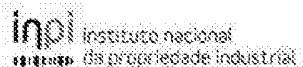


---

(11) Número de Publicação: **PT 2748182 T**



(51) Classificação Internacional:

**C07K 7/06** (2016.01) **C07K 7/08** (2016.01)  
**C07K 14/00** (2016.01) **C07K 19/00** (2016.01)  
**A61K 9/48** (2016.01)

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

---

(22) Data de pedido: **2012.08.23**

(30) Prioridade(s): **2011.08.23 US**  
**201161526526 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2014.07.02**

(45) Data e BPI da concessão: **2016.10.19**  
**015/2017**

(73) Titular(es):

**PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD  
COLLEGE  
17 QUINCY STREET CAMBRIDGE, MA 02138 US**

(72) Inventor(es):  
**CHRISTIAN DITTRICH**

**GAUDENZ DANUSER**  
CH  
US

(74) Mandatário:  
**MARIA DO ROSÁRIO MAY PEREIRA DA CRUZ**  
**AV DUQUE DE ÁVILA, 66, 7º 1050-083 LISBOA**

**PT**

(54) Epígrafe: **NANOPARTÍCULAS PEPTÍDICAS E UTILIZAÇÕES DAS MESMAS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A PÉPTIDOS ANFÍFÍLICOS E PARTÍCULAS QUE COMPREENDEM OS PÉPTIDOS ANFÍFÍLICOS. TAIS PÉPTIDOS ANFÍFÍLICOS E PARTÍCULAS DESCritos NO PRESENTE DOCUMENTO PODEM SER UTILIZADOS COMO UM SISTEMA DE APLICAÇÃO, POR EXEMPLO, PARA PROPÓSITOS TERAPÊUTICOS OU DIAGNÓSTICOS, OU COMO VEÍCULOS DE PENETRAÇÃO CELULAR OU AGENTES DE TRANSFEÇÃO CELULAR.

## **RESUMO**

### **NANOPARTÍCULAS PEPTÍDICAS E UTILIZAÇÕES DAS MESMAS**

A presente invenção refere-se a péptidos anfifílicos e partículas que compreendem os péptidos anfifílicos.

Tais péptidos anfifílicos e partículas descritos no presente documento podem ser utilizados como um sistema de aplicação, por exemplo, para propósitos terapêuticos ou diagnósticos, ou como veículos de penetração celular ou agentes de transfeção celular.

## **DESCRIÇÃO**

### **NANOPARTÍCULAS PEPTÍDICAS E UTILIZAÇÕES DAS MESMAS**

#### **REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS**

Este Pedido reivindica o benefício sob 35 U.S.C §119(e) de Pedido Provisório U.S. nºs 61/526.526 depositado em 23 de agosto de 2011.

#### **CAMPO DA TÉCNICA**

A presente invenção refere-se a péptidos anfifílicos e partículas que compreendem os péptidos anfifílicos.

#### **ANTECEDENTES**

As nanopartículas são úteis na estabilização e aplicação de fármacos: as mesmas aprimoram a solubilidade, prolongam a vida útil, reduzem os efeitos secundários e sustentam a exposição a fármacos para um efeito terapêutico prolongado. A matriz utilizada para aplicação direcionada de fármacos é geralmente composta por lípidos, polímeros ou metais e montada formando vesículas, micelas ou partículas. Veja-se Torchilin V. (2006) *Adv Drug Deliv.* 58:1532; Stark W (2011) *Angew Chem Int Ed.* 50: 1242; Soussan E et al. (2009) *ACIE.* 48: 274. As principais variáveis de partícula independentes que determinam a aplicabilidade *in vivo* incluem tamanho, carga de superfície e dispersibilidade, principalmente governadas pelo efeito hidrofóbico. Nel A et al. (2009) *Nat Matter.* 8: 543. Ao contrário desses materiais transportadores clássicos, é extremamente difícil

desenhar um sistema de libertação coloidal exclusivamente de aminoácidos, principalmente devido a questões de solubilidade de péptidos hidrofóbico curtos.

A dissolução de péptidos hidrofóbicos é enfadonha e, dessa forma, frequentemente exige protocolos elaborados de adição de solvente [14]. Apesar de todos os esforços, muitos péptidos hidrofóbicos não são solúveis e, consequentemente, difíceis de sintetizar por química de proteção Fmoc ou Boc: precipitação de péptidos na fase sólida durante a síntese resulta em rendimentos pequenos e quantidades dominantes de subprodutos.

Ainda, uma matriz de partícula composta de péptidos é desejada visto que o mesmo pode degradar-se em aminoácidos únicos. Além disso, diferente de outros materiais de matriz, por exemplo, polímero, produtos de síntese peptídica podem ser purificados até 98 %, evitando-se a polidispersidade molecular e, dessa forma, problemas com a reproduzibilidade de propriedades físico-químicas. Adicionalmente, as propriedades de estrutura peptídica podem ser prontamente moduladas, por exemplo, mediante a introdução de mutações pontuais de aminoácidos. Consequentemente, ainda há uma forte necessidade de manipular um transportador de fármaco degradável, que pode ser sintetizado e purificado num processo de amostra. Dittrich e Meier divulgam a caracterização estrutural e encapsulação de péptidos em nanopartículas sólidas (Macromolecular Bioscience, 10: 2010, 1406 a 1415). Collinset al. divulgam a automontagem de péptidos em nanopartículas esféricas para aplicação de porções hidrofílicas ao citosol (ACS Nano, 4(5); 2010, 2856 a 2864). O documento WO2009/109428A2 divulga a

automontagem de nanopartículas peptídicas para utilização como vacinas.

## **SUMÁRIO**

Vários aspetos e formas de realização fornecidos no presente documento referem-se a péptidos anfifílicos, partículas de péptidos que compreendem uma ou mais formas de realização dos péptidos anfifílicos descritos no presente documento, e utilizações dos péptidos anfifílicos ou partículas peptídicas descritos no presente documento. As cargas líquidas dos péptidos anfifílicos descritos no presente documento podem ser ajustadas ao controlar o número de grupos carregados presentes em resíduos de aminoácidos dos péptidos anfifílicos, por exemplo, ao mascarar um ou mais grupos amino, por exemplo, com acetilação. Portanto, os péptidos anfifílicos e partículas peptídicas descritos no presente documento podem ser utilizados como transportadores ou veículos de aplicação para tipos diferentes de agentes ativos, por exemplo, moléculas carregadas ou não-carregadas, ou moléculas polares ou não-polares. Além disso, as partículas peptídicas descritas no presente documento podem ser ajustadas para as suas solubilidades, por exemplo, numa condição fisiológica, ao controlar as razões de duas ou mais formas de realização dos péptidos anfifílicos presentes nas partículas peptídicas. Por exemplo, os péptidos anfifílicos completamente mascarados (por exemplo, completamente acetilados) podem formar, em geral, partículas peptídicas insolúveis, enquanto as partículas formadas a partir de péptidos parcialmente mascarados (por exemplo, parcialmente acetilados) ou não mascarados (por exemplo, não acetilados), em geral, têm

uma solubilidade maior que os péptidos anfifílicos completamente mascarados (por exemplo, completamente acetilados), por exemplo, numa condição fisiológica. Dessa forma, em algumas formas de realização, a solubilidade das partículas peptídicas descritas no presente documento, por exemplo, numa condição fisiológica, pode ser controlada ao formar as partículas peptídicas com uma mistura desses péptidos anfifílicos com solubilidades diferentes e, consequentemente, variando-se as suas quantidades nas partículas peptídicas. As partículas peptídicas da invenção, e sua utilização de acordo com a invenção, são definidas nas reivindicações.

Um aspeto fornecido no presente documento refere-se a um péptido anfifílico que compreende um segmento de peptidilo hidrofóbico e um segmento de péptido hidrofílico. O inventor constatou que ao modular a hidrofilicidade do segmento hidrofílico, pode controlar-se o tipo de partícula formada por autoagregação dos péptidos anfifílicos.

Consequentemente, um aspeto da divulgação fornece um péptido anfifílico que compreende um segmento de peptidilo hidrofóbico e um segmento de peptidilo hidrofílico, em que o segmento de peptidilo hidrofóbico compreende uma sequência de 2 a 10 D e L-aminoácidos alternados selecionada de entre alanina, valina, isoleucina, leucina (Leu), fenilalanina, tirosina ou triptofano (Trp), e em que o segmento de peptidilo hidrofílico compreende aminoácidos carregados ou não carregados, porém polares, ou derivados dos mesmos.

Em certas formas de realização desse aspetto e todos os

outros aspectos descritos no presente documento, o segmento de peptidilo hidrofóbico pode compreender uma sequência de aminoácidos de  $(Trp-Leu)_m-(Trp)_n$  ou  $(Leu-Trp)_p-(Leu)_q$ , em que cada Trp é D-Trp ou L-Trp e cada Leu é D-Leu ou L-Leu, m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 20, e n e q são, independentemente, 0 ou 1, desde que quando Trp for D-Trp, então, Leu seja L-Leu, e quando Trp for L-Trp, então, Leu seja D-Leu, ou vice-versa.

Em algumas formas de realização, o segmento de peptidilo hidrofílico pode compreender pelo menos uma carga presente tanto na terminação N como um resíduo de aminoácidos. Em tais formas de realização, a pelo menos uma carga pode ser tanto uma carga catiónica como aniónica. Em algumas formas de realização, a pelo menos uma carga catiónica pode estar num resíduo de aminoácidos selecionado do grupo que consiste em Lys, Arg, His, e quaisquer combinações dos mesmos. Em algumas formas de realização, a pelo menos uma carga aniónica pode estar num resíduo de aminoácidos selecionado do grupo que consiste em Asp ou Glu, e quaisquer combinações dos mesmos.

Em formas de realização alternativas, o segmento de peptidilo hidrofílico pode compreender aminoácidos não carregados, porém polares. Em outras formas de realização, o segmento de peptidilo hidrofílico pode compreender pelo menos uma carga e pelo menos um aminoácido não carregado, porém polar. Em várias formas de realização, o pelo menos um resíduo de aminoácidos não carregado, porém polar pode ser selecionado do grupo que consiste em Ser, Thr, Asn ou Gln, e quaisquer combinações

dos mesmos.

Em formas de realização específicas desse aspetto e todos os outros aspectos descritos no presente documento, o segmento de peptidilo hidrofílico pode compreender uma sequência de aminoácidos de  $(\text{Lys})_r$ , em que  $r$  é um número inteiro de 1 a 15. Em algumas formas de realização,  $r$  pode ser um número inteiro de 2 a 5. Em algumas formas de realização,  $r$  pode ser igual a 3.

Em algumas formas de realização desse aspetto e todos os outros aspectos descritos no presente documento, o segmento de peptidilo hidrofóbico pode compreender um polímero. Em algumas formas de realização, a ligação ao segmento de peptidilo hidrofóbico pode ser adaptada para se ligar covalentemente ao polímero. Em algumas formas de realização, o polímero pode ser um polímero biocompatível e/ou biodegradável. Exemplos do polímero incluem, mas não se limitam a, PEG, PGG, PEO, policaprolactona, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, poli-hidroxialcanoatos, dextrans, polianidridos, PLA-PGA, poliortéster, polifumarato, hidrogéis, quaisquer polímeros biocompatíveis e/ou biodegradáveis reconhecidos na técnica, e quaisquer combinações dos mesmos.

Em certas formas de realização desse aspetto e todos os outros aspectos descritos no presente documento, pelo menos um grupo amino no péptido anfifílico pode ser mascarado, por exemplo, por acetilação. Em tais formas de realização, o pelo menos um grupo amino pode ser um grupo amino de terminação N do péptido anfifílico. Em outras formas de realização, o pelo menos um grupo amino pode estar num resíduo de Lys do segmento de peptidilo

hidrofílico.

Em algumas formas de realização desse aspeto e todos os outros aspetos descritos no presente documento, todos os grupos amino no segmento de peptidilo hidrofílico podem ser mascarados, por exemplo, acetilados. Em outras formas de realização, o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico e pelo menos um dos grupos amino no segmento de peptidilo hidrofílico podem ser mascarados, por exemplo, acetilados. Em ainda outra forma de realização, o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico e todos os grupos amino no segmento de peptidilo hidrofílico podem ser mascarados, por exemplo, acetilados. Em algumas formas de realização quando o segmento de peptidilo hidrofílico compreende uma sequência de aminoácidos de  $(\text{Lys})_r$ , o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico e pelo menos um (incluindo pelo menos 2, pelo menos 3, ou mais) dos resíduos de Lys do segmento de peptidilo hidrofílico são mascarados, por exemplo, acetilados. Numa forma de realização em que o segmento de peptidilo hidrofílico compreende uma sequência de aminoácidos de  $(\text{Lys})_r$ , o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico e todos os resíduos de Lys do segmento de peptidilo hidrofílico são mascarados, por exemplo, acetilados.

Em várias formas de realização, o segmento de peptidilo hidrofóbico pode ser ligado à terminação C do segmento de peptidilo hidrofílico.

Em certas formas de realização, Leu é D-Leu. Em algumas formas de realização, Trp é L-Trp. Em algumas formas de realização, Lys é L-Lys. Em algumas formas de realização,

m ou p pode ser independentemente entre 1 e 3. Numa forma de realização, m ou p é 3. Numa forma de realização, n ou q é 1. Consequentemente, uma forma de realização do péptido anfifílico compreende a sequência de aminoácidos de (L-Lys) - (L-Lys) - (L-Lys) - (L-Trp) - (D-Leu) - (L-Trp) - (D-Leu) - (L-Trp) - (D-Leu) - (L-Trp), em que pelo menos um dos resíduos de L-Lys é acetilado.

Em algumas formas de realização, o péptido anfifílico pode compreender a sequência de aminoácidos de Ac-(L-Lys) - (L-Lys) - (L-Lys) - (L-Trp) - (D-Leu) - (L-Trp) - (D-Leu) - (L-Trp) - (D-Leu) - (L-Trp). Em tais formas de realização, pelo menos um dos resíduos de L-Lys pode ser acetilado.

Em outras formas de realização, o péptido anfifílico pode compreender a sequência de aminoácidos de Ac-(L-Lys(Ac)) - (L-Lys(Ac)) - (L-Lys(Ac)) - (L-Trp) - (D-Leu) - (L-Trp) - (D-Leu) - (L-Trp) - (D-Leu) - (L-Trp)-X, em que X está ausente ou NH<sub>2</sub>. O péptido anfifílico pode ter uma sequência de aminoácidos de qualquer comprimento. Em algumas formas de realização, o péptido anfifílico pode ter um comprimento de cerca de 5 a cerca de 25 resíduos de aminoácidos.

O segmento de peptidilo hidrofóbico ou segmento de peptidilo hidrofílico do péptido anfifílico pode ser modificado. Por exemplo, pelo menos um de entre o segmento de peptidilo hidrofóbico ou o segmento de peptidilo hidrofílico pode compreender pelo menos uma mutação pontual. Em várias formas de realização, pelo menos uma ligação amida de cadeia principal pode incluir uma ligação de substituição de amida. Em outras formas de realização, o péptido anfifílico pode compreender pelo menos um β-aminoácido, γ-aminoácido, ou quaisquer combinações dos mesmos.

Em algumas formas de realização, o péptido anfifílico compreende um segmento de peptidilo hidrofóbico e um segmento de peptidilo hidrofílico, em que o segmento de peptidilo hidrofóbico compreende a sequência de aminoácidos  $(AA^{11}-AA^{12})_b-(AA^{13})_d$ , em que  $AA^{11}$ ,  $AA^{12}$  e  $AA^{13}$  são resíduos de aminoácidos hidrofóbicos selecionados independentemente para cada ocorrência, b é um número inteiro de 1 a 20, e d é 0 ou 1, desde que  $AA^{11}$  e  $AA^{12}$  tenham a configuração oposta (isto é, D- e L-) e  $A^{12}$  e  $A^{13}$  tenham a configuração oposta (isto é, D- e L-); o segmento de peptidilo hidrofílico compreende um ou mais aminoácidos hidrofílicos ou derivados dos mesmos; e o péptido anfifílico é parcial ou completamente mascarado.

Em algumas formas de realização, um péptido anfifílico compreende a sequência de aminoácidos  $(L-Lys)_{r'}-((L-Trp)-(D-Leu))_{m'}-(L-Trp)$ , em que  $r'$  é um número inteiro de 3 a 21 e  $m'$  é um número inteiro de 3 a 20, e em que pelo menos um de entre um grupo amino de terminação N ou um grupo amino de cadeia lateral de pelo menos um resíduo de Lys é conjugado a um grupo protetor de azoto ou amino.

O inventor constatou que algumas formas de realização dos péptidos anfifílicos descritos no presente documento podem ter capacidade de penetração celular. Dessa forma, em algumas formas de realização, os péptidos anfifílicos descritos no presente documento podem ser utilizados como agentes de penetração e/ou transfeção de células. Nessas formas de realização, os péptidos anfifílicos podem ser desenhados para serem carregados positivamente. Consequentemente, a utilização de uma composição que compreende um péptido anfifílico com carga positiva como um agente de penetração ou agente de transfeção celular é

fornecido no presente documento, em que o péptido anfifílico de carga positiva compreende um segmento de peptidilo hidrofóbico e um segmento de peptidilo hidrofílico. O segmento de peptidilo hidrofóbico do péptido anfifílico de carga positiva compreende uma sequência de aminoácidos de  $(Trp-Leu)_m-(Trp)_n$  ou  $(Leu-Trp)_p-(Leu)_q$ , em que cada Trp é D-Trp ou L-Trp e cada Leu é D-Leu ou L-Leu, m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 5, e n e q são, independentemente, 0 ou 1, desde que quando Trp for D-Trp, então, Leu seja L-Leu, e quando Trp for L-Trp, então, Leu é D-Leu, ou vice-versa; enquanto o segmento de peptidilo hidrofílico compreende uma sequência de aminoácidos de  $(Lys)_r$ , em que r é um número inteiro de 1 a 15. Adicionalmente, no péptido anfifílico com carga positiva, pelo menos um dos resíduos ou o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico não é acetilado. Em algumas formas de realização, todos os resíduos de Lys e o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico com carga positiva não são acetilados. Em algumas formas de realização, o péptido anfifílico com carga positiva pode compreender uma sequência de aminoácidos de  $(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)=X$ , em que X está ausente ou  $NH_2$ .

Em algumas formas de realização, a composição pode compreender adicionalmente uma molécula de ácido nucleico (por exemplo, ADN ou ARN) a ser libertada numa célula.

Adicionalmente, os péptidos anfifílicos descritos no presente documento também podem ser utilizados, individualmente ou como parte de um sistema de aplicação para aplicar um composto de interesse, por exemplo, um

agente ativo, a uma célula. O sistema de aplicação pode ser um sistema de aplicação direcionada. Os compostos a serem libertados podem incluir agentes terapêuticos, agentes diagnósticos e quaisquer combinações dos mesmos. Consequentemente, um aspeto da divulgação fornece um método de utilização de um péptido anfifílico como um sistema de aplicação, o método que compreende um agente ativo com um péptido anfifílico e colocar uma célula em contato com o complexo. Em algumas formas de realização, o método pode ser utilizado para propósitos terapêuticos ou diagnósticos.

Num outro aspetto, a divulgação fornece partículas que compreendem um péptido anfifílico descrito no presente documento. O inventor constatou entre outros que as partículas formadas pelos péptidos anfifílicos descritos no presente documento se diferem das partículas descritas em C. Dittrich, Ph.D. Thesis, Universität Basel, 2007. Para esclarecer, as partículas fabricadas a partir dos péptidos anfifílicos descritos no presente documento são diferentes daquelas descritas em Dittrich (2007). Os péptidos descritos em Dittrich (2007) não compreendem grupos amino mascarados. Como tais, as partículas formadas a partir de tais péptidos são micelas, por exemplo, partículas ocas, e partículas não sólidas conforme descrito no presente documento. Consequentemente, em certas formas de realização, as partículas peptídicas descritas no presente documento não são micelas, por exemplo, partículas ocas. Indicado de outra forma, em certas formas de realização, as partículas peptídicas descritas no presente documento são partículas sólidas.

Em algumas formas de realização, a partícula que comprehende um péptido anfifílico descrito no presente documento pode compreender adicionalmente um ligando. Consequentemente, numa forma de realização, uma partícula peptídica descrita no presente documento comprehende um péptido anfifílico, sendo que o péptido anfifílico comprehende um segmento de peptidilo hidrofóbico e um segmento de peptidilo hidrofílico, em que o segmento de peptidilo hidrofóbico comprehende uma sequência de aminoácidos de  $(Trp-Leu)_m-(Trp)_n$  ou  $(Leu-Trp)_p-(Leu)_q$ , em que cada Trp é D-Trp ou L-Trp e cada Leu é D-Leu ou L-Leu, m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 5, e n e q são, independentemente, 0 ou 1, desde que quando Trp for D-Trp, então, Leu seja L-Leu, e quando Trp for L-Trp, então, Leu seja D-Leu, ou vice-versa; e em que o segmento de peptidilo hidrofílico comprehende uma sequência de aminoácidos de  $(Lys)_r$ , em que r é um número inteiro de 1 a 15, e em que a partícula peptídica comprehende adicionalmente sobre sua superfície externa um ligando.

Numa forma de realização, o ligando pode ser um ligando de recetor de superfície celular ou um anticorpo. Os ligandos de recetor de superfície celular exemplificadores incluem, mas não se limitam a, transferina, EGF, folato e quaisquer combinações dos mesmos. Em certas formas de realização, o ligando pode estar presente sobre uma superfície externa da partícula. Por exemplo, o ligando pode ser adsorvido sobre a superfície externa da partícula descrita no presente documento. Em formas de realização alternativas, o ligando pode ser covalentemente ligado ao péptido anfifílico. Numa forma de realização, o ligando é

covalentemente ligado ao segmento de peptidilo hidrofílico do péptido anfifílico.

A espessura do ligando presente sobre a superfície externa da partícula descrita no presente documento depende, em parte, do tamanho da molécula de ligando. Em algumas formas de realização, a espessura do ligando presente sobre a superfície externa da partícula pode situar-se na faixa de cerca de 1 nm a cerca de 100 nm. Numa forma de realização, a espessura do ligando presente sobre a superfície externa da partícula é cerca de 10 nm. Em algumas formas de realização, uma razão do ligando para os péptidos anfifílicos pode situar-se na faixa de cerca de 1:10 a cerca de 1:1.000.000.

O ligando presente sobre a partícula peptídica pode ser selecionado com base nos tipos de alvos (por exemplo, mas sem se limitar a, células, bactérias, proteínas, e/ou ácidos nucleicos) para os quais as partículas peptídicas serão libertadas. Por exemplo, para facilitar a aplicação de uma partícula peptídica descrita no presente documento a uma célula, um ligando específico para o receptor de superfície celular pode ser selecionado. Então, algumas formas de realização das partículas peptídicas descritas no presente documento podem ser utilizadas para aplicação direcionada de um agente ativo utilizando as partículas peptídicas como transportadores ou veículos de aplicação. Em tais formas de realização, as partículas peptídicas podem ser utilizadas para aplicação a uma célula de um agente ativo que é impermeável à célula quando aplicadas por si.

Consequentemente, em várias formas de realização desse aspeto e todos os outros aspetos descritos no presente documento, a partícula peptídica pode compreender um ou mais agentes ativos. Em tais formas de realização, o agente ativo pode ser disperso dentro da partícula. O agente ativo pode não ter carga líquida ou uma carga líquida. Em algumas formas de realização, o agente ativo pode compreender pelo menos um grupo aromático. Exemplos do agente ativo incluem, mas não se limitam a, proteínas, péptidos,抗原s, anticorpos ou porções dos mesmos, moléculas semelhantes a anticorpo, enzimas, ácidos nucleicos, aptâmeros, moléculas pequenas, antibióticos, agentes farmaceuticamente ativos, agentes terapêuticos, agentes de contraste, e quaisquer combinações dos mesmos. Numa forma de realização, o agente ativo é um agente farmaceuticamente ativo ou um agente terapêutico. Numa forma de realização, o agente ativo é uma molécula de ácido nucleico, incluindo, mas sem se limitar a, siARN miARN, shARN, ADN e quaisquer combinações dos mesmos. Em formas de realização particulares, a razão do agente ativo para os péptidos anfifílicos pode situar-se na faixa de cerca de 1:1 a cerca de 1:100.000, de cerca de 1:1 a cerca de 1:10.000, de cerca de 1:1 a cerca de 1:1.000, de cerca de 1:1 a cerca de 1:100, ou de cerca de 1:1 a cerca de 1:10.

