

(11) Número de Publicação: **PT 1616011 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/62 (2006.01) **C07K 14/35** (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01) **G01N 33/50** (2006.01)

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

(22) Data de pedido: **2004.04.16**

(30) Prioridade(s): **2003.04.18 IT MI20030821**

(43) Data de publicação do pedido: **2006.01.18**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.10.03**
004/2008

(73) Titular(es):

**INTERNATIONAL CENTRE FOR GENETIC
ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY**

**AREA SCIENCE PARK, PADRICIANO 99 34012
TRIESTE**

IT

(72) Inventor(es):

**CHRISTIAN KÜHNE
ANDRAS SIMONCSITS**

**AT
IT**

(74) Mandatário:

**ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA**

PT

(54) Epígrafe: **POLIPEPTÍDEOS QUIMÉRICOS E A SUA UTILIZAÇÃO**

(57) Resumo:

RESUMO**"POLIPEPTÍDEOS QUIMÉRICOS E A SUA UTILIZAÇÃO"**

A presente invenção refere-se a moléculas quiméricas que contêm uma região polipeptídica preferencial, caracterizada por uma afinidade específica para a ligação a sequências de DNA específicas, de uma região polipeptídica preferencial caracterizada por uma actividade de modificação do DNA, e esta molécula quimérica é capaz de atravessar membranas biológicas devido à presença de uma região que contém actividade de transferência. A invenção contém adicionalmente os polinucleótidos isolados que codificam para as moléculas quiméricas da invenção se estas forem quer inteira quer parcialmente de natureza polipeptídica. Noutra forma de realização, baseada nas actividades dos polipeptídeos incluídos na invenção que interferem com os pontos chave da regulação do ciclo celular e com os pontos de controlo celulares devido à sua introdução em rupturas de DNA de cadeia dupla, a invenção inclui vários procedimentos que são caracterizados pela utilização dos ditos polipeptídeos da invenção para células in vivo e fornece uma actividade para a modificação de sítios específicos do DNA contidos numa célula. A invenção inclui também procedimentos que utilizam as moléculas quiméricas da invenção para o rastreio de novas actividades de transferência ou combinações de actividades de

transferência. A invenção fornece ainda a utilização terapêutica das ditas composições como agentes antiproliferativos, antineoplásicos, antibióticos, antiparasíticos ou antivirais.

DESCRIÇÃO

"POLIPEPTÍDEOS QUIMÉRICOS E A SUA UTILIZAÇÃO"

O campo técnico da invenção é referente a moléculas e métodos para o estudo dos sistemas celulares que controlam a actividade de reparação do DNA e o controlo do ciclo celular.

Os genomas de organismos vivos estão permanentemente expostos a danos químicos resultantes de danos químicos ou bioquímicos endógenos espontâneos ou a partir da exposição a agentes exógenos que danificam o genoma.

Para assegurar as taxas necessárias da estabilidade genómicas mas também para fornecer o fluxo genómico essencial para a evolução e a adaptação indispensável de todas as espécies vivas, evoluíram nas células sistemas altamente complexos para a reparação do DNA e mecanismos de recombinação do DNA. O equilíbrio entre os dois sistemas responsáveis por um lado pela fidelidade do genoma e pela criação da diversidade molecular é regulada por mecanismos de controlo que asseguram a correcção e a precisão. Os níveis dos controlos são representados pelos chamados "pontos de controlo" ou "controlo de vigilância" que contribuem para assegurar a fidelidade do genoma em qualquer organismo vivo. Para uma revisão acerca dos

mecanismos e dos genes conhecidos envolvidos e para uma nomenclatura de referência ver por exemplo Zhou B. e S, Elledge, Nature, 2000, 408: 433-439.

Em anos recentes foram desenvolvidas muitas ferramentas moleculares para a análise do mecanismo envolvido na reparação do DNA e mais significativamente, para o controle e a regulação desses mecanismos. Em US 6,307,015 por exemplo, são descritos produtos e métodos com base na proteína Chk1, que supostamente permitem a identificação dos mecanismos e produtos de gene que são importantes para o controle dos pontos de controle celulares e reparação de DNA pela proteína Chk1.

Além disso, foram desenvolvidos procedimentos para a introdução de recombinação no genoma de uma célula: por exemplo Peitz et al. em Proc. Natl. Acad. Sci., 2002, 99: 4489-4494 obteve a tradução de uma recombinase quimérica Cre que é capaz de recombinar sítios lox-P que são previamente introduzidos no genoma com uma eficiência de cerca de 50%. Adicionalmente, em WO 00/46386 é também descrita a introdução da recombinação cromossômica em sítios SceI especialmente introduzidos em combinação com um vector que expressa a meganuclease SceI.

Tanaka et al. (J Biomed Sci 9 (2002): 534-541) refere-se a uma terapia de genes para doenças mitocondriais através da distribuição da endonuclease de restrição SmaI nas mitocôndrias através do fornecimento de uma proteína de

fusão compreendendo a dita endonuclease de restrição fundida a uma sequência alvo mitocondrial.

Em Donahue S. L. (Nucleic Acid Res 29 (2001): 1582-1589) é descrita uma proteína de fusão de uma sequência alvo mitocondrial CDC9 fundida a uma endonuclease de restrição. O gene que codifica essa proteína de fusão é introduzido por métodos genéticos no genoma da *Saccharomyces cerevisiae*.

Rosenberg et al. (Innovations 6 (1996): 1-6) descreve a tecnologia de expressão de fagos e apresenta uma molécula de ácido nucleico fágica que contém uma endonuclease T7 que quando transfectada para uma célula hospedeira leva à secreção e imobilização da dita endonuclease na superfície da dita hospedeira.

Nishigori C. et al. (J Immunol 161 (1998): 2684-2691) refere-se a lipossomas que contêm endonucleases de restrição HindIII encapsuladas. Estes lipossomas podem ser utilizados para provocar danos no DNA em células da pele e, a partir daqui, reproduzir alterações causadas regularmente pela radiação UV-B.

Na WO 00/58488 é descrito um método para modular um processo celular através do contacto de uma cultura de células com uma molécula modificada através de um processo celular conjugada com um polipeptídeo translocado. A dita proteína translocada é preferencialmente o peptídeo VP22 do

Vírus Herpes Simplex de tipo 1. O processo de modificação de enzimas, que é fundido à dita proteína translocada pode ser uma proteína de ligação ao DNA, em particular a T7 RNA polimerase.

A WO 02/096952 refere-se a um conjugado de proteínas que consiste em dois domínios, em que o primeiro domínio é uma proteína de transporte e o segundo domínio é um polipeptídeo para a regulação de um sinal notch.

Phelan et al. (Nature Biotechn 16 (1998): 440-443) descreve uma proteína de fusão contendo a proteína VP22 do Vírus Herpes Simplex fundida à proteína p53 que está presente num grande número de tumores numa forma mutada e é responsável pela regulação do ciclo celular.

Melekhovets et al. (Nucleic Acids Res 24 (1996): 1908-1912) refere-se a proteínas de fusão que compreendem uma ligação específica RNA/DNA e um domínio de clivagem RNA/DNA. Os autores descrevem a produção de uma TAT (aminoácidos 1-72) como domínio de ligação do RNA em fusão com uma proteína RNase H. Isto resulta numa RNase H que obteve a sua função numa RNase para a TAR do RNA de HIV-1 (a RNase H trabalha apenas naturalmente como uma RNase para o RNA que faz parte de um híbrido de DNA-RNA como substrato único) e é a TAT 1-71 que fornece a ligação específica do RNA às sequências TAR.

A dificuldade na análise da reparação dos danos

DNA após uma indução com agentes genotóxicos é a de que todos estes agentes danificadores do DNA causam simultaneamente um espectro largo de diferentes tipos de lesões de DNA: assim a introdução de sistemas que actuam no DNA de uma forma monoespecífica é de elevado interesse. Isto poderá permitir a definição de produtos de genes com elevada precisão que estão envolvidos nas vias de controlo do ciclo celular e em particular na reparação do DNA. A eficiência destas vias é essencial para uma replicação celular correcta, e seu conhecimento detalhado permite o desenvolvimento de sistemas de rastreio para farmacêuticas mais selectivas e para intervenções terapêuticas mais directas.

Uma gama extensa de doenças somáticas e hereditárias está associada a anomalias no mecanismo de reparação do DNA e mais comumente no controlo da informação genética codificada pelo DNA. Muitas destas anomalias são a causa principal para a patologia tumoral (por exemplo mutações no gene p53, ARE', 14-3-3sigma, p16, Rb, etc.), mas além disso estas anomalias podem muito bem ser adicionalmente responsáveis por muitas das patologias até hoje não caracterizadas e que são simplesmente classificadas como "mutações somáticas" ou "predisposição genética". As mutações até agora localizadas numa das vias e que constituem a base genética para a doença hereditária são: a Ataxia-telangiectasia (A-T), e os distúrbios que se correlacionam com a ataxia (doença ATLD como a Ataxia-telangiectasia, Mre11), o síndrome da ruptura de Nijmegen

(NBS), a anemia de Fanconi, o síndrome de Rothmund-Thomson, linfomas Não Hodgkin (NHL), o síndrome de Werner, o síndrome de Bloom, o síndrome da DNA Ligase IV (LIG4), a Xeroderma pigmentosa, BRCA1.

As rupturas de DNA de cadeia dupla (DSB) representam o dano mais perigoso do genoma. Estas podem ser induzidas por exemplo, pela radiação ionizante, por espécies reactivas de oxigénio (ROS) que podem ser quer de fontes exógenas mas também de condições endógenas por exemplo por stress celular. As ROS são também induzidas a partir de agentes quimioterapêuticos que são utilizados na terapia tumoral, por exemplo por agentes intercalantes do DNA ou por agentes de ligação cruzada do DNA. A reparação das DSBs é mais difícil do que em outros tipos de danos no DNA: os eventos de reparação e a ligação das extremidades das DSBs pode causar instabilidade genética devido à perda, à amplificação ou à modificação do material genético e são potencialmente tumorogénicas.

Devido ao facto de estes eventos induzirem as vias de reparação e os controlos celulares daí resultantes, o seu entendimento é de interesse fundamental porque isto por sua vez pode fornecer implicações para uma potencial utilização em terapia.

O objectivo da presente invenção é por conseguinte fornecer um agente eficiente para tratar estas anomalias no mecanismo de reparação do DNA ou no controlo

da informação genética. Preferencialmente, estes agentes devem ser libertado nas células e especialmente nos núcleos para proporcionar aí a sua actividade.

Por conseguinte, a presente invenção apresenta um polipeptídeo quimérico compreendendo:

- a. um polipeptídeo que apresenta afinidade para as sequências de nucleótidos específicas
- b. uma enzima de modificação do DNA
- c. uma região com actividade de transferência intracelular, em que a enzima de modificação do DNA é uma endonuclease de restrição da classe tipo II ou as suas subunidades ou os fragmentos e regiões funcionais a., b., c. estão ligadas covalentemente entre si.

A presente invenção fornece um sistema para a modificação do genoma celular através da introdução de DSBs com as moléculas quiméricas da invenção que exibem sítios cognatos específicos no genoma. Uma das vantagens das moléculas quiméricas da invenção é a cinética linear da sua actividade, a actividade monoespecífica, e o facto de estas moléculas serem capazes de penetrar a totalidade das populações celulares além disso de um modo de receptor independente. Vantajosamente estes eventos causados pelas moléculas quiméricas podem ser induzidos sem selecção através de reagentes selectivos o que simplifica significativamente a sua utilização.

A primeira forma de realização da invenção refere-se a moléculas quiméricas que consistem em: uma região, preferivelmente de natureza polipeptídica, que contém actividade de ligação ao DNA específica, que deriva vantajosamente de uma enzima de restrição de classe II; uma região preferencialmente de natureza polipeptídica que exhibe uma actividade de modificação do DNA catalítica, consistindo numa actividade endonucleolítica das enzimas de restrição de classe tipo II, e uma região com uma actividade de transferência de cruzamento de membrana celular e/ou nuclear. Estas regiões funcionais abordadas acima estão covalentemente ligadas umas com as outras.

Outra forma de realização importante da invenção refere-se aos polinucleótidos isolados que codificam para as moléculas quiméricas da invenção se estas forem inteira ou parcialmente de natureza polipeptídica.

De acordo com uma outra forma de realização da invenção, que infere a partir das actividades dos polipeptídeos da invenção para interferir com pontos chave da regulação do ciclo celular e dos seus pontos de controlo devido a uma introdução de rupturas de DNA de cadeia dupla, a invenção inclui vários procedimentos que são totalmente caracterizados pela utilização das moléculas quiméricas da invenção em células in vivo. Em particular estes procedimentos de acordo com a invenção contêm procedimentos de diagnóstico para avaliar o dano genético dos genes que codificam para os produtos que estão envolvidos no controlo

do ciclo celular e na reparação do DNA incluindo procedimentos para a selecção de composições com actividades biológicas capazes de modular estas actividades de controlo.

A invenção contém também procedimentos que utilizam as moléculas quiméricas da invenção para rastrear novas actividades de transferência ou combinações de actividades de transferência.

A invenção fornece adicionalmente a utilização terapêutica das ditas composições como agentes antiproliferativos, antineoplásicos, antibióticos, antiparasíticos ou antivirais.

Os vários aspectos da invenção baseiam-se nos resultados das experiências apresentados pelos inventores de que é possível introduzir rupturas de DNA de cadeia dupla (DSB) monoespecíficas no genoma de uma célula in vivo e que estas DSBs representam um sinal suficiente para a activação dos pontos de controlo (controlo) durante o ciclo celular. Muitas destas activações estão conservadas ao longo da evolução desde o homem até à levedura e os mecanismos correspondentes estão também presentes em procariotas e nas arqueobactérias.

Em eucariotas estas activações são mediadas pela modulação dos produtos de gene da ATM (proteína Mutada da Ataxia-Telangiectasia), da ATR (Ataxia-telangiectasia

Relacionada), da DNA-PKcs (subunidade catalítica da Proteína Cinase dependente de DNA), e dos seus substrato directos ou indirectos tais como o Chk1 (Ponto de Controlo da Cinase 1), o Chk2 (Ponto de Controlo da Cinase 2), o Brca1 (susceptibilidade do Cancro da Mama 1), o Brca2 (susceptibilidade do Cancro da Mama 2), o Mre11 (recombinação Meiótica 11), o Rad50 (reparação da ruptura de cadeia dupla de Radiação 50), o Nbs1 (síndrome da ruptura de Nijmegen), o Rad51 (reparação da ruptura de cadeia dupla de Radiação 51), o FANCD2 (complementação D2 da anemia de Fanconi), as Histonas, as helicases do tipo BLM (mutação do síndrome de Bloom), o WRN (mutação do síndrome de Werner), a p53, e os alvos transcrpcionais directos ou indirectos de p53 como por exemplo o p21 e o 14-3-3 sigma, no entanto esta lista não está completa e muitos outros alvos são também conhecidos e outros ainda estão por descobrir.

Descobriu-se em particular que a activação de alguns destes produtos de genes coordenam supostamente a manutenção da homeostase da integridade do genoma durante a reparação do DNA, a apoptose ou os bloqueios do ciclo celular.

A presente invenção fornece moléculas quiméricas que são capazes de atravessar a membrana celular, para entrar nos núcleos no caso de células eucarióticas ou em parasitas das células, e de se ligarem a sítios específicos da cadeia dupla do DNA, modificando idealmente o DNA com cinéticas de primeira ordem.

Claramente, estas descobertas e o seu modo de utilização abrem caminho para muitas aplicações práticas na medicina bem como propósitos específicos e aplicações para métodos únicos para o estudo dos mecanismos de reparação do DNA, o controlo da reparação do DNA e do ciclo celular em geral e para produtos capazes de modificar o genoma e qualquer célula de uma forma selectiva.

Numa forma de realização principal as moléculas quiméricas aqui inventadas contêm três componentes funcionais:

- uma região, que consiste num polipeptídeo, que exhibe afinidade para sequências específicas de DNA ou de RNA. Esta região é preferencialmente representada por uma enzima de restrição de classe II, as suas subunidades ou fragmentos funcionais são capazes de reconhecer sequências palindrómicas no DNA;

- uma região, que consiste num polipeptídeo, exibindo actividade endonucleolítica do DNA de uma enzima de restrição de classe II;

- uma região que contém uma actividade de transferência que é capaz de atravessar as membranas celulares e/ou a membrana nuclear e transportar moléculas heterólogas para a célula e para os organelos; esta actividade é denominada "transferência", em que por "transferência" entende-se uma estrutura química que preferencialmente consiste num polipeptídeo ou peptídeo

capaz de penetrar membranas biológicas de células e no caso de eucariotas também adicionalmente as membranas celulares e as membranas dos núcleos ou membranas de qualquer outro organelo incluindo a mitocôndria ou os plastídios. São especialmente preferidas transferências que permitem o transporte para os núcleos.

Os domínios funcionais mencionados acima estão covalentemente ligados. As moléculas quiméricas da presente invenção são obtidas a partir de síntese química, ou se as regiões funcionais forem de natureza peptídica, são preferencialmente sintetizadas através de tecnologias do DNA recombinante. Para esta forma de realização e para a presente invenção as sequências de nucleótidos que codificam para as proteínas quiméricas contendo as três regiões funcionais como definido acima, servem para a expressão do polipeptídeo recombinante num sistema hospedeiro, preferencialmente de origem procariótica.

As moléculas quiméricas da invenção podem também ser produzidas através de técnicas mistas bem como por métodos químicos ou recombinantes, em que pelo menos uma região é acoplada com métodos químicos a dois outros produtos que são produzidos por técnicas de DNA recombinante.

Numa forma de realização preferencial na molécula quimérica da invenção, a região com actividade de ligação ao DNA específica é de uma endonuclease de classe II.

Preferencialmente escolhida entre as endonucleases: EcoRV, PvuII, HinfI, ou as suas subunidades ou fragmento funcionais. No seguimento da presente invenção entende-se como um fragmento funcional um polipeptídeo que inclui como uma sequência de aminoácidos uma sequência que parcialmente deriva a partir da sequência de uma destas proteínas inteiras contendo pelo menos uma função da enzima nativa

De acordo com a presente invenção a região para a actividade de modificação de DNA é uma endonuclease de restrição de classe II e é escolhida preferencialmente a partir da mesma endonuclease que contém a actividade específica de ligação ao DNA e em particular: a EcoRV, a PvuII, a HinfI ou as suas subunidades ou fragmentos funcionais. Nesta forma de realização preferencial, numa única proteína homodimérica as actividades de reconhecimento de DNA e de modificação de DNA estão ligadas.

Neste último caso, numa forma de realização preferencial, a enzima de restrição é vantajosamente incluída como uma molécula de cadeia única, enquanto que todas as subunidades da enzima estão covalentemente ligadas e são expressas como um polipeptídeo de cadeia simples como é descrito para a enzima PvuII em Simoncsits A. et al. J. Mol. Biol, 2001, 309: 89-97, mantendo as características de ligação e clivagem comparáveis com a enzima de estirpe selvagem. Os inventores desenvolveram também no âmbito desta invenção uma molécula quimérica em que a enzima de

restrição está incluída como uma proteína de cadeia simples e em que a actividade de modificação está alterada ou não existe devido a mutações pontuais, deleções, ou outras variações estruturais da região, subunidade ou domínio catalítico da enzima de restrição e a afinidade para o reconhecimento do DNA cognato e a ligação permanece comparável à da enzima nativa. As mutações especificamente preferidas incluem tais mutantes que retiveram substancialmente (ou até aumentaram) a sua capacidade de ligação ao ácido nucleico mas perderam (parte significativa (por exemplo > 50%) ou a maioria (> 80%)) a sua actividade enzimática (corte).

Para este último aspecto da invenção incluindo também moléculas quiméricas que contêm pelo menos a região para a transdução ou o transporte ou transportador intracelular e a região de ligação ao DNA como definida acima e caracterizadas pelo facto de que a sequência de aminoácidos que exhibe a actividade para sequências de DNA específicas é de preferência de natureza endonucleolítica e tem pelo menos 95% de homologia de sequência com uma enzima de restrição de classe II. Em tais moléculas quiméricas a actividade enzimática está em falta e estas são utilizadas como vectores para um transporte para sequências de DNA específicas no genoma sem empregar a capacidade de modificação. Uma forma de realização preferencial deste aspecto da invenção está incluído na enzima quimérica obtida pela utilização em vez da sequência nativa da enzima PvuII (como em SCPVUTAT) o mutante D34G do sítio catalítico

obtido pela mutação de substituição na posição 34 (Asp34/Gli34) da enzima PvuII como descrito em Nastri et al, 1997, J. Biol. Chem. 272: 25761-25767. Em tal enzima mutada (SC34) a actividade de reconhecimento de DNA é comparável à da enzima de estirpe selvagem mas a actividade endonucleolítica está em falta. Tais moléculas são também úteis como controlos para serem utilizadas em paralelo com as moléculas quiméricas que exibem actividade de modificação.

