, os painéis C e D representam, respectivamente, o exame histológico do ouvido contralateral (controlo) e injectado com D-JNK1.

As FIG. 14 A e B são figuras representando o efeito protector de D-JNK1 na perda de audição induzida por antibiótico.

A Fig. 15 é um gráfico de barras representando a recuperação aumentada de ilhéus pancreáticos submetidos ao tratamento com D-JNK1 durante o processo de isolamento.

A FIG. 16A é uma ilustração mostrando a sensibilidade e a especificidade dos péptidos inibidores da JNK (JNKI) da presente invenção contra a activação e a acção da JNK. A FIG. 16A mostra o efeito inibidor de L-JNKI1 e D-JNKI1 sobre a activação e acção da JNK em ensaios de cinase com, respectivamente, JNK1 $\alpha$ 1 recombinante e GST-Jun e substratos GST-Elk1.

A FIG. 16B é uma ilustração mostrando a sensibilidade e especificidade dos péptidos inibidores da JNK (JNKI) da presente invenção contra a activação e acção da JNK. A FIG. 16B mostra o efeito inibidor da sequência mínima de JIP-IB1, inibidora da JNK, com 20 aminoácidos (forma L de JBD<sub>20</sub>) em experiências de resposta à dose, utilizando condições semelhantes às da FIG. 16A e com quantidades decrescentes de L-JBD<sub>20</sub>.

A FIG. 16C é uma ilustração mostrando a sensibilidade e especificidade dos péptidos inibidores da JNK (JNKI) da presente invenção contra a activação e acção da JNK. A FIG. 16C mostra a especificidade dos péptidos JNKI da presente invenção no

bloqueio de activação da JNK, utilizando ensaios de cinase com diferentes cinases recombinantes.

A FIG. 17A é uma ilustração mostrando a activação da JNK induzida por N-metil-D-aspartato ("NMDA"), em neurónios não tratados (0) e em neurónios expostos a 100  $\mu$ M de NMDA, durante 10 minutos (10') ou durante 30 minutos (30').

A FIG. 17B é uma ilustração que mostra os efeitos dos péptidos JNKI da presente invenção sobre o nível de fosforilação de c-Jun e a quantidade da JNK após exposição a NMDA. Na FIG. 17B, foi aplicada 4 vezes mais proteína nos extractos nucleares (Nucl), do que nos citoplasmáticos (Cyt) e as abreviaturas utilizadas são: C: Controlo; N: NMDA; L: L-JNKI1 + NMDA; D: D-JNKI1 + NMDA.

A FIG. 17C é um histograma que representa a quantificação da expressão de c-fos por PCR em tempo real, utilizando ARN extraído. A FIG. 17C ilustra a expressão de c-fos em relação à actina.

A FIG. 18 são ilustrações e um histograma representando a evolução, ao longo do tempo, da neurotoxicidade de NMDA e da neuroprotecção por L-JNKI1, D-JNKI1 e dois péptidos de controlo, TAT-vazia (apenas a sequência TAT, sem JBD<sub>20</sub>) e L-JNKI1-mut (em que 6 aminoácidos foram mutados em alanina).

As FIG. 18A-18E são uma série de micrografias representando neurónios corados com Hoechst, às 24 horas após o tratamento com NMDA.

A FIG. 18F é um histograma representando a morte neuronal às 12h, 24h e 48h após a exposição a NMDA (100  $\mu$ M de NMDA), como indicado pela actividade de LDH.

A FIG. 19 são ilustrações e um histograma representando a isquemia transiente em murganhos.

A FIG. 19A mostra o efeito sobre o volume do enfarte de um pré-tratamento, no qual foi administrada uma injeção intracerebroventricular (icv) de D-JNKI1 (15,7 ng em 2  $\mu$ L de solução de tampão de fosfato (PBS)), a um indivíduo, 1 hora antes da oclusão.

A FIG. 19B mostra o efeito sobre o volume do enfarte, quando a injeção icv de D-JNKI1 foi administrada 1 hora antes da oclusão ou 3 horas, 6 horas e 12 horas após a oclusão.

A FIG. 20 são ilustrações e um histograma mostrando a protecção por D-JNKI1 contra isquemia focal permanente em ratos jovens (P14), que tinham sido perfundidos 24 horas após a oclusão.

A FIG. 20A é uma série de ilustrações representando exemplos de lesões de um rato de controlo (painel esquerdo) e de um rato tratado com D-JNKI1, 6 horas após a oclusão (painel direito).

A FIG. 20B é um histograma representando os volumes de enfarte, expressos como % do volume hemisférico, após a injeção intraperitoneal (i. p.) de D-JNKI1 a -0,5h antes ou +6h ou +12h após a oclusão.

A FIG. 20C é uma série de ilustrações representando os resultados de imuno-histoquímica para P-c-Jun, em que c-Jun estava fosforilado em muitos neurónios no córtex peri-enfarte.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

A presente invenção é baseada, em parte, na identificação de péptidos permeáveis em células que inibem a via sinalizadora activada da cinase do terminal amina de c-Jun (JNK). Estes péptidos são aqui designados como péptidos inibidores da JNK. Adicionalmente, a descoberta proporciona métodos e composições farmacêuticas para o tratamento de patofisiologias associadas com sinalização JNK.

Foram identificados péptidos inibidores da JNK pela inspecção de alinhamentos de sequências entre os Domínios De Ligação a kJNK em várias proteínas de ligação à insulina (IB). Os resultados deste alinhamento são mostrados na FIG. 1A-1C. A FIG. 1A representa a região com homologia mais elevada entre as JBD de IB1, IB2, c-Jun e ATF2. O painel B representa o alinhamento da sequência de aminoácidos de JBD de IB1 e IB2. Os resíduos totalmente conservados são indicados por asteriscos, enquanto que os resíduos modificados para Ala no vector GFP-JBD<sub>23Mut</sub> são indicados por círculos não preenchidos. A FIG. 1C mostra as sequências de aminoácidos de proteínas quiméricas que incluem um domínio peptídico inibidor de JNK e um domínio de transporte. No exemplo mostrado, o domínio de transporte é derivado do polipéptido TAT do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o péptido inibidor da JNK é derivado de um polipéptido IB1. As sequências humana, de murganho e rato, nos Painéis B e C, são idênticas.

A comparação entre as sequências dos domínios de ligação a JNK de IB1 [SEQ ID N°: 17], IB2 [SEQ ID N°: 18], c-Jun [SEQ ID N°: 19] e ATF2 [SEQ ID N°: 20] revelou uma sequência de 8 aminoácidos parcialmente conservada (FIG. 1A). Uma comparação entre os JBD de IB1 e IB2 revelou, adicionalmente, dois blocos de sete e três aminoácidos, que são altamente conservados, entre as duas sequências. Estes dois blocos estão contidos dentro de uma sequência peptídica de 23 aminoácidos em IB1 [SEQ ID N°: 1] e de 21 aminoácidos em IB2 [SEQ ID N°: 2]. Na FIG. 1C é mostrada a sequência mínima de JIP-IB1, inibidora da JNK, com 20 aminoácidos (forma L de JBD<sub>20</sub> (SEQ ID N°: 21)).

Os péptidos inibidores da JNK podem ser utilizados em qualquer situação em que seja pretendida a inibição da actividade de JNK. Isto pode incluir aplicações *in vitro*, *ex vivo* e aplicações *in vivo*. Dado que as JNK e todas as suas isoformas participam no desenvolvimento e no estabelecimento de estados patológicos ou em vias, os péptidos JNK podem ser utilizados para prevenir ou inibir a ocorrência desses estados patológicos. Isto inclui a prevenção e o tratamento de doenças e a prevenção e o tratamento de patologias secundárias às acções terapêuticas. Por exemplo, os péptidos podem ser utilizados tratar ou prevenir, e. g., diabetes, radiação ionizante, respostas imunitárias (incluindo doenças autoimunes), lesões de isquemia/reperfusão, hipertrofias cardíacas e cardiovasculares e alguns cancros (e. g., transformação *Bcr-Abl*).

Os péptidos podem também ser utilizados inibir a expressão de genes cuja a expressão aumente na presença de um polipéptido de JNK activo. Estes genes e produtos génicos incluem, e. g., citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas são encontradas em

todas as formas de doenças inflamatórias, auto-inflamatórias, imunes e autoimunes, doenças degenerativas, miopatias, cardiomiopatias e rejeição de enxertos.

Os péptidos inibidores da JNK aqui descritos podem ser também utilizados para tratar ou prevenir efeitos associados com o stress de tensão de corte celular, tal como nos estados patológicos induzidos pela hipertensão arterial, incluindo hipertrofia cardíaca e lesões arterioscleróticas e em ramificações de vasos sanguíneos e semelhantes; radiação ionizante, tal como utilizada em radioterapia e luz UV; radicais livres; agentes lesivos do ADN, incluindo fármacos quimioterapêuticos; transformação oncogénica; danos em células neuronais e pancreáticas, perda de audição, isquemia e reperfusão; hipóxia; e hipo- e hipertermia.

Os polinucleótidos proporcionados pela presente invenção podem ser utilizados para expressar péptidos recombinantes para análise, caracterização ou utilização terapêutica; como marcadores para tecidos em que os péptidos correspondentes são expressados de um modo preferido (constitutivamente ou num estágio particular de diferenciação, ou de desenvolvimento do tecido ou em estados da doença). Outras utilizações para os ácidos nucleicos incluem, e. g., marcadores de peso molecular em análise de ácidos nucleicos baseada em electroforese em gel.

Os péptidos inibidores da JNK, aqui divulgados, são apresentados na Tabela 1. A tabela apresenta o nome do péptido inibidor da JNK, assim como o seu número identificador da sequência, comprimento e sequência de aminoácido.



TABELA 1

NOME DO PÉPTIDO	SEQ ID	AA	Sequência
L-IB1	1	23	DTYRPKRPTT LNLFPQVPRS QDT
L-IB2	2	21	EEPHKHRPTT LRLTTLGAQD S
D-IB1	3	23	TDQSRPVQPF LNLTPRKPR YTD
D-IB2	4	21	SDQAGLTTLR LTTPRHKHPE E
L-IB (genérico)	5	19	XRPTTLXLXX XXXXXQDS/TX
D-IB (genérico)	6	19	XS/TDQXXXXXX XLXLTPRX
L-TAT	7	10	GRKKRRQRRR
D-TAT	8	10	RRRQRRKKRG
L-genérico-TAT	9	17	XXXXRKKRRQ RRRXXXX
D-genérico-TAT	10	17	XXXXRRRQRR KKRXXXX
L-TAT-IB1	11	35	GRKKRRQRRR PPDYRPKRP TTLNLFPQVP RSQDT
L-TAT-IB2	12	33	GRKKRRQRRR PPEEPHKHRP TTLRLTTLGA QDS
L-TAT-IB (genérico)	13	42	XXXXXXXXRKK RRQRRRXXXX XXXXRPTTLX LXXXXXXXXQD S/TX
D-TAT-IB1	14	35	TDQSRPVQPF LNLTPRKPR YDPPRRRQR RKKRG
D-TAT-IB2	15	33	SDQAGLTTLR LTTPRHKHPE EPPRRRQRRK KRG
D-TAT-IB (genérico)	16	42	XT/SDQXXXXXX XLXLTPRXX XXXXXRRRQ RRKKRXXXXX XX
EB1-longo	17	29	PGTGCGDTYR PKRPTTLNLF PQVPRSQDT
IB2-longo	18	27	IPSPSVEEPH KHRPTTLRLT TLGAQDS
c-Jun	19	29	GAYGYSNPKI LKQSMTLNLA DPVGNLKP
ATF2	20	29	TNEDHLAVHK HKHBMTLKFG PARNDSVIV
L-JBD <sub>20</sub>	21	20	RPKRPTTLNL FPQVPRSQDT

(Continuação)

NOME DO PÉPTIDO	SEQ ID	AA	Sequência
D-JBD <sub>20</sub>	22	20	TDQSRPVQPF LNLTPRKPR
L-TAT-JNKI1 ( <i>i.e.</i> , L-TAT-JBD <sub>20</sub> )	23	32	GRKKRRQRRR PPRPKRPTTL NLFPQVPRSQ DT
D-TAT-JNKI1 ( <i>i.e.</i> , D-TAT-JBD <sub>20</sub> )	24	32	TDQSRPVQPF LNLTPRKPR PPRRRQR RKKRG
L-TAT-JNKI1 (genérico)	25	34	XXXXRKRRQ RRRXXXXRPT TLXLXXXXXX XQDS/T
D-TAT-JNKI1 (genérico)	26	34	S/TDQXXXXXXXX LXLTTPRXXX XRRRQRRKKR XXXX
L-JBD <sub>20</sub> -mut	27	20	RPKRPTAANA FPQVPRSQDT
D-JBD <sub>20</sub> -mut	28	20	TDQSRPVAPF ANAATPRKPR

## PÉPTIDOS INIBIDORES DA JNK

A divulgação proporciona um péptido inibidor da JNK. No termo “péptido” não está implícito qualquer comprimento em particular. Em algumas formas, o péptido inibidor da JNK tem menos de 280 aminoácidos de comprimento, *e. g.*, menos ou igual a 150, 100, 75, 50, 35 ou 25 aminoácidos de comprimento. Em várias formas, o péptido inibidor da ligação à JNK inclui a sequência de aminoácidos de uma ou mais das SEQ ID N°: 1-6 e 21-22. Numa opção, os péptidos inibidores da JNK ligam-se à JNK. Numa outra opção o péptido inibe a activação de, pelo menos, um factor de transcrição activado da JNK, *e. g.*, c-Jun, ATF2 ou Elk1.

Os exemplos de péptidos inibidores da JNK incluem um péptido, o qual inclui (na totalidade ou em parte) a sequência

NH<sub>2</sub>-DTYRPKRPTTLNLFPQVPRSQDT-COOH [SEQ ID N°: 1]. Numa outra forma de realização, o péptido inclui a sequência NH<sub>2</sub>-EEPHKHRPTTLRLTTLGAQDS-COOH [SEQ ID N°: 2]. Alternativamente, os exemplos de péptidos inibidores da JNK incluem um péptido, o qual inclui (na totalidade ou em parte) a sequência NH<sub>2</sub>-RPKRPTTLNLFPQVPRSQDT-COOH [SEQ ID N°: 21].

Os péptidos inibidores da JNK podem ser polímeros de L-aminoácidos, D-aminoácidos ou uma combinação de ambos. Por exemplo, em várias formas de realização, os péptidos são péptidos D retro-inversos. O termo "isómero retro-inverso" refere-se a um isómero de um péptido linear, no qual a direcção da sequência é invertida, o termo "isómero D-retro-inverso" refere-se a um isómero de um péptido linear no qual a direcção da sequência é invertida e a quiralidade de cada resíduo de aminoácido é invertida. Ver, e. g., Jameson *et al.*, *Nature*, **368**, 744-746 (1994); Brady *et al.*, *Nature*, **368**, 692-693 (1994). O resultado final da combinação de D-enantiómeros e da síntese inversa consiste nas posições dos grupos carbonilo e amina em cada ligação amida serem permutadas, enquanto que a localização dos grupos da cadeia lateral em cada carbono alfa é preservada. A menos que estabelecido, especificamente, de outra forma, é presumido que qualquer determinada sequência de L-aminoácidos da invenção pode ser transformada num péptido D retro-inverso, pela síntese de um reverso da sequência, para a sequência de L-aminoácidos nativa correspondente.

Por exemplo, um péptido D retro-inverso tem a sequência NH<sub>2</sub>-TDQSRPVQPFLNLTPRKPRYTD-COOH [SEQ ID N°: 3] ou NH<sub>2</sub>-SDQAGLTTLRLTTPRHKHPPEE-COOH [SEQ ID N°: 4]. Alternativamente, um péptido D retro-inverso inclui a sequência NH<sub>2</sub>-TDQSRPVQPFLNLTPRKPR-COOH [SEQ ID N°: 22]. Foi,

inesperadamente, verificado que os péptidos D-retro-inversos têm várias propriedades úteis. Por exemplo, os péptidos D-TAT e D-TAT-IB e D-TAT-JNKI entram nas células tão eficientemente como os péptidos L-TAT e L-TAT-IB e D-TAT-JNKI e os péptidos D-TAT e D-TAT-IB e D-TAT-JNKI são mais estáveis do que os L-péptidos correspondentes. Além disso, embora os D-TAT-IB1 sejam ~10-20 vezes menos eficiente na inibição da JNK do que os L-TAT-IB e L-TAT-JNKI, estes são ~50 vezes mais estáveis *in vivo*. Além disso, os péptidos JNKI D-retro-inversos são resistentes a proteases. Finalmente, como é ainda discutido abaixo, os péptidos D-TAT-IB e D-TAT-JNKI protegem da apoptose as células tratadas com interleucina 1 e sujeitas a radiação ionizante e estes péptidos são úteis no tratamento de neurónios, uma vez que a sequência TAT contém seis pares de aminoácidos que tornam a sequência TAT extremamente sensível às proteases neuronais que estão envolvidas no processamento de péptidos no sistema nervoso. Ver e. g., Steiner et al., *J. Biol. Chem.* **267**:23435-23438 (1992); Brugidou et al., *Biochem. & Biophys. Res. Comm.* **214**:685-693 (1995).

Um péptido inibidor da JNK inclui a sequência de aminoácidos  $\text{NH}_2\text{-X}_n\text{-RPTTLXLXXXXXXXXXQDS/T-X}_n\text{-COOH}$  [SEQ ID N°: 5 e os resíduos 17-42 de L-TAT-IB, SEQ ID N°: 13, como mostrado na FIG. 2]. Como aqui utilizado,  $\text{X}_n$  pode ter zero resíduos de comprimento ou pode ser uma porção contígua de resíduos de péptido derivados das SEQ ID N°: 1 e 21, de um modo preferido, uma porção com entre 1 a 7 aminoácidos de comprimento ou ter 10, 20, 30 ou mais aminoácidos de comprimento. O resíduo único representado por S/T pode ser Ser ou Thr na sequência genérica. Numa forma adicional, um péptido inibidor da JNK pode ser um péptido D retro-inverso, tendo a sequência  $\text{NH}_2\text{-X}_n\text{-S/TDQXXXXXXXXLXLTPR-X}_n\text{-COOH}$  [SEQ ID N°: 6] e os

resíduos 17-42 de L-TAT-IB, SEQ ID N°: 16, como mostrado na FIG. 2].

Os péptidos inibidores da JNK são obtidos ou produzidos por métodos bem conhecidos na técnica, e. g., síntese química, métodos de engenharia genética, como discutidos abaixo. Por exemplo, pode ser sintetizado um péptido correspondente a uma porção de um péptido inibidor da JNK, incluindo uma região ou domínio pretendido ou que medeia a actividade pretendida *in vitro*, pela utilização de um sintetizador de péptidos.

Um péptido inibidor da JNK candidato é analisado por análise da hidrofiliicidade (ver, e. g., Hopp e Woods, 1981. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 3824-3828), que pode ser utilizada para identificar as regiões hidrofóbicas e hidrofílicas dos péptidos, auxiliando, deste modo, na concepção de substratos de manipulação experimental, tais como em experiências de ligação, síntese de anticorpos. Pode ser, também, realizada análise estrutural secundária, para identificar regiões de um péptido inibidor da JNK que assumem motivos estruturais específicos. Ver e. g., Chou e Fasman, 1974. *Biochem* **13**: 222-223. A manipulação, tradução, previsão da estrutura secundária, perfis de hidrofiliicidade e hidrofobicidade, previsão e delineamento da grelha de leitura aberta e determinação das homologias de sequência podem ser realizados, utilizando programas informáticos para computador, disponíveis na técnica. Podem ser, também, utilizados outros métodos de análise estrutural, incluindo, e. g., cristalografia de raios X (ver, e. g. Engstrom, 1974. *Biochem Exp Biol* **11**: 7-13); espectroscopia de massa e cromatografia gasosa (ver. e. g., *METHODS IN PROTEIN SCIENCE*, 1997. J. Wiley and Sons, Nova Iorque, NI) e modelação computacional (ver, e. g., Fletterick e Zoller, eds., 1986.

Computer Graphics and Molecular Modeling, Em: *CURRENT COMMUNICATIONS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NI).

A presente divulgação refere-se, adicionalmente, a ácidos nucleicos codificando os péptidos de ligação a JNK, tendo aminoácidos na forma L, e. g., os L-péptidos indicados na Tabela 1, assim como os complementos destas sequências. As fontes adequadas de ácidos nucleicos codificando péptidos inibidores da JNK incluem o ácido nucleico de IB1 humano (e as sequências de proteína codificadas) disponíveis, respectivamente, sob os N° de Acesso do GenBank AF074091 e AAD20443. Outras fontes incluem o ácido nucleico de IB1 de rato e as sequências de proteína que são apresentadas, respectivamente, sob os N° de Acesso do GenBank AF108959 e AAD22543. O ácido nucleico IB2 humano e as sequências de proteína são apresentadas sob o N° de Acesso do GenBank AF218778.

Os ácidos nucleicos codificando os péptidos inibidores da JNK podem ser obtidos por qualquer método conhecido na técnica (e. g., por amplificação por PCR, utilizando iniciadores sintéticos hibridáveis com os terminais 3' e 5' da sequência e/ou por clonagem, a partir de uma biblioteca de ADNc ou genómica, utilizando uma sequência oligonucleotídica específica para essa sequência génica).