A partícula peptídica desse aspeto e todos os outros aspetos descritos no presente documento podem ser de qualquer tamanho. Em algumas formas de realização, a partícula peptídica pode ter um tamanho de cerca de 5 nm a cerca de 5.000 nm. Em algumas formas de realização, a partícula pode ter um tamanho de cerca de 30 nm a cerca de 150 nm.

Em algumas formas de realização, a partícula peptídica pode compreender uma mistura de péptidos anfifílicos completamente mascarados (por exemplo, completamente acetilados) e parcialmente mascarados (por exemplo, parcialmente acetilados) descritos no presente documento. Nessas formas de realização, a razão dos péptidos anfifílicos completamente acetilados para os parcialmente mascarados pode situar-se na faixa de cerca de 95:5 a cerca de 1:1. Em certas formas de realização, a partícula pode compreender adicionalmente péptidos anfifílicos não mascarados (por exemplo, não acetilados).

Consequentemente, uma partícula peptídica mista que compreende um péptido anfifílico completamente acetilado e um péptido anfifílico parcialmente acetilado ou não acetilado também é fornecida no presente documento. Em formas de realização específicas, a partícula peptídica mista compreende um primeiro péptido anfifílico e um segundo péptido anfifílico, em que o primeiro e o segundo péptido anfifílico, cada um, compreende independentemente um segmento de peptidilo hidrofóbico e um segmento de peptidilo hidrofílico, em que o segmento de peptidilo hidrofóbico compreende uma sequência de aminoácidos de  $(Trp-Leu)_m-(Trp)_n$  ou  $(Leu-Trp)_p-(Leu)_q$ , em que cada Trp é D-Trp ou L-Trp e cada Leu é D-Leu ou L-Leu, m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 5, e n e q são, independentemente, 0 ou 1, desde que quando Trp for D-Trp, então, Leu seja L-Leu, e quando Trp for L-Trp, então, Leu seja D-Leu, ou vice-versa; enquanto o segmento de peptidilo hidrofílico compreende uma sequência de aminoácidos de  $(Lys)_r$ , em que r é um número inteiro de 1 a 15. Adicionalmente, o grupo amino de terminação N e todos os resíduos de Lys do primeiro péptido anfifílico

são acetilados; enquanto pelo menos o grupo amino de terminação N ou um dos resíduos de Lys do segundo péptido anfifílico não é acetilado. Em algumas formas de realização, nenhum de entre o grupo amino de terminação N e os resíduos de Lys do segundo péptido anfifílico é acetilado.

Em formas de realização particulares, o primeiro e o segundo péptido anfifílico podem, cada um, compreender independentemente uma sequência de aminoácidos de (L-Lys) - (L-Lys) - (L-Trp) - (D-Leu) - (L-Trp) - (D-Leu) - (L-Trp) - (D-Leu) - (L-Trp) - X, em que X está ausente ou NH<sub>2</sub>.

A razão entre o primeiro péptido anfifílico e o segundo péptido anfifílico pode ser variada com base em vários fatores, por exemplo, mas sem se limitar a, solubilidade e/estabilidade desejada da partícula peptídica, e/ou propriedades do agente ativo a ser carregado na mesma. Em algumas formas de realização, a razão entre o primeiro péptido anfifílico e o segundo péptido anfifílico pode situar-se numa faixa de cerca de 1:1 a cerca de 1000:1. Em outras formas de realização, a razão entre o primeiro péptido anfifílico e o segundo péptido anfifílico pode situar-se numa faixa de cerca de 5:1 a cerca de 100:1.

Em algumas formas de realização, a partícula peptídica mista pode compreender adicionalmente um agente ativo descrito no presente documento. O agente ativo pode estar presente na partícula peptídica mista em quaisquer quantidades, por exemplo, dependendo da capacidade de carregamento da partícula peptídica e/ou capacidade de ligação do primeiro ou segundo péptido anfifílico. Em algumas formas de realização, a razão entre o agente ativo e os segundos péptidos anfifílicos pode situar-se

numa faixa de cerca de 1:1000 a cerca de 1:1, ou cerca de 1:100 a cerca de 1:10. Em algumas formas de realização, a razão entre o agente ativo e o segundo péptido anfifílico pode situar-se numa faixa de cerca de 1:10 a cerca de 1:2.

Sem ater à teoria, a presença do segundo péptido anfifílico na partícula peptídica mista pode fornecer uma carga catiónica para ligação a moléculas de ácido nucleico. Dessa forma, em algumas formas de realização, o agente ativo pode incluir uma molécula de ácido nucleico. Em algumas formas de realização, a partícula peptídica mista pode compreender adicionalmente sobre sua superfície externa um ligando. Conforme anteriormente descrito neste documento, a seleção de um ligando pode ser determinada com base numa molécula alvo (por exemplo, mas sem se limitar a, células, bactérias, proteínas, ácidos nucleicos) à qual a partícula peptídica mista se liga. Exemplos não limitadores de um ligando podem incluir um ligando de receptor de superfície celular ou uma proteína como um anticorpo. Em algumas formas de realização, o ligando pode ser covalentemente ligado a pelo menos um de entre o primeiro e o segundo péptido anfifílico, por exemplo, o segmento de peptidilo hidrofílico de pelo menos um de entre o primeiro e o segundo péptido anfifílico.

A partícula peptídica mista descrita no presente documento pode ser utilizada para encapsular qualquer agente ativo descrito no presente documento. Numa forma de realização específica, a partícula peptídica mista pode ser utilizada para encapsular uma molécula de ácido nucleico. Dessa forma, um aspeto adicional das invenções

fornecer a utilização de uma ou mais formas de realização da partícula peptídica mista compreendendo um primeiro péptido anfifílico e um segundo péptido anfifílico para a aplicação de uma molécula de ácido nucleico a uma célula. Em algumas formas de realização, a molécula de ácido nucleico pode incluir ARN (por exemplo, mas sem se limitar a, siARN, miARN, shARN), ADN, ou quaisquer combinações dos mesmos.

As composições ou kits para realizar uma ou mais formas de realização de uma partícula peptídica ou uma partícula peptídica mista são apresentadas, também, no presente documento. Em algumas formas de realização, a composição ou kit pode compreender um péptido anfifílico descrito no presente documento. O péptido anfifílico fornecido na composição ou kit pode ser armazenado em um recipiente. Dependendo da escolha de um usuário de uma partícula peptídica ou partícula mista descrita no presente documento a ser produzida, em algumas formas de realização, a composição ou kit pode compreender um primeiro péptido anfifílico e um segundo péptido anfifílico descritos no presente documento. O péptido anfifílico pode ser fornecido em pó ou pó liofilizado. Em algumas formas de realização, a composição ou kit pode compreender adicionalmente pelo menos um reagente, por exemplo, para reconstituição do péptido anfifílico em pó, para emulsificação de uma mistura de montagem de partícula, ou ambos. Em algumas formas de realização, a composição ou kit pode compreender adicionalmente um ligando descrito no presente documento, por exemplo, fornecido em um recipiente separado. Em algumas formas de realização, a composição ou kit pode compreender adicionalmente um agente ativo a ser encapsulado na

partícula peptídica. O agente ativo pode ser fornecido em um recipiente separado.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

As Figuras 1A a 1B mostram resultados de caracterização de CD3ac purificado de acordo com uma ou mais formas de realização da invenção. A Figura 1A mostra um espectro de massa num espectrómetro de massa orbitrap. A Figura 1B mostra perfis de eluição por RP-HPLC sobrepostos de CD3ac e síntese de CD3 intermediário medida por absorção em 280 nm. A pureza de produto excede 95% em ambos os casos.

As Figuras 2A a 2C mostram imagens obtidas por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) de nanopartículas peptídicas CD3ac de acordo com uma ou mais formas de realização da invenção. As Figuras 2A a 2B mostram imagens obtidas por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) de microesferas de CD3ac liofilizadas. A Figura 2C mostra uma imagem obtida por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) de uma microesfera de CD3ac, rompida no processo de liofilização. A imagem divulga a propriedade sólida dos precipitados de péptido. As Figuras 3A a 3B mostram ajustes lineares de resultados de dispersão dinâmica de luz (DLS). É determinado que é improvável que tanto a concentração de partículas (Figura 3A) como ângulo de deteção (Figura 3B) influenciem as propriedades de difusão de microesferas de CD3ac em solução aquosa.

A Figura 4 mostra um conjunto de espectros de dicroísmo circular de derivados de CD3ac CD1, CD2, CD3 e CD4. Os números apresentados são iguais ao número de resíduos de

lisina ligados de modo N-terminal.

As Figuras 5A a 5B mostram os apenas efeitos de L-aminoácidos sobre as propriedades de nanopartículas de péptido. A Figura 5A mostra uma imagem obtida por microscopia eletrônica de varrimento (SEM) de LCD3ac precipitado. A montagem esférica, como observado em partículas de CD3ac, não poderia ser observada com LCD3ac precipitado. A Figura 5B mostra espectros de dicroísmo circular de CD3 (linha reta) e LCD3 (linha tracejada), indicando a diferença em estrutura secundária devido à quiralidade de aminoácidos leucina. LCD3 exibe características alfa-helicoidais.

As Figuras 6A a 6C mostram imagens de microscopia confocal de microesferas de CD3ac co-montadas com rosa bengala (RB), 5-carboxi-fluoresceína (CF), ou uma mistura de ambas. A Figura 6A mostra imagens de microscopia confocal de microesferas de CD3ac co-montadas com RB. A Figura 6B mostra imagens de microscopia confocal de microesferas de CD3ac co-montadas com CF. A Figura 6C mostra microesferas de CD3ac carregadas com RB e CF, indicando a capacidade de as microesferas peptídicas encapsularem simultaneamente compostos de alta e baixa solubilidade em solução aquosa. Como mostrado nas Figuras 6A a 6C, as microesferas de CD3ac contendo RB são observadas como esferas individuais, enquanto as microesferas contendo exclusivamente CF tendem a se agregar. Nas Figuras 6A a 6C, painéis superiores esquerdos: emissão de fluorescência de RB; painéis inferiores direitos: emissão de fluorescência de CF; painéis superiores direitos: imagem de contraste de fase; e painéis inferiores esquerdos: co-localização de ambos

os canais fluorescentes. A largura de um painel corresponde a 55  $\mu\text{m}$ .

As Figuras 7A a 7B mostram eficiência de encapsulação de rosa bengala (RB) em nanopartículas de CD3ac. A Figura 7A mostra resultados de eficiência de co-precipitação de RB com CD3ac. O eixo geométrico x descreve a razão de concentração inicialmente dissolvida de CD3ac para RB, antes da troca e montagem de solvente. Eixo geométrico y esquerdo: composição molar de precipitado (o). Eixo geométrico y direito: razão molar de RB encapsulada para total ( $\Delta$ ). Como um exemplo, em uma razão inicial de RB: CD3ac = 1:4, cerca de 15 mol-% das microesferas consistem em RB e cerca de 33% de RB inicialmente dissolvida foram encapsulados nas montagens. A Figura 7B mostra a absorção de triptofano de frações de pélete ( $\blacktriangle$ ) e sobrenadante ( $\bullet$ ) contendo quantidades diferentes de RB, indicando que a montagem de CD3ac não é comprometida por concentrações equimolares de carga de RB.

As Figuras 8A a 8I mostram resultados de caracterização de partículas peptídicas CD3ac montadas na presença de transferrina marcada com AF568 (Tfn-AF568) e Flutax-2 e transferrina (Tfn). As Figuras 8A a 8C mostram imagens de microscopia de fluorescência vermelha (Figura 8A) e verde (Figura 8B) das partículas peptídicas antes da tripsinização. A imagem unida (Figura 8C) mostra a distribuição de fluorescência diferencial para Tfn-AF-568 (anel) e Flutax-2 (igualmente distribuído). As Figuras 8D a 8F mostram imagens fluorescentes da mesma amostra após a tripsinização durante 6 horas. O anel característico de fluorescência de Tfn-AF-568 desapareceu (Figura 8D) e a intensidade de emissão de Flutax-2 aumentou por um fator

de 13,5 (Figura 8E). As Figuras 8G a 8H mostram o perfil de nível de cinza calculado pela média de n=10 partículas no canal vermelho (Figura 8G) e verde (Figura 8H) antes e após a tripsinização. A Figura 8I mostra um diagrama esquemático de partículas peptídicas de CD3ac com uma coroa de proteína (por exemplo, Tfn-AF568) antes e após a tripsinização.

As Figuras 9A a 9D mostram os resultados de composições de Flutax-2 e Tfn-AF568 dentro das nanopartículas peptídicas CD3ac. As Figuras 9A e 9B mostram a composição quantificada de partículas peptídicas automontadas com Tfn-AF568 (Figura 9A) e Flutax-2 (Figura 9B), respetivamente. O eixo geométrico x descreve a razão de concentração de Tfn-AF568 ou Flutax-2 inicialmente dissolvido para CD3ac (123  $\mu$ M), antes da troca e montagem de solvente. Eixo geométrico y esquerdo (símbolos abertos): composição molar de nanopartículas peptídicas (PNPs). Eixo geométrico y direito (símbolos fechados): razão de Tfn-AF568 ou Flutax-2 encapsulado para total. Como um exemplo na Figura 9B, numa razão inicial de Flutax-2:CD3ac = 0,1, cerca de 7,5 mol-% de uma PNP consiste em Flutax-2 e cerca de 80 % de Flutax-2 inicialmente dissolvido foram encapsulados. A eficiência de encapsulação consistente de Flutax-2 em torno de 80 % corresponde a um coeficiente de separação logarítmico de 5,25. A Figura 9C mostra a distribuição de intensidade de fluorescência de Tfn-AF568 de PNPs antes e após a competição com Tfn. As partículas foram montadas na presença de 10  $\mu$ g/mL de Tfn-568 e imageadas imediatamente após a formação. As barras pretas correspondem à distribuição de intensidade da ponta de fluorescência resultante. Após a distribuição representada por barras

cinzas descreve as intensidades de fluorescência das mesmas PNPs após um período de incubação de 24 horas a 37 °C na presença de 1360 µg/mL de Tfn. A Figura 9D mostra uma distribuição de intensidade de fluorescência de Tfn-AF568 em plotagem de dados cumulativos de PNPs antes e após a competição com Tfn conforme mostrado na Figura 9C. As Figuras 10A a 10K mostram o diâmetro da partícula e caracterização de morfologia de nanopartícula por TEM. As Figuras 10A a 10C mostram a fluorescência de Tfn-AF568 sobre partículas peptídicas montadas de CD3ac de 492 µM, 246 µM e 123 µM. As barras de escala correspondem a 1 µm. A Figura 10D mostra três perfis de intensidade de fluorescência sobrepostos, cada um desses mostra os resultados médios de 10 partículas. Os resultados são representados por desvio padrão da média +/--. A Figura 10E mostra uma interpretação esquemática de perfis de intensidade que ilustram a relação de tamanho de partícula, fluorescência de coroa e a resolução limitada de microscopia ótica. As Figuras 10F a 10I mostram imagens TEM de coloração negativa de partículas CD3ac montadas na ausência (Figuras 10F a 10G) e presença (Figuras 10H a 10I) de 10 µg/mL de Tfn. As amostras contendo proteína (por exemplo, contendo Tfn) podem ser distinguidas por uma camada de contraste de intermediário em torno das partículas peptídicas. Furos ocasionais (indicados pela seta preta) resultaram de vácuo aplicado na TEM e uma observação similar foi descrita em Hyuk I. et al., (2005) Nat Matter 4: 671. As Figuras 10J a 10K mostram que o tamanho de partícula final depende da presença de Tfn durante a montagem. A formação de partícula na ausência de Tfn-AF568 resulta em um diâmetro da partícula médio de 100 nm (Figura 10J) em que a presença de proteína durante a montagem de partículas

reduz o diâmetro para 51 nm (Figura 10K). A espessura da coroa de proteína corresponde a 9,0 +/- 2,1 nm (caixa da Figura 10K).

As Figuras 11A a 11H mostram efeitos de competição de Tfn sobre a ligação *PNP<sup>Flutax-2</sup>* a células CHO. *PNP<sup>Flutax-2</sup>* é utilizado no presente documento como um acrónimo para nanopartículas peptídicas de CD3ac automontadas na presença de carga (por exemplo, Flutax-2 utilizado no presente documento) e coroa (por exemplo, Tfn-AF568 utilizado no presente documento). As Figuras 11A a 11C mostram imagens de microscopia de fluorescência de células CHO incubadas com *PNP<sup>Flutax-2</sup>* durante uma hora. A co-localização de ponta fluorescente no canal verde (Flutax-2) e vermelho (Tfn-AF568) indica a identidade de partículas, que se acumulam sobre as células.

As Figuras 11D a 11F mostram células CHO incubadas com *PNP<sup>Flutax-2</sup>* durante uma hora na presença de 17 µM de Tfn. A associação de PNP é significativamente reduzida. As barras de escala correspondem a 10 µm. A Figura 11G mostra contagens médias de nanopartícula peptídicas (PNP) por célula (por exemplo, CHO ou TRVb). O valor do controlo negativo (NC) corresponde à ponta de fluorescência falso positiva em células CHO incubadas na ausência de *PNP<sup>Flutax-2</sup>* porém, de outro modo, concentrações idênticas de Tfn-AF568 e Flutax-2. Os resultados são a média ± erro padrão da média (EPM), o asterisco duplo indica  $P < 10^{-9}$ , Kolmogorov-Smirnov. A Figura 11H mostra um conjunto de imagens que mostram células CHO após 1 hora de incubação com *PNP<sup>Flutax-2</sup>*. A fileira superior e a

fileira inferior mostram células incubadas na ausência e presença de 17  $\mu\text{M}$  de Tfn, respectivamente. A área delineada num quadrado branco é ampliada nas Figuras 11A a 11F. As barras de escala correspondem a 20  $\mu\text{m}$ .

As Figuras 12A a 12M mostram resultados experimentais de internalização de nanopartículas. As Figuras 12A a 12D mostram imagens de microscopia de fluorescência de células CHO incubadas com  $\text{PNP}_{\text{Flutax-2}}^{\text{Tfn-AF568}}$  durante 1 hora. A Figura 12E mostra distribuições de fluorescência de Flutax-2/Tfn-AF568 de  $\text{PNP}_{\text{Flutax-2}}^{\text{Tfn-AF568}}$  (G/R) após 1 hora de incubação de células CHO com  $\text{PNP}_{\text{Flutax-2}}^{\text{Tfn-AF568}}$ . As barras cinzas representam G/R na lâmina de vidro, as barras pretas correspondem a G/R encontrado dentro do perímetro celular. A Figura 12F mostra um esquema de associação e internalização de partícula após 1 hora. As Figuras 12G a 12J mostram imagens de microscopia de fluorescência de células CHO incubadas com  $\text{PNP}_{\text{Flutax-2}}^{\text{Tfn-AF568}}$  por 6 horas, em que a mudança de partículas em direção a valores de G/R maiores serve como um substituto de internalização de partículas. A Figura 12K mostra que a distribuição de valores de G/R é significativamente aumentada após um período de incubação mais longo (barras pretas). Em contrapartida, a distribuição de valores de G/R sobre a lâmina de vidro (barras cinzas) é estatisticamente indistinguível dos valores de G/R da mesma subpopulação após 1 hora. A Figura 12L mostra um esquema de associação e internalização de partícula após 1 hora. Para partículas em compartimentos lisossómicos, a coroa é proteoliticamente digerida produzindo fluorescência de Tfn-AF568 reduzida e fluorescência de Flutax-2 aumentada.

A Figura 12M mostra imagens que indicam a mudança de cor de **PNP<sub>Flutax-2</sub>-AF568**. A fileira superior mostra células CHO incubadas com **PNP<sub>Flutax-2</sub>-AF568** por 1 hora e contrasta a fileira inferior, em que a mesma linhagem celular foi incubada com **PNP<sub>Flutax-2</sub>-AF568** durante 6 horas. A área delineada num quadrado branco é ampliada nas Figuras 12A a 12D e 12G a 12J. As barras de escala correspondem a 20 µm.

As Figuras 13A a 13I mostram a libertação de carga após a incubação com **PNP<sub>Flutax-2</sub>-AF568** por 24 horas. As Figuras 13A a 13C mostram imagens de microscopia de fluorescência de células CHO incubadas durante 24 horas com 67 nM de Flutax-2 e 0,09 µg/mL de Tfn-AF568. As Figuras 13D a 13G mostram imagens de fluorescência de células CHO incubadas durante 24 horas com a mesma quantidade de Flutax-2 e

Tfn-AF568 automontados com CD3ac para formar **PNP<sub>Flutax-2</sub>-AF568**. A Figura 13H mostra a intensidade de fluorescência de Flutax-2 calculada pela média dependente de linhagem de células (CHO, TRVb) e competição com Tfn dissolvido não marcado. O controlo negativo (NC) corresponde à autofluorescência celular no canal verde. Os resultados são a média ± erro padrão da média (EPM), o asterisco único indica P 0,01, o asterisco duplo indica P 10<sup>-9</sup>, Kolmogorov-Smirnov. As barras de escala correspondem a 10 µm. A Figura 13I mostra imagens de células CHO após 24 horas de incubação com Flutax-2. Ambas as amostras (fileira superior e inferior) contêm 66,7 nM de Flutax-2. A fileira superior mostra uma cultura celular incubada com Flutax-2 dissolvido no meio de cultura celular, a fileira inferior da mesma linhagem de células incubada com Flutax-2 anteriormente automontado em **PNP<sub>Flutax-2</sub>-AF568**. A

área delineada num quadrado branco é ampliada nas Figuras 13A a 13G. As barras de escala correspondem a 20 µm.

A Figura 14 mostra um conjunto de imagens de microscopia de fluorescência de partículas peptídicas (por exemplo, CD3ac) montadas com Flutax-2 e Tfn-AF568. A fileira superior mostra a amostra antes da tripsinização. Os canais vermelho e verde não são congruentes visto que as partículas dispersas se movem e há um atraso de tempo entre as imagens causado pela mudança de excitação e filtros de emissão. As partículas idênticas são colocadas entre parênteses e são sobrepostas nas Figuras 8A a 8F. A fileira inferior mostra a mesma amostra após 6 horas de incubação com tripsina. A coroa vermelha desaparece e as partículas restantes se aderem à superfície da lâmina de vidro.

As Figuras 15A a 15B mostram as curvas de calibração de fluorescência de Tfn-AF568 (Figura 15A) e Flutax-2 (Figura 15B). Ambas medidas em uma solução de 60 % de H<sub>2</sub>O, 30 % de DMSO, 10 % de FBS. É exigido que o solvente orgânico dissolva as nanopartículas na fração de pélete e a presença de FBS minimiza a adsorção de analitos marcados e superfícies de plástico, fornecendo linearidade entre a concentração de fluoróforo e fluorescência medida.

As Figuras 16A a 16B mostram uma nanopartícula de acordo com uma ou mais formas de realização da invenção. A Figura 16A mostra um diagrama esquemático de uma partícula de CD3ac funcionalizada com moléculas de EGF, que podem ser opcionalmente marcadas com Vermelho Texas (para propósitos de visualização). A Figura 16B é um

conjunto de imagens fluorescentes mostrando as partículas de CD3ac funcionalizadas com EGF absorvidas pelas células.

As Figuras 17A a 17K mostram resultados experimentais de células (por exemplo, células HeLa) tratadas com uma das formas de realização das nanopartículas de péptido encapsuladas com nocodazol (que é um agente químico que pode despolimerizar os microtúbulos e ser utilizadas como um agente antineoplásico). A Figura 17A mostra uma representação esquemática de quatro condições experimentais diferentes, em que PBle representa nanopartículas de CD3ac funcionalizadas com EGF encapsuladas como 20  $\mu\text{M}$  de nocodazol, e os resultados experimentais são mostrados nas Figuras 17B a 17F. A Figura 17B mostra um conjunto de imagens fluorescentes mostrando estruturas de microtúbulo das células após 1 hora de incubação sob as condições indicadas na Figura 17A. Os sinais fluorescentes vermelhos dentro das células indicam as nanopartículas PBle absorvidas pelas células. A Figura 17C mostra um conjunto de imagens fluorescentes mostrando as nanopartículas de PBle absorvidas pelas células após vários períodos de tempo conforme indicado. As Figuras 17D a 17F mostram imagens fluorescentes de estruturas microtubulares de células HeLa tratadas sob condições diferentes conforme indicado. A Figura 17G mostra uma representação esquemática de quatro condições experimentais diferentes, em que PBle representa nanopartículas de CD3ac funcionalizadas com EGF encapsuladas como 40  $\mu\text{M}$  de nocodazol, e os resultados experimentais são mostrados nas Figuras 17H a 17K. As Figuras 17H a 17I mostram imagens de células após 4 horas de incubação sob condições diferentes conforme indicado.