O transportador ou a região para transferir através das membranas celulares e/ou membranas nucleares é vantajosamente um peptídeo. Este é vantajosamente escolhido de entre: a proteína VP22 de HSV, a terceira alfa-hélice do homeodomínio da proteína antenapédia, as proteínas Tat e Rev de HIV-1 ou os seus fragmentos ou mutantes funcionais. Exemplos para mutantes funcionais são os descritos em Ho et al., 2001, Cancer Res., 61: 474-577. Uma forma de realização preferencial é a dos peptídeos de Tat e aqueles que contêm os domínios funcionais com a sequência YGRKKRRQRRR (correspondente à região 47-57 de Tat) do peptídeo SYGRKKR-RQRRRGGS. As mutações funcionais deste peptídeo de entre as descritas em HO et al. são utilizadas permutavelmente. Numa outra forma de realização as sequências transportadoras podem ser específicas para qualquer tipo de célula de qualquer espécie e parasitas incluindo vírus. Por exemplo, são escolhidas sequências a partir de sequências de transporte bacterianas que levam a uma importação específica das moléculas quiméricas para os

procariotas. Para ilustração mas não como limitação pode ser escolhido o transportador bacteriano a partir de sequências oligopeptídicas descritas e revistas em Rajarao et al., 2002, FEMS Microbiology Letters; 215: 267-272. Estes peptídeos podem conter um motivo FKDE para um transporte através das membranas de *E. coli* tal como a sequência CFFKDEL e os seus derivados. Por exemplo para *S. aureus* PFS contendo motivos pode ser utilizado tal como VLTNENPFSDP e para *B. subtilis* o PFS contendo o motivo YKKSNNPFSD. Num outro exemplo podem ser utilizadas moléculas da invenção que contêm sequências conhecidas na área por penetrarem em leveduras tais como em homólogas de *S. cerevisiae* alfa e ou uns factores em combinação com sequências de importação nucleares para uma transferência de levedura de célula específica. Exemplos de sequências para uma transferência em várias estirpes de levedura são aquelas descritas em Riezman et al., 1997; Cell 91, 731-738 e em Rajarao et al., 2002, FEMS Microbiology Letters; 215: 267-272, especialmente contendo motivos PFS-, YQR-, PFR-, PMF- ou DCMD.

Uma forma de realização preferencial deste aspecto da invenção é a utilização de endonucleases de restrição de classe II que são capazes de atravessar membranas bacterianas e de alvejar e clivarem o seu DNA. As enzimas de restrição representam o sistema de eliminação mais potente e melhor evoluído desenvolvido naturalmente no reino procariótico. A actividade de nuclease enzimática assemelha-se a uma vasta amplificação de uma actividade de

danificação do DNA e são apenas necessários vestígios de enzimas para extinguir o crescimento bacteriano. Numa forma de realização preferencial deste aspecto da invenção estas moléculas quiméricas podem ser utilizadas para actividades antibióticas e podem ser utilizadas vantajosamente para parar o crescimento bacteriano de uma forma bastante selectiva. Supõem-se que os transportadores bacterianos não entram noutros tipos de células tal como as células humanas e pelo contrário os transportadores tal como as sequências TAT não entram nas células bacterianas.

Os antibióticos, os agentes antitumorais (por exemplo citoestáticos) e outros agentes activos adicionais podem ser especificamente transportados pelos agentes de acordo com a presente invenção, preferencialmente por acoplagem covalente dos polipeptídeos da presente invenção aos tais agentes activos adicionais.

Numa forma de realização particularmente vantajosa o transportador ou a região para transporte através das membranas celulares e/ou nucleares e os organelos membranares podem conter um componente de modificação adicional ou o domínio "auxiliar" de preferência um polipeptídeo ou um composto quimérico. Este domínio pode ser ligado com as sequências de transporte ou pode ser colocado em qualquer outra parte das moléculas quiméricas da invenção. A adição destas moléculas pode ser obtida por técnicas conhecidas na área, tais como técnicas recombinantes ou acoplagem química. Para ilustração mas não para

exclusão, de forma a fornecer as moléculas quiméricas da invenção o tipo de célula específica um domínio auxiliar adicional, que transporta um sítio de ligação para o tipo de célula específico e para por exemplo, os receptores amplificados específicos do tumor. Estes são por exemplo o receptor Her2, o TGF β RI, ou o CD20. Isto pode ser obtido adicionando os fragmentos de ligação de EGF, e TGF β ou Fv ou os fragmentos da imunoglobulina Fv de cadeia simples (scFv) ao domínio auxiliar. Numa forma de realização particular a enzima de restrição é utilizada na sua forma dimérica nativa, enquanto que para o N terminal da primeira proteína é ligado um fragmento específico da imunoglobulina de cadeia leve incluindo as regiões CDRL funcionais e o para o ao N terminal da outra proteína do homodímero é ligada à proteína da imunoglobulina variável de cadeia pesada incluindo as regiões CDR1-3H funcionais. Estas proteínas quiméricas são capazes de dimerizar por dimerização de cadeia leve ou cadeia pesada e por dimerização do domínio da enzima de restrição. Assim, isto pode alvejar ligações selectivas específicas para certos tipos de células e levar a um forte aumento no levantamento preferencial das proteínas quiméricas da invenção em células seleccionadas. É evidente que estes domínios auxiliares podem ser múltiplos. Por exemplo, podem ser adicionadas sequências adicionais para uma marcação específica do DNA intracelular não cromossomal tal como o DNA da mitocôndria ou de parasita (isto é vírus, invertebrados, e células bacterianas infectadas). Noutra forma de realização podem ser adicionados elementos estimuladores dos transportadores.

Uma forma de realização particularmente preferível para uma molécula quimérica da invenção é apresentada na SEQ ID NO: 2, onde a enzima de restrição PvuII com as duas subunidades ligadas como uma proteína de cadeia simples (SCPVU) representa o domínio ou região para a afinidade de ligação ao DNA e para a actividade de modificação do DNA através da actividade endonucleolítica e além disso o peptídeo SYGRKKR-RQRRRGGS de Tat contém a subunidade de transferência intercitoplasmática.

Uma das formas de realização vantajosas das proteínas quiméricas da invenção é a sua estabilidade também em meio de cultura celular na presença de soro. Esta estabilidade pode ser finalmente aumentada por substituições de aminoácidos em configuração L com aminoácidos D, ou com aminoácidos não naturais, na estrutura tal como é tecnicamente possível na área. Estas variantes da proteína quimérica, tal como no caso das mutações pontuais exibem a mesma actividade enzimática das enzimas de restrição preferidas, ou falta-lhes a mesma actividade nucleolítica nas moléculas utilizadas para um controlo, e estão assim incluídas na invenção apresentada.

Estão também incluídos na presente invenção os polinucleótidos isolados que codificam para as moléculas quiméricas da invenção e por isso são inteira ou parcialmente de natureza recombinante e compreendem a SEQ ID NO: 1 que codifica para a forma de realização quimérica

de cadeia simples da enzima PvuII para a qual a região de transporte da proteína corresponde à SEQ ID NO: 4 e é codificada pelo nucleótido da SEQ ID NO: 3. A forma de realização preferida contém adicionalmente uma cauda de poli-histidinas que permite a fácil purificação da proteína quimérica por cromatografia de afinidade de níquel NTA.

A invenção contém adicionalmente todas as sequências polinucleotídicas que codificam para todas as realizações possíveis nas quais a molécula quimérica é um polipeptídeo e pode ser obtida através da tecnologia do DNA recombinante com métodos familiares para os peritos na área e é descrita por exemplo em Sambrook and Maniatis, 1989, CSH ed. De acordo com estes métodos, e também como descrito por exemplo para outras enzimas de restrição, para os peptídeos utilizados como elementos de ligação sintéticos ou para peptídeos utilizados para purificação por afinidade, as técnicas na área são capazes de produzir realizações que apresentam diferenças não essenciais para a purificação da proteína quimérica por cromatografia de afinidade de níquel NTA.

A invenção contém adicionalmente todas as sequências de polinucleótidos que codificam para qualquer uma das possíveis realizações nas quais a molécula quimérica é um polipeptídeo e pode ser obtida através da tecnologia do DNA recombinante com métodos familiares para os peritos na área como descrito por exemplo em Sambrook and Maniatis, 1989, CSH ed. De acordo com estes métodos, e

também como descrito por exemplo para outras enzimas de restrição, para os peptídeos utilizados como elementos de ligação sintéticos ou para peptídeos utilizados para purificação por afinidade, as técnicas na área são capazes de produzir realizações que apresentam diferenças não essenciais para as realizações da presente invenção e assim estão incluídas mais adiante.

Está também incluída na presente invenção uma forma de realização particular vantajosa para as moléculas quiméricas da invenção e em particular para a actividade da nuclease reduzida mas as moléculas quiméricas de ligação ao DNA, mas também para as moléculas quiméricas de ligação ao RNA. Nesta forma de realização a actividade de ligação do DNA ou do RNA das moléculas quiméricas pode ser utilizado como uma molécula alvo específica do ácido nucleico numa célula. Isto permite a transferência de compostos como um carga para o DNA ou o RNA de uma célula. Por isto, os compostos específicos são ligados covalentemente ou não covalentemente a estas moléculas quiméricas por técnicas recombinantes ou através de acoplagem química. Estes compostos incluem para demonstração mas não para exclusão: nanopartículas, compostos inorgânicos ou orgânicos e combinações daí resultantes, tal como para demonstração mas não para exclusão compostos radioactivos, quimioterapêuticas como a doxorubicina bleomicina, vincristina, etoposida, cisplatina, e outros agentes radiomiméticos e indutores de DSB, anticorpos e fragmentos daí resultantes, compostos coloridos, tais como moléculas fluorescentes,

ácidos nucleicos naturais e não naturais, peptídeos ou polipeptídeos contendo ou não actividades enzimáticas. A acoplagem química pode ser alcançada com métodos conhecidos na área tais como a acoplagem de compostos de maleimida activados para reduzir cisteínas nas moléculas quiméricas. Para o caso das moléculas quiméricas da invenção que não contêm uma cisteína natural, como por exemplo a PvuII, pode ser introduzida uma cisteína por técnicas recombinantes ou sintéticas bem conhecidas na área. Como um exemplo adicional pode ser utilizada a acoplagem bromociano para libertar os grupos amina. Uma acoplagem atractiva particular pode ser alcançada por processamento de proteínas e ligação de proteínas com compostos seleccionados. As moléculas podem também ser acopladas às diversas extremidades que são fundidas às proteínas para a purificação como por exemplo uma cauda de poli-histidinas, uma cauda GST, ou uma cauda de proteína A, cauda myc, cauda HA, biotina, o que permite a acoplagem de por exemplo mas não para exclusão anticorpos, fretamentos de anticorpos ou compostos contendo glutathione. As moléculas que são ligadas desta forma às proteínas da invenção podem ou não ser ligados transversalmente com reagentes químicos e através de UV. Para ilustração mas não para exclusão, para estes procedimentos de acoplagem é apresentado um sítio atractivo particular nas moléculas quiméricas pelas partes N ou C terminal. No caso das formas de realização de cadeia simples pode também ser utilizado vantajosamente o elemento de ligação entre as duas subunidades.

Adicionalmente existem também os vectores incluídos que contêm as sequências de polinucleótidos descritas acima, e em particular vectores para expressão em procariotas que são normalmente mais viáveis para uma expressão de grandes quantidades de proteínas recombinantes.

A utilização das moléculas quiméricas preferidas da invenção (onde a enzima de modificação de DNA é uma enzima de restrição de classe II) permite a sua aplicação no aspecto principal da invenção que consiste num procedimento para provocar, induzir ou criar rupturas de DNA de cadeia dupla, e os sítios palindrómicos que são sítios cognatos para uma dada enzima, e assim vantajosos para as sequências CAG/CTG (PvuII), GAT/ATC (EcoRV) ou G/ATC (HinfI) que estão presentes aleatoriamente no genoma com uma frequência estatística de aproximadamente 6000 pb (EcoRV e PvuII) ou 400-600 pb (HinfI).

O efeito induzido após o tratamento com a proteína quimérica da invenção de células em cultura é detectado através da análise do ciclo de distribuição da célula por análise de FACS, ou directamente do genoma por transferência Southern, ensaio de TUNEL, marcação bromodesoxiuridina (BrdU), e por imunofluorescência utilizando anticorpos específicos ou derivados da proteína de fluorescência verde e os seus coloridos derivados, todos os métodos podem ser aplicados rotineiramente. Adicionalmente, a determinação de actividades clonogénicas e a capacidade

de proliferação de células tratadas com as proteínas da presente invenção representam um indicador para a funcionalidade de controlos de proliferação, controlos do ciclo celular e de reparação do DNA.

Os cinéticos da actividade da forma de realização preferencial das proteínas da invenção como medidos por exemplo através do ensaio de TUNEL é linear no raio entre 0,001 nM e 100 μ M, mais preferencialmente entre 0,1 nM e 1 μ M, e ainda mais preferencialmente entre 1 e 500 nM. Esta linearidade representa uma das vantagens das moléculas quiméricas da presente invenção, e em particular da SCPVUTAT, junto com a actividade monoespecífica e a sua característica para penetrar em todas as células. Além disso, os eventos que são causados pelas moléculas quiméricas não têm de ser seleccionados com agentes selectivos específicos e por seu turno simplificam notável e vantajosamente a utilização destes últimos.

Os efeitos que são observados após o tratamento com as proteínas quiméricas da invenção, e em particular com a realização preferida da invenção, resumem-se de uma forma não limitada como se segue:

- o aumento da percentagem das células em fases específicas do ciclo celular, tal como em G0-G1/S-S-G2-G2/M-M ou em apoptose ou em poliploidia. A qualidade destas alterações é específica do tipo de célula e a sua especificidade representa uma

realização de diagnóstico ulterior de tal procedimento da invenção e permite detectar alterações e/ou mutações genéticas ou alterações epigenéticas/somáticas numa amostra desconhecida, comparado com um ou mais controlos, por exemplo, linhas celulares contendo anomalias genéticas bem descritos ou também células normais. Por exemplo o tratamento de células que contêm uma anomalia específica para o controlo do ciclo celular na decisão G1/S, tal como mutantes no gene p21^{CIP/WAF1}, com as ditas proteínas da invenção que exibem um aumento do número de células em G2 com respeito à distribuição vista após o tratamento de células normais com as ditas proteínas da invenção. No caso das células p21^{CIP/WAF1} não pararem em G1/S mas ainda assim exibirem um ponto de verificação (ponto de controlo) G2/M parcialmente funcional e assim apresentar um aumento relativo do pico na fase G2/M, tal como pode ser observado em experiências onde a distribuição do conteúdo do DNA é analisado por FACS e comparado com células de controlo normais. Podem ser obtidos resultados similares a partir de experiências de mutantes em genes para produtos de genes que estão envolvidos em controlos dos pontos de controlo para a reparação do DNA tais como a ATM e o Nbs.

Tal como foi apresentado anteriormente a importância do método contém a comparação da distribuição

ou a comparação do comportamento das células relativamente às células de controlo (células normais ou de controlo).

- as alterações nos níveis do estado estacionário de proteínas chave que estão envolvidas na regulação do ciclo celular e na reparação. Enquanto é medida uma alteração no nível do estado estacionário nas variações de uma proteína na quantidade de proteínas, por exemplo isto pode resultar de variações nos níveis de expressão, ou em alterações na estabilidade do mRNA, ou em alterações nas modificações da proteína tais como a proteólise, a fosforilação, a ubiquitinilação, ou outras modificações pós-traducionais.

- ao nível da fosforilação de proteínas que são centrais na via de controlo de ATM/ATR/DNA-PKcs. E apresenta alterações após tratamento com as ditas proteínas da invenção. As proteínas que exibem alterações na fosforilação estão melhor descritas na parte experimental que se segue, mas estão aqui listadas de uma forma não limitativa: a ATM, (proteína Mutada da Ataxia-Telangiectasia), a ATR (Ataxia-telangiectasia Relacionada), a DNA-PKcs (subunidade catalítica da Proteína Cinase dependente de DNA), e os seus substrato directos ou indirectos tais como o Chk1 (Ponto de Controlo da Cinase 1), o Chk2 (Ponto de Controlo da Cinase 2), o Brca1 (susceptibilidade do Cancro da Mama 1), o

Brca2 (susceptibilidade do Cancro da Mama 2), o Mre11 (recombinação Meiótica 11), o Rad50 (proteína de reparação da ruptura de cadeia dupla de Radiação 50), o Nbs1 (síndrome da ruptura de Nijmegen), o Rad51 (proteína de reparação da ruptura de cadeia dupla de Radiação 51), o FANC-A,C,E,F e G (proteínas de complementação da anemia de Fanconi), as histonas, as helicases do tipo BLM (mutação do síndrome de Bloom), o WRN (mutação do síndrome de Werner), a p53, etc.. São particularmente preferíveis os marcadores moleculares e bioquímicos: Nbs, Mre11, Rad51, p53, Chk2, Brca1.

Numa forma de realização particular específica é representado através das variações induzidas em p53 e nos alvos transcrpcionais directos ou indirectos de p53 tais como o p21^{CIP/WAF1}, e o 14-3-3 sigma. A análise de alterações nos níveis destas proteínas ou alterações na actividade e/ou estado de fosforilação destas proteínas após o tratamento com as proteínas da invenção representa um aspecto importante da invenção e é de particular interesse para diagnósticos. Estas medições podem ser utilizadas tal como é bem conhecido na área, por exemplo por métodos imunológicos (por exemplo transferência western) com anticorpos específicos por exemplo para a forma fosforilada das proteínas tal como no caso para um aumento na forma fosforilada de p53 como detectado com anti-p53-S15P. Tal como é demonstrado em maior detalhe na parte experimental seguinte, o tratamento de diferentes linhas celulares com

as proteínas da invenção resulta num aumento da proteína p53 e/ou dos níveis de fosforilação.

- as alterações das distribuições celulares de complexos onde proteínas importantes para os controlos do ciclo celular ou para os controlos que são importantes na resposta acentuada na reparação do DNA. Estas variações podem ser observadas a partir da resposta celular no focus nuclear onde o complexo Rad/Mre11/Nbs está localizado (Zhong Q. et al. 1999, Science 285: 747-750), a fosforilação de Tre68 de Chk2, a fosforilação de ATM, a fosforilação da Histona 2AX-Ser135 como analisadas através de métodos imunológicos.

- Alternativamente é possível seguir as variações das distribuições citoplasmáticas/nucleares dos complexos Cdc2/ciclinaB1, Cdc25C, p21^{CIP/WAF1} e 14-3-3 sigma comparando variações de células mutantes versus normais em resposta ao tratamento com as proteínas da invenção. Isto pode ser efectuado por exemplo através da marcação fluorescente específica para um destes componentes e análise com o microscópio como está descrito no exemplo experimental 12;

- a apoptose pode ser medida através de métodos bem conhecidos na área, por exemplo por análise de FACS, pela libertação do citocromo C ou através das

actividades da caspase ou por marcação com anticorpos específicos de Anexina V. Um aumento na apoptose pode ser detectado por exemplo por análise de FACS como um aumento do conteúdo de DNA sub G1 em neuroblastomas após o tratamento das células com proteínas da invenção.

- Os efeitos que são induzidos a partir do tratamento com proteínas da invenção podem ser também analisados através da medição das actividades clonogénicas ou das capacidades proliferativas com reacções coloridas bem conhecidas na área. Alternativamente os efeitos a longo prazo das proteínas podem ser determinados por exemplo pela actividade tumorigénica ou invasiva em sistemas animais modelos.

As selecções das composições capazes de modular o dano genómico das proteínas da presente invenção podem ser analisadas através da troca de cromátídeos irmãos (SCE), análise da ploidia, amplificações genéticas, perda de heterozigocidade e através de outros ensaios bem conhecidos na área.

Finalmente, a invenção requer um método para a medição das predisposições genéticas para o desenvolvimento de tumores ou da sensibilidade genotóxica (por exemplo sensível à radiação ou agentes intercalantes), testado nas células obtidas a partir de amostras desconhecidas (por

exemplo a partir de biópsia) que inclui essencialmente tratamentos com proteínas da invenção, preferencialmente em paralelo com células de controlo, e a medição sucessiva dos níveis de expressão ou de activação de ambos os oncogenes tais como por exemplo o myc, o rãs; ou de genes supressores de tumores, tais como por exemplo o ARF, o p16, o p53, o Brcal por reagentes de ensaio específico incluindo métodos imunoenzimáticos.

Onde as mutações de componentes no sistema de controlo do ciclo celular (ponto de controlo) levam a um aumento na susceptibilidade do tumor, os defeitos genéticos nos genes que codificam para os factores que estão envolvidos na reparação da ruptura do DNA de cadeia dupla apresentam baixa penetrância, embora se a combinação destes defeitos com outros factores de risco, o que pode ser por exemplo um aumento dos níveis de espécies reactivas de oxigénio (ROS), factores de inflamação crónica, podem determinar uma maior incidência em tumores.