Para a expressão recombinante de um ou mais péptidos inibidores da JNK, o ácido nucleico, contendo a totalidade ou uma porção da sequência nucleotídica codificando o péptido, pode ser inserido num vector de expressão adequado (i. e., um vector que contém os elementos necessários para a transcrição e

tradução da sequência codificante do péptido inserido). Em algumas formas de realização, os elementos reguladores são heterólogos (*i. e.*, não o promotor nativo do gene). Alternativamente, os sinais de transcrição e tradução necessários podem ser, também, proporcionados pelo promotor nativo dos genes e/ou pelas suas regiões flanquedoras.

Podem ser utilizados vários sistemas de hospedeiro-vector para expressar a(s) sequência(s) codificando péptido(s). Estes incluem, mas não estão limitados a: (i) sistemas células de mamífero que são infectadas com vírus vaccinia, adenovírus e semelhantes; (ii) sistemas de células de insecto infectadas com baculovírus e semelhantes; (iii) leveduras contendo vectores de levedura ou (iv) bactérias transformadas com bacteriófagos, ADN, ADN plasmídico ou ADN cosmídico. Dependendo do sistema de vector hospedeiro utilizado, pode ser utilizado qualquer um de vários elementos de transcrição e tradução adequados.

As sequências promotoras/intensificadoras dentro dos vectores de expressão podem utilizar sequências reguladoras vegetais, animais, de insecto ou fungos, como proporcionado na invenção. Por exemplo, podem ser utilizados elementos promotores/intensificadores de levedura e de outros fungos (*e. g.*, o promotor GAL4, o promotor da álcool desidrogenase, o promotor da fosfoglicerol cinase, o promotor da fosfatase alcalina). Alternativa ou adicionalmente, estes podem incluir regiões de controlo de transcrição animais, *e. g.*, (i) a região de controlo do gene da insulina, activa no interior de células  $\beta$  pancreáticas (*ver, e. g.*, Hanahan *et al.*, 1985. *Nature* **315**: 115-122); (ii) a região de controlo do gene da imunoglobulina, activa no interior de células linfóides (*ver, e. g.*, Grosschedl *et al.*, 1984. *Cell* **38**: 647-658); (iii) a

região de controlo do gene da albumina, activa no interior do fígado (ver, e. g., Pinckert et al., 1987. *Genes and Dev* **1**: 268-276; (iv) a região de controlo do gene da proteína básica da mielina, activa dentro de células oligodendrocíticas do cérebro (ver, e. g., Readhead et al., 1987. *Cell* **48**: 703-712); e (v) a região de controlo do gene da hormona de libertação da gonadotrofina, activa no interior do hipotálamo (ver, e. g., Mason et al., 1986. *Science* **234**: 1372-1378) e semelhantes.

Os vectores de expressão ou os seus derivados, incluem, e. g., vírus humanos ou animais (e. g., vírus vaccinia ou adenovírus); vírus de insecto (e. g., baculovírus); vectores de levedura; vectores de bacteriófago (e. g., fago lambda); vectores plasmídicos e vectores cosmídicos.

Uma estirpe celular hospedeira pode ser seleccionada para modular a expressão de sequências de interesse inseridas ou para modificar ou processar péptidos expressos codificados pelas sequências, da forma específica pretendida. Além disso, a expressão de determinados promotores pode ser intensificada na presença de determinados indutores, numa estirpe hospedeira seleccionada; facilitando, deste modo, o controlo da expressão de um péptido modificado geneticamente. Além disso, as diferentes células hospedeiras possuem mecanismos característicos e específicos para o processamento e modificação na tradução e após tradução (e. g., glicosilação, fosforilação e semelhantes) de péptidos expressos. As linhas celulares ou os sistemas hospedeiros adequados podem ser, deste modo, seleccionados, de forma a assegurar a modificação pretendida e a realização do processamento do péptido exógeno. Por exemplo, pode ser utilizada a expressão do péptido no interior de um sistema bacteriano, para produzir um péptido nuclear não



glicosilado; enquanto que a expressão no interior de células de mamífero assegura a glicosilação “nativa” de um péptido heterólogo.

São também divulgados derivados, fragmentos, homólogos, análogos e variantes de péptidos inibidores da JNK e ácidos nucleicos codificando estes péptidos. Os ácidos nucleicos, derivados, fragmentos e análogos, aqui proporcionados, são definidos como sequências com, pelo menos, 6 ácidos nucleicos (contíguos) e as quais têm um comprimento suficiente para permitir hibridação específica. Os aminoácidos, derivados, fragmentos e análogos, aqui proporcionados, são definidos como sequências com, pelo menos, 4 aminoácidos (contíguos), um comprimento suficiente para permitir o reconhecimento específico de um epitopo.

O comprimento dos fragmentos é inferior ao comprimento do ácido nucleico ou do polipéptido completo correspondente, do qual o péptido inibidor da JNK ou ácido nucleico que o codifica, é derivado. Os derivados e os análogos podem ter a totalidade do comprimento ou outro comprimento que não a totalidade, se o derivado ou análogo contiverem um ácido nucleico ou um aminoácido modificado. Os derivados ou os análogos dos péptidos inibidores da JNK incluem, e. g., moléculas incluindo regiões que são substancialmente homólogas aos péptidos, em várias formas de realização, com, pelo menos, 30%, 50%, 70%, 80% ou 95%, 98% ou, mesmo, 99% de identidade com uma sequência de aminoácidos de tamanho idêntico ou quando em comparação com uma sequência alinhada, em que o alinhamento é realizado por um programa informático de homologia, conhecido na técnica. Por exemplo, a identidade de sequência pode ser medida, utilizando programas informáticos de análise de sequências (Sequence

Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center. 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705), com os seus parâmetros por omissão.

No caso de sequências polipeptídicas, as quais sejam menos de 100% idênticas a uma sequência de referência, as posições não-idênticas são, de um modo preferido, mas não necessariamente, substituições conservadoras da sequência de referência. As substituições conservadoras incluem, tipicamente, substituições dentro dos grupos seguintes: glicina e alanina; valina, isoleucina e leucina; ácido aspártico e ácido glutâmico; asparagina e glutamina; serina e treonina; lisina e arginina; e fenilalanina e tirosina. Deste modo, são incluídos na invenção péptidos tendo sequências mutadas, de forma a que estas permaneçam homólogas, *e. g.*, em termos de sequência, de função e de carácter antigénico ou de outra função, com uma proteína tendo a sequência parental correspondente. Essas mutações podem ser, por exemplo, mutações envolvendo alterações de aminoácido conservadoras, *e. g.*, alterações entre aminoácidos com propriedades moleculares de um modo geral semelhantes. Por exemplo, as permutas dentro do grupo alifático alanina, valina, leucina e isoleucina podem ser consideradas como conservadoras. Por vezes, a substituição da glicina por um destes pode ser, também, considerada conservadora. Outras permutas conservadoras incluem as dentro do grupo alifático do aspartato e glutamato; dentro do grupo amida da asparagina e glutamina; dentro do grupo hidroxilo da serina e treonina; dentro do grupo aromático da fenilalanina, tirosina e triptofano; dentro do grupo básico da lisina, arginina e histidina; e dentro do grupo contendo enxofre metionina e cisteína. Por vezes, a substituição dentro do grupo da metionina e da leucina pode ser, também, considerada como

conservadora. Os grupos de substituição conservados preferidos são aspartato-glutamato; asparagina-glutamina; valina-leucina-isoleucina; alanina-valina; fenilalanina-tirosina; e lisina-arginina.

Quando é referido que um polipéptido em particular tem uma identidade percentual específica em relação a um polipéptido de referência com um comprimento definido, a identidade percentual é relativa ao péptido de referência. Deste modo, um péptido que é 50% idêntico a um polipéptido de referência que tem 100 aminoácidos de comprimento, pode ser um polipéptido com 50 aminoácidos, que é completamente idêntico a uma porção com um comprimento de 50 aminoácidos do polipéptido de referência. Este poderá ser, também, um polipéptido com 100 aminoácidos de comprimento, o qual é 50% idêntico ao polipéptido de referência ao longo da totalidade do seu comprimento. Obviamente, outros polipéptidos irão estar de acordo com os mesmos critérios.

A divulgação abrange também variantes alélicas dos polinucleótidos ou dos péptidos divulgados; ou seja, as formas alternativas de ocorrência natural do polinucleótido isolado que codificam também péptidos que são idênticos, homólogos ou relacionados com os codificados pelos polinucleótidos. Alternativamente, podem ser produzidas variantes que não ocorrem naturalmente, por técnicas de mutagénese ou por síntese directa.

São também proporcionados pela presente divulgação, homólogos de espécies dos polinucleótidos e péptidos divulgados. "Variante" refere-se a um polinucleótido ou polipéptido que se diferencia do polinucleótido ou polipéptido da presente invenção, mas que conserva as suas propriedades essenciais. De um modo geral, as variantes são, na sua globalidade, muito

semelhantes e, em muitas regiões, idênticas ao polinucleótido ou polipéptido da presente invenção. As variantes podem conter alterações nas regiões codificantes, regiões não-codificantes ou em ambas.

Em algumas formas, as sequências alteradas incluem inserções de forma a que a sequência de aminoácidos global seja alongada, enquanto a proteína conserva as propriedades de transporte. Adicionalmente, as sequências alteradas podem incluir eliminações internas aleatórias ou planeadas que encurtam a sequência de aminoácidos global, enquanto que a proteína conserva as propriedades de transporte.

As sequências alteradas podem ser, adicional ou alternativamente, codificadas por polinucleótidos que hibridam sob condições de restringências com a cadeia adequada do polinucleótido de ocorrência natural, codificando um polipéptido ou péptido do qual o péptido inibidor da JNK é derivado. O péptido variante pode ser testado para ligação à JNK e para a modulação da actividade mediada pela JNK, utilizando os ensaios aqui descritos. As "condições de restringência" são dependentes da sequência e serão diferentes em circunstâncias diferentes. De um modo geral, as condições de restringência podem ser seleccionadas para serem, cerca de, 5 °C inferiores ao ponto de fusão térmica ( $T_M$ ) para a sequência específica, numa força iónica e pH definidos. A  $T_M$  é a temperatura (sob força iónica e pH definidos) à qual 50% da sequência alvo hibrida com uma sonda perfeitamente correspondente. Tipicamente, as condições de restringência serão aquelas em que a concentração de sal é, pelo menos, cerca de 0,02 molar a pH 7 e a temperatura é de, pelo menos, cerca de 60 °C. Dado que outros factores podem afectar a restringência da hibridação (incluindo, entre outros, a

composição em bases e o tamanho das cadeias complementares), a presença de solventes orgânicos e a extensão da não correspondência da bases, a combinação dos parâmetros é mais importante do que a medida absoluta de qualquer um.

A restringência elevada pode incluir, e. g., Passo 1: Os filtros contendo ADN são pré-tratados durante 8 horas até de um dia para o outro, a 65 °C, em tampão composto por SSC 6X, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) EDTA 1 mM, PVP a 0,02%, Ficoll a 0,02%, BSA a 0,02% e ADN de esperma de salmão desnaturado 500 µg/mL. Passo 2: Os filtros são hibridados durante 48 horas, a 65 °C na mistura de pré-hibridação acima, à qual é adicionado ADN de esperma de salmão desnaturado a 100 mg/mL e 5-20 x 10<sup>6</sup> cpm de sonda marcada com <sup>32</sup>P. Passo 3: Os filtros são lavados, durante 1 hora, a 37 °C, numa solução contendo SSC 2 X, PVP a 0,01%, Ficoll a 0,01% e BSA a 0,01%. Isto é seguido por uma lavagem em SSC 0,1 X, a 50 °C, durante 45 minutos. Passo 4: Os filtros são autorradiografados. São bem conhecidas na técnica outras condições de restringência elevada que podem ser utilizadas. Ver, e. g., *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, John Wiley and Sons, NI; e Kriegler, 1990, *GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL*, Stockton Press, NI.

As condições de restringência moderada podem incluir o seguinte: Passo 1: Os filtros contendo ADN são pré-tratados, durante 6 horas, a 55 °C, numa solução contendo SSC 6 X, solução de Denhardt 5 X, SDS a 0,5% e ADN de esperma de salmão desnaturado 100 mg/mL. Passo 2: Os filtros são hibridados durante 18-20 horas, a 55 °C, na mesma solução, com adição de 5-20 x 10<sup>6</sup> cpm de sonda marcada com <sup>32</sup>P. Passo 3: Os filtros são lavados a 37 °C, durante 1 hora, numa solução contendo SSC 2 X, SDS a 0,1%, seguidamente lavados duas vezes durante 30 minutos a

60 °C, numa solução contendo SSC 1 X e SDS a 0,1%. Passo 4: Os filtros são enxugados até à secura e são expostos para a autorradiografia. São bem conhecidas na técnica outras condições de restringência moderada que podem ser utilizadas. Ver, e. g., Ausubel et al., (eds.), 1993, *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, John Wiley and Sons, NI; e Kriegler, 1990, *GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL*, Stockton Press, NI.

A restringência baixa pode incluir: Passo 1: Os filtros contendo ADN são pré-tratados, durante 6 horas, a 40 °C, numa solução contendo formamida a 35%, SSC 5 X, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, PVP a 0,1%, Ficoll a 0,1%, BSA a 1% e ADN de esperma de salmão desnaturado 500 µg/mL. Passo 2: Os filtros são hibridados durante 18-20 horas, a 40 °C, na mesma solução, com adição de PVP a 0,02%, Ficoll a 0,02%, BSA a 0,2%, ADN de esperma de salmão 100 µg/mL, sulfato de dextrano a 10% (p/vol) e 5-20 x 10<sup>6</sup> cpm de sonda marcada com <sup>32</sup>P. Passo 3: Os filtros são lavados durante 1,5 horas, a 55 °C, numa solução contendo SSC 2 X, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4) EDTA 5 mM e SDS a 0,1%. A solução de lavagem é substituída por solução fresca e é incubada durante 1,5 horas adicionais, a 60 °C. Passo 4: Os filtros são enxugados até à secura e expostos para a autorradiografia. Se necessário, os filtros são lavados durante uma terceira vez a 65-68 °C e são re-expostos à película. São bem conhecidas na técnica outras condições da restringência baixa que podem ser utilizadas (e. g., como utilizado para hibridações entre espécies). Ver, e. g., Ausubel et al., (eds.), 1993, *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, John Wiley and Sons, NI; e Kriegler, 1990, *GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL*, Stockton Press, NI.

## **Péptidos Quiméricos Incluindo um Domínio Inibidor da JNK e um Domínio de Transporte**

Num outro aspecto, a divulgação proporciona um péptido quimérico, que inclui um primeiro e segundo domínio. O primeiro domínio inclui uma sequência de transporte, enquanto que o segundo domínio inclui uma sequência inibidora da JNK, ligada por uma ligação covalente, e. g., uma ligação peptídica, ao primeiro domínio. Os primeiro e segundo domínios podem ocorrer em qualquer ordem no péptido e o péptido pode incluir um ou mais de cada domínio.

Uma sequência de transporte é qualquer sequência de aminoácidos que direcciona um péptido no qual está presente para um destino celular pretendido. Deste modo, a sequência de transporte pode direccionar o péptido através da membrana plasmática, e. g., desde o exterior da célula, através da membrana plasmática e para o interior do citoplasma. Alternativa ou adicionalmente, a sequência de transporte pode direccionar o péptido para uma localização pretendida dentro da célula, e. g., núcleo, ribossoma, ER, lisossoma ou peroxissoma.

Em algumas formas de realização, o péptido transportador é derivado de uma sequência de translocação membranar conhecida. Por exemplo, o péptido transportador pode incluir sequências da proteína TAT do vírus da imunodeficiência humana (HTV) 1. Esta proteína é descrita, e. g., nas Patentes US N° 5804604 e 5674980. O péptido inibidor da JNK está ligado a alguns ou à totalidade dos 86 aminoácidos que constituem a proteína TAT. Por exemplo, pode ser utilizado um fragmento ou uma porção funcionalmente eficaz de uma proteína TAT que tem menos de

86 aminoácidos, a qual apresenta incorporação em células e a qual, opcionalmente, se incorpora no núcleo de célula. Ver e. g., Vives et al., *J. Biol. Chem.*, **272** (25):16010-17 (1997). Numa forma de realização, o fragmento inclui um péptido contendo os resíduos 48-57 da TAT, e. g.  $\text{NH}_2\text{-GRKKRRQRRR-COOH}$  [SEQ ID N°: 7] ou uma sequência TAT genérica  $\text{NH}_2\text{-X}_n\text{-RKKRRQRRR-X}_n\text{-COOH}$  [SEQ ID N°: 9]. Pode ainda ser definido um péptido TAT, que inclui a região que medeia a entrada e a incorporação nas células, utilizando técnicas conhecidas. Ver, e. g., Franked et al., *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* **86**: 7397-7401 (1989).

A sequência TAT pode ser ligada, quer ao terminal N, quer à extremidade do terminal C da sequência inibidora da JNK. Pode ser adicionada uma charneira de dois resíduos de prolina entre TAT e péptido inibidor da JNK, para criar o péptido de fusão completo. Por exemplo, os péptidos de fusão de L-aminoácido podem ser o péptido L-TAT-IB1 [SEQ ID N°: 11], o péptido L-TAT-IB2 [SEQ ID N°: 12] ou péptido L-TAT-IB genérico [SEQ ID N°: 13]. Alternativamente, os péptidos de fusão de L-aminoácidos podem ser o péptido L-TAT-JNKI1 [SEQ ID N°: 21] ou o péptido L-TAT-JNKI genérico [SEQ ID N°: 25]. Os péptidos de fusão D retro-inversos podem ser o péptido D-TAT-IB1 [SEQ ID N°: 14], o péptido D-TAT-IB2 [SEQ ID N°: 15] ou péptido D-TAT-IB genérico [SEQ ID N°: 16]. Alternativamente, os péptidos de fusão D retro-inversos podem ser o péptido D-TAT-JNKI [SEQ ID N°: 22] ou o péptido D-TAT-JNKI genérico [SEQ ID N°: 26]. O péptido TAT pode ser um péptido D retro-inverso tendo a sequência  $\text{NH}_2\text{-X}_n\text{-RRRQRRKKR-X}_n\text{-COOH}$  [SEQ ID N°: 10]. Nas SEQ ID N°: 5-6, 9-10, 13, 16 e 25-26, o número "X" de resíduos não está limitado ao representado e pode igualar qualquer número de resíduos de aminoácido, incluindo o zero e podem variar, como descrito acima.



A sequência de transporte pode ser uma única (*i. e.*, contínua) sequência de aminoácidos, presente na sequência TAT. Alternativamente, esta pode ser duas ou mais sequências de aminoácidos, as quais estão presentes na proteína TAT, mas que na proteína de ocorrência natural estão separadas por outras sequências de aminoácidos. Como aqui utilizado, proteína TAT inclui uma sequência de aminoácidos de ocorrência natural que é a mesma que a da proteína TAT de ocorrência natural ou sua proteína funcional equivalente ou seus fragmentos funcionalmente equivalentes (péptidos). Essas proteínas equivalentes funcionais, ou fragmentos funcionalmente equivalentes, possuem actividade de incorporação na célula e no núcleo celular, que é substancialmente semelhante à da proteína TAT de ocorrência natural. A proteína TAT pode ser obtida a partir de fontes de ocorrência natural ou ser produzida, utilizando técnicas de engenharia genética ou síntese química.

A sequência de aminoácidos da da proteína TAT de HIV de ocorrência natural pode ser modificada, por exemplo, pela adição, eliminação e/ou substituição de, pelo menos, um aminoácido presente na proteína TAT de ocorrência natural, para produzir a proteína TAT modificada (aqui também designada como proteína TAT). Pode ser produzida proteína TAT ou análogos de péptidos TAT modificados, com estabilidade aumentada ou reduzida, utilizando técnicas conhecidas. Em algumas formas de realização, as proteínas ou os péptidos TAT incluem sequências de aminoácidos que são substancialmente semelhantes, embora não idênticas, às das proteínas TAT de ocorrência natural ou suas porções. Além disso, podem ser adicionados colesterol ou outros derivados lipídicos à proteína TAT, para produzir uma TAT modificada, tendo solubilidade membranar aumentada.

As variantes da proteína TAT podem ser concebidas para modular a localização intracelular do péptido TAT-inibidor da JNK. Quando adicionadas exogenamente, essas variantes são concebidas de forma a que seja conservada a capacidade da TAT para entrar nas células (*i. e.*, que a incorporação da proteína TAT ou do péptido variante na célula seja, substancialmente, semelhante à da TAT do HIV de ocorrência natural). Por exemplo, a alteração da região básica que se considera importante para a localização nuclear (*ver, e. g.*, Dang e Lee, *J. Biol. Chem.* **264**:18019-18023 (1989); Hauber *et al.*, *J. Virol.* **63**:1181-1187 (1989); Ruben *et al.*, *J. Virol.* **63**:1-8 (1989)) pode resultar numa localização citoplasmática ou numa localização parcialmente citoplasmática da TAT e, conseqüentemente, do péptido inibidor da JNK. Alternativamente, pode ser introduzida na TAT uma sequência para a ligação a um componente ou compartimento citoplasmático ou qualquer outro (*e. g.*, retículo endoplasmático, mitocôndria, aparelho de Golgi, vesículas lisossômicas), para manter a TAT e o péptido inibidor da JNK no citoplasma ou em qualquer outro compartimento, para conferir regulação após a incorporação da TAT e do péptido inibidor da JNK.