A Figura 17I mostra imagens fluorescentes de estruturas microtubulares (indicadas por verde) de células sob condições diferentes. Os sinais vermelhos dentro das células indicam as nanopartículas PB1le absorvidas pelas células. As Figuras 17J a 17K mostram imagens de células após 24 horas de incubação sob condições diferentes conforme indicado. A Figura 17K mostra imagens fluorescentes de estruturas microtubulares (indicadas por verde) de células sob condições diferentes. Os sinais vermelhos dentro das células indicam as nanopartículas PB1le absorvidas pelas células.

As Figuras 18A a 18C mostram uma outra forma de realização das nanopartículas peptídicas de acordo com a invenção, em que as nanopartículas de CD3ac são funcionalizadas com um anticorpo. A Figura 18A mostra representações esquemáticas de nanopartículas funcionalizadas com anticorpos primários ou secundários. A Figura 18B mostra que as nanopartículas de CD3ac funcionalizadas com IgG anti-transferrina de coelho podem se ligar à transferrina (marcada com A568) e, dessa forma, mostradas como ponto brilhante à direita da figura. A Figura 18C mostra que as nanopartículas de CD3ac funcionalizadas com IgG anti-transferrina de coelho podem se ligar à IgG anti-coelho (marcada com Alexa555) e, dessa forma, mostradas como pontos brilhosos à direita da figura.

As Figuras 19A a 19B mostram imagens fluorescentes de nanopartículas peptídicas não acetiladas (CD3) para utilização como um agente de transfeção *in vitro*. A Figura 19A mostra que as partículas de CD3 podem ser utilizadas para libertar oligonucleótido dentro das

células. A Figura 19B não mostra transfeção celular com oligonucleótidos na ausência de partículas de CD3.

As Figuras 20A a 20B mostram a eficiência de encapsulação de oligonucleótidos em partículas peptídicas não acetiladas. A Figura 20A é um conjunto de imagens de curso do tempo que mostram a migração de oligonucleótidos e proteínas através de um gel de durante a eletroforese. Na Figura 20A, a linha superior foi carregada com uma mistura que contém péptidos CD3 de 21 µm (H-LK-LK-LK-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH<sub>2</sub>)<sup>4+</sup>, ~5,4 µM ssDNA (5'-TTGTGCCGCCTTGCAGGTGTATC-3')<sup>24-></sup>, ~0,24 µM AF488-ssDNA (AF488-5'-TTGTGCCGCCTTGCAGGTGTATC-3')<sub>2</sub><sup>4-</sup>, e ~4,14 ug/mL de Tf<sub>n</sub>-AF568, embora a linha inferior (controlo) seja carregada com uma mistura similar, porém sem péptidos de CD3. Após a eletroforese de cerca de 40 minutos, o excesso de ssDNA e Tf<sub>n</sub> migrado através do gel de agarose em direção ao ânodo, enquanto as partículas peptídicas formadas na zona de carregamento do gel de agarose (como evidenciado por co-localização do sinal AF488 e sinal de fluorescência AF568) não foram capazes de migrar no gel de agarose devido a seu tamanho maior. A Figura 20B é um conjunto de dados de cromatografia HP-WAX (troca aniónica fraca) que mostram que a maior parte dos péptidos CD3 e ssDNA foi encapsulada em partículas peptídicas (pélete), e permaneceu pouco tempo no sobrenadante. Pico em ~1,5 min: péptidos CD3; Picos ~14m5 min ~15 min: ssDNA separado e parcialmente hibridizado, respectivamente.

A Figura 21 é uma imagem fluorescente microscópica que mostra a absorção de partículas peptídicas contendo ácido nucleico por células HeLa. Nessa forma de realização, as partículas peptídicas foram formadas a partir de uma

mistura que compreende péptidos CD3, péptidos CD3ac, oligonucleótidos (por exemplo, ssDNA) e transferrina. A co-localização do sinal de fluorescência de ssDNA-AF488 com as partículas peptídicas (como indicado por fluorescência de transferrina-AF568, em que a transferrina se forma sobre a superfície externa da partícula) indica a estabilidade das partículas peptídicas numa condição fisiológica e a capacidade de tais partículas peptídicas aplicarem moléculas de ácido nucleico ou oligonucleótidos a células.

As Figuras 22A a 22D mostram dados de estabilidade de partículas peptídicas contendo ssDNA no soro (por exemplo, ~10% de soro) e eficiência de transfeção celular utilizando-se as partículas peptídicas. A Figura 22A mostra que a estabilidade de partículas de PNP1 (partículas peptídicas CD3 contendo ssDNA) em água é dependente de temperatura e mais partículas de PNP1 tendem a se dissociar a uma temperatura mais elevada. A Figura 22B mostra dados de estabilidade durante um estudo de curso do tempo das partículas de PNP1 em água, indicando que a estabilidade de partículas de PNP1 em água é dependente de temperatura e as partículas de PNP1 tendem a se dissociar mais rápido a uma temperatura mais elevada, por exemplo, a uma temperatura maior que 4 °C. A Figura 22C é um conjunto de imagens fluorescentes que mostra células HeLa incubadas na presença de partículas de PNP1 ou partículas de PNP2 (partículas peptídicas de CD3/CD3ac contendo ssDNA) a temperaturas de cerca de 4°C e cerca de 37°C. Os painéis superiores da Figura 22C mostram que o sinal de fluorescência de Tfn-AF568 difuso e mais forte foi detetado no citosol quando as células foram incubadas com as partículas de PNP1 a cerca de 37

°C, em comparação com fluorescência de Tfn-AF568 mais pontuada detetada nas células incubadas a cerca de 4 °C. Entretanto, esse contraste não foi observado nas células incubadas com as partículas de PNP2, conforme mostrado nos painéis inferiores da Figura 22C. Em vez disso, os painéis inferiores da Figura 22C mostram que os sinais de fluorescência de Tfn-AF568 pontuados e comparáveis foram observados em ambas as células incubadas a cerca de 4 °C e cerca de 37 °C, na presença das partículas de PNP2. Essas constatações indicam que as partículas de PNP1 tendem a se dissociar no soro (por exemplo, ~10% de soro) a cerca de 37 °C; enquanto as partículas de PNP2 parecem ser mais estáveis no soro (por exemplo, ~10% de soro) a cerca de 37 °C por pelo menos cerca de 30 minutos. A Figura 22D é uma imagem fluorescente de células de controlo negativo (isto é, células HeLa incubadas na presença de ssDNA sem PNP1 ou partículas de PNP2 ou péptidos correspondentes), indicando que uma intensidade de fluorescência muito mais baixa de AF488-ssDNA é observada no controlo negativo do que aquela nas células incubadas com as partículas de PNP1 ou PNP2.

#### **DESCRÍÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

Vários aspetos e formas de realização fornecidos no presente documento se referem a péptidos anfifílicos, partículas de péptidos que compreendem uma ou mais formas de realização dos péptidos anfifílicos descritos no presente documento, e utilizações dos péptidos anfifílicos ou partículas peptídicas descritos no presente documento. As cargas líquidas dos péptidos anfifílicos descritos no presente documento podem ser ajustadas ao controlar o número de grupos carregados

presentes em resíduos de aminoácidos dos péptidos anfifílicos, por exemplo, ao mascarar um ou mais grupos amino, por exemplo, com acetilação. Portanto, os péptidos anfifílicos e partículas peptídicas descritas no presente documento podem ser utilizados como transportadores ou veículos de aplicação para tipos diferentes de agentes ativos, por exemplo, moléculas carregadas ou não-carregadas, ou moléculas polares ou não polares. Além disso, as partículas peptídicas descritas no presente documento podem ser ajustadas para as suas solubilidades, por exemplo, numa condição fisiológica, ao controlar as razões de duas ou mais formas de realização dos péptidos anfifílicos presentes nas partículas peptídicas. Por exemplo, os péptidos anfifílicos completamente mascarados (por exemplo, completamente acetilados) podem formar, em geral, partículas peptídicas insolúveis, enquanto as partículas formadas a partir de péptidos parcialmente mascarados (por exemplo, parcialmente acetilados) ou não mascarados (por exemplo, não acetilados), em geral, têm uma solubilidade maior (ou estabilidade menor) que os péptidos anfifílicos completamente mascarados (por exemplo, completamente acetilados), por exemplo, numa condição fisiológica. Dessa forma, em algumas formas de realização, a solubilidade ou estabilidade das partículas peptídicas descritas no presente documento, por exemplo, numa condição fisiológica, pode ser controlada, por exemplo, ao formar as partículas peptídicas com uma mistura de péptidos anfifílicos com solubilidades diferentes e, consequentemente, variando-se as suas quantidades nas partículas peptídicas. Consequentemente, a versatilidade e estabilidade de péptidos anfifílicos e partículas peptídicas descritas no presente documento podem ser adaptadas para uma variedade de aplicações, por

exemplo, aplicação de fármacos e/ou libertação sustentada de um agente ativo.

Pelo termo "estabilidade" ou "estável" utilizado no presente documento entende-se uma capacidade de uma partícula peptídica manter seu volume original (por exemplo, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, ou mais de seu volume original) durante um período de tempo, por exemplo, pelo menos cerca de 30 minutos ou mais (incluindo pelo menos cerca de 1 hora, pelo menos cerca de 3 horas, pelo menos cerca de 6 horas, pelo menos cerca de 12 horas, pelo menos cerca de 24 horas, ou mais), sob uma condição especificada, por exemplo, uma condição fisiológica. A estabilidade de uma partícula peptídica pode ser, em parte, governada por sua solubilidade sob uma condição especificada. Quanto mais solúvel for uma partícula peptídica sob uma condição especificada, menos estável será a partícula peptídica sob a condição especificada. Numa forma de realização, o termo "estabilidade" ou "estável" como utilizado no presente documento, refere-se a uma partícula peptídica que é insolúvel sob uma condição especificada, por exemplo, em um meio aquoso a uma temperatura especificada. Em algumas formas de realização, o meio aquoso é água. Em algumas formas de realização, o meio é um meio fisiológico, por exemplo, com uma certa concentração de sal, pH e/ou concentração de proteína/soro.

Num aspeto, um péptido anfifílico que compreende um segmento de peptidilo hidrofóbico e um segmento de peptidilo hidrofílico é fornecido no presente documento.

O inventor constatou entre outros que ao modular a hidrofilicidade de um resíduo de aminoácidos hidrofílico de um péptido anfifílico, a anfifilicidade do péptido anfifílico pode ser modulada de modo que resulte inesperadamente em automontagem dos péptidos que formam partículas sólidas. A anfifilicidade pode ser modulada ao conjugar um grupo hidrofílico a um aminoácido no segmento de peptidilo hidrofílico, ou ao mascarar um grupo hidrofílico no segmento de peptidilo hidrofílico, ou ao mascarar o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico. Por exemplo, quando o aminoácido hidrofílico for um aminoácido carregado, a hidrofilicidade pode ser modulada ao conjugar a parte carregada da molécula com um grupo protetor. Consequentemente, em algumas formas de realização, pelo menos um grupo amino no péptido anfifílico é conjugado a um grupo protetor de azoto ou amino.

Em algumas formas de realização, o péptido anfifílico é completamente mascarado. Como utilizado no presente documento, um péptido completamente mascarado se refere a um péptido anfifílico em que o grupo amino de terminação N e todos os grupos amino de cadeia lateral no segmento de peptidilo hidrofílico são conjugados a um grupo protetor de azoto ou amino.

Em algumas formas de realização, o péptido anfifílico é parcialmente mascarado. Como utilizado no presente documento, um péptido parcialmente mascarado refere-se a um péptido anfifílico em que um ou mais de entre o grupo amino de terminação N ou grupo amino de cadeia lateral no segmento de peptidilo hidrofílico não é conjugado a um grupo protetor de azoto ou amino; entretanto, o péptido

anfifílico ainda compreende pelo menos um grupo amino conjugado a um grupo protetor de azoto ou amino.

Como utilizado no presente documento, um "grupo protetor de azoto" ou um "grupo protetor de amino" refere-se a porções que bloqueiam ou mascaram o grupo NH<sub>2</sub>. Os grupos protetores de amino exemplificadores incluem, mas não se limitam a, grupos protetores de carbamato, como 2-trimetilsililetoxicarbonilo (Teoc), 1-metil-1-(4-bifenilil)etoxicarbonilo (Bpoc), t-butoxicarbonilo (BOC), aliloxicarbonilo (Alloc), 9-fluorenilmetylloxicarbonilo (Fmoc), e benziloxicarbonilo (Cbz); grupos protetores de amida, como formilo, acetilo, trialoacetilo, benzoílo, e nitrofenilacetilo; grupos protetores de sulfonamida, como 2-nitrobenzenossulfonilo; e grupos protetores de imina e imida cílicos, como ftalimido e ditiasuccinoílo. Os grupos protetores de amino adicionais, bem como outros grupos protetores representativos, são divulgados em Greene e Wuts, Projective Groups in Organic Synthesis, Capítulo 2, 2<sup>a</sup> ed., John Wiley & Sons, New York, 1991, e Oligonucleotides And Analogues A Practical Approach, Ekstein, F. Ed., IRL Press, N.Y, 1991.

Em algumas formas de realização, o grupo protetor de azoto ou amino é acilo ou alquilo, por exemplo, acetilo, etanoílo, propionilo, t-butanoílo, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo ou hexanilo.

Em algumas formas de realização, o grupo amino de terminação N de um péptido anfifílico é conjugado a um grupo protetor de azoto ou amino.

Em algumas formas de realização, pelo menos um (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais) grupo amino de cadeia lateral de um aminoácido do péptido anfifílico é conjugado a um grupo protetor de azoto ou amino. O aminoácido cujo grupo amino de cadeia lateral será conjugado pode estar presente em qualquer posição no péptido anfifílico. Os aminoácidos conjugados de cadeia lateral podem estar presentes próximos uns aos outros ou não próximos uns aos outros. Quando três ou mais aminoácidos conjugados de cadeia lateral estão presentes, alguns dos aminoácidos de cadeia lateral podem estar presentes próximos a outro aminoácido conjugado de cadeia lateral embora alguns aminoácidos conjugados de cadeia lateral não estejam próximos a outro aminoácido conjugado de cadeia lateral. Adicionalmente, quando dois ou mais grupos protetores de azoto ou amino estão presentes, os mesmos podem ser iguais ou diferentes ou qualquer combinação dos mesmos e diferentes.

Em algumas formas de realização, pelo menos um (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais) grupo amino de cadeia lateral de um aminoácido no segmento de peptidilo hidrofílico é conjugado a um grupo protetor de azoto ou amino. Sem limitações, o aminoácido conjugado de cadeia lateral pode estar presente em qualquer posição do segmento de peptidilo hidrofílico. Por exemplo, mediante a leitura do N-terminal, na posição 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, e assim por diante do segmento de peptidilo hidrofílico.

Em algumas formas de realização, o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico e pelo menos um grupo amino de cadeia lateral (incluindo, por exemplo, pelo

menos um, pelo menos dois, pelo menos três ou mais grupos amino de cadeia lateral) no segmento de peptidilo hidrofílico do péptido anfifílico são conjugados a um grupo protetor de azoto ou amino. Em algumas formas de realização, o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico e pelo menos um grupo amino de cadeia lateral (incluindo, por exemplo, pelo menos um, pelo menos dois, pelo menos três ou mais grupos amino de cadeia lateral) no segmento de peptidilo hidrofílico do péptido anfifílico é acetilado.

Em algumas formas de realização, o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico e todos os grupos amino de cadeia lateral no segmento de peptidilo hidrofílico do péptido anfifílico são conjugados a um grupo protetor de azoto ou amino. Em algumas formas de realização, o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico e todos os grupos amino de cadeia lateral no segmento de peptidilo hidrofílico do péptido anfifílico são acetilados.

Sem se ater à teoria, a presença de um grupo protetor de azoto ou amino no péptido anfifílico modula a hidrofilicidade do péptido anfifílico. Dessa forma, a natureza anfifílica do péptido anfifílico pode ser transformada variando-se o número de grupos protetores de azoto ou amino no péptido anfifílico.

O péptido anfifílico pode ter uma sequência de aminoácidos de qualquer comprimento. Em algumas formas de realização, o péptido anfifílico pode ter um comprimento de cerca de 5 a cerca de 25 resíduos de aminoácidos. Numa forma de realização, o péptido anfifílico tem um

comprimento de cerca de 10 resíduos de aminoácidos.

Segmento de peptidilo hidrofóbico

Como utilizado no presente documento, o termo "segmento de peptidilo hidrofóbico" se refere a um segmento de peptidilo que tem um teor relativamente alto de aminoácido hidrofóbico. Por exemplo, um segmento de peptidilo hidrofóbico se refere a um segmento de peptidilo, em que pelo menos cerca de 50% ou mais (incluindo pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95% ou mais) dos resíduos de aminoácidos são resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Numa forma de realização, um segmento de peptidilo hidrofóbico é um segmento de peptidilo, em que todos os aminoácidos são aminoácidos hidrofóbicos.

Consequentemente, em algumas formas de realização, o segmento de peptidilo hidrofóbico compreende a sequência de aminoácidos  $(AA^{11}-AA^{12})_b-(AA^{13})_d$ , em que  $AA^{11}$ ,  $AA^{12}$  e  $AA^{13}$  são, resíduos de aminoácidos hidrofóbicos independentemente selecionados para cada ocorrência, b é um número inteiro de 1 a 20, e d é 0 ou 1, desde que  $AA^{11}$  e  $AA^{12}$  tenham a configuração oposta (isto é, D e L) e  $AA^{12}$  e  $AA^{13}$  têm a configuração oposta. Por exemplo, se os aminoácidos representados por  $AA^{11}$  tiverem a configuração D, então, os aminoácidos representados por  $AA^{12}$  têm a configuração L e  $AA^{13}$ , se presente, tem a configuração D. Alternativamente, se os aminoácidos representados por  $AA^{11}$  tiverem a configuração L, então, os aminoácidos representados por  $AA^{12}$  têm a configuração D e  $AA^{13}$ , se presente, tem a configuração L.

Em algumas formas de realização, o segmento de peptidilo hidrofóbico compreende uma sequência de 2 a 10 aminoácidos D e L alternados selecionados do grupo que consiste em alanina, valina, isoleucina, leucina (Leu), fenilalanina, tirosina, triptofano (Trp) e quaisquer combinações dos mesmos.

Como utilizado no presente documento, o termo "aminoácido hidrofóbico" se refere a um aminoácido que exibe uma hidrofobicidade maior que zero de acordo com a escala de hidrofobicidade consenso normalizada de Eisenberg, 1984, J. Mol. Biol. 179:125 a 142 (1984). Os aminoácidos hidrofóbicos exemplificadores incluem, mas não se limitam a, Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp, Pro, Met, Gly e derivados dos mesmos.

Em algumas formas de realização, um aminoácido hidrofóbico é um aminoácido aromático. Como utilizado no presente documento, o termo "aminoácido aromático" se refere a um aminoácido hidrofóbico com uma cadeia lateral tendo pelo menos um anel aromático ou heteroaromático. O anel aromático ou heteroaromático pode conter um ou mais substituintes como -OH, -SH, -CN, -F, -CI, -Br, -I, -NO<sub>2</sub>, -NO, -NH<sub>2</sub>, -NHR, -NRR, -C(O)R, -C(O)OH, -C(O)OR, -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR, -C(O)NRR e similares em que cada R é independentemente alquilo (C<sub>1</sub> -C<sub>6</sub>), alquilo substituído (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), alquenilo (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), alquenilo substituído (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), alquinilo (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), alquinilo substituído (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), arilo (C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>), arilo substituído (C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>), alcarilo (C<sub>6</sub>-C<sub>26</sub>), alcarilo substituído (C<sub>6</sub>-C<sub>26</sub>), heteroarilo de 5 a 20 membros, heteroarilo de 5 a 20 membros substituído, alceteroarilo de 6 a 26 membros ou alceteroarilo de 6 a 26 substituído. Os aminoácidos aromáticos

exemplificadores incluem, mas não se limitam a, Phe, Tyr e Trp.

Em algumas formas de realização, um aminoácido hidrofóbico é um aminoácido alifático. Como utilizado no presente documento, o termo "aminoácido alifático" refere-se a um aminoácido hidrofóbico que tem uma cadeia lateral de hidrocarboneto alifático. Os aminoácidos alifáticos exemplificadores incluem, mas não se limitam a, Ala, Val, Leu e Ile.

Em algumas formas de realização, um aminoácido hidrofóbico é um aminoácido não polar. Como utilizado no presente documento, o termo "aminoácido não polar" refere-se a um aminoácido hidrofóbico que tem uma cadeia lateral que é não carregada em pH fisiológico e que tem ligações em que o par de eletrões compartilhados em comum por dois átomos é, em geral, mantido igualmente por cada um dos dois átomos (isto é, a cadeia lateral é não polar). Os aminoácidos não polares exemplificadores incluem, mas não se limitam a, Leu, Val, Ile, Met, Gly e Ala.

Como será entendido pelo perito na especialidade, as categorias de aminoácidos descritos no presente documento não são mutuamente exclusivas. Dessa forma, os aminoácidos que têm cadeias laterais que exibem duas ou mais propriedades físico-químicas podem ser incluídos em múltiplas categorias. Por exemplo, as cadeias laterais de aminoácidos tendo porções aromáticas que são adicionalmente substituídas por substituintes polares, como Tyr, podem exibir tanto propriedades hidrofóbicas aromáticas como hidrofílicas ou polares e, portanto,

podem estar incluídas tanto nas categorias aromáticas como polares. A categorização adequada de qualquer aminoácido será evidente pelo perito na especialidade, especialmente à luz da divulgação detalhada fornecida no presente documento.

Em algumas formas de realização, para cada ocorrência AA<sup>11</sup>, AA<sup>12</sup> e AA<sup>13</sup> são independentemente selecionados do grupo que consiste em Pro, Ile, Phe, Val, Leu, Trp, Met, Ala, Gly, Tyr, e quaisquer combinações dos mesmos.

Sem limitação, todos os AA<sup>11</sup> e AA<sup>12</sup> podem ser iguais, diferentes, ou quaisquer combinações de iguais e diferentes. Consequentemente, em algumas formas de realização, todos os AA<sup>11</sup> são iguais. Em algumas formas de realização, todos os AA<sup>12</sup> são iguais. Em algumas formas de realização, todos os AA<sup>11</sup> são iguais, todos os AA<sup>12</sup> são iguais, e AA<sup>11</sup> é diferente de AA<sup>12</sup>.

Em algumas formas de realização, pelo menos um de entre AA<sup>11</sup>, AA<sup>12</sup> e AA<sup>13</sup> não é Tyr ou Leu.

Em algumas formas de realização, pelo menos um AA<sup>11</sup> não é Tyr.

Em algumas formas de realização, pelo menos um de entre AA<sup>12</sup> não é Leu.

Em algumas formas de realização, AA<sup>13</sup> não é Tyr ou Leu.

Em algumas formas de realização, AA<sup>11</sup> é Tyr.

Em algumas formas de realização, AA<sup>12</sup> é Leu.

Em algumas formas de realização, o segmento de peptidilo hidrofóbico compreende uma sequência de aminoácidos  $(Trp-Leu)_m-(Trp)_n$  ou  $(Leu-Trp)_p-(Leu)_q$ , em que  $m$  e  $p$  são, independentemente, um número inteiro de 3 a 20, e  $n$  e  $q$  são, independentemente, 0 ou 1. Cada Trp pode ser D-Trp ou L-Trp, e cada Leu pode ser D-Leu ou L-Leu. Quando Trp for D-Trp, então, Leu é L-Leu, e quando Trp for L-Trp, então, Leu é D-Leu. De modo similar, quando Leu for L-Leu, então, Trp é D-Trp, e quando Leu for D-Leu, então, Trp é L-Trp.