Em síntese a invenção refere-se a certos procedimentos diferentes que na sua totalidade são caracterizados pelo facto de utilizarem os polipeptídeos da invenção em células in vivo, ex vivo ou in vitro. Em particular, os procedimentos de acordo com a invenção contêm procedimentos de diagnóstico para avaliar um dano genético co-envolvido nos controlos do ciclo celular e na reparação do DNA e também procedimentos para uma selecção de compostos com uma actividade biológica que é capaz de

modular estas actividades de controlo. Alguns aspectos diversos da invenção têm por base a actividade biológica dos polipeptídeos quiméricos da invenção que, devido à indução de uma ruptura de DNA de cadeia dupla com a especificidade acima descrita activa as vias de controlo para o ciclo celular e para a reparação do DNA (ponto de controlo).

Tal como é observado e descrito mais detalhadamente na secção dos exemplos, e como uma consequência da indução das rupturas de DNA de cadeia dupla monoespecíficas, os polipeptídeos da invenção exibem actividade terapêutica e em particular antiproliferativa e anti-tumorigénica. Esta actividade representa assim um assunto adicional da invenção. A invenção inclui assim composições farmacêuticas contendo como uma substância activa os polipeptídeos ou polinucleótidos que codificam estes polipeptídeos como descrito na invenção. Adicionalmente, a invenção inclui a utilização dos polipeptídeos quiméricos da invenção e/ou os polinucleótidos que codificam esses polipeptídeos, para a preparação de fármacos para a prevenção, a terapia ou o diagnóstico de doença neoplásica ou predisposição para esta doença.

Uma forma de realização adicional da invenção inclui a utilização diagnostica dos polipeptídeos ou dos polinucleótidos da invenção no diagnóstico de patologia tumoral ou para o diagnóstico de uma predisposição para estas doenças como descrito em detalhe na secção dos exemplos.

Como uma forma de realização preferencial o tratamento das células com as proteínas da presente invenção, por exemplo para a sua utilização em diagnóstico é utilizado como descrito acima é aplicada para as amostras tese e em paralelo para linhas celulares que não contêm a mutação putativa (controlo). Numa forma de realização ainda mais preferencial do ensaio adicional os tratamentos de controlo são incluídos nas experiências com as proteínas quiméricas da invenção através da utilização de linhas celulares de teste que contêm por exemplo mutações em passos seleccionados nas vias de reparação do DNA o que permite por comparação, um mapeamento preciso das alterações genéticas respectivas.

Após um longo período de tempo, tal como 24 horas após a administração das proteínas da invenção é possível detectar um efeito diferencial dependendo se as células são capazes de reparar o dano genético (rupturas de DNA de cadeia dupla, DSB) que são induzidas pelas proteínas da invenção e se em tal caso a distribuição das populações celulares nas várias fases do ciclo celular regressa ou não ao normal. Em células com mutações do gene que codifica para a ATM ou por exemplo noutros genes que codificam para produtos que estão envolvidas na via de reparação do DNA da NHEJ (Junção Terminal Não Homóloga) a apoptose não pode ser imediatamente observada mas constitui um efeito indirecto com baixa incidência. Pelo contrário, em células de neuroblastoma a apoptose é induzida imediatamente e de uma

forma directa. No geral a invenção inclui numa forma de realização adicional a utilização das proteínas quiméricas e dos polinucleótidos que codificam essas proteínas para induzirem a apoptose nas células de origem neuronal, e preferencialmente para o neuroblastoma e assim para a preparação de um fármaco para o tratamento de tumores de origem neuronal.

A indução da apoptose em neuroblastomas correlaciona-se com a deleção 1p36 em combinação com a amplificação do oncogene myc-N de minuto duplo (DM). Esta hipersensibilidade não se correlaciona com a presença da translocação 17q15. As amplificações myc-N DM são agregados epissomais myc-N, conhecidos como as formas mais agressivas de NB amplificado por myc-N e possuem prognósticos extremamente baixos. Grande parte do NB maligno agressivo exhibe este tipo de amplificação oncogénica. Noutra forma de realização particular outros tumores que contêm amplificação DM de oncogenes tais como por ilustração mas não para exclusão, estão também incluídos o tratamento da próstata contendo DM ou tumores da mama. Em geral as moléculas quiméricas que são acopladas a tais compostos podem ser utilizadas para a preparação de um fármaco para o tratamento de tumores seleccionados.

A resposta celular a um tratamento com as proteínas da invenção é diferente de células que tenham quer uma mutação nas vias de reparação do DNA ou que exibam alterações em componentes que são responsáveis pelo

controlo dessas vias para o ciclo e/ou reparação celulares (ponto de controlo). Por isso a presente invenção contém uma série de procedimentos, todos eles substancialmente caracterizados pelo facto de utilizarem a indução de DSB no genoma de uma célula de teste através da aplicação da forma de realização preferencial das moléculas quiméricas de acordo com a invenção e para analisarem as respostas com ensaios como descrito acima, preferencialmente através da comparação dos resultados da amostra de teste com células padrão o mais possível de natureza isogénica.

Os efeitos das proteínas da invenção no ciclo celular e nos mecanismos para a reparação do DNA são sinérgicos na presença de indutores de radicais livres (ROS), estes podem ser por exemplo H_2O_2 . Este efeito sinérgico é observado também em concentrações muito baixas da proteína quimérica, preferencialmente abaixo dos 10 nm da proteína SCPVUTAT e abaixo de 10 μM de H_2O_2 . Por isso a invenção contém um procedimento para uma indução de DSB no genoma que é caracterizado pelo facto de que as proteínas da invenção são utilizadas em combinação com os produtores de oxigénio reactivo (ROS), por exemplo o H_2O_2 . Este processo pode também ser utilizado para uma selecção de compostos antagonísticos e sinérgicos.

A indução de DSB numa célula in vivo activa de uma resposta celular e molecular similar aquela que é induzida por radiação ionizante frequentemente utilizada para terapia antitumoral; mas comparada com esta apresenta

efeitos colaterais reduzidos. Assim uma forma de realização adicional na invenção contém a utilização dos polipeptídeos quiméricos da invenção para a preparação de fármacos com actividade antitumoral ou para a terapia, o diagnóstico ou a prevenção de doenças genéticas que por seu turno definem a predisposição de um indivíduo para desenvolver doenças causadas por uma desregulação da actividade proliferativa de uma célula e em particular a doença neoplásica que inclui produtos de gene essenciais para os mecanismos para o controlo da reparação do DNA.

Com base neste aspecto a invenção compreende um método terapêutico baseado essencialmente na administração in vivo ou ex vivo dos polipeptídeos quiméricos da invenção como definido acima, onde é necessário um efeito antiproliferativo, preferencialmente anti-tumorigénico.

Uma forma de realização adicional da invenção contém um procedimento para o diagnóstico in vitro de um defeito genético ou somático na reparação de DNA ou em defeitos da regulação do ciclo celular de células isoladas obtidas a partir de uma amostra biológica e consiste essencialmente no seguinte:

- a) O crescimento de células isoladas em cultura em que uma se destina a medir a eficiência ou o dano nas vias de reparação do DNA ou nas vias do ciclo celular.

b) A incubação destas células com a molécula preferida da invenção, onde a enzima modificadora é uma endonuclease de classe II, e ainda mais preferencialmente a forma de realização de cadeia simples da enzima PvuII (SCPVU). Vantajosamente em paralelo um tratamento das células é também efectuado com um polipeptídeo de controlo que exhibe actividade de ligação ao DNA específica mas é para a actividade de nuclease reduzida como por exemplo o SC34. Opcionalmente, adicionalmente um tratamento paralelo de linhas celulares viáveis que são mutadas e/ou defectivas na reparação do DNA, os controlos de reparação de DNA e/ou do ciclo celular onde estas linhas são de preferência maioritariamente de natureza isogénica;

c) Caracterização e medição das repostas celulares;

d) Comparação opcional para uma linha celular de controlo.

Para duas ou mais linhas celulares isogénicas é destinado que exibam uma base genética similar tanto quanto possível como por exemplo as linhas celulares: MRC-5 e AT-5; CHO-K1 e KU70 ou M059K e M059J como descrito e utilizado nos exemplos experimentais abaixo. As linhas celulares de controlo padrão podem ser também uma linha celular normal sem alterações nas vias de controlo do ciclo celular e de

reparação do DNA, e deveriam ser o mais isogénicas possível para a amostra de teste, ou uma linha celular com uma alteração genética bem caracterizada.

Numa forma de realização preferencial do procedimento da invenção as células de teste e as células de controlo crescem juntas e sob condições idênticas. Assim são mantidas e comparadas de uma forma directa, as diferenças nos marcadores em cultura, destes por exemplo: a capacidade clonogénica, a % de células em apoptose ou em quiescência, medida como por exemplo pela determinação da capacidade proliferativa com células vivas coloridas, ou através de medições de marcadores bioquímicos, dos descritos acima. Um exemplo deste tipo de ensaio é descrito em Torrance C. J. et al., 2001, Nature Biotechnology, 19, 940-945.

Numa forma de realização preferida para a caracterização da resposta descrita em c) é utilizada uma medição da actividade clonogénica, tal como é bem conhecida na área, tal como por exemplo pelo crescimento de células em cultura ou pela medição da actividade clonogénica com o crescimento em soft-agar, ou por análise de FACS após coloração do DNA.

Uma forma de realização particularmente útil descrita na invenção e de particular utilização para diagnósticos e/ou prognósticos para avaliar: a predisposição genética para o desenvolvimento de doença neoplá-

sica, sensibilidade em terapia de tumores, em particular tolerância através de tratamentos antitumorais radio- ou quimioterapêuticos de um paciente, ou também sensibilidade do tecido tumoral em comparação com tecidos saudável por razões prognósticas.

A invenção contém também estojos ("kits") para efectuar os procedimentos da invenção, ou seja estojos ("kits") de diagnóstico ou estojos ("kits") para pesquisa preferidos.

Algumas formas de realização preferenciais do estojo ("kit") contêm:

- 1) um tubo contendo um polipeptídeo quimérico, preferencialmente a endonuclease quimérica escolhida entre a EcoRV, a PvuII ou a HinfI como uma forma de realização de cadeia simples em fusão com o peptídeo de transferência Tat, ou um vector de expressão que contém os polinucleótidos que codificam para as proteínas quiméricas, em combinação com um tubo que contém o polipeptídeo de controlo uma proteína quimérica que exhibe a proteína de ligação ao DNA específica mas que reduzida é na actividade da endonuclease, ou um vector de expressão que contém os polinucleótidos que codificam para esta proteína quimérica. Numa forma de realização preferencial o estojo ("kit") consiste num tubo que contém a proteína quimérica SCPVUTAT e outro tubo

que contém vantajosamente a proteína quimérica SC34 sob a forma liofilisada ou numa solução aquosa;

2) o estojo ("kit") contém opcionalmente um tubo com um anticorpo contra a totalidade ou partes do polipeptídeo quimérico, preferencialmente um anticorpo anti-SCPVUTAT;

3) o estojo ("kit") contém opcionalmente um tubo ou um frasco contendo células controlo como definido acima, por exemplo células que são hipersensíveis a DSB ou células que contêm mutações bem caracterizadas em genes que codificam para proteínas que estão envolvidas na reparação do DNA e nas vias do ciclo celular e nos seus controlos (ponto de controlo). Tais células poderão estar contidas como stocks congelados ou em frascos adaptados para transporte;

4) o estojo ("kit") contém opcionalmente reagentes quimioterapêuticos tal como agentes intercalantes, radiomiméticos, ou outros tipos de químicos incluindo fármacos para determinar e comparar os efeitos qualitativos e quantitativos.

Como uma forma de realização adicional importante que tem por base as actividades dos polipeptídeos quiméricos preferenciais a invenção contém um procedimento para seleccionar composições que modulam, são

sinérgicas, antagónicas e que não alteram a actividade e/ou os controlos da reparação do DNA do genoma e para a estabilização genómica num sistema celular utilizando rastreios de elevada produtividade baseada em células, incluindo essencialmente como se segue:

a) a incubação de células de teste com as proteínas quiméricas da invenção preferencialmente na presença de um polipeptídeo de controlo apropriado (no caso específico consistindo numa molécula quimérica que contém actividade de ligação ao DNA específica mas exhibe actividade de endonuclease reduzida tal como o polipeptídeo quimérico SC34), opcionalmente também na presença de substâncias sinérgicas tal como por exemplo o H_2O_2 ou outros produtores de radicais e/ou outras substâncias moduladoras ou antagónicas;

b) opcionalmente em paralelo a incubação é também efectuada com outras, células de controlo que são tanto quanto possível isogénicas com a célula de teste, por exemplo as mesmas células contendo um gene repórter. Vários genes repórter são bem conhecidos na área, entre eles por exemplo as proteínas EGFP e os seus mutantes como descrito por exemplo em Torrance et al., 2001, Nature Biotechnology, 19, 940-945; ou outros tipos de repórteres que permitem uma leitura automática eficiente do ensaio;

c) a adição de composição que são supostas serem testadas quanto a uma potencial actividade ou não actividade, entre elas por exemplo moléculas simples ou bibliotecas químicas ou colecções de químicos, peptídeos ou outros ou colecções de amostras biológicas;

d) a leitura da resposta celular é preferencialmente efectuada de um modo automático, e preferencialmente com instrumentações de rastreios de elevada produtividade (HTS). Exemplos disso são os sistemas que se baseiam na medição de variações de um fenótipo morfológico como um sinal fluorescente induzido como uma resposta para substâncias de controlo e substância de teste positivas que apresentam actividade biológica numa célula. A resposta celular que consiste em qualquer sinal celular ou sinal de marcadores bioquímicos incluídos, ou também a detecção de parâmetros celulares tal como por exemplo o fluxo de cálcio, corrente de radicais, alteração no citocromo C, combinado com um sistema que permite a detecção automática.

Durante este procedimento da invenção a ordem dos passos b) e c) pode ser invertida.

Este ensaio permite a selecção de composições que contêm actividades biológicas importantes para o controlo

do ciclo celular, para as vias de reparação do DNA, para a indução da apoptose, para a indução da senescência, ou através da interrupção de uma via que por seu turno causa a activação de outra via.

Podem ser aplicados ciclos de selecção adicionais após a modificação vantajosa dos compostos isolados das primeiras rondas de um rastreio, para finalmente obter composições farmacologicamente mais adaptáveis ou também para seleccionar vantajosamente características adicionais tal como por exemplo a biocompatibilidade ou a estabilidade do produto.

Apesar dos aspectos adicionais derivarem dos acima descritos, a invenção contém um método para induzir bloqueios do ciclo celular ou alternativamente para induzir a apoptose preferivelmente em células de origem neuronal ou alternativamente para induzir a reparação do DNA em células isoladas, com base numa utilização das moléculas quiméricas da invenção, preferencialmente representadas por endonucleases de restrição de classe II, e ainda mais preferencialmente como uma forma de realização de cadeia simples, e ainda mais preferencialmente pela enzima SCPVUTAT, bem como polinucleótidos que codificam para estas moléculas, e onde este efeito é sinérgico na presença de composições tais como por exemplo produtores de radicais livres. Estes métodos são baseados essencialmente no princípio de induzir rupturas de DNA de cadeia dupla pelos polipeptídeos quiméricos da invenção.

Uma forma de realização adicional da invenção contém um procedimento para a selecção de novas sequências de penetração e a selecção de sequências auxiliares. Nesta forma de realização as sequências de penetração ou auxiliares não consistem num composto singular mas sim num composto de bibliotecas moleculares que é utilizado para seleccionar os domínios putativos de penetração ou auxiliares. Estes procedimentos são bem aplicáveis com rastreios de elevada produtividade que permitem a análise de muitas amostras diferentes. Os princípios descritos na invenção para diagnóstico são também a base para procedimentos de rastreio e permitem a descoberta de novas sequências de penetração e sequências auxiliares basicamente para qualquer tipo de célula ou organismo. Os aparelhos automáticos e robóticos permitem uma performance dos passos abaixo com capacidades de elevada produtividade. Isto pode ser efectuado com unidades de pipetagem e de leitura conhecidos na área. Para ilustração mas não para exclusão para um rastreio de sequências específicas auxiliares ou de penetração consistem essencialmente nos seguintes passos:

1. Para sequências auxiliares específicas a sequência de penetração é constante e as bibliotecas das proteínas quiméricas da invenção são construídas com métodos da área. Por exemplo, para o N terminal das proteínas quiméricas da invenção vários fragmentos de cadeia leve e de CDRL funci-

onal são fundidos e depois misturados com as mesmas proteínas da invenção que são fundidas a proteínas da imunoglobulina de cadeia pesada variáveis incluindo regiões CDR1-3H funcionais. Isto é obtido por técnicas recombinantes num sistema de expressão de dois plasmídeos preferencialmente em *E. coli*. Em geral bibliotecas de imunoglobulinas ou de fragmentos de imunoglobulinas, ou de proteínas de ligação ao receptor ou de bibliotecas aleatórias produzidas a partir de origem sintética ou natural podem ser ligadas às proteínas da invenção por técnicas recombinantes ou outros métodos de acoplagem também descritos acima. Por exemplo para ilustração, as bibliotecas de fragmentos de anticorpos podem ser ligadas às proteínas da invenção através da ligação à proteína A contida nas moléculas da invenção.

2. Para o caso de uma sequência de penetração as bibliotecas de rastreio podem ser obtidas por técnicas bem conhecidas na área. Por exemplo estas bibliotecas são obtidas a partir de origens naturais ou de origens sintéticas incluindo os compostos de qualquer classe. Para uma forma de realização vantajosa particular as sequências de penetração bacterianas são rastreadas para fragmentos de DNA aleatórios a partir da mesma ou de espécie diferentes.

3. As bactérias que expressam proteínas da biblioteca são crescidas e induzidas para a produção de proteínas. Estas proteínas podem ser isoladas a partir dos sobrenadantes de sistemas de secreção mas também a partir da lise das células seguido da preparação de afinidade de elevada produtividade das proteínas quiméricas utilizando por exemplo várias extremidades de afinidade como por ilustração uma cauda de poli-histidinas, uma cauda GST, uma cauda de proteína A, uma cauda myc, uma cauda HA, ou a biotina.

4. Estas proteínas são utilizadas para analisar a função ou a função diferencial de uma dada molécula da biblioteca. Se as sequências são funcionais as proteínas quiméricas são funcionais. Este é o caso em que elas são capazes de atravessar as membranas celulares e eventualmente as nucleares e se ligarem ao DNA e ocasionalmente introduzirem DSBs. Ou para o rastreio auxiliar, quando a função pode ser detectada em células seleccionadas. A detecção pode ser efectuada como descrito acima. As células ou tecidos de teste podem ser de qualquer origem incluindo as células procarióticas onde a função das proteínas quiméricas da invenção pode ser detectada de um modo como por exemplo o descrito acima.

6. Numa forma de realização particular útil células de teste são transfectadas estavelmente com

EGFP (proteína de fluorescência verde estimulada) para uma fácil leitura;

7. Numa outra forma de realização particular útil as células de controlo são estavelmente transfectadas diferencialmente por exemplo com EYFP (proteína de fluorescência amarela estimulada);

8. As células de teste e de controlo são crescidas quer separadamente quer misturadas em dispositivos de multipoços ou em membranas específicas. As células podem ser bastante similares apenas com pequenas alterações (isto é utilizadas para encontrar sequências auxiliares tais como células tumorais e não tumorais da mesma origem) ou bastante diversas (isto é as células de teste estão onde a transferência deve ocorrer mas para as células de controlo nenhuma transferência deve ter lugar; isto inclui também células de diferentes espécies tais como a célula de teste é uma célula bacteriana e as células de controlo são de origem humana). A escolha das células permite qualquer combinação técnica possível.

9. As proteínas são adicionadas aos sobrenadantes das células e incubadas;

10. A leitura será para a função da molécula quimérica como a descrita nos exemplos acima. Num

exemplo vantajoso particular a detecção é para células verdes e amarelas preparadas como anteriormente. As proteínas que produzem significativamente mais células amarelas do que células verdes são seguidamente isoladas como clones únicos, com novo rastreio e análise com procedimentos recombinantes e de espectrometria de massa bem conhecidos na área. Numa aplicação preferida onde as moléculas quiméricas introduzem o dano do DNA após a entrada nas células, este ensaio pode ser efectuado ainda mais sensivelmente. As células de teste (isto é as células tumorais) e as células de controlo (isto é as comparáveis não tumorogénicas) são submetidas hipersensitivamente à introdução de DSBs por disrupção de genes ou por silenciamento de genes ou introduzindo o dominante negativo ou o ganho dominante dos mutantes funcionais. Isto é obtido por método bem conhecidos na área tais como por co-transfecção com siRNA, através de vectores que expressam os siRNAs, vectores alvo para disrupções de genes ou mutagénese, vectores para a expressão de mutantes ou sobprodução de proteínas que inibem funções importantes na reparação do DNA e apresentam hipersensibilidade às DSB inibidores ou activadores químicos. Isto permite uma leitura mais rápida e mais diferenciada a baixas concentrações. Por exemplo a inibição siRNA de Ku70, Ku80, DNAPKcs, ATM, XRCC4 e Ligase IV, Bcl2. Mas também a inibição de ATM por compostos químicos tais como a

cafeína. Podem ser introduzidos o p53 ou outros factores reguladores da apoptose.