Outras fontes de péptidos transportadores incluem, *e. g.*, VP22 (descrita em, *e. g.*, documento WO 97/05265; Elliott e O'Hare, *Cell* **88**: 223-233 (1997)) ou proteínas não-virais (Jackson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10691-10695 (1992)).

A sequência inibidora da JNK e a sequência de transporte podem ser ligadas por ligação química, de qualquer forma adequada, conhecida na técnica. Muitos métodos de reticulação

química conhecidos são não-específicos, *i. e.*; estes não direccionam o ponto da ligação para qualquer local particular no polipéptido de transporte ou macromolécula de carga. Consequentemente, a utilização de agentes de reticulação não-específicos pode atacar locais funcionais ou bloquear estericamente locais activos, tornando as proteínas conjugadas biologicamente inactivas.

Uma forma de aumentar a especificidade de ligação consiste em realizar, directamente, uma ligação química a um grupo funcional que ocorra apenas uma vez ou poucas vezes em um ou em ambos os polipéptidos a serem reticulados. Por exemplo, em muitas proteínas, a cisteína, a qual é o único aminoácido proteico contendo um grupo tiol, ocorre apenas algumas vezes. Também, por exemplo, se um polipéptido não contiver quaisquer resíduos lisina, um reagente de reticulação específico para aminas primárias será selectivo para o terminal amina desse polipéptido. A utilização com sucesso desta abordagem para aumentar especificidade de ligação requer que o polipéptido tenha, adequadamente, os resíduos raros e reactivos em áreas da molécula que possam ser alteradas sem perda da actividade biológica da molécula.

Os resíduos de cisteína podem ser substituídos, quando estes ocorrem em partes de uma sequência polipeptídica em que a sua participação numa reacção de reticulação iria, provavelmente, interferir de outra forma na actividade biológica. Quando um resíduo de cisteína é substituído, é, tipicamente, desejável minimizar as modificações resultantes no enrolamento do polipéptido. As modificações no enrolamento do polipéptido são minimizadas, quando a substituição é química e estericamente semelhante à cisteína. Por estas razões, é

preferida a serina como uma substituição da cisteína. Como demonstrado nos exemplos abaixo, pode ser introduzido um resíduo de cisteína na sequência de aminoácidos de um polipéptido, para finalidades de reticulação. Quando é introduzido um resíduo de cisteína, é preferida a introdução no terminal amina ou carboxilo ou na sua proximidade. Estão disponíveis métodos convencionais para essas modificações da sequência de aminoácidos ou o polipéptido de interesse seja produzido por síntese química, quer por expressão de ADN recombinante

A ligação dos dois constituintes pode ser realizada através de um agente de ligação ou de conjugação. Existem vários reagentes de reticulação intermolecular que podem ser utilizados, Ver, por exemplo, Means e Feeney, *CHEMICAL MODIFICATION OF PROTEINS*, Holden-Day, 1974, p. 39-43. Entre estes reagentes estão, por exemplo, J-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) ou N,N'-bismaleimida (1,3-fenileno) (sendo, ambos, altamente específicos para grupos sulfidrilo e formam ligações irreversíveis); N,N'-etileno-bis-(iodoacetamida) ou outro desses reagentes tendo 6 para 11 pontes de carbono de metileno (as quais são, relativamente, específicas para grupos sulfidrilo); e 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno (o qual forma ligações irreversíveis com grupos amina e tirosina). Outros reagentes de reticulação úteis para esta finalidade incluem: p,p'-difluoro-m,m'-dinitrodifenilsulfona (a qual forma reticulações irreversíveis com grupos amina e fenólicos); dimetiladipimidato (o qual é específico para grupos amina); cloreto de fenol-1,4-dissulfonilo (o qual reage, principalmente, com grupos amina); hexametenodi-isocianato ou di-isotiocianato ou azofenil-p-di-isocianato (o qual reage, principalmente, com grupos amina); glutaraldeído (o qual reage com várias cadeias

laterais diferentes) e disdiazobenzidina (a qual reage, principalmente, com tirosina e histidina).

Os reagentes de reticulação podem ser homobifuncionais, *i. e.*, tendo dois grupos funcionais que sofrem a mesma reacção. Um reagente de reticulação homobifuncional preferido é o bismaleimido-hexano ("BMH"). O BMH contém dois grupos funcionais maleimida, os quais reagem, especificamente, com compostos contendo sulfidrilo, sob condições suaves (pH 6,5-7,7). Os dois grupos maleimida são ligados por uma cadeia de hidrocarbonetos. Consequentemente, o BMH é útil para a reticulação irreversível de polipéptidos que contém resíduos de cisteína.

Os reagentes de reticulação podem ser, também, heterobifuncionais. Os agentes de reticulação heterobifuncionais têm dois grupos funcionais diferentes, por exemplo, um grupo reactivo com amina e um grupo reactivo com tiol, que irão reticular duas proteínas tendo, respectivamente, aminas livres e tióis. São exemplos de agentes de reticulação heterobifuncionais, succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilolato ("SMCC"), éster m-maleimidobenzoi-N-hidroxisuccinimídico ("MBS") e butirato de succinimida 4-(p-maleimidofenilo) ("SMPB"), um análogo de cadeia estendida do MBS. O grupo succinimidilo destes agentes de reticulação reage com uma amina primária e a maleimida reactiva com tiol forma uma ligação covalente com o tiol de um resíduo cisteína.

Os reagentes de reticulação têm, frequentemente, uma baixa solubilidade em água. Pode ser adicionada uma parte hidrofílica, tal como um grupo sulfonato, ao reagente de reticulação, para melhorar a sua solubilidade em água. Sulfo-MBS e sulfo-SMCC são

exemplos de reagentes de reticulação modificados para a solubilidade em água.

Muitos reagentes de reticulação produzem um conjugado que é, essencialmente, não-clivável sob condições celulares. No entanto, alguns reagentes de reticulação contêm uma ligação covalente, tal como um persulfureto, que é clivável sob condições celulares. Por exemplo, o reagente de Traut, ditiobis(succinimidilpropionato) ("DSP") e N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato ("SPDP") são agentes de reticulação cliváveis, bem conhecidos. A utilização de um reagente de reticulação clivável permite à parte de carregamento separar-se do polipéptido de transporte, após a distribuição na célula alvo. A ligação persulfureto, directa, pode ser, também, útil.

Estão comercialmente disponíveis vários reagentes de reticulação, incluindo os discutidos acima. Estão facilmente disponíveis instruções detalhadas para a sua utilização, a partir dos fornecedores comerciais. Uma referência geral em reticulação de proteínas e preparação de conjugados é: Wong, *CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING*, CRC Press (1991).

A reticulação química pode incluir a utilização de braços espaçadores. Os braços espaçadores proporcionam flexibilidade intramolecular ou ajustam as distâncias intramoleculares entre as partes conjugadas e, deste modo, podem auxiliar a conservar a actividade biológica. Um braço espaçador pode estar sob a forma de uma parte polipeptídica que inclui aminoácidos espaçadores, e. g., prolina. Alternativamente, um braço espaçador pode ser

parte do reagente de reticulação, tal como em "SPDP de cadeia longa" (Pierce Chem. Co., Rockford, IL, N° de cat. 21651 H).

Alternativamente, o péptido quimérico pode ser produzido como uma forma de um péptido de fusão que inclui a sequência de transporte e a sequência inibidora da JNK, a qual pode ser, convenientemente, expressa em células hospedeiras adequadas conhecidas. Os péptidos de fusão, como aqui descritos, podem ser formados e utilizados em formas análogas a ou facilmente adaptáveis a partir de técnicas de ADN recombinante padrão, como descritas acima.

#### **PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA PÉPTIDOS INIBIDORES DA JNK**

Os péptidos inibidores da JNK, incluindo péptidos quiméricos incluindo os péptidos inibidores da JNK (e. g., péptidos incluindo as sequências de aminoácidos mostradas na Tabela 1), assim como seus péptidos ou derivados, fragmentos, análogos ou homólogos, podem ser utilizados como imunogénios para produzir anticorpos que se ligam imuno-especificamente a estes componentes do péptido. Esses anticorpos incluem, e. g., policlonais, monoclonais, quiméricos, cadeia única, fragmentos Fab e uma biblioteca de expressão de Fab. Numa opção específica, são divulgados os anticorpos contra péptidos humanos. Numa outra opção específica, os fragmentos dos péptidos inibidores da JNK são utilizados como imunogénios para a produção do anticorpo. Podem ser utilizados vários processos conhecidos na técnica para a produção de anticorpos policlonais ou monoclonais contra um péptido inibidor da JNK ou seu derivado, fragmento, análogo ou homólogo.

Para a produção de anticorpos policlonais, podem ser imunizados vários animais hospedeiros por injeção com o péptido nativo ou uma sua variante sintética ou um derivado do anterior. Podem ser utilizados vários adjuvantes para aumentar a resposta imunológica e incluem, mas não estão limitados a, adjuvantes de Freund (completo e incompleto), géis minerais (e. g., hidróxido de alumínio), substâncias tensioactivas (e. g., lisolecitina, polióis plurónicos, polianiões, péptidos, emulsões de óleo, dinitrofenol, etc.) e humanos, tais como *Bacille Calmette-Guerin* e de *Corynebacterium parvum*.

Pode ser utilizada qualquer técnica que proporcione a produção de moléculas do anticorpo por cultura contínua de linhas celulares, para a preparação dos anticorpos monoclonais dirigidos contra um péptido inibidor da JNK ou seus derivados, fragmentos, análogos ou homólogos. Essas técnicas incluem, mas não estão limitadas, a técnica do hibridoma (ver, Kohler e Milstein, 1975. *Nature* **256**: 495-497); a técnica do trioma; a técnica do hibridoma de células B humanas (ver, Kozbor, et al., 1983. *Immunol Today* **4**: 72) e a técnica do hibridoma EBV para produzir anticorpos monoclonais humanos (ver, Cole, et al., 1985. Em: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., p. 77-96). Podem ser utilizados anticorpos monoclonais humanos na prática da presente invenção e podem ser produzidos por utilização de hibridomas humanos (ver, Cote, et al., 1983. *Proc Acad Natl Sci USA* **80**: 2026-2030) ou transformando células B humanas com o vírus de Epstein Barr *in vitro* (ver, Cole, et al., 1985. Em: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* (Alan R Liss, Inc., p. 77-96).



Podem ser adaptadas técnicas para a produção de anticorpos de cadeia única específicos para um péptido inibidor da JNK (ver, e. g., patente U.S. N° 4946778). Além disso, as metodologias podem ser adaptadas para a construção de bibliotecas de expressão de Fab (ver, e. g., Huse, et al., 1989. *Science* **246**: 1275-1281) para permitir a identificação rápida e eficaz de fragmentos Fab monoclonais com a especificidade pretendida contra um péptido inibidor da JNK ou seus derivados, fragmentos, análogos ou homólogos. Os anticorpos não-humanos podem ser “humanizados” por técnicas bem conhecidas na técnica. Ver, e. g., patente U.S. N° 5225539. Podem ser produzidos fragmentos de anticorpo que contêm os idiotipos contra um péptido inibidor da JNK por técnicas conhecidas na técnica incluindo, e. g., (i) um fragmento  $F(ab')_2$  produzido por digestão de uma molécula de anticorpo com pepsina; (ii) um fragmento Fab produzido por redução das pontes de persulfureto de um fragmento  $F(ab')_2$ ; (iii) um fragmento Fab produzido por tratamento da molécula de anticorpo com papaína e um agente redutor e (iv) fragmentos Fv.

Numa opção, as metodologias para a selecção dos anticorpos que possuem a especificidade pretendida incluem, mas não estão limitadas a, ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) e outras técnicas mediadas imunologicamente, conhecidas na técnica. Numa opção específica, a selecção de anticorpos que são específicos para um domínio particular de um péptido inibidor da JNK é facilitada pela produção de hibridomas que se ligam ao fragmento de um péptido inibidor da JNK possuindo esse domínio. São, também, aqui proporcionados anticorpos que são específicos para um domínio dentro de um péptido inibidor da JNK ou seus derivados, fragmentos, análogos ou homólogos.

Podem ser utilizados anticorpos anti-péptido inibidor da JNK, em métodos conhecidos na técnica, relacionados com a localização e/ou com a quantificação de um péptido inibidor da JNK. (e. g., para utilização na medição dos níveis do péptido dentro de amostras fisiológicas adequadas, para a utilização em métodos de diagnóstico, para a utilização na visualização do péptido e semelhantes). Numa determinada opção, são utilizados anticorpos contra os péptidos inibidores da JNK ou seus derivados, fragmentos, análogos ou homólogos, que contêm o domínio de ligação derivado do anticorpo, como compostos farmacologicamente activos (aqui, seguidamente "Agentes Terapêuticos").

## **MÉTODOS PARA TRATAR OU PREVENIR DISTÚRBIOS**

### ACTIVIDADE INDESEJADA DE JNK ASSOCIADA A DISTÚRBIOS

São também divulgados métodos para tratar os distúrbios proliferativos celulares associados com a activação de JNK num indivíduo, por administração de um composto terapêutico biologicamente activo a um indivíduo (seguidamente "Agente Terapêutico").

A expressão "distúrbio proliferativo celular" designa populações celulares malignas assim como não-malignas que parecem frequentemente diferir morfológica e funcionalmente do tecido circundante. Por exemplo, o método pode ser útil no tratamento de malignidades dos vários sistemas de órgãos, em que a activação de JNK foi demonstrada frequentemente, e. g., pulmão, mama, linfóide, tracto gastrointestinal e genito urinário, assim como adenocarcinomas que incluem

malignidades tais como a maioria dos cancros do cólon, carcinoma das células renais, cancro da próstata, carcinoma pulmonar de células não-pequenas, cancro do intestino delgado e cancro do esófago. São incluídos também cancros com transformações oncogénicas *Bcr-Abl* que requerem claramente a activação de JNK.

O método também é útil no tratamento de doenças não-malignas ou de proliferação celular relacionadas imunologicamente, tais como psoríase, pênfigo vulgar, síndrome de Behcet, síndrome da dificuldade respiratória aguda (ARDS), doença cardíaca isquémica, síndrome pós-diálise, leucemia, artrite reumatóide, síndrome da imunodeficiência adquirida, vasculite, choque séptico e outros tipos de inflamação aguda e histiocitose lipídica. São especialmente preferidos os distúrbios imunopatológicos. Essencialmente, qualquer distúrbio, que esteja ligado etiológicamente à actividade da cinase de JNK, irá ser considerado susceptível ao tratamento.

#### Perda de Audição

São também divulgados métodos para prevenir ou tratar a perda de audição, administrando um Agente Terapêutico, *i. e.*, um péptido bioativo permeável numa célula, em que o péptido previne danos aos estereocílios das células ciliadas, apoptose de células ciliadas ou apoptose neuronal, num indivíduo. De um modo preferido, o Agente Terapêutico é o péptido das SEQ ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28.

A exposição ao ruído intenso provoca perda de audição induzida pelo ruído (NIHL), por danificar os órgãos de Corti. Os

danos de NIHL dependem do nível do ruído e da duração da exposição. A perda de audição pode ser temporária (TTS) se um mecanismo de reparação tiver a capacidade de restaurar o órgão de Corti, No entanto, esta torna-se permanente (PTS) quando as células ciliadas ou os neurónios morrem. As correlações estruturais com o traumatismo acústico são de dois tipos: (1) danos ligeiros das sinapses e/ou dos estereocílios das células ciliadas, os quais podem ser reparado e representar TTS e recuperação e (2) danos graves induzindo apoptose das células ciliadas e neuronal, a qual não pode ser reparada e representa PTS.

O Agente Terapêutico é administrado ao indivíduo antes da exposição a um traumatismo acústico, antibiótico ou agente quimioterapêutico. Alternativamente, o Agente Terapêutico é administrado após o indivíduo ser exposto a um traumatismo acústico, antibiótico ou agente quimioterapêutico.

Um traumatismo acústico é um ruído que é suficiente para causar danos ao corti. Por exemplo, um traumatismo acústico corresponde a, pelo menos, 70 dB SPL, pelo menos, 90 dB SPL ou, pelo menos, 100 dB SPL, pelo menos, 120 dB SPL ou, pelo menos, 130 dB SPL.

Os antibióticos incluem, por exemplo, penicilinas, tais como penicilina G, penicilina V, ampicilina, amoxicilina, dicloxacilina e oxacilina; cefalosporinas, tais como cefalexina (Keflex), cefaclor (Ceclor) e cefixima (Suprax); aminoglicósidos, tais como tobramicina e estreptomicina; macrólidos, tais como eritromicina, azitromicina (Zithromax) e claritromicina; sulfonamidas, tais como

trimetoprima-sulfametoxazole ou tetraciclinas, tais como tetraciclina ou doxiciclina.

### DISTÚRBIOS NEURONAIS

São também divulgados métodos para tratar ou prevenir distúrbios relacionados com a morte das células neuronais por administração, a uma célula ou a um indivíduo, de uma composição de um péptido bioactivo permeável em células em que o péptido previne danos aos neurónios ou apoptose neuronal. A composição é por exemplo o péptido da SEQ ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ou 21-26.

De um modo preferido, a composição actua para inibir a morte induzida pelo stress excitotóxico ou oxidativo de células neuronais. Uma célula neuronal é qualquer célula derivada do sistema nervoso central ou periférico, e. g., neurónio, neurite ou dendrite. A célula é contactada *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro*. O indivíduo é, por exemplo, qualquer mamífero, e. g., humano, primata, murganho, rato, cão, gato, vaca, cavalo, porco.

A morte das células neuronais é medida por métodos conhecidos na técnica. Por exemplo a morte celular é determinada por microscopia ou utilizando um indicador químico como Calcein-am (Molecular Probes).

A excitotoxicidade é o mecanismo principal subjacente à morte neuronal no acidente vascular cerebral, danos cerebrais anóxicos e traumáticos é excitotoxicidade. A excitotoxicidade é desencadeada pela activação excessiva de receptores do glutamato ionotrópicos, particularmente, o subtipo de receptor

N-metil-D-aspartato, conduzindo desse modo ao influxo rápido de  $\text{Ca}^{2+}$  que desencadeia a morte celular. Ver e. g., Dirnagl et al., *Trends in Neurosci.* **22**:391-97 (1999); Zipfel et al., *J. of Neurotrauma* **17**:857-69 (2000).

Os métodos são úteis para aliviar os sintomas de vários distúrbios neuronais. O distúrbio neuronal é agudo ou crônico. O distúrbio neuronal inclui os associados com um evento excitotóxico, tal como acidente vascular cerebral isquêmico, isquemia cerebral, danos cerebrais hipóxicos/isquêmicos, danos cerebrais traumáticos, morte neuronal originada por crises epilépticas e morte neuronal associada com diversos distúrbios neurodegenerativos, tais como doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica (ALS) e doença de Huntington.

A morte neuronal na isquemia cerebral está associada com mecanismos excitotóxicos. A isquemia cerebral (por exemplo, isquemia cerebral global e isquemia cerebral focal) é devida a acidente vascular cerebral, lesões cranianas ou à paragem cardíaca. A isquemia cerebral global resulta de paragem cardíaca ou de oclusão bilateral da artéria carótida. A isquemia cerebral focal resulta de uma redução no fluxo sanguíneo cerebral após oclusão da artéria cerebral. A isquemia cerebral focal resulta em morte neuronal necrótica por uma cascata patogénica complexa de eventos que inclui esgotamento da energia, excitotoxicidade e despolarização peri-enfarte, assim como um mecanismo mais retardado envolvendo tanto apoptose como inflamação. A isquemia cerebral focal pode ser ainda dividida em isquemia focal trombótica ou embólica. Um acidente vascular cerebral trombótico ocorre quando as artérias cerebrais ficam obstruídas por um coágulo sanguíneo que é formado no interior do cérebro. Um acidente vascular cerebral embólico é causado também por uma

artéria obstruída, mas no acidente vascular cerebral embólico, o coágulo é formado num outro local que não o próprio cérebro.

Os métodos aqui descritos originam uma redução da severidade ou o alívio de um ou mais sintomas de um distúrbio neuronal, tais como os aqui descritos. Os distúrbios neuronais são diagnosticados e ou monitorizados, tipicamente, por um médico utilizando metodologias convencionais.

Os péptidos JNKI da divulgação revelaram, como descrito nos exemplos, proporcionar níveis elevados de neuroprotecção e, além disso, o nível de protecção permanece elevado mesmo quando o péptido JNKI é administrado 6-12 horas após o início da isquemia. Embora tenha sido demonstrada neuroprotecção a 30-50% com vários compostos administrados até 9 horas após isquemia (ver e. g., Fink et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **18**:1071-76 (1998); Williams et al., *Neuroreport*, **13**:821-24 (2002)), os péptidos JNKI da presente invenção revelaram proporcionar protecção quando administrados 12 horas após o evento isquémico, como descrito nos exemplos abaixo.

A maioria dos doentes que estão a sofrer ou que sofreram, um evento excitotóxico, tal como um acidente vascular cerebral isquémico, procuram auxílio médico dentro de 3 a 6 horas após o evento excitotóxico. O espaço de tempo disponível para tratar ou prevenir os danos excitotóxicos, tais como os danos que ocorrem num evento isquémico, é importante, dado que a activação dos mecanismos de morte celular pode demorar várias horas após o evento excitotóxico. Consequentemente, o Agente Terapêutico pode ser administrado ao indivíduo antes de sofrer um evento excitotóxico. Alternativamente, o Agente Terapêutico pode ser administrado após o indivíduo sofrer um evento excitotóxico.