Em algumas formas de realização,  $m$  e  $p$  são, independentemente, um número inteiro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15. Em algumas formas de realização,  $m$  e  $p$  são, independentemente, um número inteiro de 1 a 5 (por exemplo, um número inteiro de 1, 2, 3, 4 ou 5). Em algumas formas de realização,  $m$  ou  $p$  é um número inteiro igual a 1, 2 ou 3. Numa forma de realização,  $m$  ou  $p$  é um número inteiro igual a 3.

Numa forma de realização, o segmento de peptidilo hidrofóbico compreende uma sequência de aminoácidos  $((L-Trp)-(D-Leu))_3-(L-Trp)$ .

#### Segmento de peptidilo hidrofílico

Como utilizado no presente documento, o termo "segmento de peptidilo hidrofílico" refere-se a um segmento de peptidilo que tem propriedades de hidrofilicidade em relação a uma porção de hidrocarboneto. Em algumas formas de realização, o segmento de peptidilo hidrofílico refere-se a um segmento de peptidilo que tem propriedades de hidrofilicidade em relação ao segmento de peptidilo hidrofóbico de um péptido anfifílico descrito no presente

documento. Em geral, o segmento de peptidilo hidrofílico compreende pelo menos um aminoácido hidrofílico. Como utilizado no presente documento, o termo "aminoácido hidrofílico" refere-se a um resíduo de aminoácidos que exibe uma hidrofobicidade menor que zero de acordo com a escala de hidrofobicidade consenso normalizada de Eisenberg, et al., J. Mol. Biol. 179:125 a 142 (1984). Aminoácidos hidrofílicos exemplificadores incluem, mas não se limitam a, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, e derivados dos mesmos.

Em algumas formas de realização, o aminoácido hidrofílico é um aminoácido carregado ou não carregado. Conforme utilizado no presente documento, o termo "aminoácido carregado" refere-se a um resíduo de aminoácidos que tem uma carga líquida. Consequentemente, um aminoácido carregado pode ser um aminoácido catiónico ou um aminoácido aniónico. Conforme utilizado no presente documento, o termo "aminoácido não carregado" refere-se a um resíduo de aminoácidos que não tem carga líquida. Um resíduo de aminoácidos carregado pode ser modificado formando um aminoácido não carregado ao mascarar a carga do aminoácido, por exemplo, ao conjugar um grupo protetor a um átomo portador de carga. Numa forma de realização, um resíduo de aminoácidos carregado pode ser modificado formando um aminoácido não carregado por acetilação.

Em algumas formas de realização, o aminoácido hidrofílico é um aminoácido polar. Como utilizado no presente documento, o termo "aminoácido polar" refere-se a um aminoácido hidrofílico que tem uma cadeia lateral que é carregada ou não carregada em pH fisiológico, porém que tem pelo menos uma ligação na qual o par de eletrões

compartilhados em comum por dois átomos é mantido mais estreitamente por um dos átomos. Os aminoácidos polares exemplificadores incluem, mas não se limitam a, Asn, Gln, Ser, Thr, e quaisquer combinações dos mesmos.

Em algumas formas de realização, o aminoácido hidrofílico é um aminoácido polar carregado ou não carregado.

Em algumas formas de realização, o aminoácido hidrofílico é um aminoácido catiónico. Como utilizado no presente documento, o termo "aminoácido catiónico" refere-se a um resíduo de aminoácidos que compreende uma cadeia lateral carregada positivamente sob condições fisiológicas normais. Dessa forma, o termo "aminoácido catiónico" inclui qualquer aminoácido de ocorrência natural ou mimético tendo, portanto, uma cadeia lateral positivamente carregada sob condições fisiológicas normais. Em geral, os resíduos de aminoácidos que compreendem um grupo amino em sua cadeia lateral variável são considerados como aminoácidos catiónicos. Os aminoácidos catiónicos exemplificadores incluem, mas não se limitam a, lisina, histidina, arginina, hidroxilisina, ornitina, e seus respetivos derivados, análogos, e configurações estereoisoméricas dos mesmos.

Em algumas formas de realização, o aminoácido hidrofílico é um aminoácido aniónico. Como utilizado no presente documento, o termo "aminoácido aniónico" refere-se a um aminoácido hidrofílico que tem uma carga negativa. Os aminoácidos aniónicos exemplificadores incluem, mas não se limitam a, Glu, Asp e derivados dos mesmos.

Em algumas formas de realização, o aminoácido hidrofílico é um aminoácido ácido. Como utilizado no presente documento, o termo "aminoácido ácido" refere-se a um aminoácido hidrofílico que tem um valor pK de cadeia lateral menor que 7. Os aminoácidos ácidos têm, tipicamente, cadeias laterais carregadas negativamente em pH fisiológico devido à perda de um ião de hidrogénio. Os aminoácidos ácidos exemplificadores incluem, mas não se limitam a, Glu, Asp e derivados dos mesmos.

Em algumas formas de realização, o aminoácido hidrofílico é um aminoácido básico. Como utilizado no presente documento, o termo "aminoácido básico" refere-se a um aminoácido hidrofílico que tem um valor pK de cadeia lateral maior que 7. Os aminoácidos básicos têm, tipicamente, cadeias laterais carregadas positivamente em pH fisiológico devido à associação ao ião de hidrónio. Os aminoácidos básicos exemplificadores incluem, mas não se limitam a, His, Arg, Lys e derivados dos mesmos.

Em algumas formas de realização, o segmento de peptidilo hidrofílico compreende pelo menos um aminoácido carregado, ou pelo menos um aminoácido polar não carregado, ou uma combinação dos mesmos. Em algumas formas de realização, o segmento de peptidilo hidrofílico compreende pelo menos um aminoácido selecionado do grupo que consiste em Lys, Arg, His, Asp e Glu, ou pelo menos um aminoácido selecionado do grupo que consiste em Ser, Thr, Asn e Gln, ou uma combinação dos mesmos. Em algumas formas de realização, o segmento de peptidilo hidrofílico pode compreender um aminoácido selecionado do grupo que consiste em Lys, Arg e His.

Em algumas formas de realização, pelo menos um grupo amino no segmento de peptidilo hidrofílico é mascarado ou conjugado a um grupo protetor de azoto ou amino.

Em algumas formas de realização, o segmento de peptidilo hidrofílico compreende a sequência de aminoácidos  $(AA^{21})_f$ , em que  $AA^{21}$  é um aminoácido hidrofílico selecionado independentemente para cada ocorrência e  $f$  é um número inteiro de 1 a 21.

Sem limitação, todos os  $AA^{21}$  podem ser iguais, diferentes, ou quaisquer combinações de iguais e diferentes.

Em algumas formas de realização,  $f$  é 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15.

Em algumas formas de realização, o segmento de peptidilo hidrofílico compreende uma sequência de aminoácidos  $(Lys)_r$ , em que  $r$  é um número inteiro de 1 a 15. Em algumas formas de realização,  $r$  é um número inteiro igual a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15. Em algumas formas de realização,  $r$  é um número inteiro igual a 2 a 5 (por exemplo,  $r$  é um número inteiro igual a 2, 3, 4 ou 5). Numa forma de realização,  $r$  é um número inteiro igual a 3.

Em algumas formas de realização, o segmento de peptidilo hidrofílico compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em  $(L-Lys)- (L-Lys)- (L-Lys)$ ,  $(L-Lys)- (L-Lys)- (L-Lys(Ac))$ ,  $(L-Lys)- (L-Lys(Ac))- (L-Lys)$ ,  $(L-Lys(Ac))- (L-Lys)- (L-Lys)$ ,  $(L-Lys)- (L-Lys(Ac))- (L-Lys(Ac))$ ,  $(L-Lys(Ac))- (L-Lys(Ac))- (L-Lys)$ ,  $L-Lys(Ac))- (L-Lys(Ac))- (L-Lys(Ac))$ , e quaisquer combinações dos

mesmos, em que "Ac" se refere à acetilação do resíduo de aminoácidos Lys.

Em algumas formas de realização, o segmento de péptido hidrofílico inclui ou é um polímero hidrofílico. Como utilizado no presente documento, o termo "polímero hidrofílico" refere-se a um polímero tendo propriedades de hidrofilicidade em relação a uma porção de hidrocarboneto. Em algumas formas de realização, o termo "polímero hidrofílico" refere-se a um polímero tendo propriedades de hidrofilicidade em relação ao segmento de peptidilo hidrofóbico de um péptido anfifílico descrito no presente documento. A hidrofilicidade de um polímero pode ser determinada, por exemplo, por teste de ASTM D570. Em geral, os polímeros hidrofílicos são solúveis em água. Os polímeros hidrofílicos incluem, mas não se limitam a, poli(etileno glicol), poli (óxido de etileno), poli(propileno glicol), poli (óxido de etileno-co-óxido de propileno), ácido hialurônico, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), heparina, polivinil(pirrolidona), sulfato de condroitano, quitosana, glicosaminoglicanas, dextrano, dextrina, sulfato de dextrano, acetato de celulose, carboximetilcelulose, hidróxi etil celulose, celulósicos, poli(trimetileno glicol), poli(tetrametileno glicol), polipéptidos, poliacrيلamida, poliacriliimida, poli(etileno amina), poli(alil amina), e blendas dos mesmos.

#### Modificações peptídicas exemplificativas

Em algumas formas de realização, um péptido anfifílico descrito no presente documento pode compreender pelo menos um (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,

12, 13, 14, 15, ou mais) aminoácido selecionado do grupo que consiste em alanina; arginina; asparagina; ácido aspártico; cisteína; ácido glutâmico; glutamina; glicina; histidina; isoleucina; leucina; lisina; metionina; fenilalanina; prolina; serina; treonina; triptofano; tirosina; valina; homocisteína; fosfoserina; fosfotreonina; fosfotirosina; hidroxiprolina;  $\gamma$ -carboxiglutamato; ácido hipúrico; ácido octaidroindol-2-carboxílico; estatina; ácido 1,2,3,4,-tetraidroisoquinolina-3-carboxílico; penicilamina (3-mercanto-D-valina); ornitina (Orn); citrulina; alfa-metil-alanina; para-benzoilfenilalanina; para-aminofenilalanina; p-fluorofenilalanina; fenilglicina; propargilglicina; N-metilglicinas (sarcosina, Sar); e terc-butilglicina; ácido diaminobutírico; ácido 7-hidroxi-tetraidroisoquinolina carboxílico; naftilanina; bifenilalanina; cicloexilalanina; ácido amino-isobutírico (Aib); norvalina; norleucina (Nle); terc-leucina; ácido tetraidroisoquinolina carboxílico; ácido pipecólico; fenilglicina; homofenilalanina; cicloexilglicina; desidroleucina; 2,2-dietilglicina; ácido 1-amino-1-ciclopantanocarboxílico; ácido 1-amino-1-cicloexanocarboxílico; ácido amino-benzoico; ácido amino-naftoico; ácido gama-aminobutírico; difluorofenilalanina; ácido nipecótico; ácido N- $\alpha$ -imidazol acético (IMA); tienil-alanina; t-butilglicina; desamino-Tyr; ácido aminovalérico (Ava); ácido piroglutamínico (Glu); ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico ( $\alpha$ Aib); ácido  $\gamma$ -aminobutírico ( $\gamma$ Abu); ácido  $\alpha$ -aminobutírico ( $\alpha$ Abu); ácido  $\alpha\gamma$ -aminobutírico ( $\alpha\gamma$ Abu); 3-piridilalanina (Pal); Isopropil- $\alpha$ -N  $\varepsilon$ >lisina (ILys); Naftilanina (Nal);  $\alpha$ -naftilanina ( $\alpha$ -Nal);  $\beta$ -naftilanina ( $\beta$ -Nal); Acetyl- $\beta$ -naftilanina (Ac- $\beta$ -naftilanina);  $\alpha$ , $\beta$ -naftilanina; N $\varepsilon$ -picoloil-lisina

(PicLys); 4-halo-Fenil; 4-pirolidilalanina; ácido isonipecótico carboxílico (inip); ácidos beta-; e isómeros, análogos e derivados dos mesmos. O elemento perito na especialidade poderia saber que essa definição inclui, aminoácidos D e L; alfa, beta e gama-aminoácidos; aminoácidos quimicamente modificados; aminoácidos não-proteogénicos de ocorrência natural; aminoácidos raros; e compostos quimicamente sintetizados que têm propriedades conhecidas na técnica como sendo características de um aminoácido. Adicionalmente, cada forma de realização pode incluir quaisquer combinações dos grupos.

Além disso, como utilizado no presente documento, o termo "aminoácido" inclui um composto ou molécula que muda da estrutura dos aminoácidos de ocorrência natural, porém que têm substancialmente a estrutura de um aminoácido, de modo que os mesmos possam ser utilizados para substituição dos aminoácidos de ocorrência natural dentro de um péptido, depois disso, a atividade do péptido, por exemplo, atividade formadora de agregados, ainda é mantida. Dessa forma, por exemplo, em algumas formas de realização os aminoácidos também podem incluir aminoácidos tendo modificações ou substituições de cadeia lateral, e também incluem ácidos orgânicos relacionados, amidas ou similares. Sem limitação, um aminoácido pode ser um aminoácido proteogénico ou não proteogénico. Como utilizado no presente documento, o termo "proteogénico" indica que o aminoácido pode ser incorporado numa proteína numa célula através de vias metabólicas bem conhecidas.

Em algumas formas de realização, um péptido anfifílico comprehende pelo menos um (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6,

7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou mais) aminoácido quimicamente modificado. Como utilizado no presente documento, o termo "aminoácido quimicamente modificado" refere-se a um aminoácido que foi tratado com um ou mais reagentes. Um aminoácido quimicamente modificado pode estar presente em qualquer posição no péptido anfifílico. Quando mais de um aminoácido quimicamente modificado estiver presente, os mesmos podem ficar posicionados próximos ou não próximos um do outro. Quando três ou mais aminoácidos quimicamente modificados estiverem presentes próximos um do outro embora alguns aminoácidos quimicamente modificados não estejam próximos a outro aminoácido quimicamente modificado.

Em algumas formas de realização, o segmento de peptidilo hidrofílico compreende um aminoácido quimicamente modificado. Sem limitação, o aminoácido quimicamente modificado pode estar presente em qualquer posição do segmento de peptidilo hidrofílico, por exemplo, lendo-se a partir do N-terminal, na posição 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, e assim por diante do segmento de peptidilo hidrofílico.

Em algumas formas de realização, o segmento de peptidilo hidrofóbico compreende um aminoácido quimicamente modificado. Sem limitação, o aminoácido quimicamente modificado pode estar presente em qualquer posição do segmento de peptidilo hidrofóbico, por exemplo, lendo-se a partir do N-terminal, na posição 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, e assim por diante do segmento de peptidilo hidrofóbico.

Em algumas formas de realização, tanto os segmentos de peptidilo hidrofílicos como hidrofóbicos podem, cada um, compreender pelo menos um aminoácido quimicamente modificado. Quando tanto os segmentos de peptidilo hidrofílicos como hidrofóbicos compreendem um aminoácido quimicamente modificado, o número de tais aminoácidos quimicamente modificados presentes em cada segmento pode ser igual ou diferente.

Em algumas formas de realização, o péptido anfifílico compreende pelo menos um (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais) beta-aminoácido. Quando mais de um beta-aminoácido estiver presente, os mesmos podem ficar posicionados próximos ou não próximos um do outro. Quando três ou mais beta-aminoácidos estiverem presentes, alguns dos beta-aminoácidos podem estar presentes próximos a outro beta-aminoácido embora alguns beta-aminoácidos não estejam próximos a outro aminoácido conjugado de cadeia lateral.

Em algumas formas de realização, o segmento de peptidilo hidrofílico compreende um beta-aminoácido. Sem limitação, o beta-aminoácido pode estar presente em qualquer posição do segmento de peptidilo hidrofílico, por exemplo, lendo-se a partir do N-terminal, na posição 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, e assim por diante do segmento de peptidilo hidrofílico.

Em algumas formas de realização, o segmento de peptidilo hidrofóbico compreende um beta-aminoácido. Sem limitação, o beta-aminoácido pode estar presente em qualquer posição do segmento de peptidilo hidrofóbico, por exemplo, lendo-se a partir do N-terminal, na posição 1, 2, 3, 4, 5, 6,

7, 8, 9, 10, e assim por diante do segmento de peptidilo hidrofóbico.

Em algumas formas de realização, tanto os segmentos de peptidilo hidrofílicos como hidrofóbicos podem, cada um, compreender pelo menos um beta-aminoácido. Quando tanto os segmentos de peptidilo hidrofílicos como hidrofóbicos compreenderem um beta-aminoácido, o número de tais beta-aminoácidos em cada segmento pode ser igual ou diferente. Os beta-aminoácidos incluem, mas não se limitam a, cloridrato de L-β-Homoprolina; ácido ( $\pm$ )-3-(Boc-amino)-4-(4-bifenilil)butírico; ácido ( $\pm$ )-3-(Fmoc-amino)-2-fenilpropiónico; ácido (1S, 3R)-(+)-3-(Boc-amino)ciclopantanocarboxílico; ácido (2R, 3R)-3-(Boc-amino)-2-hidróxi-4-fenilbutírico; ácido (2S, 3R)-3-(Boc-amino)-2-hidróxi-4-fenilbutírico; ácido (R)-2-[ (Boc-amino)metyl]-3-fenilpropiónico; ácido (R)-3-(Boc-amino)-2-metilpropiónico; ácido (R)-3-(Boc-amino)-2-fenilpropiónico; ácido (R)-3-(Boc-amino)-4-(2-naftil)butírico; ácido (R)-3-(Boc-amino)-5-fenilpentanoico; ácido (R)-3-(Fmoc-amino)-4-(2-naftil)butírico; ácido (R)-(-)-Pirrolidina-3-carboxílico; (R)-Boc-3,4-dimetóxi-β-Phe-OH; (R)-Boc-3-(3-piridil)-β-Ala-OH; (R)-Boc-3-(trifluorometil)-β-Phe-OH; (R)-Boc-3-ciano-β-Phe-OH; (R)-Boc-3-metóxi-β-Phe-OH; (R)-Boc-3-metil-β-Phe-OH; (R)-Boc-4-(4-piridil)-β-Homoala-OH; (R)-Boc-4-(trifluorometil)-β-Homophe-OH; (R)-Boc-4-(trifluorometil)-β-Phe-OH; (R)-Boc-4-bromo-β-Phe-OH; (R)-Boc-4-cloro-β-Homophe-OH; (R)-Boc-4-cloro-β-Phe-OH; (R)-Boc-4-ciano-β-Homophe-OH; (R)-Boc-4-ciano-β-Phe-OH; (R)-Boc-4-fluoro-β-Phe-OH; (R)-Boc-4-metoxi-β-Phe-OH; (R)-Boc-4-metil-β-Phe-OH; (R)-Boc-β-Tir-OH; (R)-Fmoc-4-(3-piridil)-β-Homoala-OH; (R)-Fmoc-4-fluoro-β-Homophe-OH;

ácido (S)-(+)-Pirrolidina-3-carboxílico; ácido (S)-3-(Boc-amino)-2-metilpropiónico; ácido (S)-3-(Boc-amino)-4-(2-naftil)butírico; ácido (S)-3-(Boc-amino)-5-fenilpentanoico; ácido (S)-3-(Fmoc-amino)-2-metilpropiónico; ácido (S)-3-(Fmoc-amino)-4-(2-naftil)butírico; ácido (S)-3-(Fmoc-amino)-5-hexenoico; ácido (S)-3-(Fmoc-amino)-5-fenil-pentanoico; ácido (S)-3-(Fmoc-amino)-6-fenil-5-hexenoico; (S)-Boc-2-(trifluorometil)- $\beta$ -Homophe-OH; (S)-Boc-2-(trifluorometil)- $\beta$ -Homophe-OH; (S)-Boc-2-(trifluorometil)- $\beta$ -Phe-OH; (S)-Boc-2-ciano- $\beta$ -Homophe-OH; (S)-Boc-2-metil- $\beta$ -Phe-OH; (S)-Boc-3,4-dimetoxi- $\beta$ -Phe-OH; (S)-Boc-3-(trifluorometil)- $\beta$ -Homophe-OH; (S)-Boc-3-(trifluorometil)- $\beta$ -Phe-OH; (S)-Boc-3-metoxi- $\beta$ -Phe-OH; (S)-Boc-3-metil- $\beta$ -Phe-OH; (S)-Boc-4-(4-piridil)- $\beta$ -Homoala-OH; (S)-Boc-4-(trifluorometil)- $\beta$ -Phe-OH; (S)-Boc-4-bromo- $\beta$ -Phe-OH; (S)-Boc-4-cloro- $\beta$ -Homophe-OH; (S)-Boc-4-cloro- $\beta$ -Phe-OH; (S)-Boc-4-ciano- $\beta$ -Homophe-OH; (S)-Boc-4-ciano- $\beta$ -Phe-OH; (S)-Boc-4-fluoro- $\beta$ -Phe-OH; (S)-Boc-4-iodo- $\beta$ -Homophe-OH; (S)-Boc-4-metil- $\beta$ -Homophe-OH; (S)-Boc-4-metil- $\beta$ -Phe-OH; (S)-Boc- $\gamma,\gamma$ -difenil- $\beta$ -Homoala-OH; (S)-Fmoc-2-metil- $\beta$ -Homophe-OH; (S)-Fmoc-3,4-difluoro- $\beta$ -Homophe-OH; (S)-Fmoc-3-(trifluorometil)- $\beta$ -Homophe-OH; (S)-Fmoc-3-ciano- $\beta$ -Homophe-OH; (S)-Fmoc-3-metil- $\beta$ -Homophe-OH; (S)-Fmoc- $\gamma,\gamma$ -difenil- $\beta$ -Homoala-OH; ácido 2-(Boc-aminometil)fenilacético; ácido 3-Amino-3-(3-bromofenil)propiónico; ácido 3-Amino-4,4,4-trifluorobutírico; ácido 3-Aminobutanoico; ácido DL-3-Aminoisobutírico; ácido DL- $\beta$ -Aminoisobutírico; DL- $\beta$ -Homoleucina; DL- $\beta$ -Homometionina; DL- $\beta$ -Homofenilalanina; DL- $\beta$ -Leucina; DL- $\beta$ -Fenilalanina; cloridrato de L- $\beta$ -Homoalanina; cloridrato de ácido L- $\beta$ -Homoglutâmico; cloridrato de L- $\beta$ -Homoglutamina; cloridrato de L- $\beta$

Homoidroxiprolina; cloridrato de L- $\beta$ -Homoisoleucina; cloridrato de L- $\beta$ -Homoleucina; dicloridrato de L- $\beta$ -Homolisina; cloridrato de L- $\beta$ -Homometionina; cloridrato de alil éster L- $\beta$ -Homofenilalanina; cloridrato de L- $\beta$ -Homofenilalanina; L- $\beta$ -Homoserina; L- $\beta$ -Homotreonina; cloridrato de L- $\beta$ -Homotriptofano; cloridrato de L- $\beta$ -Homotirosina; cloridrato de L- $\beta$ -Leucina; Boc-D- $\beta$ -Leu-OH; Boc-D- $\beta$ -Phe-OH; Boc- $\beta$  3>-Homopro-OH; Boc- $\beta$ -Glu(OBzl)-OH; Boc- $\beta$ -Homoarg(Tos)-OH; Boc- $\beta$ -Homoglu(OBzl)-OH; técnica de sal de Boc- $\beta$ -Homohip(Bzl)-OH (dicicloexilamônio),; Boc- $\beta$ -Homolis(Z)-OH; Boc- $\beta$ -Homoser(Bzl)-OH; Boc- $\beta$ -Homotr(Bzl)-OH; Boc- $\beta$ -Homotir(Bzl)-OH; Boc- $\beta$ -Ala-OH; Boc- $\beta$ -Gln-OH; Boc- $\beta$ -Homoala-OAll; Boc- $\beta$ -Homoala-OH; Boc- $\beta$ -Homogln-OH; Boc- $\beta$ -Homoile-OH; Boc- $\beta$ -Homoleu-OH; Boc- $\beta$ -Homomet-OH; Boc- $\beta$ -Homophe-OH; Boc- $\beta$ -Homotrp-OH; Boc- $\beta$ -Homotrp-OMe; Boc- $\beta$ -Leu-OH; sal de Boc- $\beta$ -Lis(Z)-OH (dicicloexilamônio); Boc- $\beta$ -Phe-OH; Propionato de 3-(benzilamino)etilo; Fmoc-D- $\beta$ -Homophe-OH; Fmoc-L- $\beta$  3>-homoprolina; Fmoc- $\beta$ -D-Phe-OH; Fmoc- $\beta$ -Gln(Trt)-OH; Fmoc- $\beta$ -Glu(OtBu)-OH; Fmoc- $\beta$ -Homoarg(Pmc)-OH; Fmoc- $\beta$ -Homogln(Trt)-OH; Fmoc-p-Homoglu(OtBu)-OH; Fmoc- $\beta$ -Homohip(tBu)-OH; Fmoc- $\beta$ -Homolis(Boc)-OH; Fmoc- $\beta$ -Homoser(tBu)-OH; Fmoc- $\beta$ -Homotr(tBu)-OH; Fmoc- $\beta$ -Homotir(tBu)-OH; Fmoc- $\beta$ -Ala-OH; Fmoc- $\beta$ -Gln-OH; Fmoc- $\beta$ -Homoala-OH; Fmoc- $\beta$ -Homogln-OH; Fmoc- $\beta$ -Homoile-OH; Fmoc- $\beta$ -Homoleu-OH; Fmoc- $\beta$ -Homomet-OH; Fmoc- $\beta$ -Homophe-OH; Fmoc- $\beta$ -Homotrp-OH; Fmoc- $\beta$ -Leu-OH; Fmoc- $\beta$ -Phe-OH; N-Acetyl-DL- $\beta$ -fenilalanina; Z-D- $\beta$ -Dab(Boc)-OH; Z-D- $\beta$ -Dab(Fmoc)-OH purum,; Z-DL- $\beta$ -Homoalanina; Z- $\beta$ -D-Homoala-OH; Z- $\beta$ -Glu(OtBu)-OH técnico,; Z- $\beta$ -Homotrp(Boc)-OH; Z- $\beta$ -Ala-OH purum; Z- $\beta$ -Ala-ONp purum,; Z- $\beta$ -Dab(Boc)-OH; Z- $\beta$ -Dab(Fmoc)-OH; Z- $\beta$ -Homoala-OH;  $\beta$ -Alanina;  $\beta$ -alanina BioXtra,; cloridrato de  $\beta$ -Alanina etil éster; cloridrato de  $\beta$ -Alanina metil éster;

cloridrato de ácido  $\beta$ -Glutâmico; cloridrato de ácido cis-2-Amino-3-ciclopenteno-1-carboxílico; ácido cis-3-(Boc-amino)cicloexanocarboxílico; e ácido cis-3-(Fmoc-amino)cicloexanocarboxílico.