11. Para confirmação final adicional das sequências a partir de um novo rastreio, são utilizados preferencialmente os passos automáticos:

- Os clones são confirmados com proteínas puras
- As concentrações são tituladas;
- Verificação das sequências seleccionadas em formas de realização de nuclease estagnadas;
- Teste de outras células;
- Teste em ratos quanto à toxicidade.

A presente invenção é adicionalmente descrita pelos seguintes exemplos e pelas figuras ilustrativas, ainda que não seja restrita a estes.

Figura 1. Purificação de SCPVUTAT de E. coli.

Expressão e purificação de SCPVUTAT.

As células de E. coli que contêm o plasmídeo de expressão para SCPVUTAT foram induzidas para a expressão da proteína e foi efectuada a purificação como descrito na

parte experimental. NI e I representam a totalidade dos extractos celulares de E. coli não induzida ou induzida respectivamente. H1 e H2 são os picos das fracções obtidas a partir da purificação na coluna de agarose Hi Trap com quelante Ni^{++} ; S1 e S2 são os picos das fracções obtidas a partir da purificação na coluna de SP-Sefarose; M representa os marcadores de massa molecular (desde o topo à base em kDa: 94, 67, 43, 33, 20, 14); SCPVU representa a proteína que não contém a sequência TAT e que é purificada de uma forma similar.

Figura 2. Análise imunológica dos extractos de proteína a partir de células U2OS após a tradução da proteína.

As proteínas analisadas foram: um aumento das concentrações de SCPVUTAT (1, 19, 50, 100, 200 nM; linhas 2-6), de SCPVU (200 nM, não contém a sequência TAT, linha 7), de SC34 (200 nM, derivado de SCPVUTAT que não exhibe nenhuma actividade enzimática, linha 8), do controlo (não há adição de proteínas às células, linha 1). Dez minutos após a adição das proteínas aos sobrenadantes da cultura celular, os extractos foram preparados após a lavagem extensiva com PBS, separados em SDS-PAGE e analisados por imunoblotting com anticorpos monoespecíficos para PvuII (painel da base, IMPORTAÇÃO). Para uma comparação as alíquotas dos sobrenadantes da cultura celular obtidas antes da preparação dos extractos foram incluídas na análise (painel de cima, SOBRENADANTE).

Figura 3. Análise de imunofluorescência através do microscópio confocal.

Após 30 minutos da tradução da proteína com SCPVUTAT as células foram lavadas, fixadas com PFA a 3%, marcadas com anticorpos monoespecíficos de PvuII e coradas com anticorpos secundários conjugados com FITC para análise de imunofluorescência confocal (verde, painel de baixo). Adicionalmente a co-coloração do DNA foi obtida com propídio J⁻ após a digestão com a RNase A (vermelho, painel de cima).

Figura 4. Análise de TUNEL para a detecção de DSB num nível de célula única.

As células U20S foram tratadas com SCPVUTAT e os DSBs foram analisados com o microscópio confocal de imunofluorescência após marcação com TdT na presença de dUTP-FITC (TUNEL). O tratamento foi com 10 mM de SCPVUTAT para os períodos de tempo indicados.

Figura 5. Atrasos no ciclo celular dependentes da nuclease induzidos por SCPVUTAT.

A distribuição das várias fases do ciclo celular das células que traduzem a proteína foi analisada por análise FACS. Foi detectada a distribuição do conteúdo de DNA das populações celulares. 2n representa um DNA diplóide

equivalente (não replicado, de fase G1), $4n$ representa o DNA tetraplóide equivalente (replicado; de fase G2/M). Para a análise de FACS as células foram separadas empregando o modo DDM que permite estimular o conteúdo de DNA de uma única célula. As células U20S foram crescidas durante 24 horas (gráfico superior) ou durante 48 horas (gráfico inferior) na presença do aumento da quantidade de SCPVUTAT (10 nM, 50 nM, 100 nM) como indicado e apenas com uma adição de proteínas; células não tratadas (controle); células tratadas com um nuclease reduzida derivada de SCPVUTAT (SC34, 100 nM). Todos os histogramas apresentados representam uma medida do conteúdo do DNA relativamente ao número de células como indicado apenas no painel superior direito.

Figura 6. Actividades de cinase induzidas por SCPVUTAT.

A determinação da actividade de cinase da ciclina B1 utilizando a histona H1 como um substrato e imunoprecipitados específicos da ciclina B1 de extractos de proteína obtidos a partir do crescimento de células U20S, não tratadas ou tratadas com SCPVUTAT (100 nM), ou tratadas com nocodazole (0,2 µg/ml) durante 30 horas. Os imunoprecipitados específicos da ciclina B1 foram incubados com a histona H1 na presença de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP e as misturas de reacção foram separadas em SDS-PAGE e foram analisadas por autoradiografia. Os números em baixo indicam as actividades relativas determinadas por análise com um phospho-imager.

Figura 7. Marcadores biológicos para o controlo do ciclo celular após o tratamento de SCPVUTAT.

A) A indução de p53 através DSBs contendo extremidades cegas de 3'-OH e 5'-fosfato. As células U20S (linhas 1-7) e HCT116 (linhas 8-14) foram tratadas com SCPVUTAT (100 nM, SC), ou com adriamicina (doxorubicina, 0,02 pg/ml, AD) pelos períodos de tempo indicados; as células não tratadas foram utilizadas como controlo (linha 0). Os extractos foram preparados, separados em SDS-PAGE e analisados por imunoblotting com anticorpos específicos para p53 (painel superior, p53) ou para PARP (painel inferior, PARP).

B) A reposta de reparação da proteína mutada da Ataxia-Telangiectasia (ATM) para SCPVUTAT. A fosforilação Ser¹⁵ de p53 dependente de SCPVUTAT. As linhas celulares MRC5 de ATM positiva foram tratadas com SCPVUTAT (100 nM, SC) ou com hidroxiureia (1 mM, HU) durante os períodos de tempo indicados; foram utilizadas como controlo células não tratadas (0). Os extractos foram preparados, separados em SDS-PAGE e analisados por imunoblotting com anticorpos específicos para p53 Ser¹⁵ (painéis superiores, Ser¹⁵, p53), ou para a actina (painel inferior, actina).

C) A reposta de reparação da proteína mutada da Ataxia-Telangiectasia (ATM) para SCPVUTAT.

A sensibilidade da cafeína da fosforilação Ser¹⁵ de p53 dependente de SCPVUTAT. As células AT-5, negativas para a ATM foram tratadas com SCPVUTAT (100 nM, SC) ou com hidroximiureia (1 mM, HU) na presença de cafeína (2 mM) durante 4 horas; foram utilizadas como controlo células não tratadas e células tratadas apenas com cafeína. Os extractos foram preparados, separados em SDS-PAGE e analisados por imunoblotting com anticorpos específicos quer para p53, p53 Ser¹⁵ (painéis superiores, Ser¹⁵, p53), ou para a actina (painel inferior, actina).

Figura 8. A indução do bloqueio do ciclo celular e a actividade clonogénica por SCPVUTAT de células mutadas para a ATM (AT-5) em comparação com células não mutadas (MRC-5).

A) A distribuição do conteúdo de DNA durante o ciclo celular detectada por análise FACS de células AT-5 após 36 horas de tratamento com SCPVUTAT (25 nM, 100 nM), ou com adriamicina (0,02 µg/ml; ADRIAMICINA), ou com SC34 (100 nM) e como controlo a partir de células não tratadas. Os histogramas representam o conteúdo de DNA relativo aos membros celulares; o painel à direita indica a percentagem das distribuições correspondentes das várias fases do ciclo celular como calculado com o pacote de programa MODFIT™.

B) Ensaio de formação de colónias com linhas celulares mutadas para a ATM e induzidas para danos de DNA por SCPVUTAT. Foram tratadas várias diluições de AT-5 ou de MRC-5 (que servem como controlo positivo de ATM) durante 60 minutos com SCPVUTAT (25 nM, barras cinzentas; 100 nM, barras pretas) ou não tratadas (barras brancas); as células foram lavadas e cresceram então durante 7-10 dias, foram coradas com GIEMSA e foram contadas as colónias. É apresentado através de histogramas um resumo dos resultados e representa o meio de três experiências independentes com desvios padrão numa escala de 10%-15% como apresentado. As células não tratadas representam os 100%, a barra preta das células AT-5 ficou muito perto dos 0% e por isso não está indicada.

Figura 9. A comparação das actividades clonogénicas de células com mutações selectivas em proteínas únicas envolvidas na via de NHEJ.

O ensaio clonogénico de células CHO que foram mutadas para as proteínas envolvidas na via de reparação de NHEJ tratadas com SCPVUTAT. As linhas celulares utilizadas foram a AA8 (linha parental), a V3 (DNA-PC_{CS}^(-/-)), a xrss5 (KU80^(-/-)) e a XR-1 (XRCC4^(-/-)), a HIS P1.13-11 (KU70^(-/-)) e a linha celular parental correspondente de CHO-K1. Várias diluições das células CHO contendo as mutações NHEJ como indicado foram tratadas durante 24 horas com SCPVUTAT (25

nM, barras cinzentas; 100 nM, barras pretas) ou não tratadas (barras brancas); as células foram lavadas e cresceram então durante 7-10 dias, foram coradas com GIEMSA e foram contadas as colónias. É apresentado através de histogramas um resumo dos resultados e representa o meio de três experiências independentes com desvios padrão numa escala de 10%-15% como apresentado. As células não tratadas representam os 100%, a barra preta das células V3 (DNA-PC_{CS}^(-/-)) ficou abaixo dos 1% e por isso não está indicada.

Figura 10. A indução diferencial de apoptose em células de neuroblastoma após tratamento com SCPVUTAT.

A análise de FACS do conteúdo de DNA corado com propídio J⁻, das células de neuroblastoma GI-LIN após tratamento com SCPVUTAT (10 nM, painel C; 100 nM painel B). O tratamento das amostras foi efectuado durante 30 horas. Foram utilizadas como controlo amostras tratadas com SC34 (100 nM, painel D) ou não tratadas (painel A). Está indicada na base de cada painel a percentagem representativa das distribuições das fases do ciclo celular obtidas (G1/S/G2-M). (A) indica as células apoptóticas.

Figura 11. Os efeitos sinérgicos de baixas concentrações de SCPVUTAT e concentrações sub-letais de H₂O₂.

As células U20S foram incubadas com SCPVUTAT (10 nM, painel B), ou com H₂O₂ (10 µM, painel C), ou ambos

(SCPVUTAT, 10 nM; H₂O₂, 10 µM; painel D), ou com nenhum agente como controlo (painel A). As células posteriormente tratadas foram analisadas por FACS relativamente ao conteúdo de DNA; a percentagem das várias fases do ciclo celular está indicada nas bases dos histogramas individuais.

Figura 12. A análise microscópica da fosforilação da histona 2AXSer-139 e a inibição deste efeito através da cinase inibidora de PI3/ATM Wortmanin.

As células U20S foram tratadas com SCPVUTAT (100 nM, coluna central) durante 60 minutos, adicionalmente o tratamento foi efectuado com Wortmanin (50 µM, WM, coluna da direita), ou com nenhum agente como controlo (coluna da esquerda). Após o tratamento as células foram coradas com anticorpos específicos para a H2AX-Ser-139 fosforilada (vermelho) ou para a histona 2B (que serve como controlo, verde) e analisadas a um nível de célula única por microscópio de fluorescência.

Figura 13. A determinação da hipersensibilidade de células mutadas para a subunidade catalítica da proteína cinase dependente de DNA (DNA-PK_{CS}) através de análise automática.

A) A capacidade proliferativa de células mutadas e de células normais comparáveis foi avaliada com um dispositivo de imagem Versadoc 4 (BioRad)

utilizando células coloridas. A análise estatística dos resultados foi efectuada e é representada como um histograma.

O ensaio de formação de colónias com as linhas celulares humanas de glioblastoma M059J (DNA-PK_{CS}^(-/-)) comparadas com as células de M059K (DNA-PK_{CS}^(+/+)) após o tratamento com SCPVUTAT. É apresentado um exemplo de um ensaio de formação de colónias. O ensaio é efectuado empregando várias concentrações de células na ordem de três magnitudes (dos níveis superiores para os inferiores, 1×10^4 , 2×10^3 , 4×10^2 , 8×10). São apresentados à direita B), os histogramas dos resultados do ensaio de formação de colónias das linhas celulares M059J comparadas com os das M059K. Os ensaios foram efectuados tal como na Figura 9 mas analisados com a ajuda do sistema Versadoc 4 (BioRad). Barras brancas: amostras não tratadas; barras cinzentas: 25 nM de SCPVUTAT; barras pretas: 100 nM de SCPVUTAT.

Figura 14. Distribuição intracelular de proteínas de controlo do ciclo celular após um tratamento com SCPVUTAT.

A análise microscópica das células HCT116 (p53(+/+)) não tratadas, ou tratadas com SCPVUTAT (100 nM) durante 30 horas ou com taxol (0,2 µg/ml). A análise de imunofluorescência foi efectuada com anticorpos primários

específicos para a ciclina B1 ou específicos para Cdc25C e corados com conjugados secundários de FITC (verde, ciclina B1) ou de TRITC (vermelho, Cdc25C).

EXEMPLOS

Exemplo 1

Construção do vector para a expressão das proteínas recombinantes

Para as experiências descritas nos seguintes exemplos foram produzidas as proteínas recombinantes seguintes utilizando métodos bem conhecidos para os peritos na área: SCPVU, uma variante de cadeia simples da enzima endonuclease homodimérica PvuII, já descrita em Simoncsits et al., 2001. Para o C-terminal desta construção foi adicionada a sequência que codifica para GSYGRKKRRQRRR-GGSHHHHHH contendo parte da proteína Tat de HIV e é seguido por uma cauda de seis histidinas. A proteína de fusão recombinante obtida desta forma é denominada SCPVUTAT. Isto resulta num polipeptídeo que é composto pelos aminoácidos de 1-157 da enzima PvuII seguido por um elemento de ligação com a sequência -GSGG que liga a primeira subunidade à segunda subunidade da enzima PvuII (aa 2-157), e é seguida pela sequência GSYGRKKR-QRRRGGG-HHHHHH (peptídeo - tat + cauda 6 histidinas). Adicionalmente, a variante SC34 da endonuclease PvuII (Simoncsits et al., 2001) é produzida como um polipeptídeo de cadeia simples. Este derivado exhibe a actividade de ligação ao DNA específica de PvuII mas é

reduzida na actividade de endonuclease devido a uma mutação (Asp34/Gli34) na posição 34 em ambas as subunidades da enzima PvuII.

Exemplo 2

Expressão das proteínas recombinantes e a sua purificação.

A expressão de SCPVUTAT foi efectuada na estirpe de *E. coli* XL1 MRF' (Simoncsits et al. 2001) e a proteína foi primeiramente purificada numa coluna de afinidade Hi Trap com quelante (5 ml, Amersham Pharmacia Biotech) e seguidamente purificada em SP Sefarose (5 ml Hi Trap SP HP, Amersham Pharmacia Biotech). Na SP-Sefarose as proteínas foram eluídas entre 0,63 M e 0,67 M de NaCl. O rendimento foi aproximadamente de 10 mg de proteína purificada a partir de 1,5 l de meio. A proteína nativa PvuII (não como uma forma de realização de cadeia simples) fundida à sequência TAT foi preparada de uma forma similar. Neste caso a eluição a partir de SP-Sefarose foi de entre 0,81 M e 0,85 M NaCl. Todas as proteínas expressas foram purificadas para homogeneizar assim como para avaliar através de electroforese em gel num SDS-PAGE a 15% e por espectrometria de massa com um API 150 EX (Perkin Elmer) confirmando a massa teórica. As actividades enzimáticas dos derivados das endonucleases obtidas são comparáveis às das enzimas nativas e foram ensaiadas com DNA λ como um substrato.

Exemplo 3

Produção de anticorpos e análise imunológica.

Os anticorpos contra as proteínas recombinantes foram criados e utilizados por métodos padrão como descrito por exemplo: "Using Antibodies: A Laboratory Manual" Ed Harlow, and David Lane; CSH press New York, 1999, ISBN 0-87969-544-7, "Cells: A Laboratory Manual", David L Spector, Robert D. Goldman; Leslie A. Leinwand; CSH press New York, 1998, ISBN 0-87969-521-8. Os anticorpos foram obtidos a partir de imunização de coelhos brancos da Nova Zelândia com antígeno apropriado e o soro foi purificado contra os antígenos correspondentes que foram imobilizados em BrCN-Sefarose (Amersham Pharmacia Biotech). Os extractos celulares para imunoblotting foram obtidos através da lise das células em Tris HCl pH 8,0 a 20 mM, EDTA a 5 mM, NaCl a 150 mM, contendo os inibidores de protease por exemplo o TCPK a 20 µM, TLCK a 20 µM, os inibidores da fosfatase a fosfato de 4-nitrofenil a 60 mM, ou através da lise directa em SDS em tampão de amostra. A análise de imunofluorescência foi efectuada por métodos conhecidos na área por exemplo após a fixação das células em paraformaldeído a 3% ou a fixação numa mistura de 1:1 de acetona e metanol. A análise foi efectuada após a coloração do anticorpo utilizando um microscópio Zeiss Axiovert 100M acoplado a uma unidade confocal LSM510.

Exemplo 4

Tradução de proteína das proteínas quiméricas em linhas celulares eucarióticas.

As seguintes linhas celulares foram utilizadas para os exemplos 4-11:

As linhas celulares defectivas na via de reparação de NHEJ: as linhas CHO: Xrss5 (KU80^(-/-)), XR-1 (XRCC4^(-/-)), V3 (DNA-PK_{CS}^(-/-)), e a linha celular parental correspondente AA8 (ATCC CRL 18059) e também a linha celular: HIS P1.13-11 (KU70^(-/-)) e a linha celular parental correspondente CHO-K1 (ATCC CCL61). Estas linhas foram crescidas em meio DMEM contendo soro fetal bovino a 10% (FCS). Adicionalmente foram utilizadas as linhas celulares do glioma humanas M059J (DNA-PK_{CS}^(-/-)) e as linhas parentais correspondentes M059K (estirpe selvagem para DNA-PK_{CS}) (Lees-Miller SP, et al. Science 1995, 267 (5201): 1183-5) que cresceram em meio DMEM/NUT.MIX-F12 1:1 com FCS a 10%.

A linha AT-5 deriva de um indivíduo defectivo em ATM (proteína mutada da Ataxia-Telangiectasia) e foi utilizada como linha celular parental correspondente a MRC-5 (Raj K, et al. Nature. 2001, 412 (6850): 914-7) e ambas foram cultivadas em DMEM contendo FCS a 10%.

As linhas celulares do neuroblastoma IMR32 (ATCC CCL-127), GI-LIN e LAN-5 (Panarello C. et al. Cancer Genet. Cytogenet., 2000, 116: 124-132) foram crescidas em meio

RPMI + Hepes a 25 mM contendo os aminoácidos especiais e FCS a 10%.

A linha celular do osteosarcoma humano U20S (ATCC HTB96); os fibroblastos primários IMR90 (passagens antecedentes) foram crescidos em meio DMEM contendo FCS a 10%.

A linha celular do carcinoma do cólon HCT-116 (defectiva para o gene de reparação de emparelhamento errado da proteína MLH1 humana (Raj K, et al. Nature. 2001, 412 (6850): 914-7)) foi crescida em meio McCoy contendo FCS a 10%.

A capacidade de tradução das proteínas quiméricas foi ensaiada em células do osteosarcoma U20S e nas células do fibroblasto primário IMR90. As células foram crescidas em DMEM contendo FCS a 10% e tratadas com as proteínas da invenção no mesmo meio, em geral na presença de antibióticos. Após 10 minutos de incubação das células com aumento da quantidade da proteína de fusão SCPVUTAT (1, 10, 50, 100, 200 nM) e com a proteína SCPVU (PvuII de cadeia simples sem TAT) e SC34 como controlo (preparada como descrito para a SCPVUTAT excepto que a enzima PvuII contém um mutante na posição 34) os extractos celulares foram preparados, separados em SDS-PAGE e ensaiados por análise de imunoblot com um anticorpo monoespecífico para PvuII. Adicionalmente, a captação foi ensaiada após 30 minutos de incubação por análise de imunofluorescência utilizando anticorpos específicos de PvuII e co-coloração nuclear com

iodeto de propídio. Junto os dados demonstram que a proteína SCPVUTAT enriqueceu nas células e em particular nos núcleos e a captação foi de aproximadamente 100% das células analisadas como apresentado na Figura 2. Em contraste, a proteína de fusão não contendo sequências tat (SCPVU) não foi importada. Estes enriquecimentos não foram dependentes da desnaturação da proteína, uma vez que as proteínas utilizadas eram solúveis e foram preparadas sob condições nativas, não desnaturantes. De facto, as proteínas que foram produzidas através dos métodos descritos e sob condições nativas foram mais eficientes na tradução da proteína e superiores nos métodos de desnaturação descritos recentemente para outras proteínas na patente de Dowdy USP 6,221,335.