## INIBIÇÃO DA MORTE DE CÉLULAS DOS ILHÉUS PANCREÁTICOS

São divulgados também métodos de inibição de dano ou morte celular ou de prevenção de danos celular aberrantes tal como morte celular induzida por stress oxidativo (e. g., morte celular apoptótica) por administração de um agente terapêutico bioactivo a um indivíduo por administração de uma composição (Agente Terapêutico) contendo um péptido bioactivo, a uma célula ou a indivíduo, em que o péptido previne morte ou dano celular. A célula é por exemplo uma célula pancreática. De um modo preferido, o Agente Terapêutico é o péptido da SEQ ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ou 21-26. Opcionalmente, é também administrada colagenase à célula ou ao indivíduo.

O péptido é administrado antes ou após o indivíduo ser exposto a um citocina pró-inflamatória, tal como as interleucinas.

O indivíduo pode ser, por exemplo, qualquer mamífero, e. g., humano, primata, murganho, rato, cão, gato, vaca, cavalo, porco.

## **COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS**

Agentes Terapêuticos incluem, e. g.: (i) qualquer um ou mais dos péptidos inibidores da JNK e seus derivados, fragmentos, análogos e homólogos; (ii) anticorpos direccionados contra péptidos inibidores da JNK; (iii) ácidos nucleicos codificando um péptido inibidor da JNK e seus derivados,



fragmentos, análogos e homólogos; (iv) ácidos nucleicos anti-sentido contra sequências codificando um péptido inibidor da JNK e (v) moduladores (*i. e.*, inibidores, agonistas e antagonistas).

A expressão “terapeuticamente eficaz” significa que a quantidade do péptido inibidor que é, por exemplo, utilizada, é uma quantidade suficiente para melhorar o distúrbio associado com a JNK.

Tratamento inclui a administração de um reagente que modula a actividade da cinase JNK. O termo “modula” inclui a supressão da expressão da JNK quando esta é sobre-expressa. Este inclui, também, a supressão da fosforilação de c-Jun, ATF2 ou NFAT4, utilizando, por exemplo, um péptido de qualquer uma ou de mais das SEQ ID N°: 1-6 e 21-22 e SEQ ID N°: 11-16 e 23-26, como um inibidor competitivo do local de ligação natural de c-Jun, ATF2 e NFAT4, numa célula. Deste modo inclui, também, a supressão dos complexos hetero e homoméricos dos factores de transcrição constituídos por c-Jun, ATF2 ou NFAT4 e os seus parceiros relacionados, tal como, por exemplo, o complexo AP-1, que é constituído por c-Jun, ATF2 e c-fos. Quando um distúrbio celular proliferativo está associado com a sobre-expressão de JNK, esses péptidos supressores dos inibidores da JNK podem ser introduzidos numa célula. Em alguns casos, “modula” pode incluir o aumento da expressão da JNK, por exemplo, pela utilização de um anticorpo específico para o péptido IB, que bloqueia a ligação de um péptido IB à JNK, prevenindo, deste modo, a inibição da JNK pelo péptido relacionado com IB. Os péptidos inibidores da JNK, os péptidos de fusão e os ácidos nucleicos da invenção podem ser formulados em composições farmacêuticas. Estas composições podem compreender, além de uma das substâncias

acima, um excipiente, veículo, tampão estabilizador farmacêuticamente aceitável ou outros materiais bem conhecidos dos especialistas na técnica. Esses materiais deverão ser não-tóxicos e não deverão interferir na eficácia do ingrediente activo. A natureza precisa do veículo ou de outro material pode depender da via de administração, e. g., vias oral, intravenosa, cutânea ou subcutânea, nasal, intramuscular, intraperitoneal, intraauricular ou emplastro.

As composições farmacêuticas para administração oral podem estar sob a forma de comprimido, cápsula, pó ou líquida. Um comprimido pode incluir um veículo sólido, tal como gelatina ou um adjuvante. De um modo geral, as composições farmacêuticas líquidas incluem um veículo líquido, tais como água, vaselina, óleos vegetais ou animais, óleo mineral ou óleo sintético. Pode ser incluída uma solução salina fisiológica, de dextrose ou outra solução de sacáridos ou glicóis, tais como etilenoglicol, propilenoglicol ou polietilenoglicol.

Para injeção intravenosa, cutânea ou subcutânea, ou injeção no local da lesão, o ingrediente activo irá estar sob a forma de uma solução aquosa, parentericamente aceitável, a qual é isenta de pirogénios e tem pH, isotonicidade e estabilidade adequados. Os especialistas na técnica têm uma boa capacidade para preparar soluções adequadas, utilizando, por exemplo, veículos isotónicos, tais como Injeção de Cloreto de Sódio, Injeção de Ringer, Injeção de Ringer com Lactato. Se necessário, podem ser incluídos conservantes, estabilizantes, tampões, antioxidantes e/ou outros aditivos.

Se este for um polipéptido, péptido ou molécula de ácido nucleico, outro composto farmacêuticamente útil de acordo com a

presente divulgação, que se destina a ser administrado a um indivíduo, a administração é realizada, de um modo preferido, numa “quantidade profilaticamente eficaz” ou numa “quantidade terapeuticamente eficaz” (de acordo com o caso, embora a profilaxia possa ser considerada terapia), sendo esta suficiente para apresentar um benefício para o indivíduo. A quantidade real administrada e a velocidade e evolução ao longo do tempo da administração, irá depender da natureza e gravidade do que está a ser tratado. A prescrição do tratamento, e. g., decisões sobre a dosagem etc., está dentro da responsabilidade dos médicos de clínica geral e de outros médicos e, tipicamente, tem em consideração o distúrbio a ser tratado, o estado do doente individual, o local de distribuição, o método de administração e outros factores conhecidos dos médicos. Em *REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 16ª edição, Osol, A. (ed), 1980, podem ser encontrados exemplos das técnicas e protocolos referidos acima.

Alternativamente, podem ser utilizadas terapias direccionadas para distribuir mais especificamente o agente activo a determinados tipos de células, pela utilização de sistemas direccionados, tais como ligandos específicos de anticorpos ou células. O direccionamento pode ser desejável por vários motivos; por exemplo, se o agente for inaceitavelmente tóxico ou se este requerer, de qualquer outra forma, uma dosagem demasiado elevada ou se este não for, de qualquer outra forma, capaz entrar nas células alvo.

Em lugar de administrar estes agentes, directamente, estes podem ser produzidos nas células alvo, pela expressão de um gene codificante, introduzido nas células, e. g., num vector viral (uma variante da técnica VDEPT - ver abaixo). O vector pode ser

direccionado para as células específicas a serem tratadas ou este pode conter elementos reguladores, os quais são activados, mais ou menos selectivamente, pelas células alvo.

Alternativamente, o agente pode ser administrado numa forma de precursor, para a conversão na forma activa por um agente de activação produzido ou direccionado para as células a serem tratadas. Este tipo da abordagem é, por vezes, conhecida como ADEPT ou VDEPT; envolvendo, a primeira, direccionar o agente de activação para as células, por conjugação com um anticorpo específico para uma célula, enquanto que a segunda envolve a produção do agente de activação, e. g., um péptido inibidor da JNK, num vector, por expressão a partir de ADN codificante num vector viral (ver, por exemplo, os documentos EP-A-415731 e WO 90/07936).

Numa opção específica, são administrados ácidos nucleicos, incluindo uma sequência que codifica um péptido inibidor da JNK, ou seus derivados funcionais para modular as vias sinalizadoras de JNK activadas, através de terapia génica. Em formas de realização mais específicas, é administrado um ácido nucleico ou ácidos nucleicos codificando um péptido inibidor da JNK ou seus derivados funcionais, como terapia génica. A terapia génica refere-se à terapia que é realizada por administração de um ácido nucleico específico a um indivíduo. Nesta forma de realização da presente invenção, o ácido nucleico produz o(s) seu(s) péptido(s) codificado(s), o(s) qual(is), serve(m), então, para exercer um efeito terapêutico, modulando a função da doença ou distúrbio. Pode ser utilizada qualquer das metodologias relacionadas com terapia génica, disponíveis na técnica. Ver e. g., Goldspiel et al., 1993. *Clin. Pharm* **12**: 488-505.

Numa opção preferida, os Agentes Terapêuticos podem compreender um ácido nucleico que é parte de um vector de expressão expressando qualquer um ou mais de péptidos relacionados com IB, péptidos ou fragmentos relacionados com JBD<sub>20</sub>, seus derivados ou análogos, como definido acima, no interior de um hospedeiro adequado. Numa opção específica, esse ácido nucleico possui um promotor que está operativamente ligado à(s) região(ões) codificante(s) de um péptido inibidor da JNK. O promotor pode ser induzível ou constitutivo e, opcionalmente, específico para um tecido. Numa outra opção específica, é utilizada uma molécula de ácido nucleico em que as sequências codificantes (e qualquer outra sequência pretendida) são flanqueadas por regiões que promovem a recombinação homóloga, num local pretendido dentro do genoma, proporcionando, deste modo, a expressão intra-cromossômica de ácidos nucleicos. Ver e. g., Koller e Smithies, 1989. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 8932-8935.

A distribuição do ácido nucleico Terapêutico num doente pode ser directa (i. e., o doente é exposto, directamente, ao ácido nucleico ou ao vector contendo o ácido nucleico), ou indirecta (i. e., as células são, inicialmente, transformadas com o ácido nucleico *in vitro* e são, seguidamente, transplantadas no doente). Estas duas abordagens são conhecidas, respectivamente, como terapia génica *in vivo* ou *ex vivo*. Numa opção específica, um ácido nucleico é administrado, directamente, *in vivo*, quando é expresso para produzir o produto codificado. Isto pode ser realizado por qualquer um de vários métodos conhecidos na técnica, incluindo, e. g., a construção do ácido nucleico como parte de um vector de expressão do ácido nucleico adequado e administrando o mesmo, de tal forma que este se torna intracelular (e. g., por infecção, utilizando um vector

retroviral ou outro viral, deficiente ou atenuado; ver Patente US N° 4980286); injectando, directamente, ADN nu; utilizando bombardeamento de micropartículas (e. g., "Gene Gun<sup>®</sup>"; Biolistic, DuPont); revestindo os ácidos nucleicos com lípidos; utilizando receptores da superfície celular/agentes de transfecção associados; encapsulando em lipossomas, micropartículas ou microcápsulas; administrando-o em ligação a um péptido que seja conhecido por entrar no núcleo; ou administrando-o em ligação a um ligando predisposto à endocitose mediada por um receptor (ver, e. g., Wu e Wu, 1987. *J Biol Chem* **262**: 4429-4432), o qual pode ser utilizado para "visar" tipos celulares que expressam, especificamente, os receptores de interesse, etc.

Uma abordagem, adicional, à terapia génica envolve a transferência de um gene para células em cultura de tecidos *in vitro*, por métodos tais como electroporação, lipofecção, transfecção mediada por fosfato de cálcio, infecção viral ou semelhantes. De um modo geral, o método de transferência inclui a transferência concomitante de um marcador seleccionável para as células. As células são, então, colocadas sob pressão (e. g., resistência a antibióticos), de forma a facilitar o isolamento das células que incorporaram e estão a expressar o gene transferido. Essas células são então distribuídas a um doente. Numa opção específica, antes da administração *in vivo* da célula recombinante resultante, o ácido nucleico é introduzido numa célula, por qualquer método conhecido na técnica, incluindo, e. g., transfecção, electroporação, microinjecção, infecção com um vector viral ou vector bacteriofágico contendo as sequências de ácido nucleico de interesse, fusão celular, transferência génica mediada por cromossoma, transferência génica mediada por microcélulas, fusão de esferoplastos e metodologias semelhantes, que assegurem que as funções de desenvolvimento e fisiológicas

necessárias das células receptoras não são interrompidas pela transferência. Ver e. g., Loeffler e Behr, 1993. *Meth Enzymol* **217**: 599-618. A técnica seleccionada deve proporcionar a transferência estável do ácido nucleico à célula, de forma a que o ácido nucleico seja expressável pela célula. De um modo preferido, o ácido nucleico transferido é hereditário e é expressável pela descendência da célula.

Em opções preferidas, as células recombinantes resultantes podem ser distribuídas a um doente, através de vários métodos conhecidos na técnica, incluindo, e. g., injeção de células epiteliais (e. g., subcutaneamente), aplicação de células da pele recombinantes, sob a forma de um enxerto de pele no doente e injeção intravenosa de células sanguíneas recombinantes (e. g., células estaminais hematopoiéticas ou progenitoras). A quantidade total de células que são contempladas para utilização, depende do efeito pretendido, do estado do doente e semelhantes e pode ser determinada por um especialista na técnica.

As células nas quais pode ser introduzido um ácido nucleico, para os objectivos de terapia génica, abrangem qualquer tipo celular pretendido, disponível e podem ser xenogénicas, heterogénicas, singénicas ou autogénicas. Os tipos celulares incluem, mas não estão limitadas a, células diferenciadas, tais como células epiteliais, células endoteliais, queratinócitos, fibroblastos, células musculares, hepatócitos e células sanguíneas ou várias células estaminais ou progenitoras, em particular, células musculares de coração embrionário, células estaminais de fígado (Pedido de Patente Internacional WO 94/08598), células estaminais neuronais (Stemple e Anderson, 1992, *Cell* **71**: 973-985), células

hematopoiéticas estaminais ou progenitoras, e. g., como obtidas de medula óssea, sangue de cordão umbilical, sangue periférico, fígado fetal e semelhantes. Numa forma preferida, as células utilizadas em terapia génica são autólogas para o doente.

## **IMMUNOENSAIOS**

Os péptidos e anticorpos podem ser utilizados em ensaios (e. g., imunoensaios), para detectar, prever, diagnosticar ou monitorizar vários estados, doenças e distúrbios, caracterizados por níveis aberrantes de JNK ou de um péptido inibidor da JNK ou monitorizar o seu tratamento. Um “nível aberrante” significa um nível aumentado ou reduzido numa amostra, em relação ao presente, numa amostra análoga, proveniente de uma parte do corpo não afectada ou de um indivíduo não tendo o distúrbio. O imunoensaio pode ser realizado por um método compreendendo fazer contactar uma amostra derivada de um doente com um anticorpo, sob condições de forma a que possa ocorrer ligação imuno-específica e subsequentemente, detectar ou medir a quantidade de qualquer ligação imuno-específica pelo anticorpo. Numa opção específica, pode ser utilizado um anticorpo específico para um péptido inibidor da JNK, para analisar um tecido ou uma amostra de soro proveniente de um doente, para a presença da JNK ou de um péptido inibidor da JNK; em que um nível aberrante da JNK ou de um péptido inibidor da JNK é indicativo de um estado de doença. Os imunoensaios que podem ser utilizados incluem, mas não estão limitadas a, sistemas de ensaio competitivos e não competitivos utilizando técnicas, tais como Transferências de Western, radioimunoensaios (RIA), ensaios imunoabsorventes ligados a enzima (ELISA), imunoensaios em “sanduiche”, ensaios de imunoprecipitação, reacções de



precipitina, reacções de difusão em gel de precipitina, ensaios de imunodifusão, ensaios de aglutinação, imunoensaios de fluorescência, ensaios de fixação do complemento, ensaios imuno radiométricos e imunoensaios com proteína-A, etc.

## **KITS**

A presente divulgação proporciona adicionalmente kits para utilização em diagnóstico ou terapia que incluem um ou mais recipientes contendo um anticorpo anti-péptido inibidor da JNK e, opcionalmente, um parceiro de ligação ao anticorpo, marcado. A marcação incorporada no anticorpo pode incluir, mas não está limitada a, uma parte quimioluminescente, enzimática, fluorescente, colorimétrica ou radioactiva. Numa outra opção específica, são também proporcionados kits para utilização em diagnóstico, que são compreendidos por um ou mais recipientes contendo ácidos nucleicos modificados ou não-modificados que codificam ou que, alternativamente, são o complemento a um péptido inibidor da JNK e, opcionalmente, um parceiro de ligação aos ácidos nucleicos marcado. Numa opção específica alternativa, o kit pode compreender, num ou mais recipientes, um par de iniciadores oligonucleotídicos (e. g., cada com 6-30 nucleótidos de comprimento) que são capazes de actuar como iniciadores de amplificação para a reacção em cadeia da polimerase (PCR; ver, e. g., Innis, et al., 1990. *PCR PROTOCOLS*, Academic Press, Inc., San Diego, CA), reacção em cadeia da ligase, reacção da sonda cíclica e semelhantes ou outros métodos conhecidos na técnica. O kit pode, opcionalmente, compreender adicionalmente uma quantidade pré-determinada de um péptido inibidor da JNK purificado ou seus ácidos nucleicos, para utilização como um agente de diagnóstico, padrão ou de controlo nos ensaios.

A presente invenção não pretende ser limitada no âmbito pelas formas de realização específicas aqui descritas. De facto, várias modificações da invenção, para além das aqui descritas tornar-se-ão evidentes para os especialistas na técnica, a partir da descrição anterior e das figuras que a acompanham.

## **EXEMPLOS ESPECÍFICOS**

### **Exemplo 1: Identificação de Péptidos Inibidores da JNK**

As sequências de aminoácidos importantes para a interacção eficiente com a JNK foram identificadas através de alinhamentos de sequências entre JBD conhecidos. A comparação entre as sequências dos JBD de IB1 [SEQ ID N°: 17], IB2 [SEQ ID N°: 18], c-Jun [SEQ ID N°: 19] e ATF2 [SEQ ID N°: 20] definiu uma sequência de 8 aminoácidos pouco conservada (FIG. 1A). Uma vez que os JBD de IB1 e IB2 são, aproximadamente, 100 vezes tão eficientes quanto c-Jun ou ATF2, na ligação a JNK (Dickens *et al.*, *Science* **277**: 693 (1997)), foi considerado que os resíduos conservados entre IB1 e IB2 devem ser importantes para conferir uma ligação máxima. A comparação entre os JBD de IB1 e IB2 definiu dois blocos de sete e três aminoácidos, que são altamente conservados, entre as duas sequências. Estes dois blocos estão contidos no interior de uma sequência peptídica com 23 aminoácidos em IB1 [SEQ ID N°: 1] e 21 aminoácidos em IB2 [SEQ ID N°: 2]. Estas sequências são mostradas na FIG. 1B, os tracejados na sequência IB2 indicam um espaço na sequência, de forma a alinhar os resíduos conservados.

Os péptidos inibidores da JNK (JNKI) da presente invenção foram obtidos pela ligação do motivo de ligação à JNK, com 20 aminoácidos, de JIP-1/IB1, aqui referido como JBD<sub>20</sub>, a uma proteína de transporte, tal como, por exemplo, a sequência transportadora HIV-TAT<sub>48-57</sub>, com 10 aminoácidos.

## **Exemplo 2: Preparação de Proteínas de Fusão Inibidoras da JNK**

Foram sintetizadas proteínas de fusão do inibidor da JNK, por ligação covalente da extremidade do terminal C de JBD<sub>23</sub> ou da sequência com 21 aminoácidos derivada do JBD de IB2 (JBD<sub>21</sub>) ou da extremidade do terminal C da sequência de aminoácidos JBD<sub>20</sub>, a um péptido transportador do terminal N com 10 aminoácido de comprimento, derivado de HIV-TAT<sub>48-57</sub> (Vives et al., *J. Biol. Chem.* **272**: 16010 (1997)), através de um espaçador consistindo em dois resíduos de prolina. Este espaçador foi utilizado para permitir a flexibilidade máxima e prevenir modificações estruturais secundárias não pretendidas. Como mostrado na FIG. IC estas preparações foram designadas, respectivamente, L-TAT [SEQ ID N°: 7], L-TAT-IB1 [SEQ ID N°: 11], L-TAT-IB2 [SEQ ID N°: 12] e L-TAT-JNKI1 [SEQ ID N°: 21]. Foram, também, sintetizados péptidos de fusão com a TAT constituída, unicamente, por péptidos D retro-inversos e foram designados, respectivamente, D-TAT [SEQ ID N°: 8], D-TAT-IB1 [SEQ ID N°: 14] e D-TAT-JNKI1 [SEQ ID N°: 22]. Todos os péptidos D e L foram produzidos por síntese F-mock normal e foram, adicionalmente, analisados por Espectrometria de Massa. Estes foram, finalmente, purificados por HPLC. Para determinar os efeitos do espaçador de prolina, foram produzidos dois tipos de péptidos TAT, um com e um sem duas prolinas. A adição das duas prolinas não pareceu

modificar a entrada ou localização do péptido TAT no interior das células.

Na FIG. 2 são apresentados péptidos genéricos, apresentando os resíduos de aminoácido conservados. Um "X" indica um qualquer aminoácido. O número de X num determinado péptido não está limitado ao representado e pode variar (*i. e.*, X pode representar qualquer número de resíduos de aminoácido, incluindo zero). Ver acima, para uma descrição mais detalhada das sequências genéricas.

### **Exemplo 3: Inibição da Morte de Células $\beta$ por JBD<sub>23</sub>**

Seguidamente, foram estudados os efeitos da sequência do JBD de IB1, com 23 a.a. de comprimento, sobre as actividades biológicas da JNK. A sequência com 23 a.a. foi ligada ao terminal N da Proteína Verde Fluorescente (construção GFP-JBD<sub>23</sub>) e foi avaliado o efeito desta construção sobre a apoptose de células  $\beta$  pancreáticas, induzida pela IL-1 $\beta$ . Ver a FIG. 3. Este modo de apoptose demonstrou, anteriormente, ser bloqueado por transfecção com JBD<sub>1-280</sub>, enquanto que os inibidores específicos de ERK1/2 ou p38 não protegeram. Ver Ammendrup *et al.*, *supra*.