Em algumas formas de realização, um péptido anfifílico descrito no presente documento pode compreender pelo menos uma (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou mais) ligação amida modificada, por exemplo, uma ligação amida na cadeia principal substituído por uma ligação selecionada do grupo que consiste em ligação peptídica psi reduzida, ureia, tioureia, carbamato, sulfonil ureia, trifluoroetilamina, ácido orto-(aminoalquil)-fenilacético, ácido para-(aminoalquil)-fenilacético, ácido meta-(aminoalquil)-fenilacético, tioamida, tetrazol, éster borónico, e grupo olefínico. A ligação de substituição de amida pode estar presente em qualquer posição no péptido anfifílico. Quando duas ou mais ligações de substituição de amida estiverem presentes, as mesmas podem ficar posicionadas próximas (por exemplo, em ambos os lados de um determinado aminoácido) ou não próximas uma da outra (por exemplo, apenas um lado de um determinado aminoácido é ligado através de uma ligação de substituição de péptido ao próximo aminoácido).

Em algumas formas de realização, a ligação de substituição de amida está presente no segmento de peptidilo hidrofílico. Sem limitação, a ligação de substituição de amida pode estar presente em qualquer posição do segmento de peptidilo hidrofílico, por exemplo, lendo-se a partir do N-terminal, na posição 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, e assim por diante do segmento de peptidilo hidrofílico.

Em algumas formas de realização, a ligação de substituição de amida está presente no segmento de peptidilo hidrofóbico. Sem limitação, a ligação de substituição de amida pode estar presente em qualquer posição do segmento de peptidilo hidrofóbico, por exemplo, lendo-se a partir do N-terminal, na posição 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, e assim por diante do segmento de peptidilo hidrofóbico.

Em algumas formas de realização, tanto os segmentos de peptidilo hidrofílicos como hidrofóbicos pode, cada um, compreender pelo menos uma ligação de substituição de amida. Quando tanto os segmentos de peptidilo hidrofílicos como hidrofóbicos compreenderem a uma ligação de substituição de amida, o número de tais ligações de substituição de amida em cada segmento pode ser igual ou diferente.

A terminação C de um péptido anfifílico descrito no presente documento pode ser não modificada ou modificada ao conjugar um grupo protetor de carboxilo ou um grupo amida. Os grupos protetores de carboxilo exemplificadores incluem, mas não se limitam a, ésteres como metilo, etilo, t-butilo, metoximetila, 2,2,2-tricloroetilo e 2-haloetilo; ésteres benzílicos como trifenilmetilo, difenilmetilo, p-bromobenzilo, o-nitrobenzilo e similares; ésteres de sililo como trimetilsililo, trietilsililo, t-butildimetsilsililo e similares; amidas; e hidrazidas. Outros grupos protetores de ácido carboxílico podem incluir alfa-aminoácidos opcionalmente protegidos que são ligados à porção amino dos alfa-aminoácidos. Em algumas formas de realização, a terminação C de um péptido anfifílico é conjugada a NH<sub>2</sub>,

NH-alquilo ou N(alquilo)<sub>2</sub>.

Ligaçāo entre segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos

Sem limitação, o segmento de peptidilo hidrofílico pode ser ligado à terminação N ou à terminação C do segmento de peptidilo hidrofóbico. Consequentemente, um péptido anfifílico pode ser (segmento de peptidilo hidrofílico)-ligando-(segmento de peptidilo hidrofóbico) ou (segmento de peptidilo hidrofóbico)-ligando-(segmento de peptidilo hidrofílico). Numa forma de realização, o segmento de peptidilo hidrofílico é ligado à terminação N do segmento de peptidilo hidrofóbico. Indicado de outra forma, numa forma de realização, o segmento de peptidilo hidrofóbico é ligado à terminação C do segmento de peptidilo hidrofílico. A ligação entre os segmentos de peptidilo hidrofílicos e hidrofóbicos pode ser uma ligação de amida, uma ligação de substituição de amida, ou um ligando como definido no presente documento.

Em algumas formas de realização, a ligação entre os segmentos de peptidilo hidrofílicos e hidrofóbicos é uma ligação amida (por exemplo, -NHC(O)-) ou uma ligação de substituição de amida.

Em algumas formas de realização, a ligação entre os segmentos de peptidilo hidrofílicos e hidrofóbicos inclui um aminoácido, dois aminoácidos, ou um péptido que compreende de 3 a 15 aminoácidos. É entendido que quando os segmentos de peptidilo hidrofílicos e hidrofóbicos forem ligados por uma cadeia de aminoácidos, o ligando pode compreender uma ou mais das modificações de péptido descritas no presente documento, por exemplo, ligação de

substituição de amida, beta-aminoácidos, D-aminoácidos, aminoácidos quimicamente modificados, etc.

Péptidos anfifílicos exemplificadores e utilizações dos mesmos

Em algumas formas de realização, um péptido anfifílico compreende uma sequência de aminoácidos  $(L-AA^{21})_r - ((L-AA^{11}) - (D-AA^{12}))_{b'} - (L-AA^{13})$ , em que AA<sup>21</sup> é um resíduo de Lys ou uma substituição do mesmo; cada AA<sup>11</sup> e AA<sup>13</sup> é independentemente um resíduo de Trp ou uma substituição do mesmo, AA<sup>12</sup> é um resíduo de Leu ou uma substituição do mesmo, e em que f' é um número inteiro de 3 a 21 e b' é um número inteiro de 3 a 20, e em que pelo menos um de entre o grupo amino de terminação N ou um grupo amino de cadeia lateral de pelo menos um resíduo de AA<sup>21</sup> é conjugado a um grupo protetor de azoto ou amino.

O termo "substituição" quando se refere a um péptido, refere-se a uma alteração em um aminoácido para uma entidade diferente, por exemplo, outro aminoácido ou porção aminoácido. As substituições podem ser substituições conservativas ou não conservativas. Em algumas formas de realização, a substituição é uma substituição conservativa. Como utilizado no presente documento, o termo "substituição conservativa" refere-se a uma substituição de aminoácido em que o resíduo de aminoácidos substituído tem carga similar e/ou hidrofobicidade similar ao resíduo substituído. O resíduo substituído pode ser de tamanho similar a, ou tamanho menor ou tamanho maior que, o resíduo substituído, desde que o resíduo substituído tenha propriedades bioquímicas similares ao resíduo substituído. As substituições

conservativas de aminoácidos incluem, mas não se limitam a, substituições feitas entre aminoácidos dentro dos seguintes grupos: (i) os aminoácidos não polares pequenos: alanina (Ala), metionina (Met), isoleucina (Ile), leucina (Leu) e valina (Val); (ii) os aminoácidos polares pequenos: glicina (Gly), serina (Ser), treonina (Thr) e cisteína (Cys); (iii) os aminoácidos amido: glutamina (Gln) e asparagina (Asn); (iv) os aminoácidos aromáticos: fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp); (v) os aminoácidos básicos: lisina (Lys), arginina (Arg) e histidina (His); e (vi) os aminoácidos ácidos: ácido de glutamina (Glu) e ácido aspártico (Asp). As substituições que têm a carga neutra e que substituem um resíduo por um resíduo menor também podem ser consideradas "substituições conservativas" mesmo que os resíduos estejam em grupos diferentes (por exemplo, substituição de fenilalanina pela isoleucina menor). O termo "substituição conservativa" também abrange a utilização de miméticos de aminoácido, análogos, variantes, ou aminoácido não proteinogénico ou não padrão. Somente a título de exemplo, AdaA ou AdaG pode ser substituído por valina (Val); ácido L-1-tioazolidina-4-carboxílico ou ácido carboxílico D-ou-L-1-oxazolidina-4-carboxílico (Veja-se Kauer, Patente U.S. No. (4.511.390)) pode ser substituído por prolina; e Aib,  $\beta$ -Ala, ou Acp pode ser substituído por glicina (Gly). Consequentemente, em algumas formas de realização, AA<sup>21</sup> pode ser um resíduo de Lys, ou uma substituição conservativa do mesmo, por exemplo, Arg ou His. Numa forma de realização, AA<sup>21</sup> é um resíduo de Lys ou um derivado do mesmo.

Em algumas formas de realização, AA<sup>11</sup> e AA<sup>13</sup> pode ser, cada um, independentemente um resíduo de Trp, ou uma substituição conservativa do mesmo, por exemplo, Phe ou Tyr. Numa forma de realização, AA<sup>11</sup> e AA<sup>13</sup> é, cada um, independentemente um resíduo de Trp ou um derivado do mesmo.

Em algumas formas de realização, AA<sup>12</sup> pode ser um resíduo de Leu, ou uma substituição conservativa do mesmo, por exemplo, Ala, Met, Ile ou Val. Numa forma de realização, AA<sup>12</sup> é um resíduo de Leu ou um derivado do mesmo.

Em algumas formas de realização, um péptido anfifílico compreende uma sequência de aminoácidos (L-Lys)<sub>r'</sub>-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>m'</sub>-(L-Trp), em que r' é um número inteiro de 3 a 21 e m' é um número inteiro de 3 a 20, e em que pelo menos um de entre um grupo amino de terminação N ou um grupo amino de cadeia lateral de pelo menos um resíduo de Lys é conjugado a um grupo protetor azoto ou amino.

Em algumas formas de realização, r' e m' são, independentemente, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15. Em algumas formas de realização, tanto r' como m' são iguais. Numa forma de realização, tanto r' como m' são 3.

Em algumas formas de realização, o péptido anfifílico compreende a sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em: Ac-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp)-NH<sub>2</sub> (também chamado de CD3ac no presente documento, em que a abreviação "ac" ou "Ac" refere-se à acetilação tanto de grupo amino de terminação N de um péptido anfifílico como de um grupo

amino de um resíduo de Lys no segmento de peptidílico hidrofílico);

$\text{Ac} - (\text{L-Lys}) - (\text{L-Lys}) - (\text{L-Lys}) - ((\text{L-Trp}) - (\text{D-Leu}))_3 - (\text{L-Trp}) - \text{NH}_2;$

$(\text{L-Lys}) - (\text{L-Lys}) - (\text{L-Lys(Ac)}) - ((\text{L-Trp}) - (\text{D-Leu}))_3 - (\text{L-Trp}) - \text{NH}_2;$

$(\text{L-Lys(Ac)}) - (\text{L-Lys}) - (\text{L-Lys}) - ((\text{L-Trp}) - (\text{D-Leu}))_3 - (\text{L-Trp}) - \text{NH}_2;$

$(\text{L-Lys(Ac)}) - (\text{L-Lys}) - (\text{L-Lys(Ac)}) - ((\text{L-Trp}) - (\text{D-Leu}))_3 - (\text{L-Trp}) - \text{NH}_2;$

$(\text{L-Lys(Ac)}) - (\text{L-Lys}) - (\text{L-Lys(Ac)}) - ((\text{L-Trp}) - (\text{D-Leu}))_3 - (\text{L-Trp}) - \text{NH}_2;$

$(\text{L-Lys(Ac)}) - (\text{L-Lys(Ac)}) - (\text{L-Lys(Ac)}) - ((\text{L-Trp}) - (\text{D-Leu}))_3 - (\text{L-Trp}) - \text{NH}_2;$

$(\text{L-Lys(Ac)}) - (\text{L-Lys(Ac)}) - (\text{L-Lys(Ac)}) - ((\text{L-Trp}) - (\text{D-Leu}))_3 - (\text{L-Trp}) - \text{NH}_2;$

$\text{Ac} - (\text{L-Lys(Ac)}) - (\text{L-Lys(Ac)}) - (\text{L-Lys(Ac)}) - ((\text{L-Trp}) - (\text{D-Leu}))_3 - (\text{L-Trp}) - \text{NH}_2;$

$\text{Ac} - (\text{L-Lys}) - (\text{L-Lys}) - (\text{L-Lys}) - ((\text{L-Trp}) - (\text{D-Leu}))_3 - (\text{L-Trp});$

$(\text{L-Lys}) - (\text{L-Lys}) - (\text{L-Lys(Ac)}) - ((\text{L-Trp}) - (\text{D-Leu}))_3 - (\text{L-Trp});$

(L-Lys) - (L-Lys (Ac)) - (L-Lys) - ((L-Trp) - (D-Leu))<sub>3</sub> - (L-Trp);

(L-Lys (Ac)) - (L-Lys) - (L-Lys) - ((L-Trp) - (D-Leu))<sub>3</sub> - (L-Trp);

(L-Lys) - (L-Lys (Ac)) - (L-Lys (Ac)) - ((L-Trp) - (D-Leu))<sub>3</sub> - (L-Trp);

(L-Lys (Ac)) - (L-Lys) - (L-Lys (Ac)) - ((L-Trp) - (D-Leu))<sub>3</sub> - (L-Trp);

(L-Lys (Ac)) - (L-Lys (Ac)) - (L-Lys) - ((L-Trp) - (D-Leu))<sub>3</sub> - (L-Trp);

(L-Lys (Ac)) - (L-Lys (Ac)) - (L-Lys (Ac)) - ((L-Trp) - (D-Leu))<sub>3</sub> - (L-Trp);

Ac - (L-Lys) - (L-Lys) - (L-Lys (Ac)) - ((L-Trp) - (D-Leu))<sub>3</sub> - (L-Trp) - NH<sub>2</sub>;

Ac - (L-Lys) - (L-Lys (Ac)) - (L-Lys) - ((L-Trp) - (D-Leu))<sub>3</sub> - (L-Trp) - NH<sub>2</sub>;

Ac - (L-Lys (Ac)) - (L-Lys) - (L-Lys (Ac)) - ((L-Trp) - (D-Leu))<sub>3</sub> - (L-Trp) - NH<sub>2</sub>;

Ac - (L-Lys (Ac)) - (L-Lys) - (L-Lys (Ac)) - ((L-Trp) - (D-Leu))<sub>3</sub> - (L-Trp) - NH<sub>2</sub>;

Ac - (L-Lys (Ac)) - (L-Lys (Ac)) - (L-Lys) - ((L-Trp) - (D-Leu))<sub>3</sub> - (L-Trp) - NH<sub>2</sub>;

Ac - (L-Lys (Ac)) - (L-Lys (Ac)) - (L-Lys) - ((L-Trp) - (D-Leu))<sub>3</sub> - (L-Trp) - NH<sub>2</sub>;

AC- (L-Lys) - (L-Lys) - (L-Lys (Ac)) - ( (L-Trp) - (D-Leu) )<sub>3</sub> - (L-Trp);

AC- (L-Lys) - (L-Lys (Ac)) - (L-Lys) - ( (L-Trp) - (D-Leu) )<sub>3</sub> - (L-Trp);

AC- (L-Lys (Ac)) - (L-Lys) - (L-Lys) - ( (L-Trp) - (D-Leu) )<sub>3</sub> - (L-Trp);

AC- (L-Lys) - (L-Lys (Ac)) - (L-Lys (Ac)) - ( (L-Trp) - (D-Leu) )<sub>3</sub> - (L-Trp);

AC- (L-Lys (Ac)) - (L-Lys) - (L-Lys (Ac)) - ( (L-Trp) - (D-Leu) )<sub>3</sub> - (L-Trp);

AC- (L-Lys (Ac)) - (L-Lys (Ac)) - (L-Lys) - ( (L-Trp) - (D-Leu) )<sub>3</sub> - (L-Trp);

AC- (L-Lys (Ac)) - (L-Lys (Ac)) - (L-Lys (Ac)) - ( (L-Trp) - (D-Leu) )<sub>3</sub> - (L-Trp); e quaisquer combinações dos mesmos.

Em algumas formas de realização, o segmento de peptidilo hidrofílico do péptido anfifílico pode compreender uma cisteína. Em algumas formas de realização, a cisteína pode estar presente na terminação N do segmento de peptidilo hidrofílico.

O inventor constatou que algumas formas de realização dos péptidos anfifílicos descritos no presente documento podem ter capacidade de penetração celular. Dessa forma, em algumas formas de realização, os péptidos anfifílicos descritos no presente documento podem ser utilizados como agentes de penetração e/ou transfeção de células. Nessas

formas de realização, os péptidos anfifílicos podem ser desenhados para serem carregados positivamente. Consequentemente, a utilização de uma composição que compreende um péptido anfifílico carregado positivamente como um agente de penetração ou agente de transfeção celular é fornecido no presente documento, em que o péptido anfifílico de carga positiva compreende um segmento de peptidilo hidrofóbico e um segmento de peptidilo hidrofílico. O segmento de peptidilo hidrofóbico do péptido anfifílico de carga positiva compreende uma sequência de aminoácidos de  $(Trp-Leu)_m-(Trp)_n$  ou  $(Leu-Trp)_p-(Leu)_q$ , em que cada Trp é D-Trp ou L-Trp e cada Leu é D-Leu ou L-Leu, m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 5, e n e q são, independentemente, 0 ou 1, desde que quando Trp for D-Trp, então, Leu seja L-Leu, e quando Trp for L-Trp, então, Leu é D-Leu, ou vice-versa; enquanto o segmento de peptidilo hidrofílico compreende uma sequência de aminoácidos de  $(Lys)_r$ , em que r é um número inteiro de 1 a 15. Adicionalmente, no péptido anfifílico carregado positivamente, pelo menos um dos resíduos ou o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico não é acetilado. Em algumas formas de realização, todos os resíduos de Lys e o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico carregado positivamente não são acetilados.

Em algumas formas de realização, o péptido anfifílico com carga positiva pode compreender uma sequência de aminoácidos de  $(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-X$ , em que X está ausente ou  $NH_2$ .

Em algumas formas de realização, a composição pode compreender adicionalmente uma molécula de ácido nucleico ou oligonucleótido (por exemplo, ADN ou ARN) a ser libertada numa célula. Em algumas formas de realização, a composição pode compreender adicionalmente uma pluralidade (por exemplo, pelo menos 2 ou mais) de moléculas de ácido nucleico ou oligonucleótidos (por exemplo, ADN ou ARN incluindo, mas sem se limitar a, siARN, shARN, miARN). Em algumas formas de realização, as moléculas de ácido nucleico ou oligonucleótidos podem ser desenhadas para utilização em intervenção terapêutica, por exemplo, terapia génica ou terapia com siARN.

#### Síntese de péptidos

Os péptidos anfifílicos descritos no presente documento podem ser sintetizados de acordo com os métodos tradicionais de química de péptido de fase de solução e sólida, ou por métodos clássicos conhecidos na técnica. A purificação de péptidos é bem conhecida na técnica e pode ser, por exemplo, HPLC. Métodos para descrever a síntese peptídica e métodos de purificação podem ser encontrados, pode ser, na Publicação de Pedido de Patente US nº 20060084607.

Os péptidos descritos no presente documento podem ser sinteticamente construídos por técnicas de polimerização de péptidos conhecidas adequadas, como técnicas exclusivamente de fase sólida, técnicas parcialmente de fase sólida, condensação de fragmentos ou acoplamentos de solução clássicos. Por exemplo, os péptidos podem ser sintetizados pelo método de fase sólida utilizando métodos-padrão baseados em grupos protetores de t-

butiloxicarbonilo (BOC) ou 9-fluorenilmetoxi-carbonilo (FMOC). Essa metodologia é descrita por G. B. Fields et al. Em *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W. M. Freeman & Company, New York, N.Y., pp. 77 a 183 (1992) e no livro-texto "Solid-Phase Synthesis", Stewart & Young, Freeman & Company, San Francisco, 1969, e são exemplificados pela divulgação de Patente US nº 4.105.603, concedida em 8 de agosto de 1979. A síntese de solução clássica é descrita em detalhes em "Methoden der Organischen Chemic (Houben-Weyl): Synthese von Peptiden", E. Wunsch (editor) (1974) Georg Thieme Verlag, Stuttgart West Alemanha. O método de síntese de condensação de fragmento é exemplificado na Patente US nº 3.972.859. Outras sínteses disponíveis são exemplificadas na Patente US nº 3.842.067, Patente US nº 3.872.925, concedida em 28 de janeiro de 1975, Merrifield B, Protein Science (1996), 5: 1947 a 1951; The chemical synthesis of proteins; Mutter M, Int J Pept Protein Res 1979 Mar; 13 (3): 274 a 247 Studies on the coupling rates in liquid-phase peptide synthesis using competition experiments; e Solid Phase Peptide Synthesis in the series Methods in Enzymology (Fields, G. B. (1997) Solid-Phase Peptide Synthesis. Academic Press, San Diego. #9830).

Os métodos de preparação de miméticos de péptido incluem modificar o grupo amino N-terminal, o grupo carboxilo C-terminal e/ou mudar uma ou mais ligações amino no péptido para uma ligação não amino. Duas ou mais dessas modificações podem ser acopladas em um inibidor de mimético peptídico. As modificações de péptidos para produzir miméticos de péptido são descritas, por exemplo, na Patente US nº 5.643.873 e Nº 5.654.276.

### Miméticos de péptido

Em algumas formas de realização, o péptido anfifílico é um mimético peptídico. Por exemplo, o segmento peptídico hidrofílico pode ser mimético peptídico, o segmento de peptidilo hidrofóbico pode ser um mimético peptídico, ou ambos podem ser miméticos peptídicos.

Os métodos de desenho de miméticos peptídicos e triagem de miméticos peptídicos funcionais são bem conhecidos pelos peritos na especialidade. Um método básico de desenho de uma molécula que imita uma proteína ou péptido conhecido serve, primeiramente, para identificar a(s) região(ões) ativa(s) da proteína conhecida (por exemplo, no caso de uma interação de anticorpo-antígeno, um identifica qual/quais região(ões) do anticorpo que permite(m) a ligação ao antígeno) e, então, busca um mimético que emula a região ativa. Se a região ativa de uma proteína conhecida for relativamente pequena, é esperado que um mimético seja menor (por exemplo, em massa molecular) que a proteína e, tem uma sintetização proporcionalmente mais fácil e mais econômica. Tal mimético poderia ser utilizado como um substituto conveniente para a proteína, como um agente para interagir com a molécula alvo.