Exemplo 5

A confirmação da indução de DSB após o tratamento in vivo com as proteínas recombinantes da invenção por ensaio de TUNEL.

Após um breve tratamento das células com SCPVUTAT foi avaliada a função das proteínas com desoxinucleotidil transferase terminal (TdT)dUTP-FITC, numa reacção de TUNEL (In Situ Cell Death Detection Estojo ("kit"), Roche Diagnostic, Mannheim Germany) que marca os DSBs in vivo. O ensaio foi efectuado após a fixação das células com paraformaldeído a 4% em PBS, Triton a 0,1%. Após a reacção de TUNEL as células foram contracoradas com propídio J⁻. A

utilização de derivados reduzidos na actividade da nuclease tal como o construtor SC34 como um controlo negativo permite estimular as actividades de base. Apenas 10 minutos após o tratamento com a proteína de fusão SCPVUTAT todas as células testadas apresentavam reacção positiva de TUNEL (90-100%). Entre as células testadas estão linhas celulares humanas ou de roedores incluindo as células epiteliais (HEK-293, MCF-7, HCT116 uma linha celular do carcinoma do cólon que exhibe um defeito no gene de reparação de emparelhamento errado hMLH1), fibroblastos primários (WI83, IMR90, Fibroblastos Embrionários de Rato, MEF). Isto confirma juntamente com a transferência eficiente das proteínas de fusão da invenção que os núcleos das células exibem actividade endonucleolítica in vivo em todos os tipos de células ensaiados até agora. De facto poucos minutos de tratamento com SCPVUTAT e com concentrações das proteínas no sobrenadante da cultura celular tão baixas quanto 10 nM produzem actividade de TUNEL significativa na maioria das células, demonstrando assim a funcionalidade directa e rápida das proteínas quiméricas in vivo. Este aspecto torna o sistema descrito na invenção muito mais eficiente quando comparado com endonucleases induzidas a partir de unidades transcrpcionais ou comparado com qualquer outro tipo de transfecção de proteínas tal como a electroporação, ou a precipitações com fosfato de cálcio ou com derivados de lípidos isto é a lipofectina. Esta actividade é independente da fase do ciclo celular e na maioria das células não se correlaciona com a apoptose, como é demonstrado pela falta do marcador positivo para a

apoptose (isto é a libertação do citocromo C ou a coloração com Anexina V positiva).

Na Figura 4 são apresentados os resultados obtidos a partir de um ensaio de TUNEL de células U20S após o tratamento durante 30 minutos com SCPVUTAT ou com SC34, estes tipos de ensaios demonstram a funcionalidade do construtor SCPVUTAT.

Exemplo 6

Avaliação do efeito de um tratamento com as proteínas da invenção no ciclo celular.

Finalmente, para confirmar que os DSB's que são produzidos in vivo também induzem perturbações no ciclo celular, o conteúdo de DNA nas várias fases do ciclo celular foi analisado através do Separador de Células Activado por Fluorescência (FACS) após a tradução das proteínas da invenção. Após o tratamento com diversas proteínas a diferentes concentrações e durante diferentes espaços de tempo, as células foram fixadas em etanol a 70%, tratadas com RNase A e coradas com propídio J⁻.

Foi efectuada a análise por FACS utilizando um dispositivo FACSCalibur™ (Becton Dickinson). Os dados obtidos foram avaliados com o pacote de programa software CellQuest™. Foram analisados pelo menos 3×10^4 eventos únicos para cada amostra no modo DDM. A análise estatística

da distribuição do conteúdo de DNA durante o ciclo celular foi efectuada com o pacote de programa de software MODFITLT™. Um conteúdo de DNA diplóide 2N corresponde às células na fase G1 do ciclo celular, 4N representa um conteúdo de DNA tetraplóide relativo e corresponde a G2 e/ou fase M do ciclo celular. Um conteúdo de DNA intermédio representa a fase S correspondendo a uma população de replicação de DNA activa durante o ciclo celular e um contudo que está abaixo do diplóide 2N representa células em apoptose.

Na Figura 5 é demonstrado que uma incubação durante 24 horas com 10 nM da proteína SCPVUTAT é suficiente para induzir um aumento na população tetraplóide de células U20S. A diluição da proteína SCPVUTAT com meio fresco causa a reentrada das células num ciclo populacional normal durante 24 horas, enquanto que a adição sucessiva de SCPVUTAT (isto é a cada 12 horas) resulta num atraso do ciclo celular estavelmente induzido, na maioria das células que foram analisadas sem qualquer indução ou apoptose. Os tratamentos similares com as proteínas SC34 e SCPVU (sem o domínio TAT) não apresentam qualquer alteração nas distribuições do ciclo celular.

Outros métodos podem ajudar para finalizar a discriminação entre a fase G2 e a M de uma população detectada como tetraplóide numa análise de FACS (4N); isto é, em DNA 4N contendo células HCT116 e U20S que são tratadas com 100 nM de SCPVUTAT os núcleos permanecem grandes e não apresentam quaisquer estruturas mitóticas ou

nenhuma fragmentação do envelope nuclear o que indica que as células permanecem em G2 e que não apresentam qualquer progressão na fase M do ciclo celular e exibem assim um bloqueio do ciclo celular em G2. Podem ser utilizadas análises bioquímicas adicionais para demonstrar a actividade da cinase do complexo Cdc2-ciclina B. Além disso, a iniciação da mitose, isto é induzida com os agentes do bloqueio do microtúbulo o Nocodazole ou o Taxol, pode ser detectada pela actividade nuclear da cinase Cdc2 e também pela localização nuclear da Cdc25C. Estes ensaios permitem descobrir o ponto exacto da paragem do ciclo celular após o tratamento com SCPVUTAT e estes permitem também detectar distúrbios nesta fase do ciclo celular relativamente a um controlo positivo. São também conhecidas na área experiências similares para outras fases do ciclo celular. O ensaio apresentado na Figura 7 A e a análise de imunofluorescência apresentada na Figura 14 demonstram exemplos para estes tipos de experiências. As experiências tal como estão apresentadas indicam que na linha celular HCT116 após o tratamento com as proteínas de fusão SCPVUTAT os DSB's foram induzidos e subsequentemente há um bloqueio reversível na fase do ciclo celular que corresponde a S/G2 tardio.

Exemplo 7

Efeitos das proteínas em células com mutações em ATM/ATR.

A proteína mutada da Ataxia-telangiectasia (ATM)

e a proteína mutada da Ataxia-telangiectasia Relacionada (ATR) representam os elementos de sinalização centrais durante a activação do ponto de controlo em resposta ao dano do DNA. Estas vias coordenam a progressão do ciclo celular e os mecanismos de reparação do DNA. Estes controlos asseguram a ordem apropriada dos eventos no caso de um dano numa célula, isto é as células não progridem em fases sucessivas do ciclo celular antes do DNA ser reparado. Estes controlos implicados nos mecanismos do ciclo celular através da inibição das cinases do ciclo celular e da indução concomitante dos reguladores negativos, entre eles os supressores de tumores como o p53 e os seus alvos transcricionais conhecidos (isto é: p21, 14-3-3 sigma), proteínas que por seu turno induzem um bloqueio no ciclo celular que é importante para uma função exacta ou para a fidelidade precisa das proteínas efectoras responsáveis pela reparação do DNA. É importante notar, que as mutações em muitas destas proteínas regulatórias apresentam fortes predisposições para cancro.

O tratamento de células U2OS com cafeína a 2 mM, um derivado da metilxantina ($IC_{50} < 1$ mM) induz um atraso moderado na fase G1 do ciclo celular e além disso o efeito inibitório previne as células para o dano do DNA (Sarkaria et al., 1999). Foi demonstrado que a cafeína inibe a actividade catalítica de pelo menos três membros da classe da fosfoinositol 3 cinase (PI3) com todos eles contendo uma região cinase serina/treonina homóloga (PIKK), ATM, ATR e

TOR. As células U20S foram crescidas durante 30 horas em meio com SCPVUTAT a 100 nM em combinação com cafeína a 2 mM não exibem a paragem do ciclo celular característica de SCPVUTAT, mas no entanto induzem um atraso G1 moderado. Isto demonstra que a cafeína é um antagonista para o efeito de SCPVUTAT in vivo. Experiências finais demonstram que a cafeína não inibe o SCPVUTAT in vitro, nem influencia a capacidade de tradução da proteína. A mesma utilização racional para estas experiências aplica-se para uma selecção de composições antagonísticas para SCPVUTAT que são activas "in vivo" e constituem composições comuns ou compostos principais, activos como inibidores de ATM e/ou da via de ATM/ATR. A especificidade para ATM/ATR ou para qualquer outra proteína envolvida nesta via pode então ser finalmente analisada utilizando linhas celulares mutantes apropriadas. Devido à actividade bem caracterizada e monoespecífica imediata de SCPVUTAT, estas moléculas podem ser vantajosamente utilizadas nestes ensaios. A fácil utilização da presente invenção permite a aplicação nestes tipos de ensaios também em larga escala, tais como a elevada produtividade em vantajosa combinação com a aplicação da química combinatória e/ou da biologia molécula combinatória.

Noutra forma de realização a SCPVUTAT é utilizada para monitorizar os eventos que dependem de uma activação de ATM/ATR. A ATM funciona como uma cinase serina/treonina em muitos substratos envolvidos no ponto de controlo que é

activado pelo dano do DNA. A fosforilação dos substratos pode ou não influenciar a activação de uma resposta do ponto de controlo. Os substratos de ATM ou de cinases dependentes de ATM conhecidos in vivo incluem: Nbs1, SMC1 (Manutenção Estrutural de Cromossomas), MDC1 (Mediador dos Danos do DNA), H2AX (Histona 2Ax), p53.

Foi analisada a indução in vivo de ATM/ATR no substrato de p53-Ser15 em resposta à SCPVUTAT. A fosforilação de p53 em Ser¹⁵ regula a estabilidade da proteína e a actividade transcricional de p53 e assim é essencial para a resposta transcricional de p53.

A fosforilação de p53 em Ser15 em resposta ao tratamento com SCPVUTAT foi testada em linhas celulares de ATM positivas ou negativas (MRC-5 e AT-5 respectivamente). Para comparação foram efectuadas experiências paralelas com a hidroxureia (HU). A HU funciona como um inibidor da ribonucleotídeo redutase e causa uma paragem do garfo de replicação do DNA durante a fase S e origina DSB's. Para este imunoblotting as experiências foram efectuadas com extractos após o tratamento, utilizando anticorpos específicos para uma Ser15 fosforilada em p53 para a detecção específica. Como apresentado na Figura 7, a fosforilação específica de p53-Ser¹⁵ é obtida após o tratamento com SCPVUTAT de linhas celulares de ATM mais MRC-5 (Figura 7 B) bem como para as linhas celulares de ATM menos AT-5. Foi observado o mesmo para um tratamento com HU que induz a fosforilação de p53-Ser¹⁵ de uma forma

comparável no entanto consistentemente mais elevada. Esta fosforilação *in vivo* é sensível à cafeína inibidora de ATM/ATR; as células AT-5 incubadas com cafeína a 2 mM, e que são tratadas com SCPVUTAT ou com HU não exibem fosforilação significativa de p53-Ser¹⁵ (Figura 7 C). Como outro exemplo para uma fosforilação de um substrato de ATM em resposta ao objecto da invenção, foi analisada a fosforilação da histona H2AX Ser¹³⁹. Foi observado que o ATM fosforila a histona H2AX Ser¹³⁹ como uma resposta imediata ao dano do DNA induzido por radiação durante a fase S e a fase G2 do ciclo celular. As células U20S foram tratadas durante 60 minutos com SCPVUTAT, fixadas e analisadas relativamente à fosforilação da histona H2AX Ser¹³⁹. As células foram analisadas com um anti-soro específico para fosfo-Ser 139 em histona H2AX e analisadas num microscópio numa base de célula única. A histona 2B foi analisada como controlo. Os resultados demonstram que o tratamento com SCPVUTAT induz rapidamente a fosforilação da histona H2AX Ser¹³⁹ e esta actividade pode ser detectada numa localização específica nos núcleos das células tratadas mas não nas células não tratadas (Figura 12). Além disso o Wortmanin inibidor da cinase de ATM (50 µM) é antagonista para esta reacção. A concentração do Wortmanin utilizado é específica para a ATM mas não inibe a ATR, representando assim um ensaio simples para a distinção entre estas duas cinases. Este tipo de experiências onde os substratos das vias de ATM são analisados ajudam a definir os alvos biológicos e moleculares induzidos por DSB's induzidas por SCPVUTAT. A análise bioquímica e/ou imunológica dos substratos da cinase de ATM por transferência western, a análise por

imunofluorescência, ou os ensaios enzimáticos em células ou a partir de extractos de células tratadas com a presente invenção é útil para uma interpretação do estado de uma resposta de um ponto de controlo in vivo numa célula particular em comparação com uma indução normal da via respectiva.

Além disso, estes ensaios podem ser vantajosamente utilizados com a presente invenção em rastreios automáticos. Os extractos e a natureza bem definida do dano induzido no DNA pela presente invenção, torna a presente superior com respeito a qualquer outro composto previamente utilizado em tipos similares de ensaios. A utilização da presente invenção em ensaios simples ou em rastreios de elevada produtividade não necessita de ter em muita consideração os efeitos secundários ou pleiotrópicos, um pré-requisito essencial para o sucesso de um rastreio complexo. Os dados obtidos neste tipo de experiências podem ser considerados como equivalentes para os efeitos induzidos por uma DSB. Além disso, a capacidade dos derivados de proteína mutados que não exibem actividade de nuclease como o SC34 garante controlos importantes para estes ensaios.

Exemplo 8

A dependência do efeito induzido de SCPVUTAT a partir de ATM e de p53.

Em geral no caso das mutações do DNA danificado

nos componentes do mecanismo correspondente do controlo (ponto de controlo) exibem alterações nas características de paragem do ciclo celular e muitas destas mutações determinam a predisposição para o cancro.

Em contraste as proteínas que estão envolvidas como moléculas efectoras para a reparação do DNA exibem normalmente características de paragem normais do ciclo celular e induzem a progressão do tumor principalmente apenas em combinação com defeitos nos componentes do ponto de controlo e apresentam frequentemente sinergismo numa predisposição para tumores. As mutações nas moléculas efectoras exibem, hipersensibilidade particular a DSB's, uma característica que é significativamente menos pronunciada no caso de mutações do ponto de controlo. Devido ao facto de as proteínas da invenção serem monoespecíficas é possível interpretar a sensibilidade ao DSB e os efeitos no ciclo celular como consequência simples do dano induzido. De facto é possível avaliar se os defeitos são em componentes dos mecanismos de controlo (pontos de controlo) ou nos mecanismos de reparação.

A resposta do ciclo celular às DSB's induzida pelo tratamento de SCPVUTAT foi analisada em células p53 positivas ou negativas. Enquanto que as células que são positivas para o p53 apresentam um comportamento de paragem do ciclo celular em G1 e G2 com valores de fase S baixos, as células que são negativas para p53 não exibem características de paragem do ciclo celular. Além disso

este tipo de resultados foi também obtido para os elementos a jusante onde as mutações em p21 exibem comportamento comparável às células p53 menos e as mutações em 14-3-3 sigma exibem uma paragem de G1 confirmando que esta proteína se sobrepõe parcialmente com a p53 e tem o seu papel apenas no controlo na fase G2 do ciclo celular. Como finalmente demonstrado na Figura 8 A, os mutantes AT-5 foram analisados após o tratamento com o SCPVUTAT. A incubação durante 36 horas das linhas celulares mutadas para ATM (AT-5) com SCPVUTAT resulta numa retardação transiente do ciclo celular, como foi determinado por uma análise de FACS do conteúdo do DNA. As células AT-5 apresentam um forte aumento no conteúdo de DNA 4N em G2 e não apresenta qualquer atraso em G1, e isto indica um defeito complexo no ponto de controlo de G1 (Figura 8). Significativamente, o atraso em G2 não é anulado e a reentrada no ciclo celular não é observada após 24 horas em contrário às linhas celulares de ATM positivas (ver Figura 5). Uma adição única de SCPVUTAT durante 60 minutos para as células AT-5 foi suficiente para induzir a paragem do ciclo celular após 24 horas (Figura 8 A) e levou finalmente à morte da célula, obtida através de DNA não correctamente ligado, e consequentemente, a actividade clonogénica após um único tratamento com SCPVUTAT durante 60 minutos ficou abaixo dos 0,02% para as células AT-5. Nestes ensaios, a linha celular MRC-5 de controlo positivo de ATM foi menos sensível a um tratamento com SCPVUTAT (Figura 8 B). Adicionalmente, as células foram incubadas com adriamicina como controlo. Estes efeitos foram devidos à actividade de

endonuclease de SCPVUTAT porque se formaram colónias com eficiência comparável ao não tratamento após o tratamento com formas de realização de nucleases mutadas. Estes exemplos demonstram que várias células mutadas apresentam perfis do ciclo celular distintos em resposta ao tratamento com SCPVUTAT e que estas características podem ser utilizadas para o diagnóstico de defeitos do ciclo celular após as DSB'S.

Exemplo 9

A avaliação da capacidade de diagnóstico da proteína SCPVUTAT em células defectivas na via de reparação de NHEJ (Junção Terminal Não Homóloga).

A NHEJ representa os principais mecanismos para uma reparação da ruptura de DNA de cadeia dupla em eucariotas superiores em contraste com eucariotas inferiores onde uma reparação por recombinação homóloga está mais presente. As proteínas envolvidas neste sistema estão também envolvidas nas fases finais da recombinação da imunoglobulina V(D)J. De forma a confirmar se as proteínas da invenção activam também as enzimas de NHEJ de uma forma específica, foram analisadas linhas celulares de roedores contendo mutações individuais num dos factores essenciais desta via.

Num ensaio de formação de colónias representado na Figura 9 e na Figura 13 confirma-se que um único

tratamento com a proteína da invenção SCPVUTAT é suficiente para reduzir fortemente a actividade de formação de colónias em todas as linhas celulares mutadas de NHEJ analisadas.

Para demonstrar a especificidade da reparação de DSB's da presente invenção, foram utilizadas células de roedores que contêm perda homozigótica de mutações funcionais num dos factores essenciais envolvidos na reparação de NHEJ para DSB's: o domínio catalítico da subunidade de PIKK contendo a subunidade regulatória da proteína cinase dependente de DNA (DNA-PK_{CS}; linhas celulares de V3, correspondendo à linha celular parental de AA8), a subunidade regulatória da proteína cinase dependente de DNA de Ku70 (HIS P1.13-11; correspondendo à linha celular parental de CHO-K1), a subunidade de Ku80 (xrss5; correspondendo à linha celular parenta de AA8), e a subunidade regulatória da DNA ligase IV XRCC4 (linhas celulares de XR-1; correspondendo à linha celular parental de AA8). Estas linhas celulares foram analisadas nos ensaios da actividade da nuclease com SCPVUTAT in vivo e comparadas às linhas celulares parentais como indicado. Além disso estas células mutantes de NHEJ foram testadas com SCPVUTAT em ensaios clonogénico, de excrescência da colónia que foram ensaiados após uma adição única de SCPVUTAT durante 12 horas a uma concentração de 10 nM (barras verdes) ou a uma concentração de 75 nM (barras pretas) ou sem tratamento de proteína (não tratadas, barras brancas). Sete a dez dias após a adição, o crescimento das

células foi analisado por coloração com GIEMSA azul e pela quantificação das diversas concentrações de células. Os resultados obtidos a partir de uma experiência representativa são resumidos na Figura 9. As células que foram mutadas para a subunidade XRCC4 da DNA Ligase IV são hipersensíveis a extremidades cegas de DSB's induzidas por SCPVUTAT e mais interessante, todas as células que contêm mutantes no DNA-PK testado, incluindo os mutantes da subunidade catalítica, exibem também uma forte redução no ensaio de formação de colônias. Em contraste com as células parentais, as células que contêm defeitos conhecidos na via de reparação do emparelhamento errado, como as HCT116 que exibem uma mutação homozigótica no gene que codifica para a proteína hMLH1, não apresentam qualquer aumento na sensibilidade a um tratamento com SCPVUTAT em ensaios similares. Num exemplo adicional as linhas celulares do glioblastoma humano que são defectivas em DNA-PK_{CS} (M0059J) foram tratadas com SCPVUTAT e confrontadas com as linhas celulares parentais M059K. Em analogia, o crescimento das células foi quantificado após um único tratamento com SCPVUTAT durante 12 horas (10 nM, barras verdes; 75 nM, barras pretas; não tratado, barras brancas). Novamente, também as células mutantes de DNA-PK_{CS} humanas apresentaram um aumento diferencial significativo na sensibilidade em resposta a tratamento com SCPVUTAT, Figura 13 A, B). Estas células foram plaqueadas em placas de microtítulo multipoço em diferentes concentrações e tratadas com SCPVUTAT como indicado e coradas com GIEMSA azul. As placas de microtítulo multipoço (para um exemplo ver Figura 13 A)

foram rastreadas utilizando o sistema de imagem VersaDOC^R 4 (BioRad) e o crescimento foi automaticamente quantificado com o pacote de software Quantify One^R para a análise das placas de microtítulo (software de rastreamento de placas de microtítulo). Os dados obtidos foram seguidamente resumidos num histograma como apresentado na Figura 13. Consistentes com os resultados obtidos a partir das linhas celulares de roedores que foram mutadas para o DNA-PK_{CS}, também as linhas celulares humanas demonstraram hipersensibilidade após o tratamento com SCPVUTAT, e isto confirma a elevada especificidade de SCPVUTAT para a introdução de DSB's. Estas experiências demonstraram a viabilidade do sistema utilizado incluindo das aplicações em ensaios semi- ou totalmente automáticos.