Foram sintetizados oligonucleótidos correspondendo à sequência com 23 aminoácidos (JBD<sub>23</sub>; FIG. 1B) e uma sequência com mutação nas regiões totalmente conservadas (JBD<sub>23mut</sub>) foi inserida direccionalmente nos locais EcoRI e SalI do vector pEGFP-N1 codificando a Proteína Verde Fluorescente (GFP) (de Clontech). Foram cultivadas células  $\beta$ TC-3 produtoras de insulina, em meio RPMI 1640, suplementado com Soro de Vitelo Fetal a 10%, Estreptomicina 100  $\mu$ g/mL, Penicilina 100 unidades/mL e Glutamina

2 mM. Foram transfectadas células  $\beta$ TC-3 produtoras de insulina com os vectores indicados e foi adicionada IL-1  $\beta$  (10 ng/mL) ao meio de cultura celular. Foi contado o número de células apoptóticas às 48 horas após a adição de IL-1 $\beta$ , utilizando um microscópio de fluorescência invertido. As células apoptóticas foram discriminadas das células normais pela característica de “formação de bolhas” do citoplasma e foram contadas ao fim de dois dias.

Como indicado na FIG. 3, a GFP é o vector de expressão de Proteína Verde Fluorescente utilizado como um controlo; JBD23 é o vector expressando uma GFP quimérica ligada à sequência com 23 a.a. do JBD de IB1; JBD23Mut é o mesmo vector que GFP-JBD23, mas com um JBD com mutações em quatro resíduos conservados, mostrados na FIG. 1B; e JBD280 é o vector de GFP ligado ao JBD completo (a.a. 1-280). A construção expressando GFP-JBD<sub>23</sub> preveniu a apoptose de células  $\beta$  pancreáticas induzida pela IL-1 $\beta$ , tão eficientemente quanto o JBD<sub>1-280</sub> completo (FIG. 3, JBD23/IL-1, em comparação com JBD280/IL-1). As sequências com mutações nos resíduos IB1 totalmente conservados, como controlos adicionais, tinham reduzido significativamente a capacidade para prevenir a apoptose (FIG. 3, JBD23Mut/IL-1).

#### **Exemplo 4: Importação Celular Dos Péptidos TAT-IB1 E TAT-IB2**

Foi avaliada a capacidade de entrar nas células das formas enantioméricas L e D dos péptidos TAT, TAT-IB1 e TAT-IB2 (“péptidos TAT-IB”).

Os péptidos L-TAT, D-TAT, L-TAT-IB1, L-TAT-IB2 e D-TAT-IB1 [respectivamente, as SEQ ID N°: 7, 8, 11, 12 e 14] foram marcados pela adição de um resíduo de glicina conjugado com fluoresceína no terminal N. Foram adicionados péptidos marcados (1  $\mu$ M) a culturas de células  $\beta$ TC-3, as quais foram mantidas como descrito no Exemplo 3. Em tempos predeterminados, as células foram lavadas com PBS e fixas durante cinco minutos em metanol-acetona gelada (1:1), antes de serem examinadas sob um microscópio de fluorescência. Foi utilizada BSA marcada com fluoresceína (1  $\mu$ M, 12 moles/mole BSA) como um controlo. Os resultados demonstraram que a totalidade dos péptidos acima marcados com fluoresceína entraram eficiente e rapidamente (menos de cinco minutos) nas células, quando adicionados ao meio de cultura. Pelo contrário, a albumina de soro bovino marcada com fluoresceína (1  $\mu$ M de BSA, 12 moles fluoresceína/mole BSA) não entrou nas células.

Um estudo da evolução ao longo do tempo indicou que a intensidade do sinal fluorescente para os péptidos L-enantioméricos diminuiu em 70%, após um período de 24 horas. Às 48 horas estava presente pouco ou nenhum sinal. Pelo contrário, D-TAT e D-TAT-EB1 foram extremamente estáveis dentro das células. Os sinais fluorescentes destes péptidos D retro-inversos estavam ainda muito fortes, após 1 semana e o sinal estava, apenas, ligeiramente diminuído, 2 semanas após o tratamento.

### **Exemplo 5: Inibição *In Vitro* Da Fosforilação De c-Jun, ATF2 e Elk1**

Foram investigados os efeitos dos péptidos sobre a fosforilação mediada por JNK dos seus factores de transcrição alvo, *in vitro*. Foram produzidas JNK1, JNK2 e JNK3, recombinantes e não-activadas, utilizando um kit de lisado de reticulócito de coelho TRANSCRIPTION AND TRANSLATION (Promega) e utilizadas em ensaios de cinase em fase sólida, com c-Jun, ATF2 e Elk1, quer, isolados, quer fundidos com glutathione-S-transferase (GST), como substratos. Foram realizados estudos de resposta à dose, em que foram misturados péptidos L-TAT, L-TAT-IB1 ou L-TAT-IB2 (0-25  $\mu$ M) com as cinases recombinantes JNK1, JNK2 ou JNK3, em tampão de reacção (Tris-acetato 20 mM, EGTA 1 mM, p-nitrofenil-fosfato (pNPP) 10 mM, pirofosfato de sódio 5 mM, p-glicerofosfato 10 mM, ditiotreitól 1 mM), durante 20 minutos. As reacções da cinase foram, então, iniciadas pela adição de  $\text{MgCl}_2$  10 mM e 5  $\mu$ Ci de  $^{33}\text{P}$ - $\gamma$ -dATP e 1  $\mu$ g de qualquer um de GST-Jun (a.a. 1-89), GST-ATF2 (a.a. 1-96) ou GST-ELK1 (a.a. 307-428). As proteínas GST de fusão foram adquiridas de Stratagene (La Jolla, CA). Foram, também, adicionados dez  $\mu$ L de esferas de glutathione-agarose à mistura. Os produtos de reacção foram, então, separados por SDS-PAGE num gel de poliacrilamida desnaturante a 10%. Os géis foram secos e foram, subquentemente, expostos a películas de raios X (Kodak). Foi observada a inibição quase completa da fosforilação de c-Jun, ATF2 e Elk1 por JNK em doses do péptido TAT-IB tão baixas quanto 2,5  $\mu$ M. No entanto, uma excepção significativa foi a ausência de inibição da fosforilação JNK3 de Elk1, por TAT-IB. Globalmente, o péptido TAT-IB1 pareceu ligeiramente superior a TAT-IB2, na inibição da fosforilação da família das JNK dos seus factores de transcrição alvo. (Ver, FIG. 4A).

Foi analisada a capacidade dos péptidos D-TAT, D-TAT-IB1 e L-TAT-IB1 (estudo de dosagem de 0-250  $\mu$ M) para inibirem a fosforilação de GST-Jun (a.a. 1-73) por JNK1, JNK2 e JNK3 recombinantes, como descrito acima. Globalmente, o péptido D-TAT-IB1 reduziu a fosforilação de c-Jun mediada por JNK, mas em níveis, aproximadamente, 10-20 vezes menos eficientemente do que L-TAT-IB1. (Ver, FIG. 4B).

#### **Exemplo 6: Inibição da Fosforilação de c-Jun por JNK Activadas**

Foram avaliados os efeitos dos péptidos L-TAT, L-TAT-IB1 ou L-TAT-IB2 sobre JNK activadas, por estímulos de stress, utilizando GST-Jun para anular as JNK de células HeLa irradiadas com luz UV ou células  $\beta$ TC tratadas com IL-1 $\beta$ . As células  $\beta$ TC foram cultivadas como descrito acima. As células HeLa foram cultivadas em meio DMEM suplementado com Soro de Vitelo Fetal a 10%, Estreptomicina 100  $\mu$ g/mL, Penicilina 100 unidades/mL e Glutamina 2 mM. As células  $\beta$ TC foram activadas com IL-1 $\beta$ , como descrito acima, uma hora antes de serem utilizadas na preparação de extracto celular, enquanto que as células HeLa foram activadas por luz UV (20 J/m<sup>2</sup>). Foram preparados extractos celulares a partir do controlo, de células HeLa irradiadas com luz UV e de células  $\beta$ TC-3 tratadas com IL-1 $\beta$ , por raspagem das culturas celulares em tampão de lise (Tris-acetato 20 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 a 1%, p-nitrofenil-fosfato 10 mM, pirofosfato de sódio 5 mM,  $\beta$ -glicerofosfato 10 mM, ditiotrietiol 1 mM). Os detritos foram removidos por centrifugação, durante cinco minutos, a 15000 rpm, num rotor Beckman SS-34. Foram incubados com  $\mu$ g de extractos, durante uma hora, à temperatura



ambiente, com uma  $\mu\text{g}$  de GST-Jun (aminoácidos 1-89) e 10  $\mu\text{L}$  de esferas de glutathiona-agarose (Sigma). Após quatro lavagens com tampão de raspagem, as esferas foram ressuspensas no mesmo tampão suplementado com os péptidos L-TAT, L-TAT-IB1 ou L-TAT-IB2 (25  $\mu\text{M}$ ), durante 20 minutos. Foram, então, iniciadas reacções de cinase, pela adição de  $\text{MgCl}_2$  10 mM e 5  $\mu\text{Ci}$  de  $^{33}\text{P}$ - $\gamma$ -dATP e incubadas durante 30 minutos a 30 °C. Os produtos de reacção foram, então, separados por SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida desnaturante, a 10%. Os géis foram secos e, subsequentemente, expostos a películas de raios X (Kodak). Os péptidos TAT-IB preveniram, eficientemente, a fosforilação de c-Jun por JNK activadas, nestas experiências. (Ver, FIG. 6).

#### **Exemplo 7: Inibição *In vivo* da Fosforilação de c-Jun por Péptidos TAT-IB**

Para determinar se os péptidos permeáveis em células podem bloquear a sinalização JNK *in vivo*, os requerentes utilizaram um sistema GAL4 heterólogo. Foram co-transfectadas células HeLa, cultivadas como descrito acima, com o vector repórter 5xGAL-LUC, em conjunto com a construção de expressão GAL-jun (Stratagene), compreendendo o domínio de activação de c-Jun (aminoácidos 1-89) ligado ao domínio GAL4 de ligação ao ADN. A activação da JNK foi realizada pela co-transfecção de vectores expressando as cinases MKK4 e MKK7, directamente a montante (Ver, Whitmarsh *et al.*, *Science* **285**: 1573 (1999)). Resumidamente, foram transfectadas  $3 \times 10^5$  células com os plasmídeos, em placas de 3,5 cm, utilizando DOTAP (Boehringer Mannheim), seguindo as instruções do fabricante. Para experiências envolvendo GAL-jun, foram transfectadas 20 ng do plasmídeo com 1  $\mu\text{g}$  do plasmídeo repórter pFR-Luc (Stratagene) e 0,5  $\mu\text{g}$  de qualquer um dos plasmídeos

expressando MKK4 ou MKK7. Três horas após a transfecção, os meios celulares foram substituídos e foram adicionados os péptidos TAT, TAT-IB1 e TAT-IB2 (1  $\mu$ M). Foram medidas as actividades da luciferase, 16 horas mais tarde, utilizando o "Dual Reporter System" da Promega, após a normalização do conteúdo em proteína. Como mostrado na FIG. 5, a adição de ambos os péptidos TAT-IB1 e TAT-IB2 bloqueou activação de c-Jun, após a activação da JNK mediada por MKK4 e MKK7. Dado que as células HeLa expressam ambas as isoformas JNK1 e JNK2, mas não a JNK3, os requerentes transfectaram células com JNK3. Novamente, os dois péptidos TAT-IB inibiram a activação de c-Jun mediada pela JNK2.

#### **Exemplo 8: Inibição da Morte de Células $\beta$ Pancreáticas Induzida pela IL-1 $\beta$ , por Péptidos TAT-IB**

Os requerentes investigaram os efeitos dos péptidos L-TAT-IB na promoção de apoptose de células  $\beta$  pancreáticas, desencadeada por IL-1  $\beta$ . Foram incubadas culturas de células  $\beta$ TC-3, durante 30 minutos, com 1  $\mu$ M de qualquer um dos péptidos L-TAT-IB1 ou L-TAT-IB2, seguida por 10 ng/mL de IL-1 $\beta$ . Foi realizado uma segunda adição de péptido (1  $\mu$ M), após 24 horas. As células apoptóticas foram contadas após dois dias de incubação com IL-1  $\beta$ , utilizando coloração nuclear com Iodeto de Propídio (as células coradas de vermelho são células mortas) e Hoechst 33342 (as células coradas de azul são células com a membrana plasmática intacta). Como mostrado na FIG. 5, a adição dos péptidos TAT-IB inibiu a apoptose de células  $\beta$ TC-3, cultivadas na presença de IL-1 $\beta$ , induzida pela IL-1  $\beta$ , durante dois dias.

Foi examinada a inibição a longo prazo de morte celular induzida pela IL-1 $\beta$ , por tratamento de células  $\beta$ TC-3, como descrito acima, excepto por a incubação das células com os péptidos e IL-1 $\beta$  ter sido mantida durante 12 dias. Foram adicionados péptidos adicionais (1  $\mu$ M), em cada dia e foi adicionada IL-1 $\beta$  adicional (10 ng/mL), cada 2 dias. O péptido TAT IB1 confere uma protecção significativa contra a apoptose, nestas condições. No seu conjunto, estas experiências estabelecem que os péptidos TAT-IB são moléculas biologicamente activas, capazes de prevenir os efeitos da sinalização da JNK sobre o destino celular.

#### **Exemplo 9: Síntese de Péptido retro-inverso totalmente-D**

Os péptidos da invenção podem ser péptidos de aminoácidos totalmente-D sintetizados em reverso, para prevenir a proteólise natural (*i. e.*, péptidos retro-inversos totalmente-D). Um péptido retro-inverso totalmente-D da invenção irá proporcionar um péptido com propriedades funcionais semelhantes às do péptido nativo, em que os grupos laterais dos aminoácidos componentes irão corresponder ao alinhamento do péptido nativo, mas que irão conservar um estrutura base resistente a proteases.

Os péptidos retro-inversos da invenção são análogos sintetizados utilizando D-aminoácidos, por ligação dos aminoácidos numa cadeia peptídica, de forma a que a sequência de aminoácidos no análogo peptídico retro-inverso seja, exactamente, oposta à da do péptido seleccionado, a qual serve do modelo. Para ilustrar, se a proteína TAT de ocorrência natural (formada pelos L-aminoácidos) tiver a sequência GRKKRRQRRR [SEQ ID N°: 7], o análogo peptídico retro-inverso

deste péptido (formado por D-aminoácidos) terá a sequência RRRQRRKKRG [SEQ ID N°: 8]. São conhecidos na técnica processos para sintetizar uma cadeia de D-aminoácidos, para formar os péptidos retro-inversos. Ver, e. g., Jameson et al., *Nature*, **368**, 744-746 (1994); Brady et al., *Nature*, **368**, 692-693 (1994)); Guichard et al., *J. Med. Chem.* **39**, 2030-2039 (1996). Especificamente, os péptidos retro foram produzidos por síntese de F-mock normal e foram, adicionalmente, analisados por Espectrometria de Massa. Estes foram, finalmente, purificados por HPLC.

Uma vez que um problema inerente aos péptidos nativos é a degradação por proteases naturais e imunogenicidade inerente, os compostos heterobivalentes ou heteromultivalentes desta invenção serão preparados, de forma a incluir o "isómero retro-inverso" do péptido pretendido. A protecção do péptido contra a proteólise natural deve, consequentemente, aumentar a eficácia do composto heterobivalente ou heteromultivalente específico, tanto prolongando meia-vida, como reduzindo a extensão da resposta imunitária direccionada para destruir activamente os péptidos.

#### **Exemplo 10: Actividade biológica a longo prazo de todos os péptidos IB retro-inversos totalmente-D**

É prevista actividade biológica a longo prazo para o heteroconjugado peptídico contendo D-TAT-IB retro-inverso, quando comparada com o análogo de L-aminoácidos nativo, devido à protecção do péptido D-TAT-IB da degradação por proteases nativas, como mostrado no Exemplo 5.

Foi analisada a inibição da morte de células  $\beta$  pancreáticas induzida pela IL-1 $\beta$ , pelo péptido D-TAT-IB1. Como mostrado na FIG. 10, foram incubadas células  $\beta$ TC-3, como descrito acima, durante 30 minutos, com uma adição única dos péptidos indicados (1  $\mu$ M), seguidamente, foi adicionada IL-1  $\beta$  (10 ng/mL). Foram, então, contadas as células apoptóticas, após dois dias de incubação com IL-1 $\beta$ , pela utilização de coloração nuclear com Iodeto de Propídio e Hoechst 33342. Foi contado um mínimo de 1000 células para cada experiência. É indicado o Erro Padrão das Médias (SEM), n=5. O péptido D-TAT-IB1 diminuiu a apoptose induzida pela IL-1 numa extensão semelhante à dos péptidos L-TAT-IB (comparar as FIG. 5 e FIG. 10).

Foi, também, analisada a inibição a longo prazo da morte celular induzida pela IL-1 $\beta$ , pelo péptido D-TAT-IB1. Foram incubadas células  $\beta$ TC-3, como acima, durante 30 minutos, com uma adição única dos péptidos indicados (1  $\mu$ M), seguidamente, foi adicionada IL-1 $\beta$  (10 ng/mL), seguida pela adição de citocina, cada dois dias. Foram, então, contadas as células apoptóticas, após 15 dias de incubação com IL-1 $\beta$ , pela utilização de coloração nuclear com Iodeto de Propídio e Hoechst 33342. Verifica-se que uma adição única do péptido L-TAT-IB1 não confere protecção a longo prazo. Foi contado um mínimo de 1000 células para cada experiência. É indicado o Erro Padrão das Médias (SEM), n=5. Os resultados são mostrados na FIG. 9. O D-TAT-IB1 foi capaz de conferir protecção a longo prazo (15 dias), mas não L-TAT-IB1.

### **Exemplo 11: Inibição da Morte de Células $\beta$ Pancreáticas Induzida por Irradiação, por Péptidos TAT-IB**

A JNK é, também, activada por radiação ionizante. Para determinar se os péptidos TAT-IB irão proporcionar protecção contra danos da JNK induzidos por radiação, foram irradiadas células "WiDr" (30 Gy) na presença ou ausência de péptidos D-TAT, L-TAT-IB1 ou D-TAT-IB1 (1  $\mu$ M adicionado 30 minutos antes da irradiação), como indicado na FIG. 10. As células de controlo (CTRL) não foram irradiadas. As células foram analisadas após 48 horas, utilizando coloração com PI e Hoechst 33342, como descrito acima. N=3, SEM estão indicados. Os péptidos L-TAT-IB1 e D-TAT-IB1 foram ambos capazes de prevenir a apoptose induzida pela irradiação, nesta linha celular de cancro do colón humano.

### **Exemplo 12: Radioprotecção contra Radiação Ionizante por Péptidos TAT-IB**

Foram irradiados murganhos C57 B1/6 (2 a 3 meses) com um raio R Phillips RT 250, numa proporção de dose de 0,74 Gy/min (17 mA, filtro Cu com 0,5 mm), para determinar os efeitos radioprotectores dos péptidos TAT-IB. Os animais foram injectados i. p. com qualquer um dos péptidos TAT, L-TAT-IB1 e D-TAT-IB1 (30  $\mu$ L de uma solução de 1 mM), trinta minutos antes da irradiação. Resumidamente, os murganhos foram irradiados como se segue: os murganhos foram colocados em pequenas caixas de plástico com a cabeça situada fora da caixa. Os animais foram colocados de costas sob o irradiador e o seu pescoço foi fixo num pequeno túnel de plástico, para manter a sua cabeça numa localização correcta. O corpo foi protegido com chumbo. Antes da irradiação os murganhos foram mantidos com ração para murganhos

normal, no entanto, após a irradiação, os murganhos foram alimentados com uma comida semi-líquida, que foi renovada todos os dias.

Foi, então, classificada a reacção da mucosa do lábio, por 2 observadores independentes, de acordo com o sistema de classificação desenvolvido por Parkins *et al.*, (Parkins *et al.*, *Radiotherapy & Oncology*, **1**: 165-173, 1983), em que foi quantificado o estado do eritema, assim como a presença de edema, descamação e exudação. Adicionalmente, os animais foram pesados antes de cada registo do estado de eritema/edema.

A FIG. 12A: ilustrou peso dos murganhos após irradiação. Os valores referem-se ao peso inicial dos murganhos que foi estabelecido em 100. CTRL: murganhos de controlo injectados com 30 µL de uma solução salina. N = 2 para cada um dos valores referidos, são indicados os S.D. Os valores de x são dias.

A FIG. 12B é ilustrativa da classificação do eritema/edema após a irradiação. Foi quantificado o estado de edema e de eritema do lábio ventral, dos mesmos murganhos que na FIG. 12A. N=2 para cada valor referido. Os valores de x são dias.

Os resultados destas experiências indicam que os Péptidos TAT-IB podem proteger contra a perda de peso e eritema/edema associados à radiação ionizante.

**Exemplo 13: Supressão de Factores de Transcrição da JNK por péptidos L-TAT-IB1**

Foram realizados ensaios de retardação em gel com uma sonda (5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3') duplamente marcada com um AP-1. Os extractos nucleares celulares de HeLa foram ou não tratados durante uma hora com TNF- $\alpha$  5 ng/mL, como indicado. Foram adicionados os péptidos TAT e L-TAT-IB1, 30 minutos antes do TNF- $\alpha$ . É mostrada, apenas, a parte do gel com o complexo AP-1 ADN específico (como demonstrado por experiências de competição com competidores específicos e não-específicos não marcados). Os péptidos L-TAT-IB1 reduzem a formação do complexo de ligação AP-1 ADN, na presença do TNF- $\alpha$ . (Ver, FIG. 11).