Os métodos de preparação de miméticos de péptido incluem modificar o grupo amino N-terminal, o grupo carboxilo C-terminal e/ou mudar uma ou mais ligações amida no péptido para uma ligação não amida ou amida modificada. Duas ou mais dessas modificações podem ser acopladas em um mimético peptídico. As modificações de péptidos para produzir miméticos de péptido são descritas, por exemplo,

na Patente US nº 5.643.873 e Nº 5.654.276.

Por exemplo, Reineke et al. (1999, *Nature Biotechnology*, 17;271 a 275) projetaram uma molécula de imitação que imita um sítio de ligação da proteína interleucina-10 utilizando uma biblioteca grande de péptidos sintéticos curtos, cada um correspondendo a uma secção curta de interleucina 10. A ligação de cada um desses péptidos ao alvo (nesse caso, um anticorpo contra interleucina-10) foi, então, testada individualmente por uma técnica de ensaio, para identificar péptidos potencialmente relativos. As bibliotecas de apresentação em fago de péptidos e método de varrimento de alanina podem ser utilizadas.

Outros métodos de desenho de miméticos peptídicos para um péptido ou proteína particular incluem aqueles descritos na Patente europeia EP1206494, o programa SuperMimic por Andrean Goede et. al. 2006 *BMC Bioinformatics*, 7:11; e MIMETIC program por W. Campbell et. al., 2002, *Microbiology and Immunology* 46:211 a 215. O programa SuperMimic é desenhado para identificar os compostos que imitam partes de uma proteína, ou posições em proteínas que são adequadas para inserir miméticos. O pedido fornece bibliotecas que contêm blocos de construção de peptidomiméticos em um lado e estruturas proteicas no outro. A pesquisa de ligandos peptidomiméticos promissores para um determinado péptido se baseia na sobreposição do péptido com vários conformadores do mimético. Novos elementos sintéticos ou proteínas podem ser importados e utilizados para pesquisa. O programa de computador MIMETIC, que gera uma série de péptidos para interação com uma sequência de péptidos alvo é ensinado

por W. Campbell et. al., 2002. Uma discussão profunda do tópico é analisada em "Peptide Mimetic Design with the Aid of Computational Chemistry" por James R. Damewood Jr. Em Reviews in Computational Chemistry Reviews in Computational Chemistry, Jan 2007, Volume 9 Book Series: Reviews in Computational Chemistry, Editor(s): Kenny B. Lipkowitz, Donald B. BoydPrint ISBN: 9780471186397 ISBN: 9780470125861 Publicado por John Wiley & Sons, Inc.; e em T. Tselios, et. al., Amino Acids, 14: 333 a 341, 1998.

Os métodos de preparação de bibliotecas contendo diversas populações de péptidos, peptoides e peptidomiméticos são bem conhecidos na técnica e várias bibliotecas estão comercialmente disponíveis (veja-se, por exemplo, Ecker e Crooke, Biotechnology 13:351 a 360 (1995), e Blondelle et al., Trends Anal. Chem. 14:83 a 92 (1995); veja-se, também, Goodman and Ro, Peptidomimetics for Drug Design, em "Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery" Vol. 1 (ed. M. E. Wolff; John Wiley & Sons 1995), páginas 803 a 861, e Gordon et al., J. Med. Chem. 37:1385 a 1401 (1994). O perito na especialidade entende que um péptido pode ser produzido *in vitro* diretamente ou pode ser expresso a partir de um ácido nucleico, que pode ser produzido *in vitro*. Os métodos de péptido sintético e química de ácido nucleico são bem conhecidos na técnica.

Uma biblioteca de moléculas de péptido também pode ser produzida, por exemplo, ao construir uma biblioteca de expressão de cADN a partir de mARN recolhido de um tecido de interesse. Os métodos de produção de tais bibliotecas são bem conhecidos na técnica (veja-se, por exemplo, Sambrook et. al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. De preferência, um péptido codificado pelo cADN é expresso

sobre a superfície de uma célula ou um vírus que contém o cADN.

#### Ligandos e agentes ativos

Uma ampla variedade de entidades, por exemplo, ligandos, pode ser acoplada a um péptido anfifílico descrito no presente documento ou uma partícula peptídica descrita posteriormente. Os ligandos podem incluir moléculas de ocorrência natural, ou moléculas recombinantes ou sintéticas. Em algumas formas de realização, um ligando pode alterar a distribuição, alvejamento ou tempo de vida de um péptido anfifílico descrito no presente documento ou uma partícula peptídica feita a partir do mesmo. Em algumas formas de realização, um ligando pode fornecer uma afinidade aumentada (por exemplo, resistência à ligação aumentada) para um alvo selecionado, por exemplo, molécula, célula ou tipo de célula, compartimento, por exemplo, um compartimento celular ou de órgão, tecido, órgão ou região do corpo, como, por exemplo, em comparação com uma espécie ausente de tal ligando. Em algumas formas de realização, um ligando pode fornecer uma especificidade aumentada de um péptido anfifílico descrito no presente documento ou uma partícula peptídica feita a partir do mesmo para um alvo selecionado, como, por exemplo, em comparação com um péptido anfifílico sem tal ligando. O termo "especificidade" como utilizado no presente documento, refere-se à capacidade de um péptido anfifílico ou uma partícula peptídica para se ligar, de preferência, a um alvo selecionado sobre quaisquer outras entidades. Por exemplo, a presença de um ligando em um péptido anfifílico e/ou uma partícula peptídica descrita no presente documento pode permitir que o péptido

anfifílico ou partícula peptídica se ligue, de preferência, a um alvo selecionado sobre quaisquer outras entidades, em comparação com um péptido anfifílico ou partícula peptídica sem tal ligando.

Sem limitação, um ligando pode ser selecionado do grupo que consiste em polímeros, péptidos, polipéptidos, proteínas, peptidomiméticos, glicoproteínas, lectinas, nucleósidos, nucleótidos, ácidos nucleicos, monossacáridos, dissacáridos, trissacáridos, oligossacáridos, polissacáridos, lipopolissacáridos, vitaminas, lípidos, esteroides, hormonas, cofatores, receptores, ligandos de receptor e quaisquer combinações dos mesmos.

Em algumas formas de realização desse e outros aspectos descritos no presente documento, o ligando é selecionado do grupo consistindo em polietileno glicol (PEG, por exemplo, PEG-2K, PEG-5K, PEG-10K, PEG-12K, PEG-15K, PEG-20K, PEG-40K), MPEG, [MPEG]2, poli (óxido de etileno) (PEO), poli(propilen glicol) (PPG), poli (óxido de etileno-co-óxido de propileno), ácido hialurónico, poli(2-hidroxietil metacrilato), heparina, polivinil(pirrolidona), sulfato de condroitano, quitosana, glicosaminoglicanas, dextrano, dextrina, sulfato de dextrano, acetato de celulose, carbóxi metil celulose, hidróxi etil celulose, celulósicos, poli(trimetileno glicol), poli(tetrametileno glicol), polipéptidos, poliacrilmida, poliacriliimida, poli(etileno amina), poli(alil amina), copolímero de anidrido de estireno-ácido maleico, copolímero de poli(L-lactida-co-glicolida), copolímero de anidrido de divinil éter-maleico, copolímero de N-(2-

hidroxipropil)metacrilamina (HMPA), álcool polivinílico (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrílico), polímeros de N-isopropilacrilamida, polifosfazina, polietilenimina, espermina, espermidina, poliamina, pseudopeptídeo-poliamina, poliamina peptidomimético, dendrímero-poliamina, arginina, amidina, protamina, tirotropina, melanotropina, lectina, proteína A de tensioativo, mucina, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, um aptâmero, asialofetuína, hialuronano, procolágeno, insulina, transferrina, albumina, acridinas, psoraleno cruzado, mitomicina C, TPPC4, texafirina, Safirina, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (por exemplo, fenazina, diidrofenazina), ácidos biliares, colesterol, ácido cólico, ácido adamantano acético, ácido 1-pireno butírico, diidrotestosterona, 1,3-Bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloxiexila, hexadecilglicerol, bomeol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecila, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litocólico, ácido O3-(oleoil)colénico, dimetoxitritila, ou fenoxazina), péptido RGD, marcadores radiomarcados, haptenos, naproxeno, aspirina, dinitrofenila, HRP, AP, lectinas, vitamina A, vitamina E, vitamina K, vitamina B, ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal, táxon, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, japlacinolida, latrunculina A, faloidina, swinholida A, indanocina, mioservina, fator de necrose tumoral alfa (TNFalfa), interleucina-1 beta, gama interferão, GalNAc, galactose, manose, manose-6P, agrupamentos de açúcares como agrupamento de GalNAc, agrupamento de manose, agrupamento de galactose, um aptâmero, ligandos de receptor de integrina, ligandos de receptor de quimiocina, ligandos de receptor de serotonina, PSMA, endotelina, GCPII, somatostatina, péptido de

permeação de parede celular bacteriana, péptido GALA, péptido EALA, péptido INF-7, péptido Inf HA-2, péptido diINF-7, péptido diINF-3, péptido GLF, péptido GALA-INF3, péptido INF-5, péptido de penetratina, fragmento de Tat 48-60, péptido PVEC, péptido de transportano, péptido LL-37, péptido de cecropina P1, péptido de  $\alpha$ -defensina, péptido de  $\beta$ -defensina, péptido de PR-39, péptido de indolicidina, péptido RFGF, análogo de RFGF, bactenecina, cecropinas, licotoxinas, paradaxinas, buforina, CPF, péptido semelhante a bombinina (BLP), catelicidinas, ceratotoxinas, S. clavapéptidos, péptidos antimicrobianos intestinais de mixinídeos (HFIAPs), magaininas, brevininas-2, dermaseptinas, melitinas, pleurocidina, péptidos H2A, péptidos Xenopus, esculentinis-1, caerinas, e quaisquer combinações dos mesmos.

Em algumas formas de realização, um ligando pode incluir um agente ativo. Como utilizado no presente documento, um "agente ativo" se refere a uma molécula que é libertado a uma célula. Consequentemente, mas sem se limitar a, um agente ativo pode ser selecionado do grupo que consiste em moléculas orgânicas ou inorgânicas pequenas, monossacáridos, dissacáridos, trissacáridos, oligossacáridos, polissacáridos, macromoléculas biológicas, por exemplo, péptidos, proteínas, análogos de péptido e derivados dos mesmos, peptidomiméticos, ácidos nucleicos, análogos de ácido nucleico e derivados, polinucleótidos, oligonucleótidos, enzimas, um extrato feito a partir de materiais biológicos como bactérias, plantas, fungos, ou células ou tecidos animais, composições de ocorrência natural ou sintéticas, particulados, ou quaisquer combinações dos mesmos. Um agente ativo pode ter uma carga neutra ou compreender uma

carga líquida, por exemplo, agente ativo é aniónico ou catiónico. Além disso, um agente ativo pode ser hidrofóbico, hidrofílico ou anfifílico. Em algumas formas de realização, o agente ativo compreende pelo menos um grupo arilo ou heteroarilo.

Como utilizado no presente documento, o termo "particulado" refere-se a uma partícula, pó, flocos, etc., que existe inherentemente numa forma relativamente pequena e pode ser formado por, por exemplo, moagem, trituração, fragmentação, pulverização, atomização ou, de outro modo, subdividindo-se uma forma maior do material numa forma relativamente pequena.

Como utilizado no presente documento, o termo "molécula pequena" pode referir-se a compostos que são "semelhantes ao produto natural", entretanto, o termo "molécula pequena", não se limita a compostos "semelhantes a produto natural". Em vez disso, uma molécula pequena é, tipicamente, caracterizada pelo facto de conter várias ligações carbono-carbono, e tem uma massa molecular menor que 5000 Dáltons (5 kD), de preferência, menor que 3 kD, com mais preferência, menor que 2 kD e, com a máxima preferência, menor que 1 kD. Em alguns casos, é altamente preferencial que uma molécula pequena tenha uma massa molecular igual ou menor que 700 Dáltons.

Em algumas formas de realização, o agente ativo pode ser um péptido ou uma proteína. Como utilizado no presente documento, o termo "péptido" é utilizado no seu sentido mais amplo para se referir a compostos contendo dois ou mais aminoácidos, equivalentes de aminoácido ou outros grupos não amino unidos um ao outro por ligações

peptídicas ou ligações peptídicas modificadas. Os equivalentes peptídicos podem se diferir de péptidos convencionais pela substituição de um ou mais ácidos orgânicos relacionados (como PABA), aminoácidos ou similares ou a substituição ou modificação de cadeias laterais ou grupos funcionais. Um péptido de qualquer tamanho; entretanto, em algumas formas de realização, péptidos tendo vinte ou menos aminoácidos totais são preferenciais. Adicionalmente, o péptido pode ser linear ou cílico. As sequências peptídicas especificamente citadas no presente documento são escritas com a terminação amino à esquerda e a terminação carbóxi à direita. Além disso, o termo "péptido" inclui amplamente proteínas que, em geral, são polipéptidos. Como utilizado no presente documento, o termo "proteína" é utilizado para descrever proteínas bem como fragmentos das mesmas. Dessa forma, qualquer cadeia de aminoácidos que exibe uma estrutura tridimensional está incluída no termo "proteína", e fragmentos de proteína são, consequentemente, adotados.

Um peptidomimético é uma molécula capaz de se dobrar em uma estrutura tridimensional definida similar a um péptido natural.

Como utilizado no presente documento, o termo "ácido nucleico" se refere a polímeros (polinucleótidos) ou oligómeros (oligonucleótidos) de monómeros de nucleótido ou nucleósido que consiste em bases de ocorrência natural, açúcares e ligações interaçúcar. O termo "ácido nucleico" inclui também polímeros ou oligómeros que compreendem monómeros de ocorrência não natural, ou porções dos mesmos, que operam de forma similar. Tais

ácidos nucleicos modificados ou substituídos são frequentemente preferenciais sobre formas nativas devido a propriedades como, por exemplo, absorção celular aumentada e estabilidade aumentada na presença de nucleases.

Um ácido nucleico pode ser de cadeia simples ou dupla fita. Um ácido nucleico de cadeia simples pode ter regiões de cadeia dupla e um ácido nucleico de cadeia dupla pode ter regiões de cadeia simples. Os ácidos nucleicos exemplificadores incluem, mas não se limitam a, genes estruturais, genes que incluem regiões de controlo e terminação, sistemas de auto-replicação como ADN viral ou plasmidial, siARNs de cadeia simples e cadeia dupla e outros regentes de interferência de ARN (agentes ARNi ou agentes iARN), ARNs em formato de grampo pequeno (shARN), oligonucleótidos antissettido, ribozimas, microARNs, simuladores de microARN, aptâmeros, antimirs, antagomirs, oligonucleótidos formadores de triplex, ativadores de ARN, oligonucleótidos imuno-estimuladores, e oligonucleótido decoy.

Em algumas formas de realização, o agente ativo é biologicamente ativo ou tem atividade biológica. Como utilizado no presente documento, o termo "atividade biológica" ou "bioatividade" refere-se à capacidade de um composto afetar uma amostra biológica. A atividade biológica pode incluir, mas não se limita a, elicitação de uma resposta estimulatória, inibitória, reguladora, tóxica ou letal num ensaio biológico nos níveis moleculares, celulares, de tecido ou órgão. Por exemplo, uma atividade biológica pode referir-se à capacidade de um composto exibir ou modular o efeito/atividade de uma

enzima, bloquear um recetor, estimular um recetor, modular o nível de expressão de um ou mais genes, modular a proliferação celular, modular a divisão celular, modular a morfologia celular, ou qualquer combinação dos mesmos. Em alguns casos, uma atividade biológica pode referir-se à capacidade de um composto produzir um efeito tóxico em uma amostra biológica, ou a mesma pode referir-se a uma capacidade de modificar quimicamente uma molécula ou célula alvo.

Em algumas formas de realização, o agente ativo é um agente terapêutico. Como utilizado no presente documento, o termo "agente terapêutico" refere-se a um agente biológico ou químico utilizado para tratar, curar, mitigar ou prevenir condições prejudiciais em um indivíduo. O termo "agente terapêutico" inclui também substâncias e agentes para combater uma doença, afeção ou distúrbio de um indivíduo e inclui fármacos, diagnósticos e instrumentação. "Agente terapêutico" inclui também qualquer coisa utilizada no diagnóstico médico, ou para restaurar, corrigir ou modificar as funções fisiológicas. Os termos "agente terapêutico" e "agente farmaceuticamente ativo" são utilizados de forma intercambiável no presente documento.

Um agente terapêutico pode ser selecionado de acordo com o objetivo de tratamento e ação biológica desejada. Dessa forma, um agente terapêutico pode ser selecionado de entre qualquer classe adequada para o objetivo terapêutico. Adicionalmente, o agente terapêutico pode ser selecionado ou disposto para fornecer atividade terapêutica durante um período de tempo.

O composto farmaceuticamente ativo exemplificador inclui, mas não se limitam a, aqueles encontrados em Harrison's Principles of Internal Medicine, 13<sup>a</sup> Edição, Eds. T.R. Harrison McGraw-Hill N.Y., NY; Physicians Desk Reference, 50<sup>a</sup> Edição, 1997, Oradell New Jersey, Medical Economics Co.; Pharmacological Basis of Therapeutics, 8<sup>a</sup> Edição, Goodman and Gilman, 1990; United States Pharmacopeia, The National Formulary, USP XII NF XVII, 1990; edição atual de Goodman and Oilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics; e a edição atual do The Merck Index.

Os agentes farmaceuticamente ativos exemplificadores incluem, mas não se limitam a, agentes anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais, fármacos antirrestenóticos, agentes antimicrobianos, fatores angiogénicos, bloqueadores do canal de cálcio, agentes trombolíticos, agentes anti-hipertensivos, anticoagulantes, agentes antiarrítmicos, glicosídeos cardíacos, e similares.

Em algumas formas de realização, o agente terapêutico é selecionado do grupo consistindo em ácido salicílico e derivados (aspirina), para-aminofenol e derivados (acetaminofeno), ácidos arilpropiónicos (ibuprofeno), corticosteroides, antagonistas do recetor de histamina e antagonistas do recetor de bradicinina, antagonistas do recetor de leucotrieno, antagonistas do recetor de prostaglandina, antagonistas do recetor de fator de ativação de plaquetas, sulfonamidas, trimetoprim-sulfametoazol, quinolonas, penicilinas, cefalosporina, fator de crescimento de fibroblastos básico (FGF), fator de crescimento de fibroblastos ácido, fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento de

transformação angiogénico alfa e beta, fator de necrose tumoral, angiopoietina, fator de crescimento derivado de plaquetas, diidropiridinas (por exemplo, nifedipina, benzotiazepinas como dilitazem, e fenilalquilominas como verapamil), ativador de plasminogénio uroquinase, uroquinase, estreptoquinase, inibidores de enzima de conversão da angiotensina (ECA), espironolactona, ativador de plasminogénio de tecido (tPA), diuréticos, tiazidas, agentes antiadrenérgicos, clonidina, propanolol, inibidores de enzimas de conversão de angiotensina, captopril, antagonistas do recetor de angiotensina, losartan, antagonistas de canal de cálcio, nifedina, heparina, warfarina, hirudina, péptido anticoagulante de carrapato, e heparinas de baixa massa molecular como enoxaparina, lidocaína, procainamida, encainida, flecanida, bloqueadores beta adrenérgicos, propranolol, amiodarona, verpamil, diltiazem, cloreto de níquel, glicosídeos cardíacos, inibidores de enzimas conversoras de angiotensina, antagonista do recetor de angiotensina, nitrovasodilatadores, agentes hipolipidémicos (por exemplo, ácido nicotínico, probucol, etc.), resinas de ligação a ácido biliar (por exemplo, colestiramina, e derivados de ácido fíbrico, por exemplo, clofibrato), inibidores de HMG CoA redutase, inibidores de HMG CoA sintase, inibidores de esqualeno sintase, inibidores de esqualeno epoxidase, estatinas (por exemplo, lovastatina, cerivastatina, fluvastatina, pravastatina, sinvaststina, etc.), antipsicóticos, SSRIs, medicação anticonvulsiva, contracetivos, analgésicos sistêmicos e locais (dor crónica, fatores de crescimento/remodelagem óssea (recrutamento de osteoblasto/osteoclasto e fatores estimulantes), neurotransmissores (L-DOPA, Dopamina, neuropéptidos),

fármacos para enfisema, TGF-beta), rapamicina, naloxona, paclitaxel, anfotericina, Dexametasona, flutamida, vancomicina, fenobarbital, cimetidina, atenolol, aminoglicosídeos, hormonas (por exemplo, hormona de libertação de tirotropina, p-nitrofenil betacelopentaosida e hormona de libertação de hormona luteinizante), vincristina, amilorida, digoxina, morfina, procainamida, quinidina, quinina, ranitidinae, triantereno, trimetoprim, vancomicina, aminoglicosídeos, e penicilina, e sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos.

Em algumas formas de realização, o agente ativo é um siARN, um ARN em forma de grampo pequeno (shARN), um oligonucleótido de antissetido, uma ribozima, um microARN, um microARN mímico, um aptâmero, um antimir, um antagomir, um oligonucleótido formador de triplex, um ativador de ARN, um oligonucleótido imunoestimulatório, um oligonucleótido decoy, um plasmídeo, ou um vetor de ADN.

Em algumas formas de realização, o agente terapêutico é um material radioativo. Os materiais radioativos adequados incluem, por exemplo, <sup>90</sup>ítrio, <sup>192</sup>irídio, <sup>198</sup>ouro, <sup>125</sup>iodo, <sup>137</sup>césio, <sup>60</sup>cobalto, <sup>55</sup>cobalto, <sup>56</sup>cobalto, <sup>57</sup>cobalto, <sup>57</sup>magnésio, <sup>55</sup>ferro, <sup>32</sup>fósforo, <sup>90</sup>estrôncio, <sup>81</sup>rubídio, <sup>206</sup>bismuto, <sup>67</sup>gálio, <sup>77</sup>bromo, <sup>129</sup>césio, <sup>73</sup>selénio, <sup>72</sup>selénio, <sup>72</sup>arsénico, <sup>103</sup>paládio, <sup>123</sup>chumbo, <sup>111</sup>índio, <sup>52</sup>ferro, <sup>167</sup>túlio, <sup>57</sup>níquel, <sup>62</sup>zinc, <sup>62</sup>cobre, <sup>20</sup>tálio e <sup>123</sup>iodo. Sem se ater à teoria, as partículas que compreendem um material radioativo podem ser utilizadas para tratar o tecido doente como tumores, malformações arteriovenosas, e similares.

Em algumas formas de realização, o agente ativo é um agente de imageamento. Como utilizado no presente documento, o termo "agente de imageamento" refere-se a um elemento ou grupo funcional em uma molécula que permite a deteção, imageamento e/ou monitorização da presença e/ou progressão de uma condição(ões), distúrbio(s) patológico(s) e/ou doença(s). O agente de imageamento pode ser uma substância ecogénica (tanto líquido como gás), isótopo não metálico, um repórter ótico, um absorvente de neutrões de boro, um ferro de metal paramagnético, um metal ferromagnético, um radioisótopo emissor de gama, um radioisótopo emissor de positrões, ou um absorvedor de raios X. Sem se ater à teoria, um agente de imageamento permite o rastreamento de uma composição que comprehende tal agente de imageamento.