Exemplo 10

Ensaaios para o rastreamento de compostos candidatos como sinergistas ou antagonistas para o stress induzido por DSB.

As células U20S foram incubadas com SCPVUTAT a 10 nM e com H₂O₂ a 10 µM só ou em combinação e foi analisado por FACS o perfil do ciclo celular. A incubação simultânea das células com os dois compostos causou uma alteração diferencial altamente desenvolvida do perfil do ciclo celular com um forte aumento do pico da fase G2 correspondente de 20% para 45% (Figura 11 A comparada com a Figura 11 D) em comparação com nenhum aumento em G2 apenas

com H_2O_2 a 10 μM (Figura 11 C) e com um menor aumento de 20% para 28% em G2 (Figura 11 A comparada com a Figura 11 B) no caso de SCPVUTAT a 10 nM apenas. Com base nos resultados das incubações com os componentes únicos a incubação com ambos os componentes simultaneamente exhibe claramente um efeito sinérgico para uma perturbação do ciclo celular.

Numa experiência sucessiva, similar onde a proteína SCPVUTAT foi incubada juntamente com a afidicolina (um agente intercalante do DNA e inibidor da topoisomerase II), não foi observado nenhum efeito sinérgico e ambos os componentes apresentaram apenas comportamento aditivo. Este exemplo demonstra novamente a simplicidade do ensaio, que pode ser utilizado para a detecção do sinérgismo ou antagonismo para o stress celular que é induzido por DSB de extremidade cega a partir das proteínas da invenção. Como apresentado acima, as vantagens do ensaio vêm do dano do DNA monoespecífico induzido, da possibilidade de medir o ruído de fundo do sistema com a proteína nucleasa reduzida SC34 e da utilização extremamente rápida e fácil do ensaio em virtualmente qualquer célula e qualquer fase do ciclo celular. Isto não foi descrito antes para qualquer outro reagente capaz de induzir DSB's in vivo. Assim este tipo de ensaio demonstra que os radicais e a cafeína (Figura 7 C), podem ser utilizados para qualquer tipo de rastreio de composições que interferem com a via de reparação do DNA e dos controlos daí resultantes.

Exemplo 11

Indução da apoptose no neuroblastoma a partir do tratamento com SCPVUTAT

Enquanto que muitas das células analisadas de origem epitelial bem como de origem mesenquimal não apresentam apoptose após o tratamento com SCPVUTAT, em várias linhas celulares de neuroblastoma (IMR32, LAN5, GILIN) mas também em várias células de neuroblastoma primário isoladas a partir de clínicas foi induzida uma quantidade significativa de apoptose. A Figura 10 demonstra um exemplo de uma indução de apoptose pelas proteínas da invenção nestas células. Para a análise o conteúdo de DNA foi testado com FACS após a coloração das células com propídio J⁻. as células apoptóticas (A) foram detectadas como as células que exibem um conteúdo de DNA abaixo de 2N. As regiões calculadas estão indicadas no topo de cada histograma com setas para as áreas correspondentes. Enquanto que 10 nM de SCPVUTAT induz rapidamente 18% de células apoptóticas em 30 horas (Figura 10 B), e a adição de 100 nM de SCPVUTAT origina a indução de mais de 29% de células apoptóticas no mesmo período de tempo (Figura 10 C), contrariamente, a forma de realização da nuclease reduzida SC34 não induz este efeito. Estas experiências demonstram uma indução altamente específica de apoptose em células de neuroblastoma, e as proteínas da invenção apresentam-se como principais candidatas para um tratamento terapêutico deste tipo de tumores.

Além disso em combinação com sistemas de transferência de tecido específico, as sequências que são objecto da presente invenção podem conter especificidade suficiente como substâncias candidatas para a terapia do neuroblastoma. De facto, por sua vez é uma implicação válida de que a invenção apresentada se candidata como uma plataforma de tecnologia para um rastreio de sequências de transferência de tecido específico.

Adicionalmente, como já antecipado em exemplos anteriores (Exemplo 8), a presente invenção pode também ser utilizada para procurar compostos principais específicos ou combinações específicas de moléculas que são capazes de induzir apoptose específica, diferencial em células alvo, vantajosamente em células malignas de tumores mas não, ou numa extensão mais baixa em células normais do mesmo indivíduo.

Exemplo 12

Localização celular das proteínas do ciclo celular após o tratamento com SCPVUTAT por análise imuno-microscópica.

A HCT116 (p53(+/+)) não tratada, ou tratada durante 30 horas com SCPVUTAT (100 nM), ou com taxol (0,2 µg/ml) foi fixada com PFA a 3% e tratada com anticorpos específicos para a ciclina B1 ou para Cd-c25C. A

imunofluorescência foi analisada com o microscópio (ver Figura 14) com anticorpos primários específicos da ciclina B1 conjugados com os anticorpos secundários marcados com FITC (verde) ou com anticorpos primários específicos para Cdc25C conjugados com anticorpos secundários marcados com TRITC (vermelho). A distribuição citoplasmática dos marcadores do ciclo celular Cdc25C e Ciclina B obtidos a partir das células com um conteúdo de DNA 4N após o tratamento com SCPVUTAT demonstra uma paragem da fase G2 e que as células tratadas não prosseguem para a fase M do ciclo celular.

Este resultado é diferente dos resultados obtidos com Taxol onde a localização nuclear prevalente indica uma paragem na fase M do ciclo celular.

A alteração da distribuição especial das duas proteínas marcadas - isto é citoplasmática, correspondente a uma cinase da ciclina B inactiva, em contraste com uma localização nuclear que corresponde a uma cinase da ciclina B activa e uma subsequente progressão do ciclo celular em anafase - e uma activação sucessiva da cinase de cdc2/ciclina B por desfosforilação com a fosfatase Cdc25C (após a libertação da proteína 14-3-3 de Cdc25C e a subsequente activação da fosfatase), constitui uma característica distintiva para a transição de G2/M. De facto esta via substitui o passo de limitação da progressão nesta fase do ciclo celular.

Listagem de sequências

<110> International Center for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB)

<120> polipeptídeos quiméricos e a sua utilização

<130> 3916

<160> 4

<170> Patente Na forma de realização 3,1

<210> 1

<211> 1020

<212> DNA

<213> *Proteus vulgaris*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1020)

<223> 1...471: PvuII 472...483: elemento de ligação 484...951: PvuII 952...999: TAT 1000...1020: 6 his

<400> 1

```

atg agc cac cca gat cta aat aaa tta tta gag ott tgg ccg cat ata      48
Met Ser His Pro Asp Leu Asn Lys Leu Leu Glu Leu Trp Pro His Ile
1          5          10          15

cag gaa tat caa gac tta gca tta aaa cat gga ata aat gat att ttt      96
Gln Glu Tyr Gln Asp Leu Ala Leu Lys His Gly Ile Asn Asp Ile Phe
          20          25          30

caa gat aat ggt gga aag ttg ctt caa gtc ctt cta att aca gga tta      144
Gln Asp Asn Gly Gly Lys Leu Leu Gln Val Leu Leu Ile Thr Gly Leu
          35          40          45

aca gta cta cca gga cga gaa ggt aat gat gct gta gat aac gca gga      192
Thr Val Leu Pro Gly Arg Glu Gly Asn Asp Ala Val Asp Asn Ala Gly
          50          55          60

caa gaa tac gag tta aaa tca ata aac ata gac ctc act aaa ggt ttt      240
Gln Glu Tyr Glu Leu Lys Ser Ile Asn Ile Asp Leu Thr Lys Gly Phe
          65          70          75          80

tca act cac cac cac atg aat cct gta att att gca aaa tat aga caa      288
Ser Thr His His His Met Asn Pro Val Ile Ile Ala Lys Tyr Arg Gln
          85          90          95

gta cct tgg att ttt gcc ata tac cgt ggt atc gca ata gaa gct ata      336
Val Pro Trp Ile Phe Ala Ile Tyr Arg Gly Ile Ala Ile Glu Ala Ile
          100          105          110

```

tac	aga	tta	gag	cca	aaa	gat	cta	gaa	ttt	tac	tat	gat	aaa	tgg	gaa	384
Tyr	Arg	Leu	Glu	Pro	Lys	Asp	Leu	Glu	Phe	Tyr	Tyr	Asp	Lys	Trp	Glu	
		115					120					125				
agg	aaa	tgg	tat	tca	gat	ggg	cat	aaa	gat	att	aac	aac	cct	aaa	ata	432
Arg	Lys	Trp	Tyr	Ser	Asp	Gly	His	Lys	Asp	Ile	Asn	Asn	Pro	Lys	Ile	
		130				135					140					
cct	gta	aaa	tat	gta	atg	gaa	cat	ggg	aca	aag	att	tac	gga	tcc	gga	480
Pro	Val	Lys	Tyr	Val	Met	Glu	His	Gly	Thr	Lys	Ile	Tyr	Gly	Ser	Gly	
		145				150				155					160	
gga	agt	cac	cca	gat	cta	aat	aaa	tta	tta	gag	ctt	tgg	ccg	cat	ata	528
Gly	Ser	His	Pro	Asp	Leu	Asn	Lys	Leu	Leu	Glu	Leu	Trp	Pro	His	Ile	
				165					170					175		
cag	gaa	tat	caa	gac	tta	gca	tta	aaa	cat	gga	ata	aat	gat	att	ttt	576
Gln	Glu	Tyr	Gln	Asp	Leu	Ala	Leu	Lys	His	Gly	Ile	Asn	Asp	Ile	Phe	
			180					185					190			
caa	gat	aat	ggt	gga	aag	ttg	ctt	caa	gtc	ctt	cta	att	aca	gga	tta	624
Gln	Asp	Asn	Gly	Gly	Lys	Leu	Leu	Gln	Val	Leu	Leu	Ile	Thr	Gly	Leu	
		195					200					205				
aca	gta	cta	cca	gga	cga	gaa	ggt	aat	gat	gct	gta	gat	aac	gca	gga	672
Thr	Val	Leu	Pro	Gly	Arg	Glu	Gly	Asn	Asp	Ala	Val	Asp	Asn	Ala	Gly	
		210				215					220					
caa	gaa	tac	gag	tta	aaa	tca	ata	aac	ata	gac	ctc	act	aaa	ggt	ttt	720
Gln	Glu	Tyr	Glu	Leu	Lys	Ser	Ile	Asn	Ile	Asp	Leu	Thr	Lys	Gly	Phe	
	225				230					235					240	
tca	act	cac	cac	cac	atg	aat	cct	gta	att	att	gca	aaa	tat	aga	caa	768
Ser	Thr	His	His	His	Met	Asn	Pro	Val	Ile	Ile	Ala	Lys	Tyr	Arg	Gln	
				245					250					255		
gta	cct	tgg	att	ttt	gcc	ata	tac	cgt	ggt	atc	gca	ata	gaa	gct	ata	816
Val	Pro	Trp	Ile	Phe	Ala	Ile	Tyr	Arg	Gly	Ile	Ala	Ile	Glu	Ala	Ile	
			260					265					270			
tac	aga	tta	gag	cca	aaa	gat	cta	gaa	ttt	tac	tat	gat	aaa	tgg	gaa	864
Tyr	Arg	Leu	Glu	Pro	Lys	Asp	Leu	Glu	Phe	Tyr	Tyr	Asp	Lys	Trp	Glu	
		275					280					285				
agg	aaa	tgg	tat	tca	gat	ggg	cat	aaa	gat	att	aac	aac	cct	aaa	ata	912
Arg	Lys	Trp	Tyr	Ser	Asp	Gly	His	Lys	Asp	Ile	Asn	Asn	Pro	Lys	Ile	
		290				295					300					
cct	gta	aaa	tat	gta	atg	gaa	cat	ggg	aca	aag	att	tac	gga	tct	tac	960
Pro	Val	Lys	Tyr	Val	Met	Glu	His	Gly	Thr	Lys	Ile	Tyr	Gly	Ser	Tyr	
	305				310					315					320	
ggc	cgc	aag	aaa	cgt	cgc	cag	cgt	cgc	cgt	ggt	gga	tca	cac	cat	cat	1008
Gly	Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg	Gly	Gly	Ser	His	His	His	
				325				330						335		

cat cac cac taa
His His His

1020

<210> 2

<211> 339

<212> PRT

<213> Proteus vulgaris

<400> 2

Met Ser His Pro Asp Leu Asn Lys Leu Leu Glu Leu Trp Pro His Ile
1 5 10 15

Gln Glu Tyr Gln Asp Leu Ala Leu Lys His Gly Ile Asn Asp Ile Phe
20 25 30

Gln Asp Asn Gly Gly Lys Leu Leu Gln Val Leu Leu Ile Thr Gly Leu
35 40 45

Thr Val Leu Pro Gly Arg Glu Gly Asn Asp Ala Val Asp Asn Ala Gly
50 55 60

Gln Glu Tyr Glu Leu Lys Ser Ile Asn Ile Asp Leu Thr Lys Gly Phe
65 70 75 80

Ser Thr His His His Met Asn Pro Val Ile Ile Ala Lys Tyr Arg Gln
85 90 95

Val Pro Trp Ile Phe Ala Ile Tyr Arg Gly Ile Ala Ile Glu Ala Ile
100 105 110

Tyr Arg Leu Glu Pro Lys Asp Leu Glu Phe Tyr Tyr Asp Lys Trp Glu
115 120 125

Arg Lys Trp Tyr Ser Asp Gly His Lys Asp Ile Asn Asn Pro Lys Ile
130 135 140

Pro Val Lys Tyr Val Met Glu His Gly Thr Lys Ile Tyr Gly Ser Gly
145 150 155 160

Gly Ser His Pro Asp Leu Asn Lys Leu Leu Glu Leu Trp Pro His Ile
 165 170 175

Gln Glu Tyr Gln Asp Leu Ala Leu Lys His Gly Ile Asn Asp Ile Phe
 180 185 190

Gln Asp Asn Gly Gly Lys Leu Leu Gln Val Leu Leu Ile Thr Gly Leu
 195 200 205

Thr Val Leu Pro Gly Arg Glu Gly Asn Asp Ala Val Asp Asn Ala Gly
 210 215 220

Gln Glu Tyr Glu Leu Lys Ser Ile Asn Ile Asp Leu Thr Lys Gly Phe
 225 230 235 240

Ser Thr His His His Met Asn Pro Val Ile Ile Ala Lys Tyr Arg Gln
 245 250 255

Val Pro Trp Ile Phe Ala Ile Tyr Arg Gly Ile Ala Ile Glu Ala Ile
 260 265 270

Tyr Arg Leu Glu Pro Lys Asp Leu Glu Phe Tyr Tyr Asp Lys Trp Glu
 275 280 285

Arg Lys Trp Tyr Ser Asp Gly His Lys Asp Ile Asn Asn Pro Lys Ile
 290 295 300

Pro Val Lys Tyr Val Met Glu His Gly Thr Lys Ile Tyr Gly Ser Tyr
 305 310 315 320

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Gly Ser His His His
 325 330 335

His His His

<210> 3

<211> 48

<212> DNA

<213> Vírus da imunodeficiência humana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(48)

<223> 4..36 Distribuidor correspondente aos resíduos 47-57 da proteína Tat

<400> 3

```
gga tct tac ggc cgc aag aaa cgt cgc cag cgt cgc cgt ggt gga tca      48
Gly Ser Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Gly Ser
1          5          10          15
```

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Virus da imunodeficiência humana

<400> 4

```
Gly Ser Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Gly Ser
1          5          10          15
```

Lisboa, 21 de Dezembro de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Um polipeptídeo quimérico capaz de penetrar nas membranas biológicas compreendendo:

- a. um polipeptídeo exibindo afinidade para sequências de nucleótidos específicas
- b. uma enzima de modificação do DNA
- c. uma região com uma actividade de transferência de cruzamento de membrana celular,

onde a enzima de modificação do DNA é uma endonuclease de restrição de classe tipo II ou as suas subunidades ou fragmentos e regiões funcionais a., b., e c. estão ligadas covalentemente umas às outras.

2. Um polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, em que a região com uma actividade de transferência de cruzamento de membrana celular é seleccionada a partir dos grupo constituído por peptídeos e polipeptídeos.

3. Um polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, em que a actividade do polipeptídeo a e do polipeptídeo b. está contida na mesma molécula.

4. Um polipeptídeo de acordo com as reivin-

dicações 1 e 3, em que o polipeptídeo com a actividade de ligação ao nucleótido específica e o polipeptídeo que contém a actividade enzimática de modificação do DNA são endonucleases de restrição ou as suas subunidades ou fragmentos funcionais.

5. Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, em que a endonuclease de restrição é seleccionada a partir do grupo construído por EcoRV, PvuII, HinfI e as suas subunidades e fragmentos funcionais.

6. Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, em que a actividade da endonuclease é modificada mas a especificidade de ligação ao ácido nucleico é comparável à da enzima nativa.

7. Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, em que a região para a actividade de transferência de cruzamento de membrana celular compreende pelo menos um peptídeo seleccionado a partir do grupo constituído por VP22 do Vírus Herpes Simplex, Tat de HIV-1, Rev de Hiv-1, homeodomínio da proteína Antepédia e fragmentos daí resultantes.

8. Um polipeptídeo de acordo com a reivindicação 7 que deriva da proteína Tat de HIV-1 compreendendo o peptídeo: YGRKKRRQRRR ou mutações pontuais ou mutações funcionais daí resultantes.

9. Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 4 a 8, em que o polipeptídeo provido de afinidade de ligação ao nucleótido específica e a enzima de modificação do DNA estão representados por um peptídeo simples que codifica para uma endonuclease de restrição de classe II escolhida a partir de EcoRV, PvuII, e HinfI ou as suas subunidades ou fragmentos funcionais e a função de transferência de cruzamento de membrana celular é um peptídeo contido na sequência de aminoácidos de HIV-1 tat.

10. Um polipeptídeo de acordo com a reivindicação 9, em que as subunidades da endonuclease de restrição estão covalentemente ligadas como uma proteína de cadeia única.

11. Um polipeptídeo de acordo com a reivindicação 10 que compreende a SEQ ID NO: 2.

12. Um polipeptídeo quimérico de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 11 contendo aminoácidos não naturais.

13. Um polinucleótido isolado que codifica para um polipeptídeo contido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 11 e compreendendo a SEQ ID NO: 1.

14. Um vector compreendendo a sequência do polinucleótido de acordo com a reivindicação 13.

15. Células hospedeiras que são transformadas com os vectores de acordo com a reivindicação 14.

16. Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, polinucleótidos de acordo com a reivindicação 13, vectores de acordo com a reivindicação 14, células de acordo com a reivindicação 15 para uma utilização terapêutica.

17. Composições farmacêuticas contendo os polipeptídeos de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12 como princípio activo, em combinação com excipientes, emulsionadores ou diluentes adequados.

18. A utilização das moléculas quiméricas, dos polinucleótidos, dos vectores, das células de acordo com a reivindicação 16 para a preparação de fármacos para a prevenção, a cura ou o diagnóstico de doença neoplásica ou a predisposição para esta doença.

19. Um método para a modificação em sítios específicos no genoma de uma célula isolada compreendendo essencialmente o tratamento destas células com um polipeptídeo quimérico de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12.

20. Um método de acordo com a reivindicação 19 com base na utilização dos polipeptídeos quiméricos de

acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12 e em que as modificações introduzidas nos sítios específicos no genoma de células isoladas são rupturas de DNA de cadeia dupla.