**Exemplo 14: Protecção contra a perda de audição, induzida por ruído, por D-TAT-IB**

Foi injectada uma solução de D-JNKI (1 uM, 1 uL/h) no ouvido interno direito de uma cobaia, como mostrado na FIG. 13, painel A, enquanto que o ouvido esquerdo foi injectado apenas com soro fisiológico. A cobaia foi, então, exposta a um traumatismo acústico (120 db, 30 minutos) e foi realizado um registo da sensibilidade auditiva, após três dias (FIG. 13, painel B), assim como um exame histológico do ouvido interno (FIG. 13, painel C e D). Como mostrado na FIG. 13, as estruturas ciliadas no ouvido tratado com JNKI são completamente protegidas da destruição induzida pelo ruído, como avaliado por exame histológico, ao contrário do ouvido não-tratado, em que a maior parte das estruturas ciliadas desapareceram. Além disso, a sensibilidade do ouvido tratado com D-JNK1 ao ruído, parece ter sido conservada (FIG. 13, painel B).



**Exemplo 15: Protecção contra a perda de audição, induzida por antibióticos, por péptidos D-TAT-IB**

Foram tratados ouvidos internos de galinhas, com estreptomicina, na presença/ausência de D-JNKI. Foram, então, realizadas experiências de TUNEL para detectar a apoptose (núcleos verdes). Como mostrado na FIG. 14, o D-JNKI protege, totalmente, os ouvidos internos, da apoptose induzida pela estreptomicina. Deste modo, o DJNK-I é útil na prevenção de estados de perda de audição provocados por terapia com antibióticos.

**Exemplo 16: Protecção contra a destruição dos ilhéus pancreáticos, induzida por citocinas pró-inflamatórias, por péptidos D-TAT-IB**

Foram tratadas células de ilhéus pancreáticos com D-JNK1 (1 mM, durante uma hora, antes de serem expostas à interleucina 1B (10 ng/mL). Como mostrado na FIG. 15, os ilhéus tratados com D-JNKI resistem à destruição induzida por IL-1B. Isto indica que o tratamento com D-JNKI auxilia a preservação de ilhéus enxertados.

**Exemplo 17: Aumento da recuperação de células de ilhéus pancreáticos, por péptidos D-TAT-IB**

Foi adicionado D-JNK-I em conjunto com colagenase, durante o isolamento de células dos ilhéus. Isto resultou numa

quantidade aumentada de ilhéu, após 3 dias em cultura, como medido pelo aumento em desidrogenase do lactato. Ver a FIG. 15.

**Exemplo 18: Métodos gerais utilizados no teste dos efeitos dos péptidos JNKI sobre a activação da JNK e a acção relacionada com JNK**

Cultura Neuronal Geral: Foram dissecadas pequenas porções do córtex proveniente de cérebros de filhotes de rato com dois dias de idade e foram incubadas com 200 unidades de papaína, durante 30 minutos, a 34 °C. Seguidamente, os neurónios foram plaqueados numa densidade de, aproximadamente,  $1 \times 10^6$  células/placa, em placas que tinham sido pré-revestidas com poli-D-lisina 100 µg/mL. As células foram cultivadas utilizando um meio de cultura B27/Neurobasal (Life Technologies), suplementado com glutamina 0,5 M, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL.

Ensaio da citotoxicidade da desidrogenase do lactato (LDH): Foi medida a quantidade de LDH libertada no meio de cultura, utilizando o kit de ensaio de citotoxicidade não-radioactivo Citotox 96 (Promega).

Ensaio da anulação de GST-c-Jun e cinase: Foram preparados extractos celulares por raspagem de células em tampão de lise (Tris-acetato 20 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 a 1%, p-nitrofenil-fosfato 10 mM, pirofosfato de sódio 5 mM, β-glicerofosfato 10 mM, ditiotreitól 1 mM). Foram incubadas 25 µg de amostras, durante 1 hora, à temperatura ambiente, com 1 µg de GST-c-Jun (resíduos de aminoácido 1-89) e 10 µL de esferas de glutathiona-agarose (Sigma). As esferas foram lavadas quatro

vezes e, seguidamente, ressuspensas no tampão de lise descrito acima. Foram, então, realizados ensaios de cinase, *in vitro*, utilizando JNK1 $\alpha$ 1 recombinante e 0,5  $\mu$ g de um substrato seleccionado do grupo consistindo em proteínas de fusão com GST (e. g., as proteínas de fusão GST-Jun e GST-Elk1), caseína e histona (Sigma). Foram iniciadas reacções com MgCl<sub>2</sub> 10 mM e ATP 10  $\mu$ M, na presença de 5  $\mu$ Ci de <sup>33</sup>P-ATP e foram incubadas durante 30 minutos, a 30 graus Celsius. Os produtos de reacção foram separados por SDS-PAGE e os géis foram secos e foram, seguidamente, expostos a películas de raios X (Kodak).

Transferências de Western: Foram obtidos extractos de proteína totais por raspagem de células em tampão de lise (descrito acima), separando as proteínas num gel de poliacrilamida de SDS a 12%. As proteínas separadas foram, então, transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Os anticorpos utilizados nas transferências de Western aqui descritas foram obtidos de Alexis.

Separação dos núcleos a partir do citoplasma: Foram lisados neurónios durante 15 minutos, em tampão de lise e as amostras foram, seguidamente, centrifugadas a 300 g, durante 10 minutos, a 4 °C, para isolar núcleos para análise de transferência de Western (ver a FIG. 17B). Os sedimentos nucleares foram reconstituídos em tampão de lise e foram, seguidamente, sonicados.

RT-PCR em Tempo real: Foi realizado RT-PCR em tempo real utilizando iniciadores específicos, num equipamento lightcycler (Roche). Foi utilizada o transcrito de actina de manutenção, para normalizar para a quantidade e a qualidade dos ARN que

foram extraídos pelo método de Chomczynski. Ver Chomczynski et al., *Anal. Biochem.*, **162**:156-59 (1987). As sequências dos iniciadores utilizados foram as seguintes:

**c-Fos:** Directa: 5'-GCTGACAGATACACTCCAAG-3'  
Inversa: 5'-CCTAGATGATGCCGGAACA-3'

**Actina:** Directa: 5'-AACGGCTCCGGCATGTGCAA-3'  
Inversa: 5'-ATTGTAGAAGGTGTGGTGCCA-5'

Imuno-histoquímica P-c-Jun: P-c-Jun, como aqui utilizado refere-se a formas fosforiladas de c-Jun. A P-c-Jun foi visada por um anticorpo policlonal de coelho (500 x em PBS) (Cell Signaling Technology). O complexo de anticorpo resultante foi visualizado com 3,3-diaminobenzidina como substrato.

Isquemia transiente em murganhos adultos: Foi provocada isquemia, introduzindo um filamento na artéria carótida interna, a partir da artéria carótida comum e fazendo avançar o filamento para o interior do círculo arterial, obstruindo, deste modo, a artéria cerebral média, utilizando murganhos ICR-CD1 do sexo masculino (com, aproximadamente, 6 semanas de idade e pesando na gama de, cerca de, 18 a 37 g) (Harlan, Inc.). Ver, e. g., Huang et al., *Science*, **265**:1883-85 (1994); Hara et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **94**:2007-12 (1997); cada um destes é por este meio incorporado por referência na sua totalidade. O fluxo sanguíneo cerebral regional foi medido por fluxometria de Doppler com laser, com uma sonda fixa no crânio ao longo da isquemia e até 10 minutos após a reperfusão. Foi medida a temperatura rectal e mantida a 37 °C. Os animais foram sacrificados 48 horas após a reperfusão. Foram contornadas

secções seriadas de criostato com 20 µm de espessura, utilizando um sistema computador-microscópio, equipado com o programa Neurolucida (Microbrightfield, Inc.) e foram calculados os volumes da área isquémica e do total do cérebro (cego), com o programa Neuroexplorer. Foi medida a pressão sanguínea sistólica e diastólica com um cateter arterial em três murganhos adicionais, desde 10 minutos antes da injeção de D-JNKI1, até 30 minutos após esse momento. Estas medições da pressão sanguínea mostraram que as injeções não afectaram a pressão sanguínea (*i. e.*, alteração de menos de 10%). Foram seguidas as orientações do Swiss Federal Veterinary Office em todas as experiências.

Isquemia focal permanente em ratos jovens (Pl4): Foi obtida a oclusão de artéria cerebral média por electrocoagulação da artéria cerebral média, numa localização fechada em relação à sua origem, na junção com o ramo olfactivo. Os ratos (de Wistar), os quais pesavam na gama de, cerca de, 27-35 g, foram sacrificados 24 horas após a oclusão da artéria cerebral média. Os ratos foram sacrificados utilizando uma dose excessiva de hidrato de cloral e foram perfundidos através do ventrículo esquerdo, com o fixador de Zamboni. Os cérebros foram pós-fixados durante 2 horas, na mesma solução que a utilizada para a perfusão e, seguidamente, os cérebros foram infiltrados, durante a noite, em sacarose a 30%, para crioprotecção. Foram desenhados os contornos de cada área isquémica (corados) com um sistema computador-microscópio. Foi traçada a área da lesão isquémica e da totalidade do cérebro, a partir de secções seriadas de criostato com 50 µm, coradas com violeta de cresilo, utilizando o programa Neurolucida e foram calculados os volumes de cada um, utilizando o programa Neuroexplorer, como descrito acima.

Estatística: Os dados de ambos os modelos de isquemia (*i. e.*, transiente e permanente) foram transformados logaritmicamente, para satisfazer o critério Gaussiano. Os dados foram analisados com uma ANOVA global ( $p < 0,0001$  para ambos os modelos), seguida por testes t unicaudais não-emparelhados.

#### **Exemplo 19: Sensibilidade e especificidade dos péptidos JNKI contra a acção da JNK**

Os péptidos JNKI1 utilizados nestas experiências são direccionados para o bloqueio do acesso da JNK a c-Jun e a outros substratos, através de um mecanismo competitivo directo. Ver, *e. g.*, Bonny *et al.*, *Diabetes*, **50**:77-82 (2001); Barr *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **277**:10987-97 (2002), cada um destes é, por este meio, incorporado por referência na sua totalidade.

Foi testado o efeito inibidor de L-JNKI1 e D-JNKI1 sobre a activação e a acção da JNK, utilizando os ensaios da cinase, como descrito acima, no Exemplo 18. Os resultados destas experiências são mostrados nas FIG. 16A-16C. O efeito inibidor de L-JNKI1 e D-JNKI1 sobre a activação e a acção da JNK é demonstrado pela sua capacidade para prevenir a fosforilação *in vitro* dos alvos conhecidos da JNK, c-Jun e Elk1, utilizando JNK1 $\alpha$ 1. (Ver a FIG. 16A). Os termos "P-Jun" e "P-Elk1", como aqui utilizados, referem-se, respectivamente, às formas radiomarcadas (*i. e.*, fosforiladas com  $^{33}\text{P}$ -ATP) dos substratos GST-Jun e GST-Elk1. A FIG. 16B mostra o efeito inibidor da sequência mínima inibidora da JNK com 20 aminoácido, de JIP-IB1 (forma L de JBD<sub>20</sub> (SEQ ID N°: 21)) em experiências de resposta à dose, utilizando condições semelhantes às utilizadas para testar

o efeito inibidor de L-JNKI1 e D-JNKI1 e utilizando quantidades decrescente de L-JBD<sub>20</sub>. A FIG. 16B ilustra que o péptido L-JBD<sub>20</sub> (SEQ ID N°: 21) isolado (*i. e.*, sem a sequência TAT) pode inibir a acção da JNK. JBD<sub>20</sub> demonstrou, também, inibir outros alvos da JNK, incluindo ATF2, IRS-1, MADD, bcl-xl. Em cada um destes casos, o IC<sub>50</sub> foi de, cerca de 1 µM (dados não apresentados). A sequência TAT não estava ligada a JBD<sub>20</sub> nestas experiências, porque, a uma concentração superior a 50 µM, a sequência TAT induz uma precipitação não-específica das proteínas nos extractos. Abaixo de 50 µM, a TAT não influencia as propriedades inibidoras dos péptidos JBD<sub>20</sub>.

Foram realizadas experiências *in vitro*, para determinar a especificidade dos péptidos JNKI no bloqueio da activação da JNK. Foi testado, em particular, o efeito destes péptidos sobre a actividade de 40 cinases diferentes (péptidos 10 µM, ATP 10 µM) para os seus respectivos substratos. Em <http://www.upstate.com/img/pdf/KinaseProfiler.pdf> pode ser encontrada a lista completa de substratos utilizados nestas experiências. Como esperado, os péptidos JNKI tiveram um efeito sobre as cinases JNKs e MKK4 e MKK7, cuja totalidade contém domínios de ligação a JNK. Os péptidos (tanto as formas D-JNKI1, como L-JNKI1) não conseguiram interferir, absolutamente, com as actividades de todas as outras cinases. Experiências adicionais mostraram que 500 µM dos péptidos JBD<sub>20</sub> não interferiram com a actividade de 6 cinases particulares: ERK2, p38, pKC, p34, caK e pKA (FIG. 16C). Os substratos destas cinases são ERK2:ERK1; p38:ATF2; p34, pKC, pKA:histona; e caK:caseína. Este nível da especificidade está muito acima dos obtidos com outros pequenos inibidores químicos da cinase do terminal N da Jun, demonstrando, deste modo, a selectividade extremamente elevada dos péptidos JNKI da invenção. Para uma discussão de outros

pequenos inibidores químicos da cinase do terminal N da Jun (JNK), ver Bennett *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **98**:13681-86 (2001).

**Exemplo 20: Efeitos dos péptidos JNKI sobre alvos da JNK no interior de neurónios corticais tratados com NMDA**

Foi realizada uma série de experiências, para analisar os efeitos dos péptidos JNKI da invenção sobre alvos da JNK diferentes no interior dos neurónios. Foi estimada a activação da JNK em neurónios corticais tratados com N-metil-D-aspartato (NMDA) em cultura, pela realização de ensaios de cinase em JNK anulada, utilizando GST-c-Jun, utilizando os métodos descritos acima. (Ver *e. g.*, Ko *et al.*, *J. Neurochem.* **71**:1390-1395 (1998); Coffey *et al.*, *J. Neurosci.* **20**:7602-7613 (2000), cada um destes é por este meio incorporado na sua totalidade por referência. Os resultados destas experiências são mostrados nas FIG. 17-18.

A FIG. 17A mostra a actividade da JNK em neurónios não tratados ("0"), após 10 minutos de exposição a NMDA 100  $\mu$ M (10') ou após 30 minutos de exposição a NMDA 100  $\mu$ M. As duas pistas à direita da FIG. 17C demonstram que a activação da JNK foi, essencialmente, inalterada por D-JNKI1. O aumento da actividade da JNK pareceu máximo (*i. e.*, 2,2 vezes), após 30 minutos de tratamento com NMDA (FIG. 17A). Este aumento na actividade da JNK traduziu-se numa fosforilação elevada de c-Jun (FIG. 17B). A adição dos péptidos L-JNKI1 e D-JNKI1 penetrantes nas células demonstrou prevenir, completamente, o aumento em P-c-Jun, após 5 horas de exposição a 100  $\mu$ M de NMDA, apesar de um nível normal de activação da JNK. A adição de L-JNKI1 e



D-JNKI1 levou nível de P-c-Jun para baixo, mesmo, do nível de P-c-Jun no controlo.

A transcrição do gene c-fos induzida por NMDA, sob a influência da JNK, através do factor de transcrição Elk1 foi, também, completamente impedida pela adição de L-JNKI e D-JNKI1 (FIG. 17C). Foi quantificada a expressão de c-fos por PCR em tempo real (Lightcycler), utilizando ARN extraído, utilizando os métodos descritos acima no Exemplo 18. Os dados na FIG. 17C são apresentados como a expressão c-fos relativa à actina (n = 4). Para uma descrição da indução da expressão de c-fos através da fosforilação de TCF/Elk-1 mediada por JNK, ver Cavigelli *et al.*, *EMBO J.*, **14**:5957-5964 (1995).

O evolução ao longo do tempo da neurotoxicidade do NMDA e da neuroprotecção por L-JNKI1 e D-JNKI1, assim como por dois péptidos de controlo, TAT-vazia (*i. e.*, a sequência TAT, apenas, sem a sequência JBD<sub>20</sub>) e L-JNKI1<sub>mut</sub> (tendo seis aminoácidos mutados em alanina, como descrito em Bonny *et al.*, *Diabetes* **50**:77-82 (2001). As micrografias da FIG. 18 mostram neurónios corados com Hoechst, às 24 horas após o tratamento. A adição dos péptidos L-JNKI e D-JNKI1 protegeu, completamente, os neurónios contra os efeitos excitotóxicos do NMDA (FIG. 18) ou do cainato (dados não apresentados), enquanto que a adição de péptidos de controlo não teve qualquer efeito neuroprotector. Ambos os péptidos L-JNKI1 e D-JNKI1 demonstraram inibir a morte neuronal, às 12 horas após o tratamento, enquanto que os péptidos TAT-vazios não tiveram qualquer efeito (FIG. 18).

Como verificado na FIG. 18, a forma D dos péptidos penetradores na célula da invenção, *i. e.*, D-JNKI1, foi superior na protecção dos neurónios durante períodos de tempo

prolongados, *i. e.*, 12 horas, 24 horas e 48 horas após exposição a 100  $\mu$ M de NMDA. Estas micrografias indicam que às 24 horas após o tratamento, D-JNKI1 ainda proporcionava neuroprotecção total, dado que as culturas de controlo e as culturas de tratamento com D-JNKI1 e NMDA eram comparáveis. A forma L da JNKI1 deixou de proteger os neurónios às 24 horas após o tratamento, presumivelmente porque as formas L dos péptidos são, de um modo geral, mais susceptíveis à degradação. Os péptidos TAT-vazios não afectaram a morte celular em quaisquer condições. O histograma na FIG. 18 representa o nível de morte neuronal, às 12, 24 e 48 horas após a exposição a 100  $\mu$ M de NMDA, como indicado pela actividade da LDH no meio da placa de Petri. Os valores da absorvência, os quais representam a concentração de LDH, foram convertidos em valores de % de morte neuronal, pela divisão dos valores da absorvência pela absorvência média para a LDH total. A absorvência média para a LDH total foi obtida a partir do meio, mais os neurónios lisados.

#### **Exemplo 21: Distribuição *In Vivo* de péptidos JNKI permeáveis em células**

Para testar a praticabilidade da utilização dos péptidos permeáveis em células em aplicações *in vivo*, foi avaliada a sua capacidade de penetração no cérebro, utilizando L-JNKI1 marcado com FITC e D-JNKI1. Para uma discussão da distribuição *in vivo* de uma proteína biologicamente activa num murgancho, ver Schwarze *et al.*, *Science*, **285**:1569-72 (1999), por este meio incorporado por referência na sua totalidade. Estas experiências mostraram que, tanto L-JNKI1 marcado com FITC, como D-JNKI1 foram capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e de penetrar nos neurónios de murganchos e ratos adultos de várias idades. Tanto

L-JNKI1 marcado com FTTC como D-JNKI1 foram capazes de penetrar nos neurónios no período de 1 hora após a injeção intraperitoneal (dados não apresentados).

### **Exemplo 22: Neuroprotecção pelos péptidos JNKI contra isquemia cerebral transiente e focal permanente**

Num modelo de isquemia ligeira em murganhos, a artéria cerebral média esquerda foi obstruída durante 30 minutos, seguidos por 48 h de reperusão. O grupo de controlo tratado com veículo recebeu uma injeção de, apenas, tampão fosfato salino (PBS). No grupo de controlo tratado com veículo, esta oclusão resultou, sistematicamente, num enfarte grave contendo severamente células picnóticas, as quais foram, predominantemente, encontradas no córtex e no estrato em todos os cérebros e, em 7 dos cérebros, estas células foram, também, encontradas no hipocampo. O volume de enfarte médio foi de  $67,4 \text{ mm}^3$  ( $n = 12$ ), nos indivíduos do grupo de controlo tratados com veículo.

Os indivíduos foram tratados com uma injeção intracerebroventricular (icv) de D-JNKI1 (15,7 ng em 2  $\mu\text{L}$  de PBS), para avaliar a eficácia e a “janela terapêutica” do tratamento (i. e., o período após os danos, durante o qual o tratamento com os péptidos da invenção permanece eficaz). A FIG. 19A mostra secções coradas com violeta de cresilo que mostram exemplos típicos do enfarte resultante (barra, 1 mm). A FIG. 19B representa volumes de enfarte após a injeção icv de D-JNKI1 em tempos diferentes antes (-1 hora) ou, depois, (+3,6 ou 12 horas), após a oclusão da artéria cerebral média. Na FIG. 19B, um asterisco (\*) indica que o resultado é

estatisticamente diferente do controlo (como indicado por um teste de t).