Os repórteres óticos adequados incluem, mas não se limitam a, repórteres fluorescentes e grupos quimiluminescentes. Uma ampla variedade de corantes repórter fluorescentes são conhecidos na técnica. Tipicamente, o fluoróforo é um composto aromático ou heteroaromático e pode ser um pireno, antraceno, naftaleno, acridina, estilbeno, indol, benzindol, oxazol, tiazol, benzotiazol, cianina, carbocianina, salicilatos, antranilato, cumarina, fluoresceína, rodamina ou outro composto similar. Os repórteres fluorescentes adequados incluem corantes xanteno, como fluoresceína ou rodamina, incluindo, mas sem se limitar a, corantes Alexa Fluor® (InvitrogenCorp.; Carlsbad, Calif), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oregon GreenTM, rodamina, vermelho Texas, isotiocianato de tetrarodamina (TRITC), 5-carboxifluoresceína (FAM), 2'7'-dimetóxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE),

tetraclorofluoresceína (TET), 6-carbóxi rodamina (R6G), N,N,N,N'-tetrametil-6-carbóxi rodamina (TAMRA), 6-carbóxi-X-rodamina (ROX). Os repórteres fluorescentes adequados incluem também os corantes de naftilamina que têm um grupo amino na posição alfa ou beta. Por exemplo, os compostos naftilamino incluem 1-dimetilamino-naftil-5-sulfonato, sulfonato de 1-anilino-8-naftaleno, sulfonato de 2-p-toluidinil-6-naftaleno, e ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfônico (EDANS). Outros corantes repórteres fluorescentes incluem cumarinas, como 3-fenil-7-isocianatocumarina; acudinas, como 9-isotiocianatoacridina e laranja de acridina; N-(p(2-benzoxazolil)fenil)maleimida; cianinas, como Cy2, indodicarbocianina 3 (Cy3), indodicarbocianina 5 (Cy5), indodicarbocianina 5.5 (Cy5.5), 3-(-carbóxi-pentil)-3'etil-5,5'-dimetiloxacarbocianina (CyA); 1H,5H,11H, 15H-Xantheno[2,3,4-ij:5,6,7-i'j']diquinolizin-18-io, 9-[2(ou 4)-[[[6-[2,5-dioxo-1-pirrolidinil]oxi]-6-oxoexil]amino]sulfonil]-4(ou 2)-sulfofenil]-2,3,6,7,12,13,16,17octaidro-sal interno (TR ou Vermelho Texas); corantes de BODIPYTM; benzoxadiazóis; estilbenos; pirenos; e similares. Muitas formas adequadas desses compostos fluorescentes estão disponíveis e podem ser utilizadas.

Exemplos de proteínas fluorescentes adequadas para utilização como agentes de imageamento incluem, mas não se limitam a, proteína verde fluorescente, proteína vermelha fluorescente (por exemplo, DsRed), proteína amarela fluorescente, proteína ciano fluorescente, proteína azul fluorescente, e variantes das mesmas (veja-se, por exemplo, Patente n<sup>os</sup> US 6.403.374, 6.800.733 e 7.157.566). Exemplos específicos de variantes de GFP incluem, mas não se limitam a, GFP aumentada (EGFP), EGFP

desestabilizada, as variantes de GFP descritas em Doan et al, Mol. Microbiol, 55:1767-1781 (2005), a variante de GFP descrita em Crameri et al, Nat. Biotechnol., 14:315319 (1996), as proteínas fluorescentes cerulean fluorescent proteins descritas em Rizzo et al, Nat. Biotechnol, 22:445 (2004) e Tsien, Annu. Rev. Biochem., 67:509 (1998), e a proteína amarela fluorescente descrita em Nagal et al, Nat. Biotechnol., 20:87 a 90 (2002). As variantes de DsRed são descritas em, por exemplo, Shaner et al, Nat. Biotechnol., 22:1567 a 1572 (2004), e incluem mStrawberry, mCherry, morange, mBanana, mHoneydew e mTangerine. As variantes de DsRed adicionais são descritas em, por exemplo, Wang et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101:16745 a 16749 (2004) e incluem mRaspberry e mPlum. Exemplos adicionais de variantes de DsRed incluem mRFPmars descritos em Fischer et al, FEBS Lett., 577:227-232 (2004) e mRFPuby descritos em Fischer et al, FEBS Lett, 580:2495 a 2502 (2006).

Os gases ecogénicos adequados incluem, mas não se limitam a, um hexafluoreto de enxofre ou gás perfluorocarbono, como perfluorometano, perfluoroetano, perfluoropropano, perfluorobutano, perfluorociclobutano, perfluropentano ou perfluoroexano.

Os isótopos não metabólicos adequados incluem, mas não se limitam a,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$  e  $^{125}\text{I}$ . Os radioisótopos adequados incluem, mas não se limitam a,  $^{99}\text{mTc}$ ,  $^{95}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ , Ga,  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{153}\text{Gd}$ . Os iões metálicos paramagnéticos adequados incluem, mas não se limitam a, Gd(III), Dy(III), Fe(III) e Mn(II). Os absorvedores de raios X adequados incluem, mas não se limitam a, Re, Sm, Ho, Lu, Pm, Y, Bi, Pd, Gd, La, Au, Au,

Yb, Dy, Cu, Rh, Ag e Ir. Em algumas formas de realização, o radionuclídeo é ligado a um agente quelante ou ligando de agente quelante ligado ao agregado. Os radionuclídeos adequados para conjugação direta incluem, mas não se limitam a,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ , e misturas dos mesmos. Os radionuclídeos adequados para utilização com um agente quelante incluem, mas não se limitam a,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{87}\text{Y}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{117}\text{mSn}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ , e misturas dos mesmos. Os agentes quelantes adequados incluem, mas não se limitam a, DOTA, BAD, TETA, DTPA, EDTA, NTA, HDTA, seus análogos de fosfonato, e misturas dos mesmos. O elemento perito na especialidade estará familiarizado com métodos para a ligação de radionuclídeos, agentes quelantes, e ligandos de agentes quelantes às partículas. Uma resposta detetável, em geral, refere-se a uma alteração, ou ocorrência de um sinal que é detetável tanto por observação como instrumentalmente. Em certos casos, a resposta detetável é a fluorescência ou uma alteração na fluorescência, por exemplo, uma alteração em intensidade de fluorescência, excitação de fluorescência ou distribuição de comprimento de onda de emissão, tempo de vida de fluorescência e/ou polarização de fluorescência. O elemento perito na especialidade irá avaliar que o grau e/ou localização de marcação em um indivíduo ou amostra pode ser comparado com um padrão ou controlo (por exemplo, tecido ou órgão saudável). Em outras instâncias, a resposta detetável é a radioatividade (isto é, radiação), incluindo partículas alfa, partículas beta, nucleões, eletrões, positrões, neutrinos, e raios gama emitidos por uma substância radioativa como um radionuclídeo.

Dispositivos ou métodos específicos conhecidos na técnica para a deteção *in vivo* de fluorescência, por exemplo, de fluoróforos ou proteínas fluorescentes, incluem, mas não se limitam a, fluorescência de infravermelho proximal *in vivo* (veja-se, por exemplo, Frangioni, Curr. Opin. Chem. Biol., 7:626 a 634 (2003)), o sistema de imageamento por fluorescência MaestroTM *in vivo* (Cambridge Research & Instrumentation, Inc.; Woburn, Mass.), imageamento por fluorescência *in vivo* utilizando um scanner flying-spot (veja-se, por exemplo, Ramanujam et al, IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 48:1034 a 1041 (2001), e similares. Outros métodos ou dispositivos para detetar uma resposta ótica incluem, mas não se limitam a, inspeção visual, câmeras CCD, câmeras de vídeo, filme fotográfico, dispositivos de varrimento a laser, fluorômetros, fotodiodos, contadores quânticos, microscópios de epifluorescência, microscópios de varrimento, citômetros de fluxo, leitores de microplaca de fluorescência, ou amplificação de sinal utilizando tubos fotomultiplicadores.

Qualquer dispositivo ou método conhecido na técnica para detetar as emissões radioativas de radionuclídeos em um indivíduo é adequado para utilização na presente invenção. Por exemplo, métodos como Tomografia Computadorizada e Emissão de Fotão Único (SPECT), que deteta a radiação de um radionuclídeo emissor de gama de fotão único utilizando uma câmara giratória de gama, e cintilografia de radionuclídeos, que obtém uma imagem ou série de imagens sequenciais da distribuição de um radionuclídeo em tecidos, órgãos, ou sistemas do corpo utilizando uma câmara de gama de cintilação, podem ser utilizados para detetar a radiação emitida de um agregado

radiomarcado. A tomografia por emissão de positrões (PET) é outra técnica adequada para detetar radiação em um indivíduo.

Em algumas formas de realização, o ligando é um ligando recetor de superfície celular. Como utilizado no presente documento, um "ligando recetor de superfície celular" refere-se a uma molécula que pode se ligar à superfície externa de uma célula. O ligando recetor de superfície celular exemplificador inclui, por exemplo, um péptido de ligação a recetor de superfície celular, um glicopéptido de ligação a recetor de superfície celular, uma proteína de ligação a recetor de superfície celular, uma glicoproteína de ligação a recetor de superfície celular, um composto orgânico de ligação a recetor de superfície celular, e um fármaco de ligação a recetor de superfície celular.

Os ligandos de recetor de superfície celular incluem, mas não se limitam a, citocinas, fatores de crescimento, hormonas, anticorpos e fatores angiogénicos.

Em algumas formas de realização, o ligando de recetor de superfície celular é transferrina ou EGF.

Os ligandos que fornecem afinidade aumentada com um alvo selecionado também são chamados de ligandos de alvejamento no presente documento. Como utilizado no presente documento, o termo "ligando de alvejamento" refere-se a uma molécula que se liga ou interage com uma molécula alvo. Tipicamente, a natureza da interação ou ligação é não covalente, por exemplo, por hidrogénio, eletrostática, ou interações de van der Waals,

entretanto, a ligação podem também ser covalente.

Como utilizado no presente documento, o termo "ligando endosomolítico" refere-se a moléculas que têm propriedades endosomolíticas. Os ligandos endosomolíticos que promovem a lise e/ou transporte da composição da invenção, ou seus componentes, a partir dos compartimentos celulares como o endossomo, lisossoma, retículo endoplasmico (ER), aparelho de Golgi, microtúbulo, peroxissoma, ou outros corpos vesiculares dentro da célula, ao citoplasma da célula. Alguns ligandos endosomolíticos exemplificadores incluem, mas não se limitam a, imidazóis, poli ou oligoimidazóis, polietileno imina lineares ou ramificadas (PEIs), poliaminas lineares e ramificadas, por exemplo, espermina, poliaminas lineares ou ramificadas catiónicas, policarboxilatos, poliacetilas, oligo ou poli catiões ou aníões mascarados, acetais, poliacetais, cetais/policetais, ortoésteres, polímeros lineares ou ramificados com cargas catiónicas ou aniónicas mascaradas ou não mascaradas, dendrímeros com cargas catiónicas ou aniónicas mascaradas ou não mascaradas, péptidos polianiónicos, peptidomiméticos polianiónicos, péptidos sensíveis a pH, lípidos fusogénicos naturais e sintéticos, lípidos catiónicos naturais e sintéticos.

Como utilizado no presente documento, os termos "ligando modulador de PK" e "modulador de PK" refere-se a moléculas que podem modular a farmacocinética da composição da invenção. Alguns moduladores de PK exemplificadores incluem, mas não se limitam a, moléculas lipofílicas, ácidos biliares, esteróis, análogos de fosfolipídeo, péptidos, agentes de ligação a proteínas,

vitaminas, ácidos graxos, fenoxazina, aspirina, naproxeno, ibuprofeno, suprofeno, cetoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, PEGs, biotina e ligandos de ligação à transtirretina (por exemplo, ácido tetraiodotiroacético, 2, 4, 6-tri-iodofenol e ácido flufenâmico).

Em algumas formas de realização, um péptido anfifílico compreende pelo menos um (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ou mais) conjugado de ligando. Quando dois ou mais ligandos estiverem presentes, todos os ligandos podem ter algumas propriedades, todos têm propriedades diferentes ou alguns ligandos têm as mesmas propriedades enquanto outros têm propriedades diferentes. Por exemplo, um ligando pode ter propriedades de alvejamento, atividade endosomolítica ou moduladoras de PK. Consequentemente, os dois ou mais ligandos podem ser o mesmo ligando, ligandos diferentes, mesmo tipo de ligando (por exemplo, ligando de alvejamento, ligando endosomolítico, modulador de PK), tipos diferentes de ligandos, ou qualquer combinação dos mesmos. Em algumas formas de realização, todos os ligandos têm propriedades diferentes.

Em algumas formas de realização, o péptido anfifílico compreende um polímero hidrofílico selecionado do grupo que consiste em poli(etileno glicol), poli (óxido de etileno), poli(propileno glicol), poli (óxido de etileno-co-óxido de propileno), ácido hialurônico, poli(2-hidroxietil metacrilato), heparina, polivinil(pirrolidona), sulfato de condroitano, quitosana, glicosaminoglicanas, dextrano, dextrina, sulfato de dextrano, acetato de celulose, carboximetilcelulose, hidróxi etil celulose, celulósicos,

poli(trimetileno glicol), poli(tetrametileno glicol), polipéptidos, poliacrilmida, poliacrilimida, poli(etileno amina), poli(alil amina), e blendas dos mesmos, e em que o polímero hidrofílico é covalentemente ligado ao segmento de peptidilo hidrofóbico.

### Ligaçāo a péptidos

Uma molécula (por exemplo, um ligando) pode ser conjugado a um péptido utilizando qualquer um de entre uma variedade de métodos conhecidos pelos peritos na especialidade. A molécula pode ser acoplada ou conjugada ao péptido covalente ou não covalentemente. A ligação covalente entre a molécula e o péptido pode ser mediada por um ligando. A ligação não covalente entre a molécula e o péptido pode ser baseada em interações iónicas, interações de van der Waals, interações dipolo-dipolo, ligações de hidrogénio, interações eletrostáticas e/ou interações por reconhecimento de formato.

Sem limitação, os ligandos podem ser acoplados a um péptido em vários locais, por exemplo, terminação N, terminação C e/ou em uma posição interna (por exemplo, cadeia lateral de um aminoácido). Quando dois ou mais ligandos estiverem presentes, o ligando pode estar em extremidades opostas de um péptido (por exemplo, terminação N e terminação C).

Em geral, o ligando fica localizado na extremidade terminal (por exemplo, na posição 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 contando-se a partir da extremidade) que fica mais distante do segmento de peptidilo hidrofóbico. Sem o desejo de se vincular à teoria, isso permite que o

ligando seja posicionado sobre ou próximo à superfície de uma partícula formada por auto-agregação de péptidos anfifílicos.

Em algumas formas de realização, um ligando fica localizado na terminação de segmento de peptidilo hidrofílico que não é ligada ao segmento de peptidilo hidrofóbico. Por exemplo, se a terminação N do segmento de peptidilo hidrofílico for ligada ao segmento de peptidilo hidrofóbico, então, o ligando fica localizado na posição 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 contando-se a partir da terminação C do segmento de peptidilo hidrofílico. Alternativamente, se a terminação C do segmento de peptidilo hidrofílico for ligada ao segmento de peptidilo hidrofóbico, então, o ligando fica localizado na posição 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 contando-se a partir da terminação N do segmento de peptidilo hidrofílico.

Em algumas formas de realização, o ligando é ligado ao péptido através de um ligando. O ligando pode estar presente em um monómero quando o dito monómero for incorporado em um péptido durante a síntese. Em algumas formas de realização, o ligando pode ser incorporado através de acoplamento a um monómero "precursor" após o dito monómero "precursor" ser incorporado no péptido. Por exemplo, um monómero tendo, por exemplo, um ligando amino-terminado (isto é, não tendo ligando associado), por exemplo, monómero-ligando-NH<sub>2</sub> pode ser incorporado no péptido. Em uma operação subsequente, isto é, após a incorporação do monómero precursor no péptido, um ligando tendo um grupo eletrofílico, por exemplo, um grupo éster de pentafluorofenilo ou aldeído, pode ser

subsequentemente ligado ao monómero precursor acoplando-se o grupo eletrofílico do ligando ao grupo nucleofílico terminal do monómero precursor. Em outro exemplo não-limitador, um ligando tendo um grupo eletrofílico pode ser ligado a uma terminação N, terminação C ou um grupo amino de cadeia lateral. Em um outro exemplo, um tiol que compreende ligando pode ser ligado a um péptido por um ligando de dissulfeto quando o péptido compreende uma cisteína.

### Ligandos

Como utilizado no presente documento, o termo "ligando" significa uma porção orgânica que conecta duas partes de um composto. Os ligandos compreendem, tipicamente, uma ligação direta ou um átomo como oxigénio ou enxofre, uma unidade como NH, C(O), C(O)NH, SO, SO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>NH, SS, ou uma cadeia de átomos, como alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> substituído ou não substituído, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> substituído ou não substituído, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> substituído ou não substituído, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> substituído ou não substituído, heteroarilo C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub> substituído ou não substituído, heterociclilo C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub> substituído ou não substituído, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> substituído ou não substituído, em que um ou mais metilenos podem ser interrompidos ou terminados por O, S, S(O), SO<sub>2</sub>, NH, C(O).

Em algumas formas de realização, o ligando é um ligando ramificado. O ponto de ramificação do ligando ramificado pode ser pelo menos trivalente, porém pode ser um átomo tetravalente, pentavalente ou hexavalente, ou um grupo que apresenta tais múltiplas valências. Em algumas formas de realização, o ponto de ramificação é -N, -N(R)-C, -O-

C, -S-C, -SS-C, -C(O)N(R)-C, -OC(O)N(R)-C, -N(R)C(O)-C, ou -N(R)C(O)O-C; em que R é, independentemente, para cada ocorrência H ou alquilo opcionalmente substituído. Em algumas formas de realização, o ponto de ramificação é glicerol ou derivado do mesmo.

Em algumas formas de realização, o ligando compreende um grupo de ligação clivável. Como utilizado no presente documento, um "grupo de ligação clivável" é uma porção química que é suficientemente estável fora da célula, porém que mediante a entrada em uma célula alvo é clivada para libertar as duas partes que o ligando está mantendo unidas. Numa forma de realização preferencial, o grupo de ligação clivável é pelo menos 10 vezes ou mais, de preferência, pelo menos 100 vezes mais rápido na célula alvo ou sob uma primeira condição de referência (que pode ser, por exemplo, selecionada para imitar ou representar as condições intracelulares) do que no sangue ou soro de um indivíduo, ou sob uma segunda condição de referência (que pode ser, por exemplo, selecionada para imitar ou representar as condições encontradas no sangue ou soro).

Os grupos de ligação cliváveis são suscetíveis a agentes de clivagem, por exemplo, pH, potencial de oxirredução ou a presença de moléculas de degradação. Em geral, os agentes de clivagem são mais predominantes ou encontrados em níveis ou atividades maiores dentro de células do que no soro ou sangue. Exemplos de agentes degradantes incluem: agentes de oxirredução que são selecionados para substratos particulares ou que não têm especificidade de substrato, incluindo, por exemplo, enzimas oxidantes ou redutoras ou agentes redutores como mercaptanos, presentes em células, que podem degradar um grupo de ligação clivável de oxirredução por redução; esterases;

amidases; endossomas ou agentes que podem criar um ambiente ácido, por exemplo, aqueles que resultam em um pH de cinco ou menor; enzimas que podem hidrolisar ou degradar um grupo de ligação clivável atuando como um ácido geral, peptidases (que pode ser específico para substrato) e proteases e fosfatases.

Um ligando pode incluir um grupo de ligação clivável que é clivável por uma enzima particular. O tipo de grupo de ligação clivável incorporado em um ligando pode depender da célula a ser alvejada. Por exemplo, para alvejamento hepático, os grupos de ligação cliváveis podem incluir um grupo éster. As células hepáticas são ricas em esterases e, portanto, o ligando será clivado de modo mais eficiente em células hepáticas do que em tipos de célula que não são ricos em esterase. Outros tipos de célula ricos em esterases incluem células do pulmão, córtex renal e testículos.

Os ligandos que contêm ligações peptídicas podem ser utilizados quando se realiza o alvejamento de tipos de célula ricos em peptidases, como células hepáticas e sinoviócitos.

Em algumas formas de realização, o grupo de ligação clivável é clivado pelo menos 1,25, 1,5, 1,75, 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50 ou 100 vezes mais rápido do que na célula (ou sob condições *in vitro* selecionadas para imitar condições intracelulares) em comparação com sangue ou soro (ou sob condições *in vitro* selecionadas para imitar condições extracelulares). Em algumas formas de realização, o grupo de ligação clivável é clivado por menos que 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%,

5%, ou 1% no sangue (ou condições *in vitro* selecionadas para imitar condições extracelulares) em comparação com a célula (ou sob condições *in vitro* selecionadas para imitar condições intracelulares).

Os grupos de ligação exemplificadores incluem, mas não se limitam a, grupos de ligação cliváveis de oxirredução (por exemplo,  $-S-S-$  e  $-C(R)_2-S-S-$ , em que R é H ou alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> e pelo menos um R é alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> como CH<sub>3</sub> ou CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); grupos de ligação cliváveis baseados em fosfato (por exemplo,  $-O-P(O)(OR)-O-$ ,  $-O-P(S)(OR)-O-$ ,  $-O-P(S)(SR)-O-$ ,  $-S-P(O)(OR)-O-$ ,  $-O-P(O)(OR)-S-$ ,  $-S-P(O)(OR)-S-$ ,  $-O-P(S)(ORK)-S-$ ,  $-S-P(S)(OR)-O-$ ,  $-O-P(O)(R)-O-$ ,  $-O-P(S)(R)-O-$ ,  $-S-P(O)(R)-O-$ ,  $-S-P(S)(R)-O-$ ,  $-S-P(O)(R)-S-$ ,  $-O-P(S)(R)-S-$ ,  $-O-P(O)(OH)-O-$ ,  $-O-P(S)(OH)-O-$ ,  $-O-P(S)(SH)-O-$ ,  $-S-P(O)(OH)-O-$ ,  $-O-P(O)(OH)-S-$ ,  $-S-P(O)(OH)-S-$ ,  $-O-P(S)(OH)-S-$ ,  $-S-P(S)(OH)-O-$ ,  $-O-P(O)(H)-O-$ ,  $-O-P(S)(H)-O-$ ,  $-S-P(O)(H)-O-$ ,  $-S-P(S)(H)-O-$ ,  $-S-P(O)(H)-S-$  e  $-O-P(S)(H)-S-$ , em que R é alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> linear ou ramificada opcionalmente substituído); grupos de ligação cliváveis por ácido (por exemplo, hidrazonas, ésteres, e ésteres de aminoácidos,  $-C=NN-$  e  $-OC(O)-$ ); grupos de ligação cliváveis baseados em éster (por exemplo,  $-C(O)O-$ ); grupos de ligação cliváveis baseados em péptidos, (por exemplo, grupos de ligação que são clivados por enzimas como peptidases e proteases em células, por exemplo,  $-NHCHR^A C(O) NHCHR^B C(O)-$ , em que R<sup>A</sup> e R<sup>B</sup> são os grupos R dos dois aminoácidos adjacentes). Um grupo de ligação clivável baseado em péptido compreende dois ou mais aminoácidos. Em algumas formas de realização, a ligação de clivagem baseada em péptido compreende a sequência de aminoácidos que é o substrato para uma peptidase ou uma protease encontrada em células.

Em algumas formas de realização, um grupo de ligação clivável com ácido é clivável em um ambiente ácido com um pH de cerca de 6,5 ou mais baixo (por exemplo, cerca de 6,0, 5,5, 5,0, ou mais baixo), ou por agentes como enzimas que podem atuar como um ácido geral.

Além de ligações covalentes, duas partes de um composto podem ser ligadas por um par de ligação por afinidade. O termo "par de ligação por afinidade" ou "par de ligação" refere-se à primeira e à segunda moléculas que se ligam especificamente uma à outra. Um membro do par de ligação é conjugado à primeira parte a ser ligada enquanto o segundo membro é conjugado à segunda parte a ser ligada. Como utilizado no presente documento, o termo "ligação específica" refere-se à ligação do primeiro membro do par de ligação ao segundo membro do par de ligação com maior afinidade e especificidade do que a outras moléculas.

Os pares de ligação exemplificadores incluem qualquer composto haptênico ou antigénico em combinação com um anticorpo ou porção de ligação correspondente ou fragmento do mesmo (por exemplo, digoxigenina e anti-digoxigenina; imunoglobulina de murganho e imunoglobulina de cabra anti-murganho) e pares de ligação não imunológicos (por exemplo, biotina-avidina, biotina-estreptavidina, hormona [por exemplo, tiroxina e proteína de ligação a hormona cortisol, antagonista do recetor-recetor, antagonista do recetor-recetor (por exemplo, recetor de acetilcolina-acetilcolina ou um análogo do mesmo), IgG-proteína A, lectina-carboidrato, cofator de enzima-enzima, inibidor de enzima-enzima, e pares de oligonucleótidos complementares capazes de formar duplexes de ácido nucleico], e similares. O par de

ligação pode também incluir uma primeira molécula que é carregada negativamente e uma segunda molécula que é carregada positivamente.