21. Um método para rastrear composições que são adequadas para modular as actividades de reparação do genoma ou para modular o controlo do ciclo celular e as actividades dos pontos de controlo num sistema celular que contenha essencialmente o seguinte:

- i) a incubação das células isoladas com os polipeptídeos quiméricos de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12,
- ii) a adição de composições ou colecções de composições opcionais na presença de substâncias que produzem radicais,
- iii) caracterização e/ou melhoramento da resposta celular.

22. Um método para a activação da reparação do DNA e dos mecanismos dos pontos de controlo in vitro através da utilização do procedimento de acordo com a reivindicações 19 e 20 ou a utilização dos polipeptídeos quiméricos de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12.

23. Um método para um diagnóstico de um defeito

genético na reparação do DNA e no controlo do ciclo celular e nas vias dos pontos de controlo in vitro, compreendendo essencialmente os seguintes passos:

- a) cultivo opcional de células isoladas de uma amostra teste,
- b) incubação destas células com os polipeptídeos quiméricos de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, opcionalmente em paralelo com linhas celulares de referência adequadas,
- c) caracterização e/ou medição das respostas celulares.

24. Um método de acordo com as reivindicações 21 e 23 em que respectivamente nos pontos iii) e c) a resposta celular é escolhida de entre: actividade clonogénica, estado de fosforilação ou nível de expressão do marcador bioquímico constituído por proteínas intracelulares, as localizações dessas proteínas no nível nuclear ou citoplasmático, o conteúdo total de DNA da população celular, a proliferação celular.

25. Um método de acordo com a reivindicação 24 em que aquelas proteínas intracelulares são seleccionadas a partir do grupo constituído por p53, ATM, Chk1, Chk2, BRCA-1, BRCA-2, Nbs1, Mre11, Rad50, Rad51 e histonas.

26. Um método de acordo com a reivindicação 24 e

25 para o diagnóstico in vitro de uma predisposição genética para tumores ou para o diagnóstico da sensibilidade à radiação.

27. A utilização das moléculas quiméricas de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12 para a introdução de um bloqueador do ciclo celular em células isoladas.

28. A utilização das moléculas quiméricas de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12 para a introdução de apoptose em células isoladas de origem de neuroblastoma.

29. Um estojo ("kit") para o diagnóstico de um defeito genético no sistema de reparação do DNA ou no sistema de controlo para o ciclo celular (pontos de controlo) numa célula isolada contendo o polipeptídeo quimérico de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12 em combinação com um tubo contendo um polipeptídeo quimérico para o controlo em que o polipeptídeo exhibe actividade de ligação ao DNA específica mas é reduzido em actividade de nuclease.

30. Um estojo ("kit") de acordo com a reivindicação 29 em que o polipeptídeo quimérico de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12 contém a SEQ ID NO: 2 e o polipeptídeo para o controlo é o polipeptídeo SC34.

31. Um estojo ("kit") de acordo com a reivindicação 30 para o diagnóstico in vitro de defeitos genéticos que determinam a predisposição para tumores em células isoladas.

32. Um estojo ("kit") de acordo com a reivindicação 31 para o diagnóstico da radiosensibilidade de um tumor.

Lisboa, 21 de Dezembro de 2007

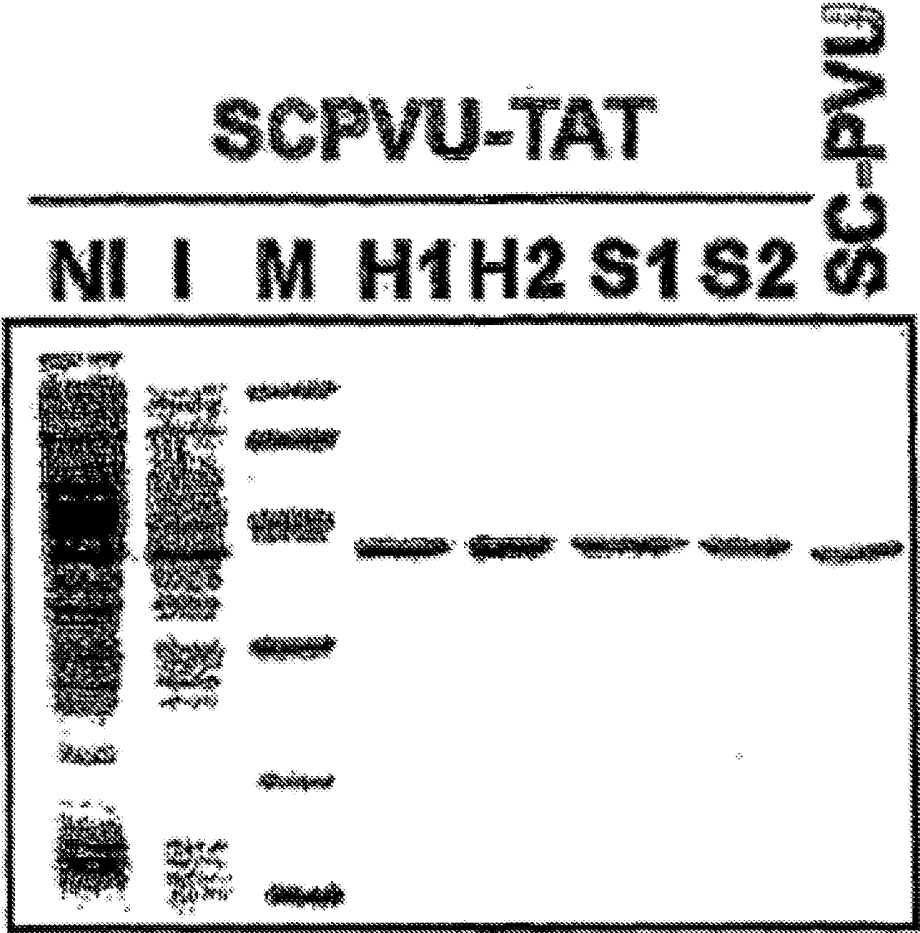


Figura 1

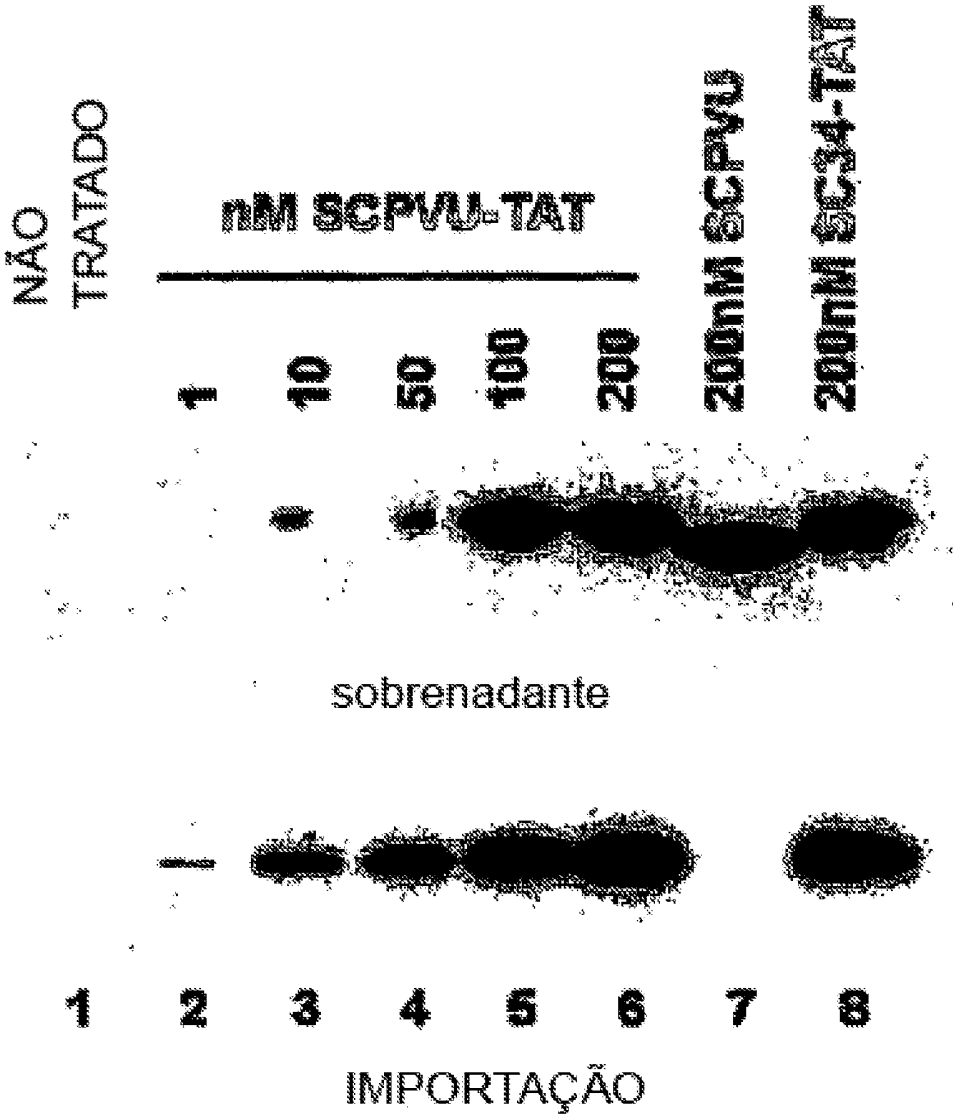
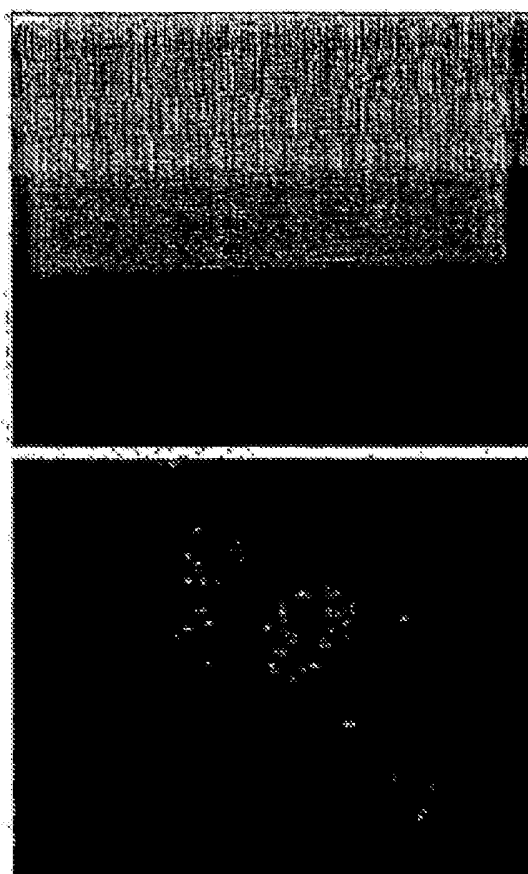


Figura 2



DNA

SCPVU-TAT

Figura 3

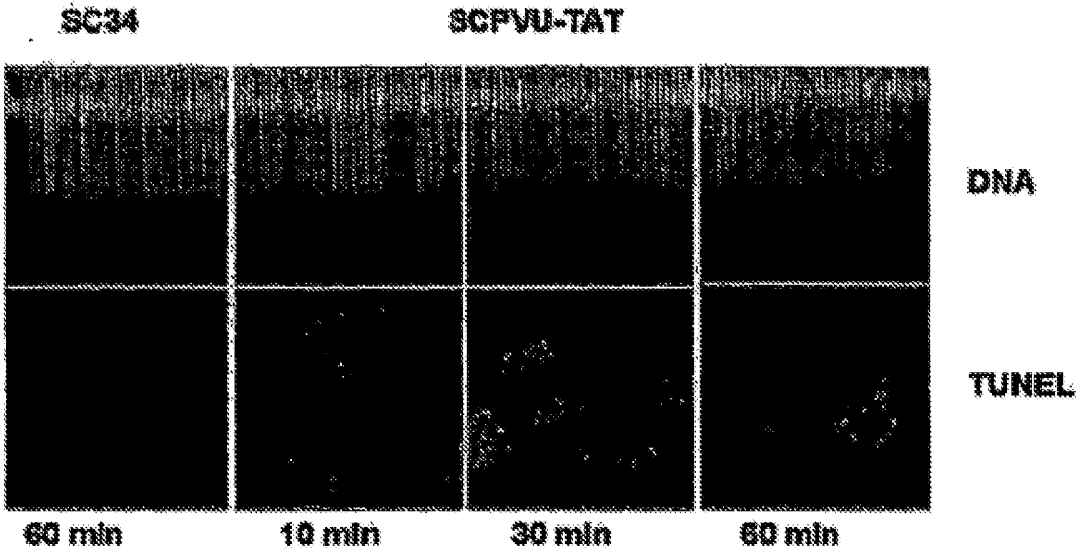


Figura 4

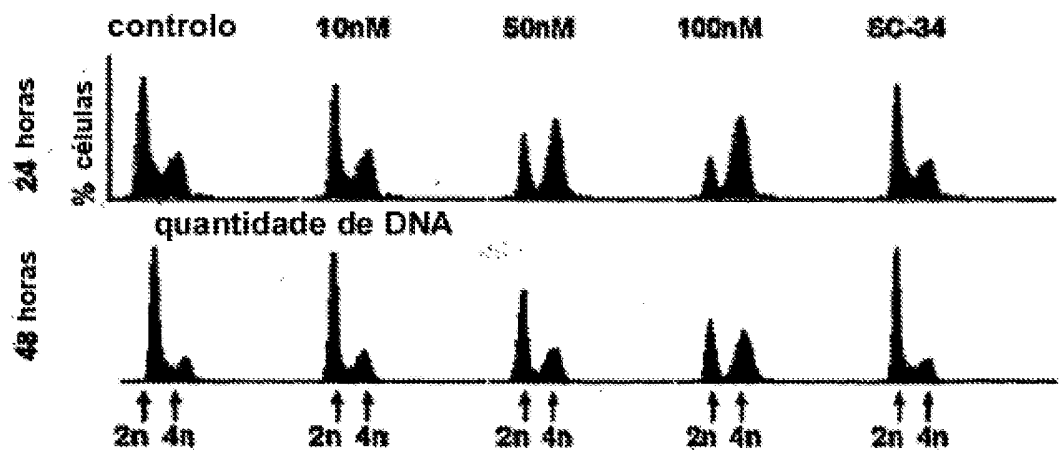


Figura 5

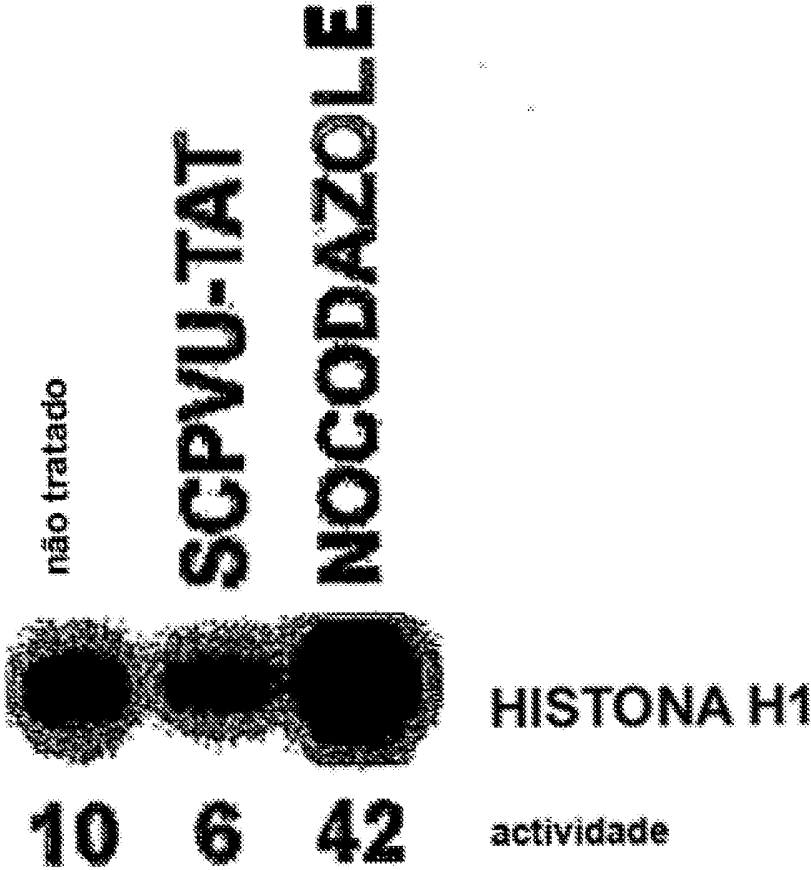


Figura 6

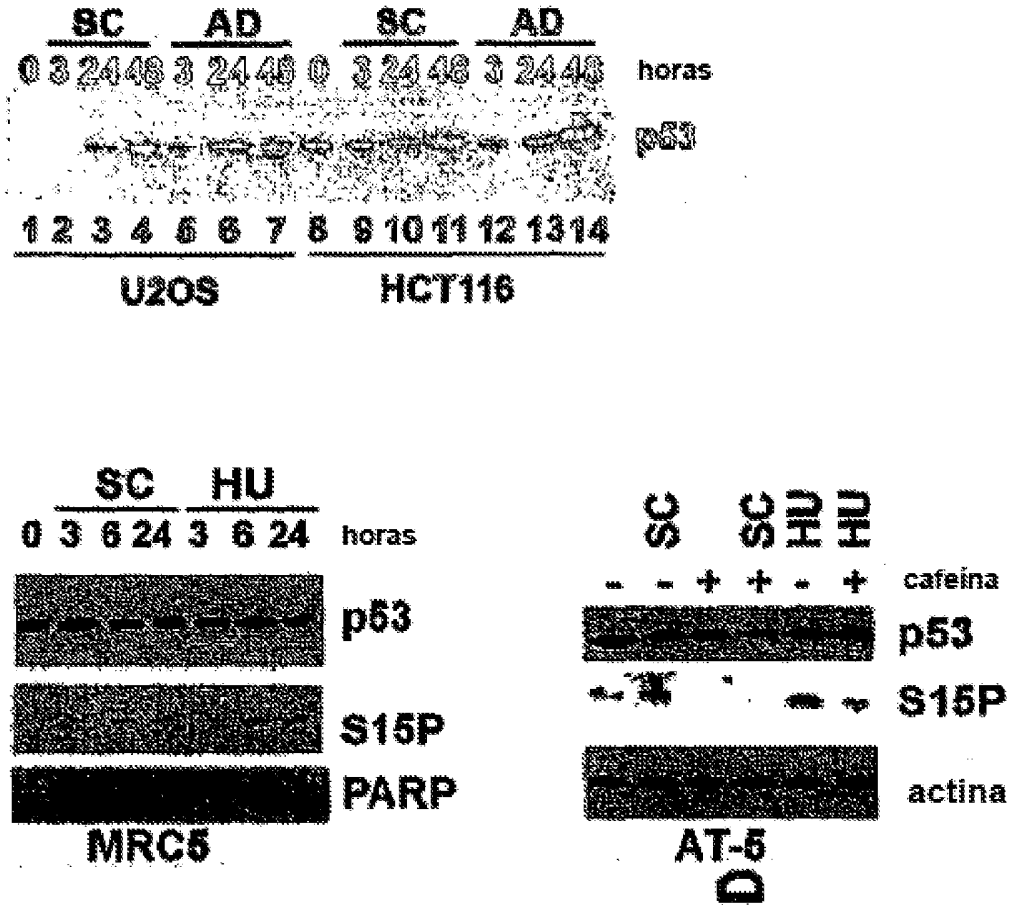


Figura 7

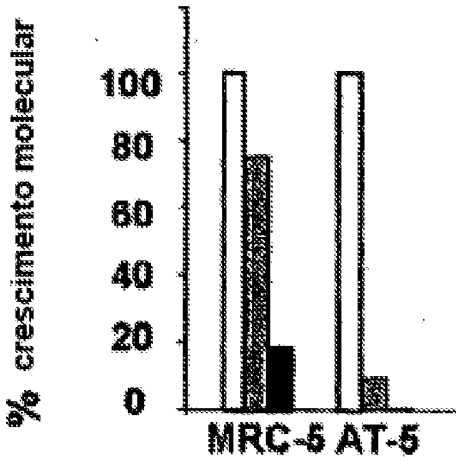
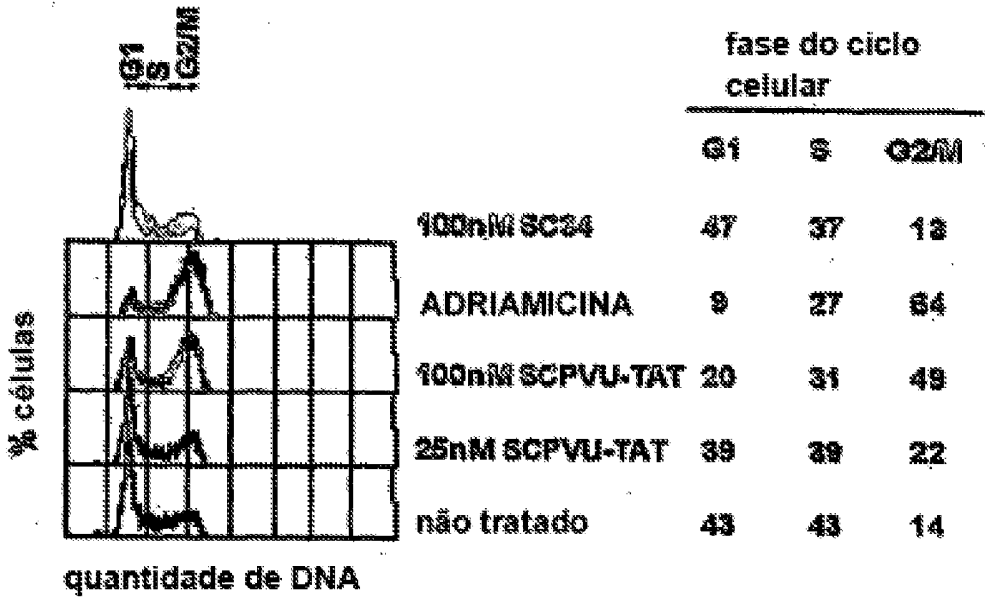