O pré-tratamento 1 hora antes da oclusão da artéria cerebral média, com a injeção icv de D-JNKI1, reduziu, significativamente, o volume de enfarte medido 48 horas após a reperfusão, em 88%, para um volume de 7,8 mm<sup>3</sup>. (FIG. 19A-19B). A administração do péptido D-JNKI1, 3 ou 6 horas após a oclusão da artéria cerebral média, foi, ainda, significativamente protectora, uma vez que o volume de enfarte médio, para indivíduos injectados 3 horas após oclusão, foi reduzido para 5,8 mm<sup>3</sup> (uma redução de 91%, em comparação com animais não tratados) e o volume de enfarte médio, para indivíduos injectados 6 horas após oclusão, foi reduzido para 4,8 mm<sup>3</sup> (uma redução de 93% em comparação com animais não tratados). Pelo contrário, a injeção do péptido D-JNKI1 às 12 horas após a oclusão de artéria cerebral média não foi, significativamente, protectora. A obtenção de isquemia completa, seguida por reperfusão, foi confirmada em todos os animais, pela monitorização do fluxo sanguíneo cerebral regional no território da artéria cerebral média esquerda.

Foram, também, avaliadas as capacidades protectoras de D-JNKI1 contra isquemia focal permanente em ratos jovens (P14). Uma zona isquémica no córtex cerebral de ratos P14, pela realização de uma oclusão permanente da artéria cerebral média, induzindo, deste modo, uma zona de degeneração significativa restrita ao córtex parietotemporal. Dado que os volumes cerebrais nos ratos P14 foram variáveis, as lesões foram expressas como uma percentagem do volume do hemisfério cerebral. D-JNKI1 foi injectado intraperitonealmente numa concentração de 11 mg/kg, a qual corresponde a, aproximadamente, 340 µg. Foi

administrado D-JNKI1, 30 minutos antes da oclusão da artéria cerebral média ou 6 ou 12 horas após a oclusão. Os ratos foram fixos 24 horas após a oclusão. Em cada um destes pontos temporais (*i. e.*, administração a -30 minutos, +6 h ou +12 h), D-JNKI1 causou reduções significativas e estatisticamente significativas do volume de enfarte, em comparação com animais de controlo (FIG. 20A-20B). A administração de D-JNKI1, 30 minutos antes da oclusão, originou uma redução do volume de enfarte de 68%, enquanto que a administração do péptido às 6 e 12 horas após oclusão originou reduções no volume de enfarte, respectivamente, de 78% e 49%.

Foi realizada análise imuno-histoquímica, para determinar a activação do factor de transcrição c-Jun, um alvo principal da JNK, nos cérebros de filhotes de rato com isquemia permanente. A fosforilação de c-Jun foi evidente em muitos neurónios no córtex peri-enfartado (FIG. 5C, barra = 200  $\mu$ M). Pelo contrário, em cérebros tratados com o péptido D-JNKI1, o córtex peri-enfartado foi negativo e foram, apenas, detectados alguns neurónios positivos, no limite da região enfartada.

#### **Exemplo 22: Avaliação comportamental de potenciais efeitos laterais de péptidos JNKI**

Tipicamente, a elevada toxicidade de outros compostos neuroprotectores limitou, significativamente, a sua utilização clínica. (Ver Gladstone *et al.*, *Stroke*, **33**:2123-36 (2002), incorporado por referência na sua totalidade). Foi utilizada a capacidade dos murganhos para se manterem num rotarod rotativo horizontal, como critério para efeitos secundários possíveis para doses diferentes de D-JNKI1 e de uma dose terapêutica de

MK-801 (1 mg/kg, uma dose terapêutica padrão). Foi avaliada, em particular, a função motora dos murganhos, utilizando o teste do rotarod às 3 h, 24 h, 6 dias e 12 dias após injeções, tanto i. p. (11 e 110 mg/kg), como icv de D-JNKI1 (2 µL contendo 15,7 ng ou 157 ng de D-JNKI1). Foi utilizada a injeção i. p. de MK-801 (1 mg/kg), como um composto de controlo, durante este processo de avaliação.

Os murganhos foram treinados no dia antes e na manhã do dia da experiência, de modo a reduzir a variabilidade entre indivíduos. Tanto o treino como as sessões de teste foram idênticos para os murganhos de controlo e injectados. A função motora de cada murganho foi examinada, imediatamente antes da injeção e a 1, 6 e 12 dias após a injeção. Os murganhos foram colocados no rotarod, o qual foi programado para acelerar uniformemente, de 4 para 40 rpm. Foi registada a latência até às quedas de cada murganho testado. Na Tabela 2 são apresentados os resultados desta avaliação, utilizando o método de rotarod como a latência mediana até à queda (medida em segundos).

**TABELA 2: EFEITO DO D-JNKI1 SOBRE A COORDENAÇÃO MOTORA**

Latência Mediana até à queda (segundos)

	DOSE	-1 h	+3 h	1 dia	6 dias	12 dias
<b>PBS</b>	2 µL icv	234	202	238	268	246
<b>MK-801</b>	1 mg/kg i.p.	226	incapaz	174	233	292
<b>D-JNKI1</b>	11 mg/kg i.p.	204	221	372	287	418
	110 mg/kg i.p.	276	266	447	416	325
	15,7 ng icv	210	342	302	345	285

(continuação)					
DOSE	-1 h	+3 h	1 dia	6 dias	12 dias
157 ng icv	260	200	253	338	335
2 µL PBS icv	234	202	238	268	246

Como verificado na Tabela 2, a coordenação motora revelou não ser diminuída com ambas as doses de D-JNKI1, i.p. e icv (*i. e.*, tanto a dose, 2,8 µL/Kg, que conferiu 90% de neuroprotecção, como uma dose 10 vezes mais elevada). Pelo, contrário, MK-801 originou uma diminuição significativa da coordenação motora, dado que os murganhos foram incapazes de permanecer no rotor. (Ver *e. g.*, a Tabela 2; Dawson *et al.*, *Brain Res.* **892**:344:350 (2001) (descrevendo resultados semelhantes para outros neuroprotectores) e uma dose 10 vezes mais elevada de MK-801 matou todos os murganhos. Os efeitos secundários da dose mais baixa de MK-801 revelaram desaparecer, essencialmente, após 24 horas. Aos 6 e 15 dias após o tratamento com D-JNKI1, não foi verificado qualquer sinal de diminuição motora e as classificações no rotarod foram reproduzivelmente melhores do que nos murganhos de controlo.

Lisboa, 29 de Abril de 2014

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Utilização de qualquer um dos péptidos, incluindo a SEQ ID N°: 22 ou sendo a SEQ ID N°: 24 ou dos péptidos apresentando uma identidade de sequência de, pelo menos, 95% com estes péptidos, na preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de um distúrbio neuronal pela inibição da morte celular neuronal num indivíduo, em que o indivíduo está a sofrer ou em risco de desenvolver um distúrbio neuronal e em que o distúrbio neuronal é um distúrbio neurodegenerativo seleccionado de esclerose lateral Amiotrófica, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, epilepsia, esclerose múltipla e doença de Huntington.
2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o péptido é administrado por qualquer uma via de administração seleccionada do grupo consistindo em distribuição intraauricular, intraperitoneal, nasal, intravenosa, oral e emplastro.

Lisboa, 29 de Abril de 2014



## Sequências Peptídicas de Humano, Murganho e Rato

### A.

```

                                ::  **.:
IB2                          : IPSPSVEEPHKHRPTTLRL--TTLGAQDS
IB1                          : PGTGCGDTYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT
c-Jun                        : GAYGYSNPKILKQSMTLNLADPVGNLKPH
ATF2                         : TNEDHLAVHKHKHEMTLKFGPARNSVIV

```

### B.

```

                                : . .***** *          **:
L-IB2                        : EEPHKHRPTTLRL--TTLGAQDS
L-IB1                        : DTYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT
                                . . .

```

### C.

```

L-TAT                        : NH2- GRKKRRQRRR -COOH
L-TAT-IB1                    : NH2- GRKKRRQRRRPPDTYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT -COOH
L-TAT-IB2                    : NH2- GRKKRRQRRRPPEEPHKHRPTTLRLTTLGAQDS -COOH
L-TAT-JBD20                  : NH2- GRKKRRQRRRPPRPRKPTTLNLFQVPRSQDT -COOH

D-TAT                        : NH2- RRRQRRKKRG -COOH
D-TAT-IB1                    : NH2- TDQSRPVQPFLNLTTTPRKPRYTDPPIRRQRRKKRG -COOH
D-TAT- JBD20                  : NH2- TDQSRPVQPFLNLTTTPRKPRPPIRRQRRKKRG -COOH

```

Fig. 1

## Sequências Genéricas de Humano, Murganho e Rato

L-TAT-IB	: NH <sub>2</sub> - XXXXXXXXKKRRQRRXXXXXXXXXXRPTTLXLXXXXXXXXQDS/TX -COOH
L-TAT-JBD <sub>20</sub>	: NH <sub>2</sub> - XXXXXXXXKKRRQRRXXXXXXXXXXRPTTLXLXXXXXXXXQDS/TX -COOH
D-TAT	: NH <sub>2</sub> - XXXRRRQRRKKXXXX -COOH
D-TAT-IB	: NH <sub>2</sub> - XT/SDQXXXXXXXXLXLTPRXXXXXXXXRRRQRRKKXXXXXXXX -COOH
D-TAT- JBD <sub>20</sub>	: NH <sub>2</sub> - XT/SDQXXXXXXXXLXLTPRXXXXXXXXRRRQRRKKXXXXXXXX -COOH

**Fig. 2**

## Efeitos da Construção GFP-JBD<sub>23</sub> sobre a Apoptose das Células $\beta$ de Murganho

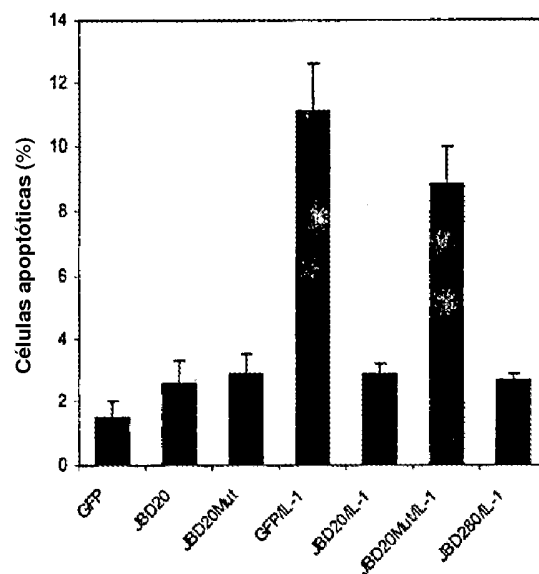


Fig. 3

## Efeitos dos Péptidos TAT-IB sobre a Fosforilação Mediada por JNK

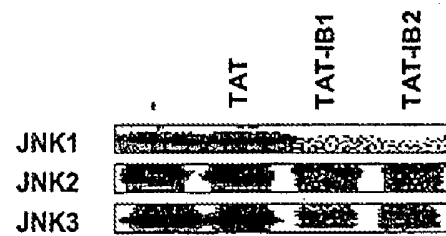


Fig. 4a

Efeitos dos Péptidos TAT-IB sobre a Fosforilação Mediada por JNK

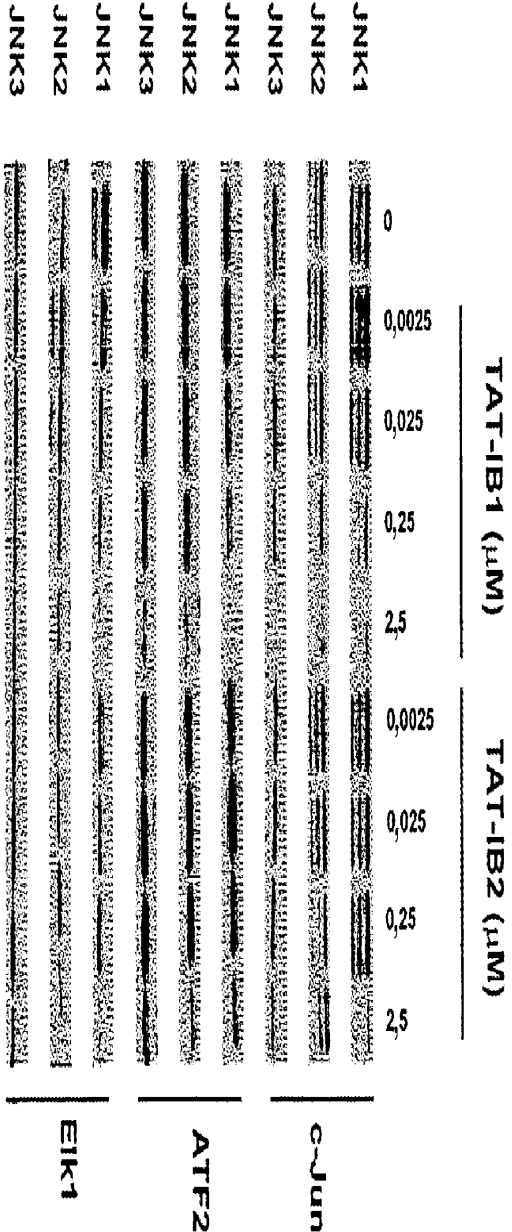


Fig. 4b

## Inibição por L-TAT-IB da Fosforilação por JNK Recombinante

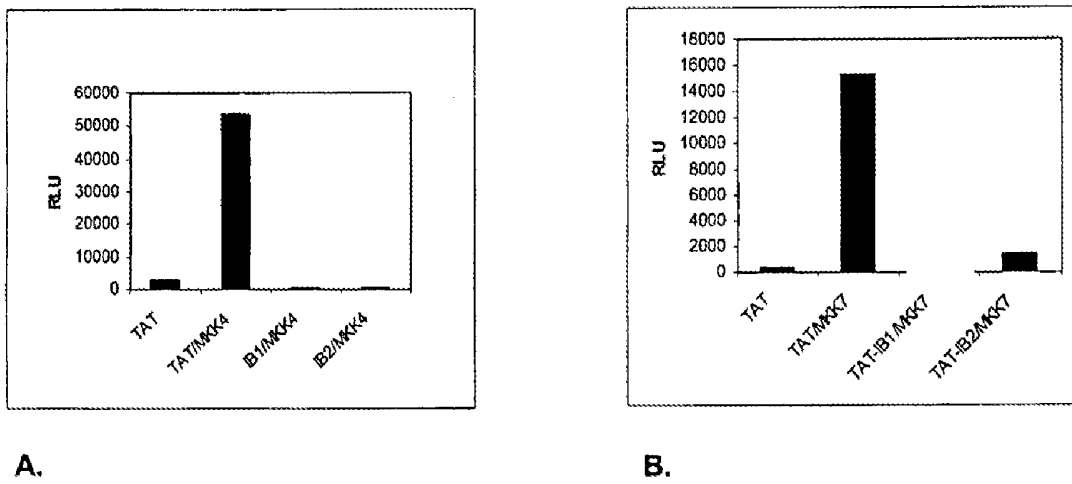


Fig. 5

## Inibição *In Vivo* da Fosforilação de c-Jun por Péptidos

### TAT-IB

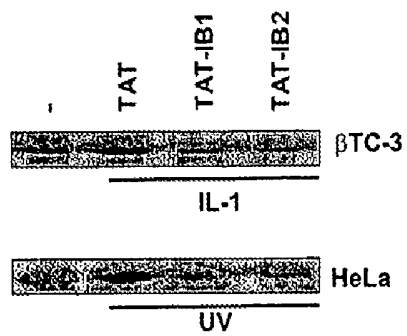
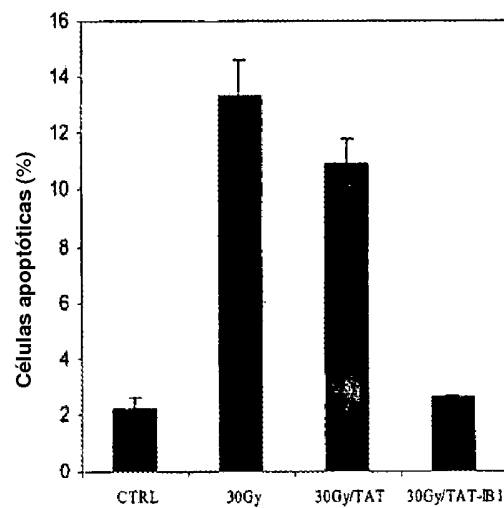


Fig. 6

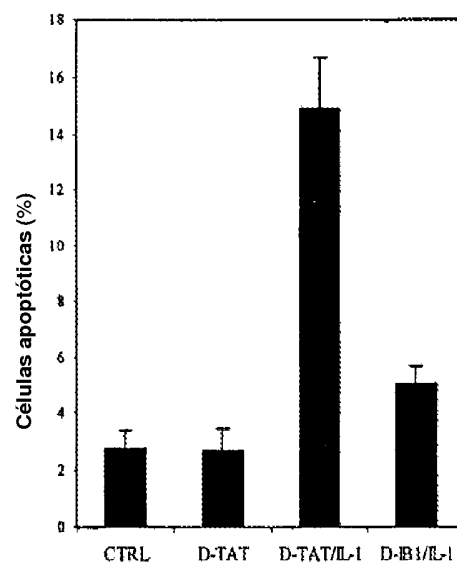
### Inibição da Morte de Células $\beta$ Pancreáticas induzida por IL-1 $\beta$ , por Péptidos TAT-IB



**Fig. 7**

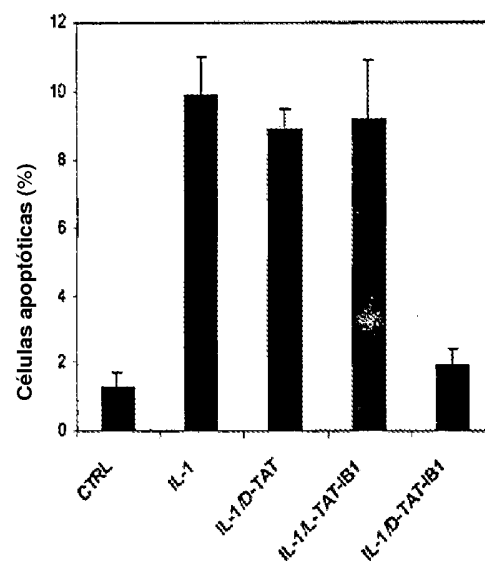


**O péptido D-TAT-IB1 reduz a apoptose induzida por IL1, em células  $\beta$ TC3**



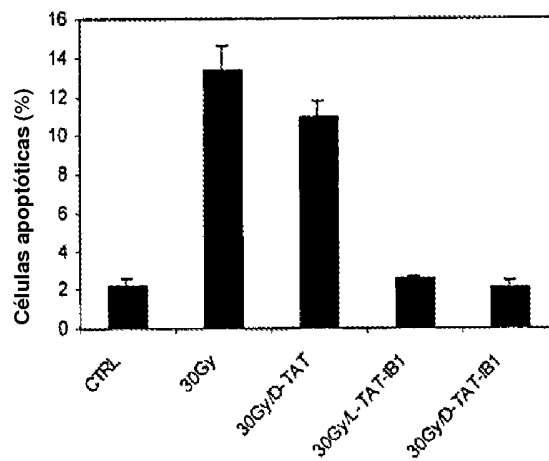
**Fig. 8**

**O péptido D-TAT-IB1 confere protecção a longo prazo (15 dias) contra apoptose induzida por IL1, em células  $\beta$ TC-3**



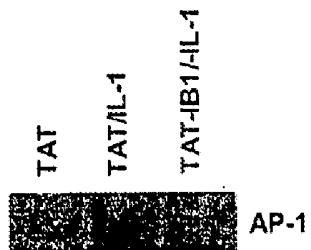
**Fig. 9**

**Os péptidos D-TAT-IB1 e L-TAT-IB1 previnem a apoptose induzida por IR numa linha de células do cancro do cólon humano**



**Fig. 10**

## Supressão do Factor de Transcrição da JNK por Péptidos L-TAT-IB



**Fig. 11**

## Radioprotecção contra a Radiação Ionizante por Péptidos TAT-IB1

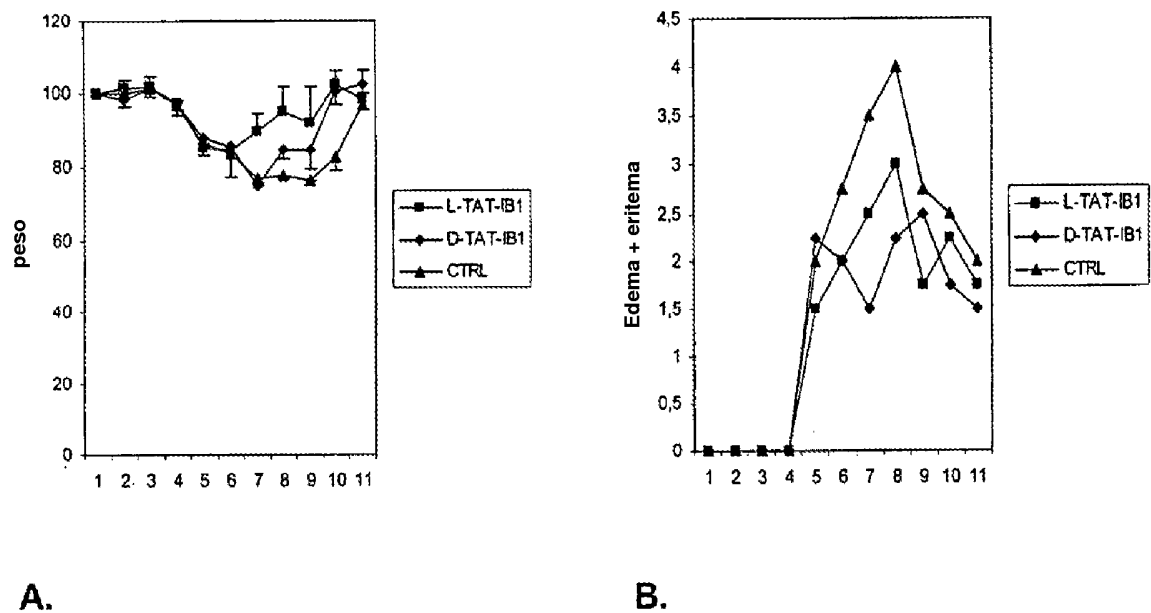


Fig. 12

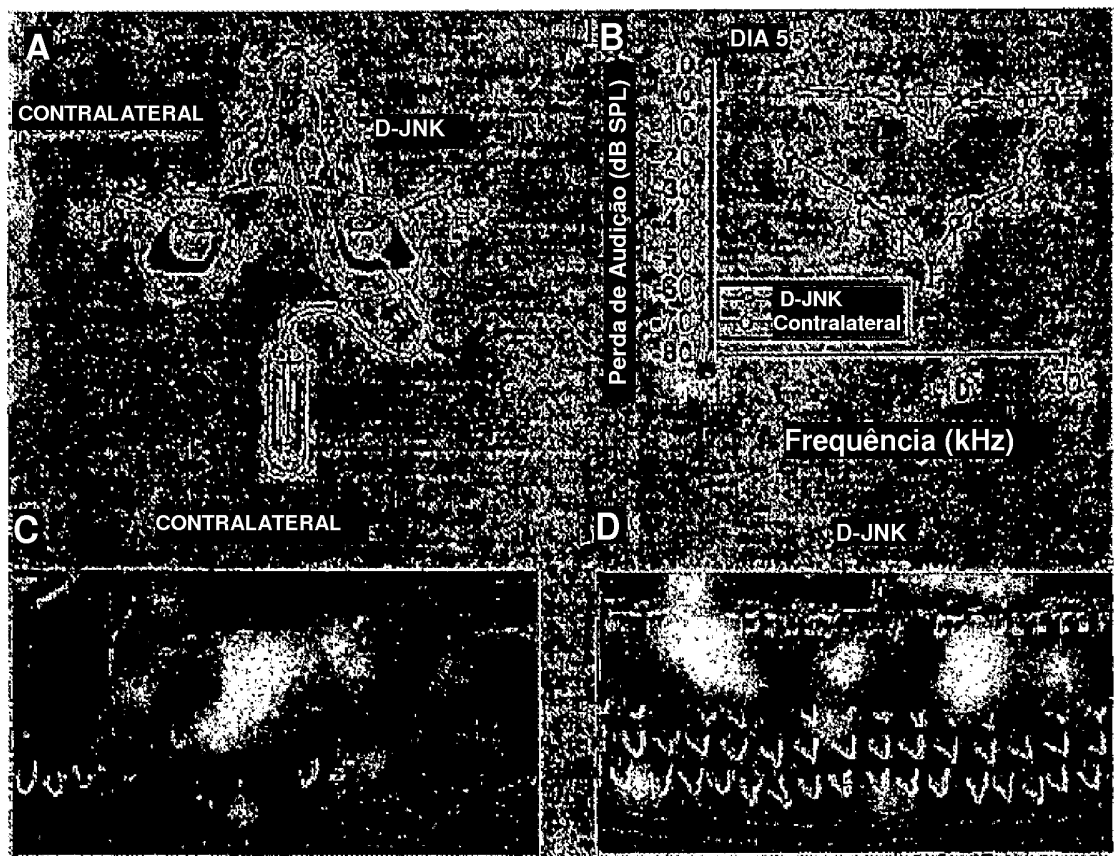
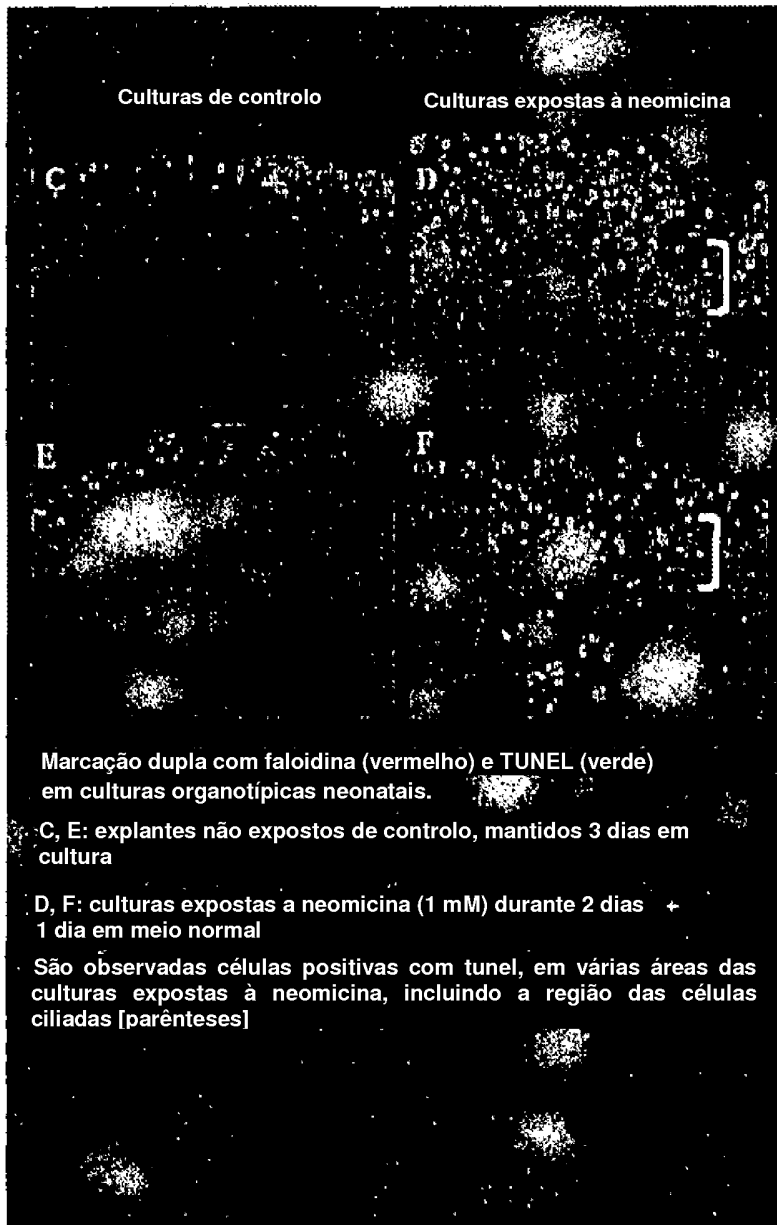


Fig. 13



**Fig. 14A**

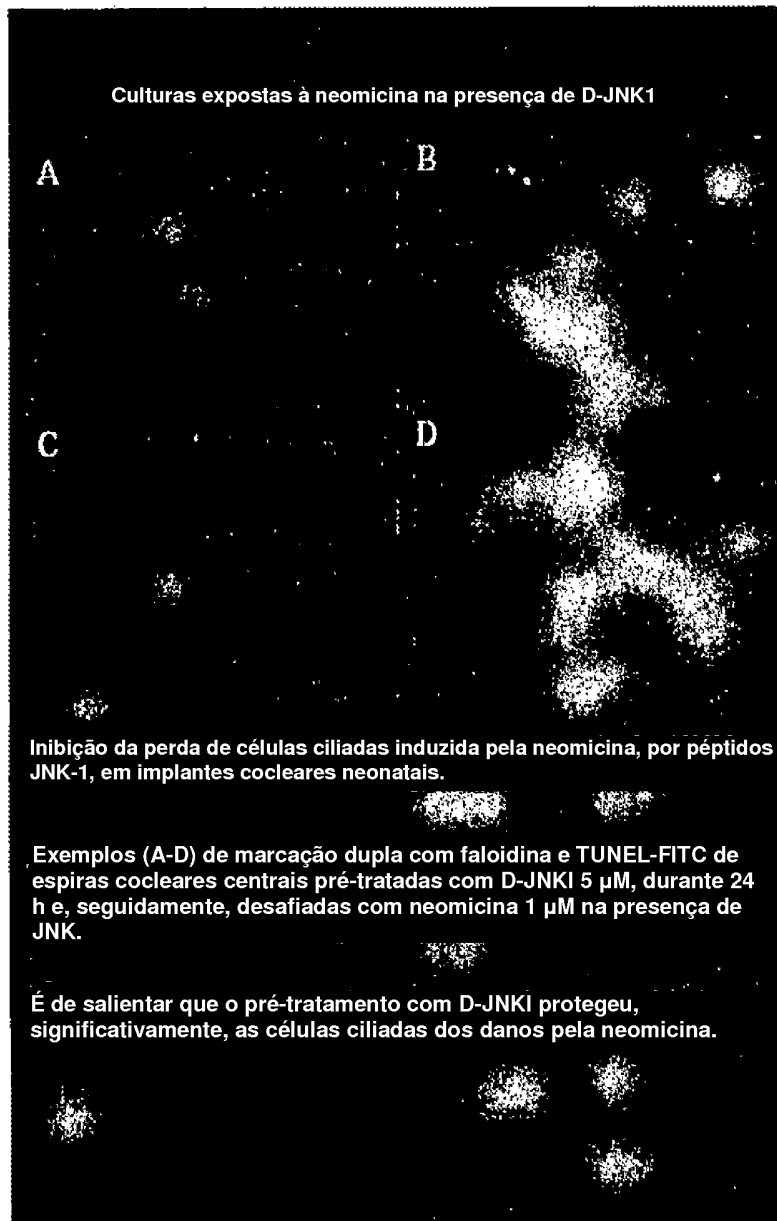


Fig. 14B



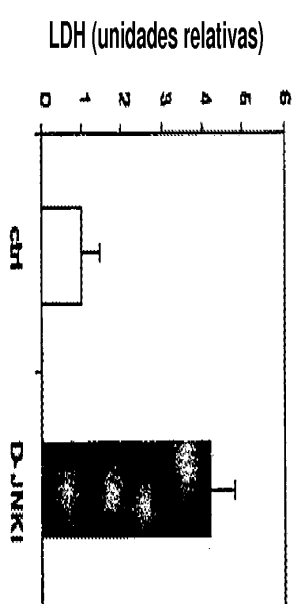


Fig. 15

FIG. 16

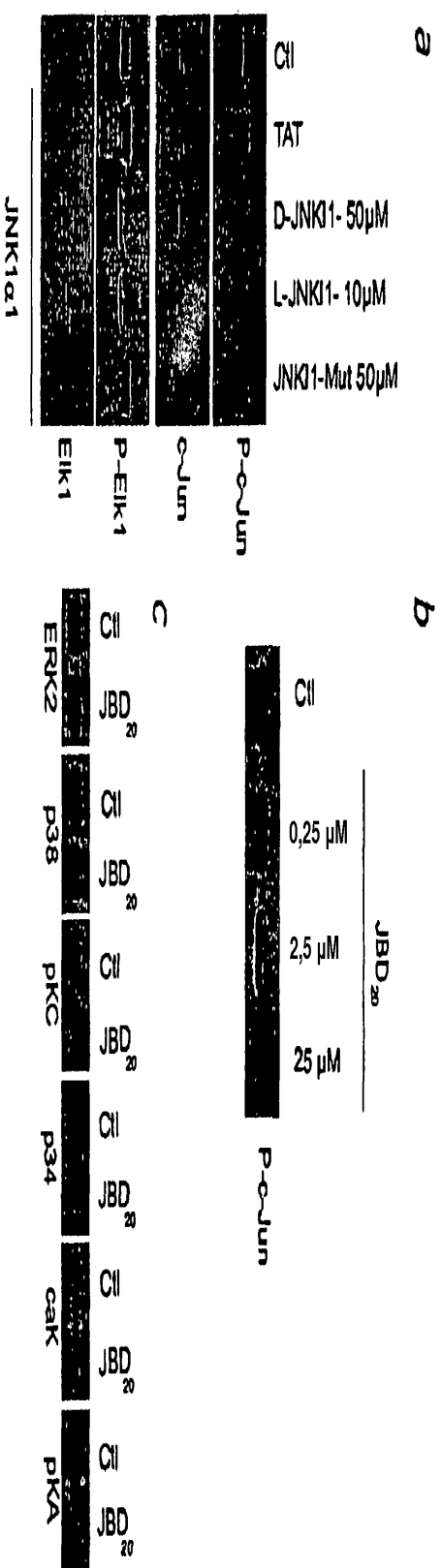


FIG. 17

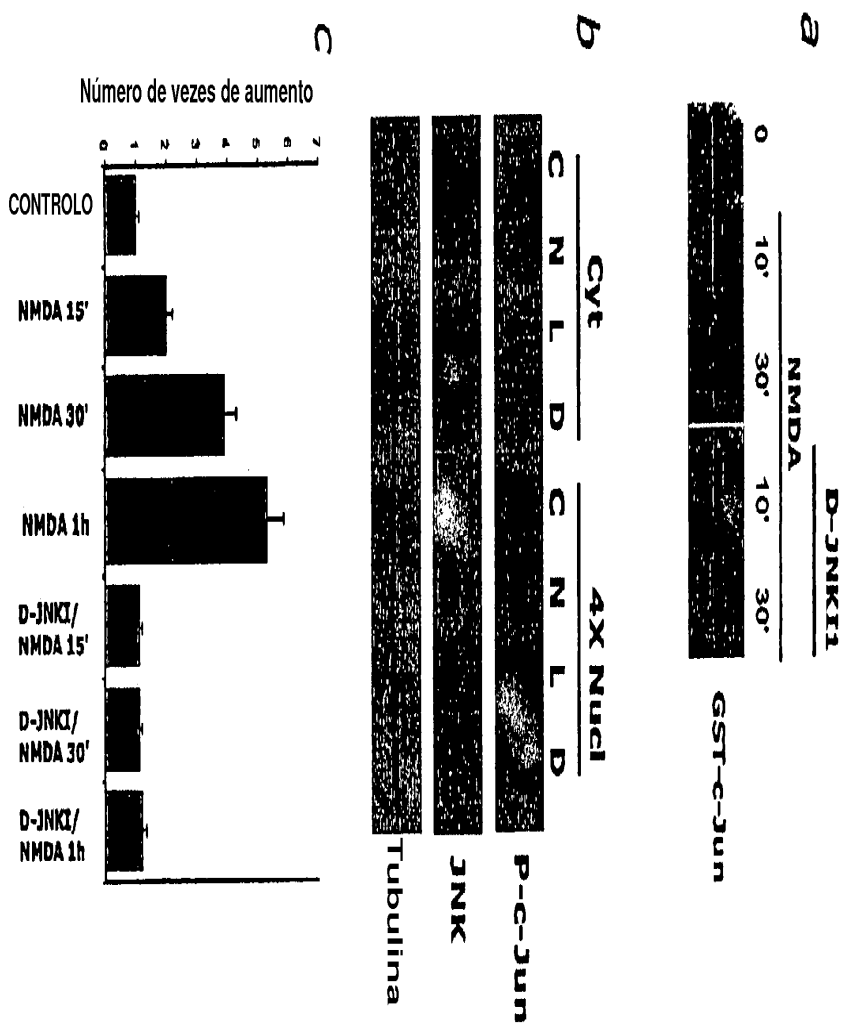


FIG. 18

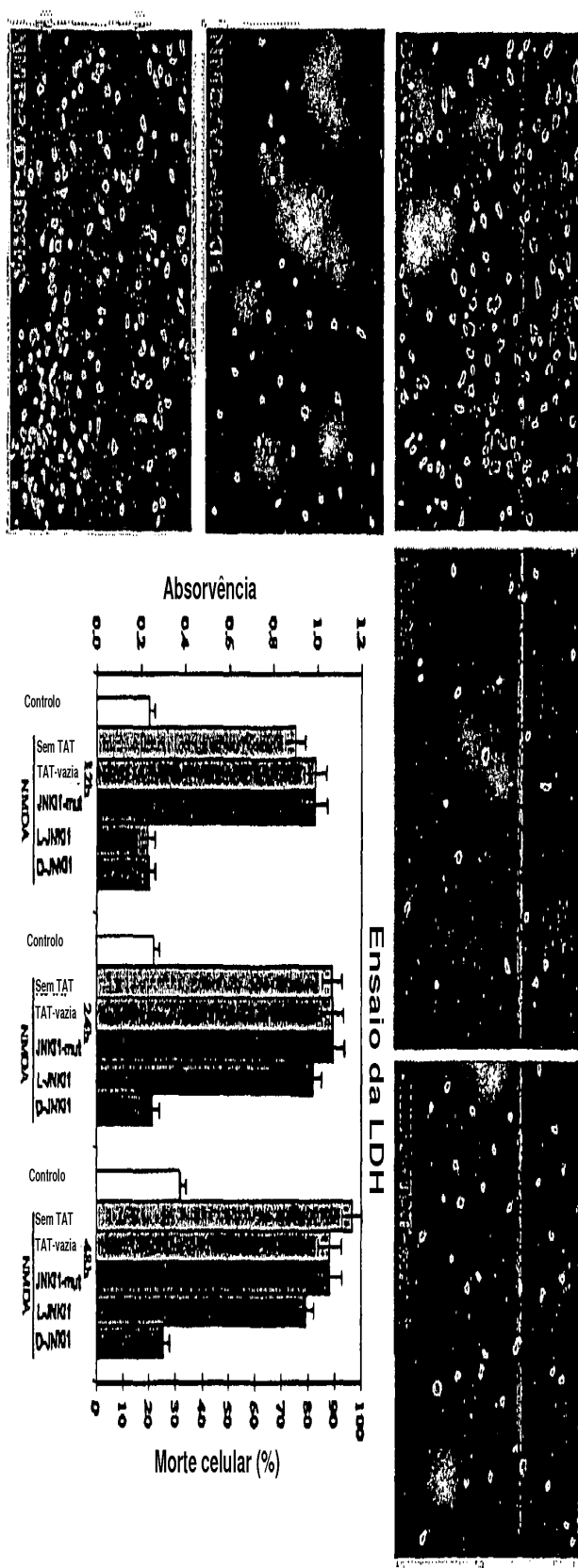
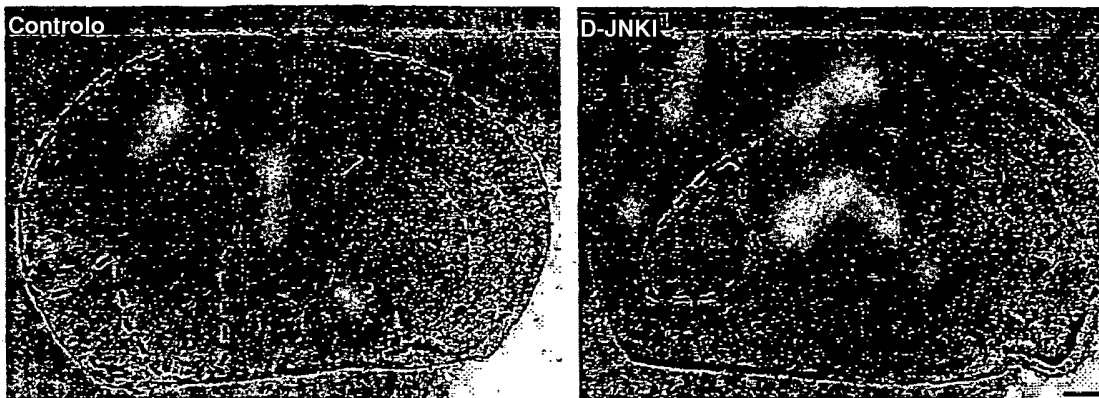
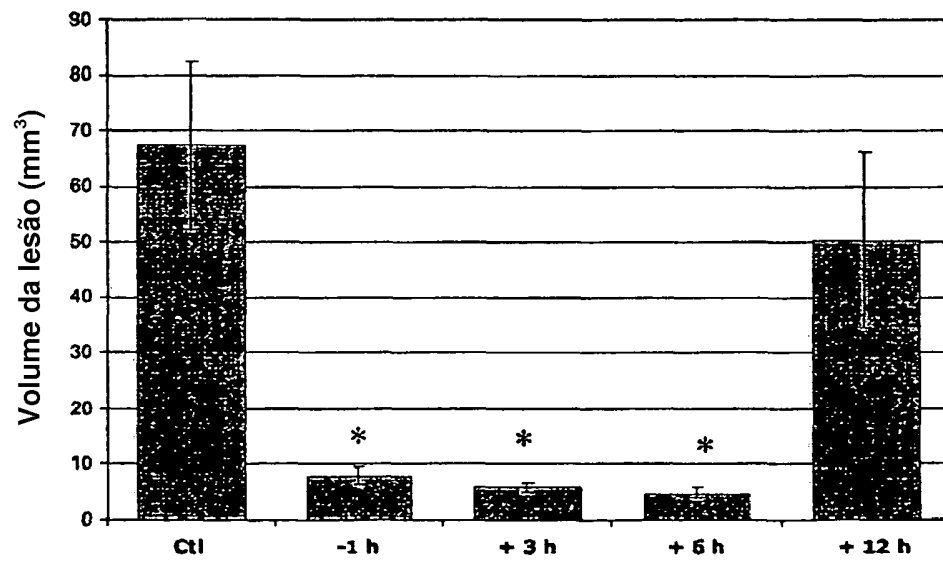


FIG. 19

*a**b*

**FIG. 20**