Figura 8

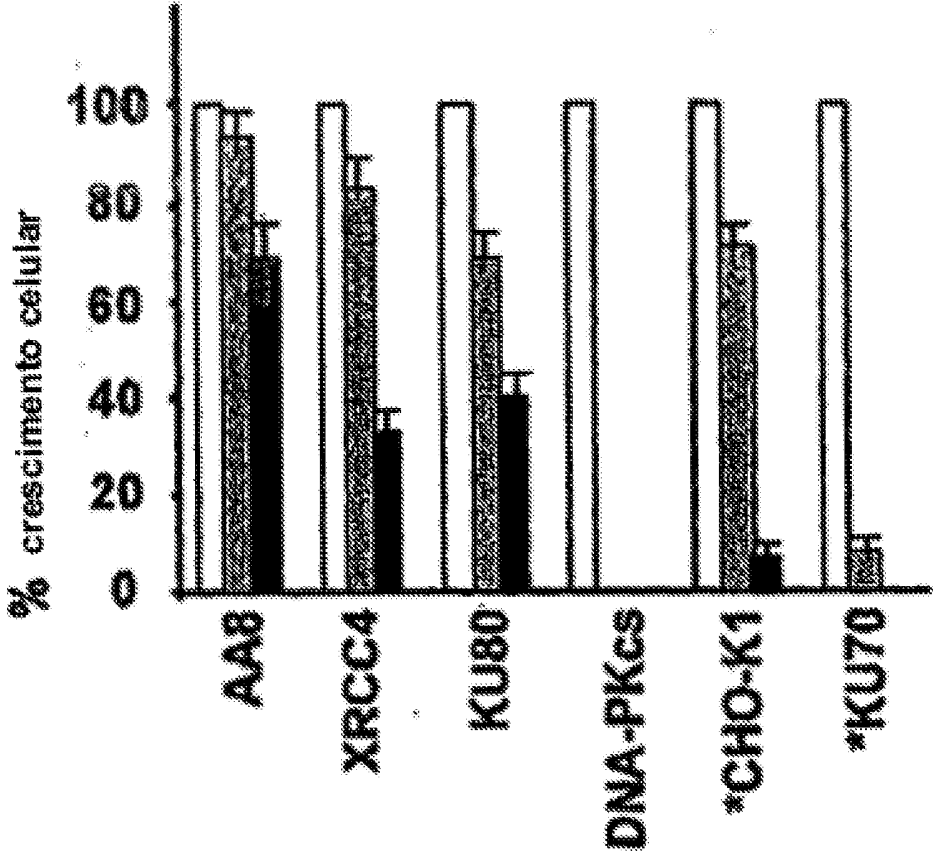


Figura 9

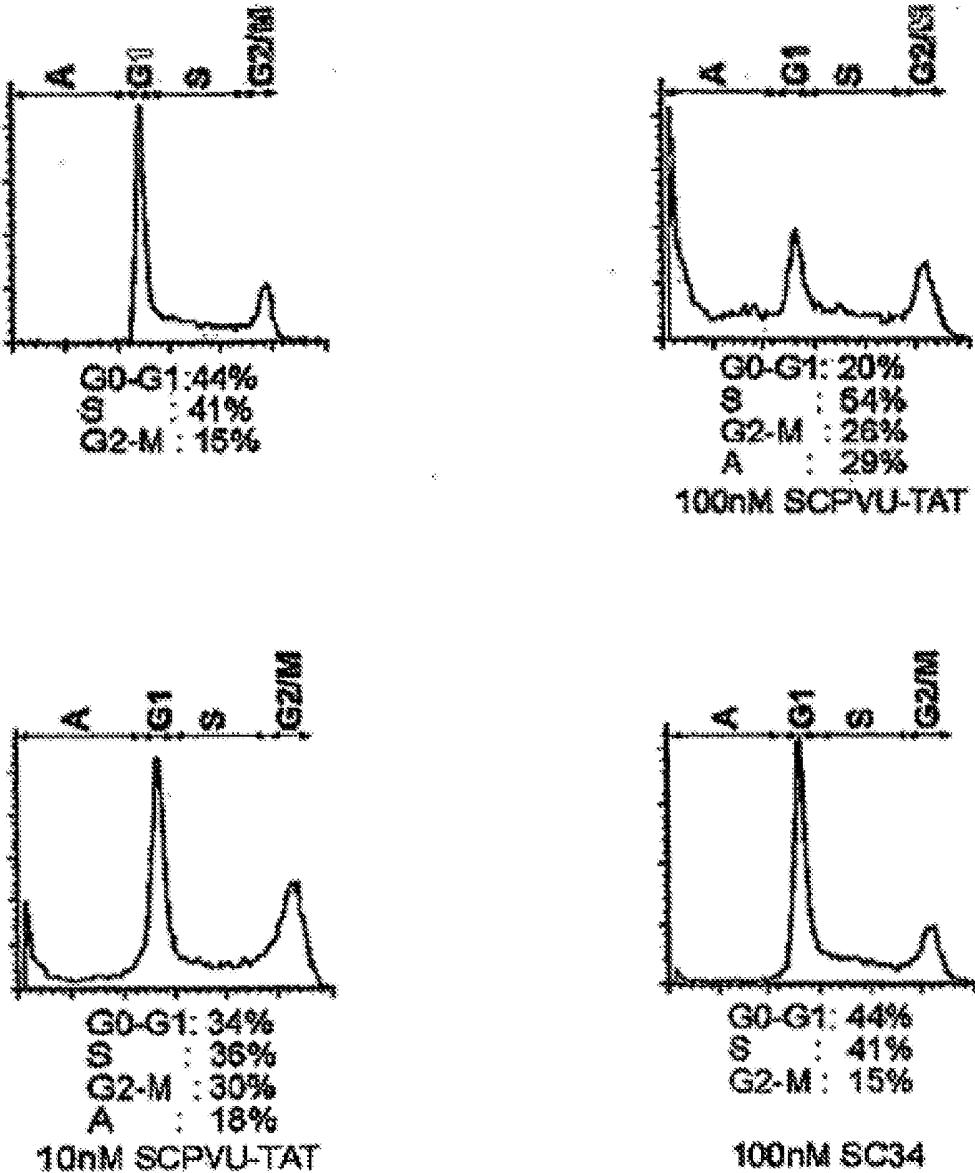


Figura 10

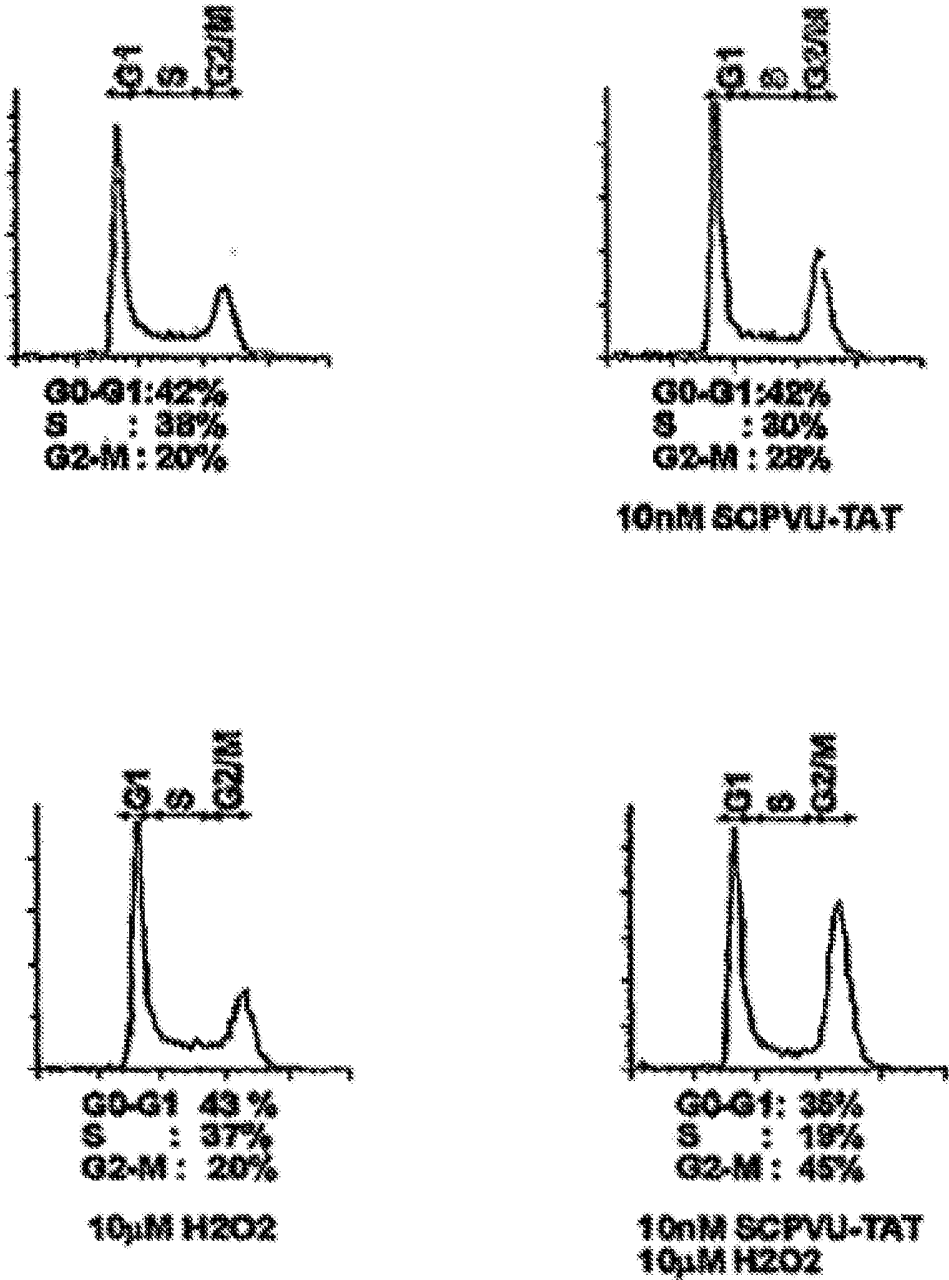


Figura 11

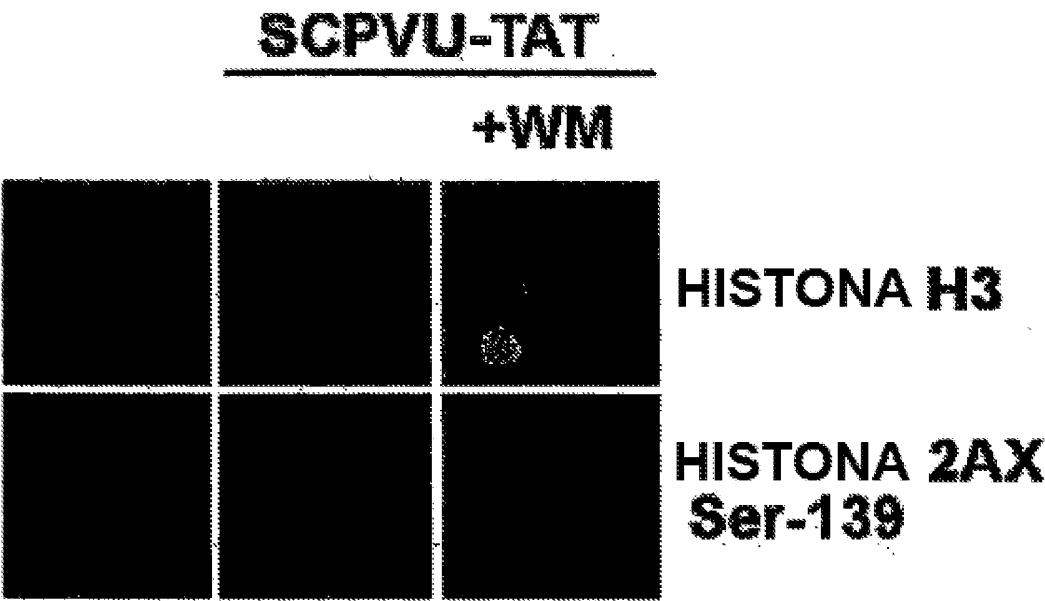


Figura 12

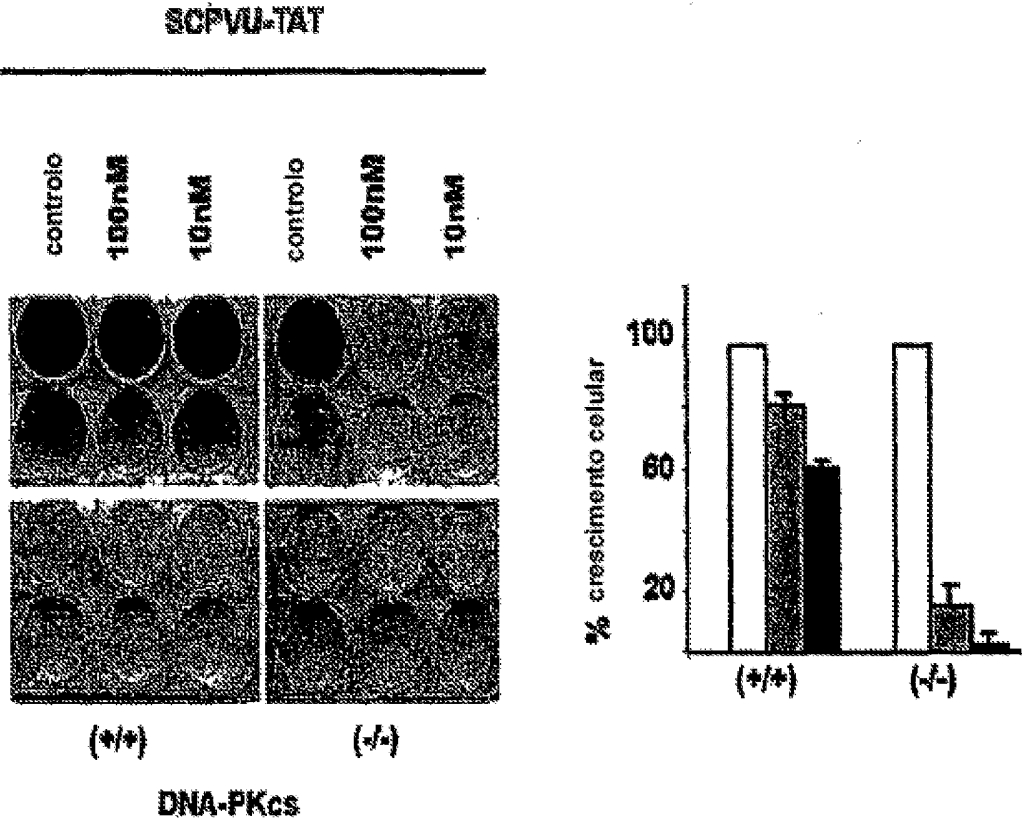


Figura 13

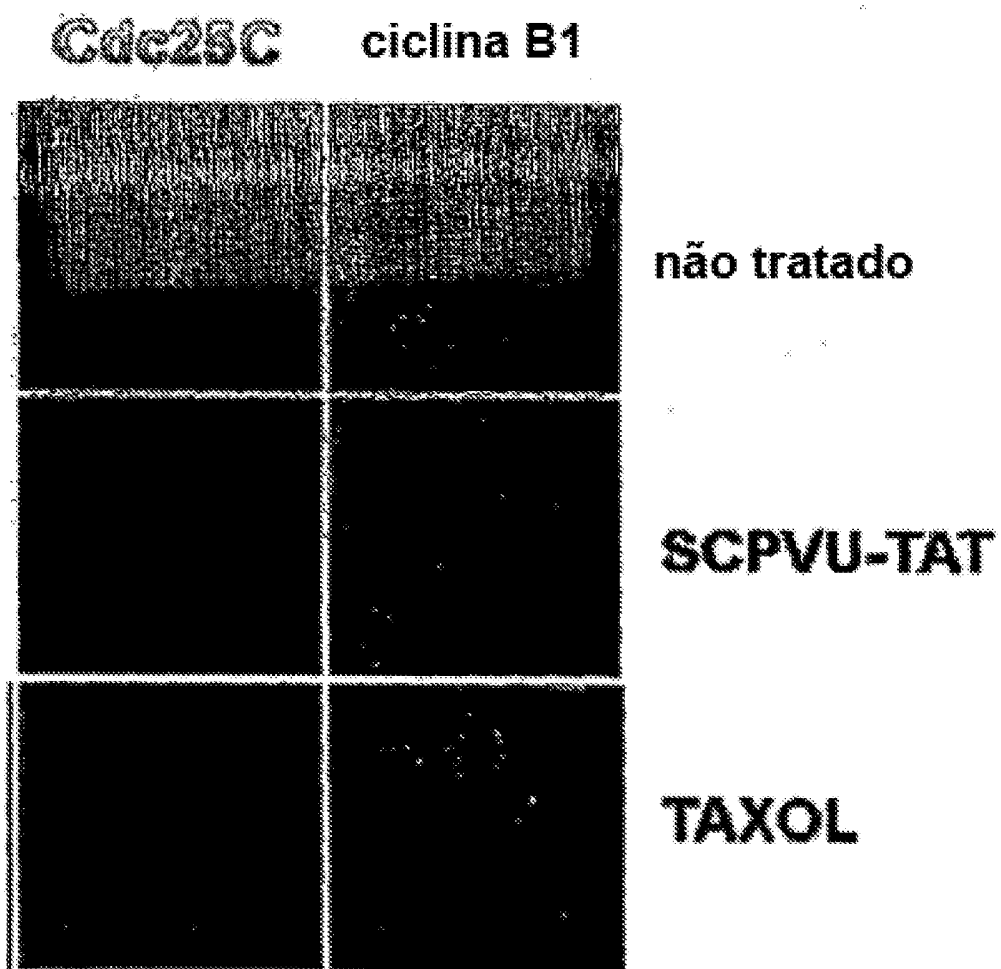


Figura 14

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- US 6307015 B
- WO 0046386 A
- WO 0058488 A
- WO 02096952 A
- US 6221335 B

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- ZHOU B.; S, ELLEDGE. *Nature*, 2000, vol. 408, 433-439
- PEITZ et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2002, vol. 99, 4489-4494
- TANAKA et al. *J Biomed Sci*, 2002, vol. 9, 534-541
- DONAHUE S.L. *Nucleic Acid Res*, 2001, vol. 29, 1582-1589
- ROSENBERG et al. *Innovations*, 1996, vol. 6, 1-6
- NISHIGORI C. et al. *J Immunol*, 1998, vol. 161, 2684-2691
- PHELAN et al. *Nature Biotechn.*, 1998, vol. 16, 440-443
- MELEKHOVETS et al. *Nucleic Acids Res*, 1996, vol. 24, 1908-1912
- SIMONCITS A. et al. *J. Mol. Biol*, 2001, vol. 309, 89-97
- NASTRI et al. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 25761-25767
- HO et al. *Cancer Res*, 2001, vol. 61, 474-577
- RAJARAO et al. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, vol. 215, 267-272
- RIEZMAN et al. *Cell*, 1997, vol. 91, 731-736 [0039]
- ZHONG Q. et al. *Science*, 1999, vol. 285, 747-750
- TORRANCE C. J. et al. *Nature Biotechnology*, 2001, vol. 19, 940-945
- TORRANCE et al. *Nature Biototechnology*, 2001, vol. 19, 940-945
- Using Antibodies: A Laboratory Manual. CSH press, 1999
- DAVID L SPECTOR; ROBERT D. GOLDMAN; LE-SLIE A. LEINWAND. *Cells: A Laboratory Manual*. CSH press, 1996
- LEES-MILLER SP et al. *Science*, 1995, vol. 267 (5201), 1183-5
- RAJ K et al. *Nature*, 2001, vol. 412 (6950), 914-7
- PANARELLO C. et al. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2000, vol. 116, 124-132