Um exemplo de utilização de conjugação de par de ligação é a conjugação de biotina-avidina ou biotina-estreptavidina. Nessa abordagem, uma de entre a molécula ou o péptido é biotinilado e o outro é conjugado à avidina ou estreptavidina. Muitos kits comerciais também estão disponíveis para moléculas biotinilantes, como proteínas.

Um outro exemplo de utilização de conjugação de par de ligação é o método sanduíche de biotina. Veja-se, por exemplo, Davis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 8155 a 60 (2006). As duas moléculas a serem conjugadas são biotiniladas e, então, conjugadas utilizando-se estreptavidina tetravalente como um ligando.

Ainda outro exemplo de utilização de conjugação de par de ligação é a conjugação de ácido nucleico de cadeia dupla. Nessa abordagem, a primeira parte a ser ligada é conjugada à primeira fita do ácido nucleico de cadeia dupla e a segunda parte a ser ligada é conjugada à segunda fita do ácido nucleico de cadeia dupla. Os ácidos nucleicos incluem, mas não se limitam a, segmentos de sequência definidos e sequências que compreendem nucleótidos, ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, análogos de nucleótidos, nucleótidos modificados e nucleótidos que compreendem modificações de cadeia principal, pontos de ramificação e resíduos, grupos ou pontes de não nucleótidos.

Partículas peptídicas

O inventor constatou que os péptidos anfifílicos descritos no presente documento são submetidos à auto-agragação para formar agregados supramoleculares. Dessa forma, num outro aspetto, a invenção fornece partículas peptídicas que compreendem um péptido anfifílico descrito no presente documento. Em algumas formas de realização, a partícula peptídica compreende uma pluralidade de péptidos anfifílicos descritos no presente documento. Por exemplo, uma partícula peptídica pode compreender pelo menos cerca de 2, pelo menos cerca de 3, pelo menos cerca de 4, pelo menos cerca de 5, pelo menos cerca de 6, pelo menos cerca de 7, pelo menos cerca de 8, pelo menos cerca de 9, pelo menos cerca de 10, pelo menos cerca de 20, pelo menos cerca de 25, pelo menos cerca de 50, pelo menos cerca de 75, pelo menos cerca de 100, pelo menos cerca de 150, pelo menos cerca de 200, pelo menos cerca de 250, pelo menos cerca de 500, pelo menos cerca de 750, pelo menos cerca de 1000, pelo menos cerca de 2500, pelo menos cerca de 5000, pelo menos cerca de 10.000 ou mais péptidos anfifílicos descritos no presente documento. A pluralidade de péptidos anfifílicos presentes em uma partícula peptídica pode compreender uma forma de realização de um péptido anfifílico descrito no presente documento, ou pelo menos duas formas de realização diferentes de um péptido anfifílico descrito no presente documento.

O termo "partícula" inclui esferas; nano-hastes; e prismas. As partículas peptídicas descritas no presente documento se diferem de micelas, lipossomas, e outras partículas que compreendem um invólucro diferente (por

exemplo, uma camada lipídica), que serve como um material formador de parede, meios encapsulados circundantes localizados dentro do invólucro. As partículas descritas no presente documento são partículas sólidas. As partículas podem ser, por exemplo, monodispersas ou polidispersas e a variação em diâmetro das partículas de uma determinada dispersão pode variar. Entretanto, devido ao facto de os péptidos anfifílicos de um tamanho uniforme poderem ser obtidos, as partículas descritas no presente documento são, em geral, monodispersas. Consequentemente, em algumas formas de realização, o diâmetro de uma partícula descrita no presente documento está dentro de  $\pm 2,5\%$ , dentro de  $\pm 5\%$ , dentro de  $\pm 10\%$ , dentro de  $\pm 15\%$ , dentro de  $\pm 20\%$ , dentro de  $\pm 25\%$ , dentro de  $\pm 30\%$ , ou dentro de  $\pm 35\%$  do diâmetro médio.

Em algumas formas de realização, uma partícula peptídica descrita no presente documento é uma nanopartícula. Como utilizado no presente documento, o termo "nanopartícula" refere-se a partículas que estão na ordem de  $10^{-9}$  ou um bilionésimo de um metro e abaixo de  $10^{-6}$  ou 1 milionésimo de um metro em tamanho.

Em geral, as partículas peptídicas têm um diâmetro médio de cerca de 5 nm a cerca de 5000 nm. Em algumas formas de realização, as partículas têm um diâmetro médio de cerca de 50 nm a cerca de 2500 nm. Em algumas formas de realização, as partículas têm um diâmetro médio de cerca de 100 nm a cerca de 2000 nm. Em algumas formas de realização, as partículas têm um diâmetro médio de cerca de 150 nm a cerca de 1700 nm. Em algumas formas de realização, as partículas têm um diâmetro médio de cerca de 200 nm a cerca de 1500 nm. Em algumas formas de

realização, as partículas têm um diâmetro médio de cerca de 260 nm. Numa forma de realização, as partículas têm um diâmetro médio de cerca de 30 nm a cerca de 150nm. Sem o desejo de se vincular à teoria, o tamanho de partícula pode ser modulado alterando-se a concentração do péptido anfifílico na solução utilizada para fabricar as partículas peptídicas.

Em algumas formas de realização, uma partícula peptídica descrita no presente documento compreende uma mistura de péptidos anfifílicos completamente mascarados e péptidos anfifílicos parcialmente ou não mascarados. Como utilizado no presente documento, um "péptido não mascarado" refere-se a um péptido anfifílico em que nenhum grupo amino de terminação N e os grupos amino de cadeia lateral no segmento de peptidilo hidrofílico são conjugados a um grupo protetor de azoto ou amino.

Alterando-se a razão entre péptidos completamente mascarados para parcialmente mascarados ou não mascarados, a carga líquida da partícula peptídica pode ser variada. Sem o desejo de se vincular à teoria, razões mais altas de péptidos completamente mascarados podem aumentar a estabilidade de partícula, enquanto razões mais altas de péptidos parcialmente e/ou não mascarados podem aumentar o carregamento de moléculas contendo cargas aniónicas (por exemplo, ácidos nucleicos, como ADN ou ARN incluindo siARN) e uma capacidade maior de penetrar uma membrana celular.

Em algumas formas de realização, a partícula peptídica pode compreender um péptido anfifílico completamente mascarado (por exemplo, um péptido anfifílico

completamente acetilado). O termo "péptido anfifílico completamente acetilado" como utilizado no presente documento refere-se a um péptido anfifílico em que todo o grupo amino de terminação N e os grupos amino de cadeia lateral no segmento de peptidilo hidrofílico são acetilados.

Em algumas formas de realização, a partícula peptídica pode compreender uma mistura de péptidos completamente mascarados (por exemplo, completamente acetilados) e parcialmente mascarados (por exemplo, parcialmente acetilados). Como utilizado no presente documento, o termo "péptido anfifílico parcialmente acetilado" refere-se a um péptido anfifílico em que pelo menos um de entre o grupo amino de terminação N e os grupos amino de cadeia lateral no segmento de peptidilo hidrofílico é acetilado, porém não todos. Em algumas formas de realização, um péptido anfifílico parcialmente acetilado pode ter o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico acetilado, porém nenhum grupo amino de cadeia lateral no segmento de peptidilo hidrofílico. Em algumas formas de realização, um péptido anfifílico parcialmente acetilado pode ter pelo menos um (incluindo pelo menos dois ou mais) grupos amino de cadeia lateral no segmento de peptidilo hidrofílico acetilado, porém não o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico. Em algumas formas de realização, um péptido anfifílico parcialmente acetilado pode ter tanto o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico como pelo menos um (incluindo pelo menos dois ou mais), porém não todos, os grupos amino de cadeia lateral no segmento de peptidilo hidrofílico acetilado.

Em algumas formas de realização, a partícula peptídica pode compreender uma mistura de péptidos anfifílicos completamente mascarados (por exemplo, completamente acetilados) e não mascarados (por exemplo, não acetilados). Como utilizado no presente documento, o termo "péptido anfifílico não acetilado" refere-se a um péptido anfifílico em que nenhum amino de terminação N e os grupos amino de cadeia lateral no segmento de peptidilo hidrofílico é acetilado. Em algumas formas de realização, a partícula peptídica pode compreender uma mistura de péptidos anfifílicos completamente mascarados (por exemplo, completamente acetilados), parcialmente mascarados (por exemplo, parcialmente acetilados) e não mascarados (por exemplo, não acetilados).

Em algumas formas de realização, a partícula peptídica não compreende um péptido anfifílico completamente mascarado, por exemplo, a partícula compreende péptidos anfifílicos parcialmente mascarados ou uma mistura de péptidos parcialmente mascarados. Em algumas formas de realização, a partícula peptídica compreende uma mistura de péptidos parcialmente mascarados e não mascarados.

Sem limitação, a razão de péptidos completamente mascarados para parcialmente mascarados ou não mascarados na partícula peptídica pode situar-se na faixa de cerca de 100:1 a cerca de 1:100. Em algumas formas de realização, a razão de péptidos completamente mascarados para parcialmente mascarados ou não mascarados na partícula peptídica situa-se na faixa de cerca de 95:5 a cerca de 1:1.

As partículas descritas no presente documento podem ser utilizadas para aplicação de fármacos. Dessa forma, uma ampla variedade de agentes terapêuticos pode estar incluída nas partículas descritas no presente documento. Consequentemente, em algumas formas de realização, uma partícula peptídica descrita no presente documento pode compreender um agente ativo descrito no presente documento. Um agente ativo pode ser covalentemente ligado a um componente, por exemplo, péptido anfifílico, da partícula peptídica. Em algumas formas de realização, o agente ativo na partícula peptídica descrito no presente documento não é covalentemente ligado a um componente da partícula. Sem limitação, o agente ativo pode ser absorvido/adsorvido sobre a superfície da partícula, encapsulado na partícula ou distribuído (de modo homogéneo ou não homogéneo) em toda a partícula.

Em geral, qualquer razão de agente ativo para péptidos anfifílicos pode estar presente na partícula peptídica descrita no presente documento. Consequentemente, em algumas formas de realização, a razão do agente ativo para os péptidos anfifílicos situa-se na faixa de cerca de 100:1 a cerca de 1:100.000. Em algumas formas de realização, a razão do agente ativo para os péptidos anfifílicos situa-se na faixa de cerca de 1:1 a cerca de 1:100.000. Em algumas formas de realização, a razão do agente ativo para os péptidos anfifílicos situa-se na faixa de cerca de 1:1 a cerca de 1:10.000. Em algumas formas de realização, a razão do agente ativo para os péptidos anfifílicos situa-se na faixa de cerca de 1:1 a cerca de 1:1.000. Em algumas formas de realização, a razão do agente ativo para os péptidos anfifílicos situa-se na faixa de cerca de 1:1 a cerca de 1:100. Em algumas

formas de realização, a razão do agente ativo para os péptidos anfifílicos situa-se na faixa de cerca de 1:1 a cerca de 1:10. Em algumas formas de realização, a razão do agente ativo para os péptidos anfifílicos situa-se na faixa de cerca de 50:1 a cerca de 1:500. Em algumas formas de realização, a razão do agente ativo para os péptidos anfifílicos situa-se na faixa de cerca de 10:1 a cerca de 01:25.

Em algumas formas de realização, a partícula peptídica pode compreender um ligando. Sem limitação, um ligando pode ser covalentemente ligado a um componente, por exemplo, péptido anfifílico, das partículas. Em algumas formas de realização, um ligando não é covalentemente ligado a um componente da partícula, por exemplo, o ligando é absorvido/adsorvido sobre a superfície da partícula, o ligando é encapsulado na partícula, ou o ligando é distribuído (de modo homogéneo ou não homogéneo) em toda a partícula. Em algumas formas de realização, o ligando é um ligando de alvejamento.

Em algumas formas de realização, o ligando forma uma camada sobre a superfície da partícula peptídica, por exemplo, o ligando forma uma coroa em torno da partícula. Quando o ligando forma uma camada sobre a superfície de partícula, a espessura da camada pode situar-se na faixa de cerca de 1 nm a cerca de 100 nm. Em algumas formas de realização, a espessura da camada é cerca de 10 nm.

Em geral, qualquer razão de um ligando para péptidos anfifílicos pode estar presente na partícula.

Consequentemente, em algumas formas de realização, a razão do ligando para os péptidos anfifílicos situa-se na faixa de cerca de 1000:1 a cerca de 1:1.000.000. Em algumas formas de realização, a razão do ligando para os péptidos anfifílicos pode situar-se na faixa de cerca de 1:10 a cerca de 1:1.000.000. Em algumas formas de realização, a razão do ligando para os péptidos anfifílicos situa-se na faixa de cerca de 500:1 a cerca de 1:500. Em algumas formas de realização, a razão do ligando para os péptidos anfifílicos situa-se na faixa de cerca de 100:1 a cerca de 1:250. Em algumas formas de realização, a razão do ligando para os péptidos anfifílicos pode situar-se na faixa de cerca de 1:10 a cerca de 1:1000.

Em algumas formas de realização, uma partícula peptídica pode compreender tanto um agente ativo (por exemplo, um agente terapêutico) como um ligando. Em algumas formas de realização, uma partícula peptídica pode compreender um agente ativo (por exemplo, um agente terapêutico) distribuído dentro da partícula e um ligando sobre a superfície externa da partícula.

Sem limitação, tipos diferentes de partículas peptídicas podem ser fabricados, por exemplo, (1) partículas formadas apenas de péptidos anfifílicos; (2) partículas formadas a partir dos péptidos anfifílicos aos quais uma molécula de interesse, por exemplo, um agente ativo ou um ligando, absorve/adsorve ou forma um revestimento sobre um núcleo de péptidos anfifílicos; (3) partículas formadas de um núcleo formado por uma molécula de interesse, por exemplo, um agente ativo ou um ligando, que é revestido com uma camada de péptidos anfifílicos;

(4) partículas formadas de péptidos anfifílicos às quais uma molécula de interesse, por exemplo, um agente ativo ou um ligando, é covalentemente ligada; (5) partículas formadas a partir de uma mistura de uma molécula de interesse (por exemplo, um agente ativo ou um ligando) e péptidos anfifílicos; e (6) partículas formadas para compreender uma mistura geralmente homogênea de uma molécula de interesse, por exemplo, um agente ativo ou um ligando com péptidos anfifílicos, ou qualquer combinação dos mesmos. Por exemplo, uma partícula peptídica pode ser formada a partir dos péptidos anfifílicos aos quais uma primeira molécula de interesse, por exemplo, um agente ativo ou um ligando, absorve/adsorve ou forma um revestimento sobre um núcleo de péptidos anfifílicos, em que o núcleo de péptidos anfifílicos compreende adicionalmente uma segunda molécula de interesse, por exemplo, um agente ativo. Nessas formas de realização, a segunda molécula de interesse pode ser igual ou diferente da primeira molécula de interesse.

Em algumas formas de realização, uma partícula peptídica pode compreender adicionalmente um polímero, por exemplo, um polímero biocompatível. Como utilizado no presente documento, o termo "biocompatível" significa a exibição de essencialmente nenhuma citotoxicidade ou imunogenicidade enquanto estiver em contato com fluidos corpóreos ou tecidos. Como utilizado no presente documento, o termo "polímero" refere-se a oligómeros, co-oligómeros, polímeros e copolímeros, por exemplo, bloco aleatório, multibloco, estrela, copolímeros enxertados, gradiente e combinação dos mesmos.

O termo "polímero biocompatível" refere-se a polímeros que são não tóxicos, quimicamente inertes e substancialmente não imunogénicos quando utilizados internamente em um indivíduo e que são substancialmente insolúveis no sangue. O polímero biocompatível pode ser tanto não biodegradável como, de preferência, biodegradável. De preferência, o polímero biocompatível também é não inflamatório quando empregado *in situ*.

Os polímeros biodegradáveis são divulgados na técnica. Exemplos de polímeros biodegradáveis adequados incluem, mas não se limitam a, polímeros de cadeia linear como polilactídeos, poliglicolídeos, policaprolactonas, copolímeros de ácido polilático e ácido poliglicólico, polianidridos, poliepsilon caprolactona, poliamidas, poliuretanos, poliésteramidas, polioxiésteres, polidioxanonas, poliacetais, policetais, policarbonatos, poliortocarbonatos, polidi-hidropiranos, polifosfazenos, poli-hidroxibutiratos, poli-hidroxivaleratos, oxalatos de polialquíleno, succinatos de polialquíleno, poli(ácido mágico), poli(aminoácidos), polivinilpirrolidona, polietíleno glicol, poli-hidroxicelulose, metacrilato de polimetila, quitina, quitosano, copolímeros de ácido polilático, poli(glicerol sebacato) (PGS), e copolímeros, terpolímeros, e copolímeros que incluem um ou mais dos anteriores. Outros polímeros biodegradáveis incluem, por exemplo, gelatina, colágeno, seda, quitosano, alginato, celulose, ácidos poli-nucleicos, etc.

Os polímeros biocompatíveis não biodegradáveis adequados incluem, a título de exemplo, acetatos de celulose (incluindo diacetato de celulose), polietíleno, polipropileno, polibutileno, terftalato de polietíleno

(PET), cloreto de polivinila, poliestireno, poliamidas, náilon, policarbonatos, polissulfetos, polissulfonas, hidrogéis (por exemplo, acrílicos), poliacrilonitrila, polivinilacetato, butirato de acetato de celulose, nitrocelulose, copolímeros de uretano/carbonato, copolímeros de estireno/ ácido maleico, poli(etilenimina), poloxômeros (por exemplo, Pluronic como Poloxamers 407 e 188), Hyaluron, heparina, agarose, Pullulan, e copolímeros incluindo um ou mais dos anteriores, como copolímeros de etileno/álcool vinílico (EVOH) .

As partículas peptídicas também podem compreender porções adicionais que podem prolongar o tempo de vida das partículas *in vivo*. Por exemplo, as partículas peptídicas podem compreender porções funcionais que aumentam o tempo de vida *in vivo* das partículas no sangue. Uma porção exemplificadora para aumentar o tempo de vida *in vivo* é polietileno glicol. Consequentemente, as partículas peptídicas podem compreender polietileno glicol além do péptido anfifílico.

#### Formas de realização adicionais de partículas peptídicas

Numa forma de realização, uma partícula peptídica descrita no presente documento compreende formas de realização específicas de um péptido anfifílico descrito no presente documento. O péptido anfifílico presente nessa forma de realização da partícula peptídica compreende um segmento de peptidilo hidrofóbico e um segmento de peptidilo hidrofílico, em que o segmento de peptidilo hidrofóbico compreende uma sequência de aminoácidos de  $(Trp-Leu)_m-(Trp)_n$  ou  $(Leu-Trp)_p-(Leu)_q$ , em

que cada Trp é D-Trp ou L-Trp e cada Leu é D-Leu ou L-Leu, m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 5, e n e q são, independentemente, 0 ou 1, desde que quando Trp for D-Trp, então Leu seja L-Leu, e quando Trp for L-Trp, então Leu seja D-Leu, ou vice-versa; e em que o segmento de peptidilo hidrofílico compreende uma sequência de aminoácidos de (Lys)<sub>r</sub>, em que r é um número inteiro de 1 a 15, e em que a partícula peptídica compreende adicionalmente sobre sua superfície externa um ligando descrito no presente documento.

Em algumas formas de realização, a partícula peptídica pode compreender uma ou mais formas de realização de um péptido anfifílico descrito anteriormente na secção "Péptidos anfifílicos exemplificadores". Numa forma de realização, a partícula peptídica pode compreender um péptido anfifílico com uma sequência de aminoácidos de (L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-X, em que X está ausente ou NH<sub>2</sub>. Como anteriormente descrito, em algumas formas de realização, pelo menos um dos resíduos de Lys do segmento de peptidilo hidrofílico ou o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico é acetilado. Em algumas formas de realização, todos os resíduos de Lys do segmento de peptidilo hidrofílico são acetilados. Em algumas formas de realização, o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico e todos os resíduos de Lys do segmento de peptidilo hidrofílico são acetilados.

O ligando presente sobre a superfície externa da partícula peptídica pode ser selecionado com base nos tipos de moléculas alvo (por exemplo, mas sem se limitar a, células, bactérias, proteínas, e/ou ácidos nucleicos)

às quais as partículas peptídicas irão se ligar e/ou interagir. Por exemplo, para facilitar a aplicação de uma partícula peptídica descrita no presente documento a uma célula, um ligando específico para o recetor de superfície celular pode ser selecionado, dessa forma, facilitando a absorção da partícula peptídica pela célula, por exemplo, através de endocitose. Então, algumas formas de realização das partículas peptídicas descritas no presente documento podem ser utilizadas para aplicação direcionada de qualquer agente ativo descrito no presente documento utilizando as partículas peptídicas como transportadores ou veículos de aplicação. Numa forma de realização, as partículas peptídicas podem ser utilizadas para aplicação a uma célula de um agente ativo que é impermeável à célula quando aplicadas por si.

Como anteriormente descrito, em algumas formas de realização, a partícula peptídica pode compreender uma mistura de péptidos anfifílicos completamente mascarados (por exemplo, completamente acetilados) e parcialmente mascarados (por exemplo, parcialmente acetilados) descritos no presente documento. Nessas formas de realização, a razão dos péptidos anfifílicos completamente acetilados para os parcialmente mascarados pode situar-se na faixa de cerca de 95:5 a cerca de 1:1. Em certas formas de realização, a partícula pode compreender adicionalmente péptidos anfifílicos não mascarados (por exemplo, não acetilados).

Consequentemente, uma partícula peptídica mista que compreende um péptido anfifílico completamente acetilado e um péptido anfifílico parcialmente acetilado ou não acetilado também é fornecida no presente documento. Em

formas de realização específicas, a partícula peptídica mista compreende um primeiro péptido anfifílico e um segundo péptido anfifílico, em que o primeiro e o segundo péptido anfifílico, cada um, compreende independentemente um segmento de peptidilo hidrofóbico e um segmento de peptidilo hidrofílico, em que o segmento de peptidilo hidrofóbico compreende uma sequência de aminoácidos de  $(Trp-Leu)_m-(Trp)_n$  ou  $(Leu-Trp)_p-(Leu)_q$ , em que cada Trp é D-Trp ou L-Trp e cada Leu é D-Leu ou L-Leu, m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 5, e n e q são, independentemente, 0 ou 1, desde que quando Trp for D-Trp, então, Leu seja L-Leu, e quando Trp for L-Trp, então, Leu seja D-Leu, ou vice-versa; enquanto o segmento de peptidilo hidrofílico compreende uma sequência de aminoácidos de  $(Lys)_r$ , em que r é um número inteiro de 1 a 15. Adicionalmente, o grupo amino de terminação N e todos os resíduos de Lys do primeiro péptido anfifílico são acetilados; enquanto pelo menos o grupo amino de terminação N ou um dos resíduos de Lys do segundo péptido anfifílico não é acetilado. Em algumas formas de realização, nenhum de entre o grupo amino de terminação N e os resíduos de Lys do segundo péptido anfifílico é acetilado.

Em algumas formas de realização, a partícula peptídica mista pode compreender uma pluralidade (por exemplo, pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, ou mais) dos primeiros péptidos anfifílicos e uma pluralidade (por exemplo, pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, ou mais) dos segundos péptidos anfifílicos.

Em formas de realização particulares, o(s) primeiro(s)

péptido(s) anfifílico(s) e o(s) segundo(s) péptido(s) anfifílico(s) podem ser selecionados de entre qualquer uma ou mais formas de realização de um péptido anfifílico descrito anteriormente na secção "Péptidos anfifílicos exemplificadores". Em algumas formas de realização, o primeiro e o segundo péptido anfifílico podem, cada um, compreender independentemente uma sequência de aminoácidos de (L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-X, em que X está ausente ou NH<sub>2</sub>.

A razão entre o primeiro péptido anfifílico e o segundo péptido anfifílico pode ser variada com base em vários fatores, por exemplo, mas sem se limitar a, solubilidade e/estabilidade desejada da partícula peptídica, e/ou propriedades do agente ativo a ser carregado na mesma. Em algumas formas de realização, a razão entre o primeiro péptido anfifílico e o segundo péptido anfifílico pode situar-se numa faixa de cerca de 1:1 a cerca de 1000:1000. Em algumas formas de realização, a razão entre o primeiro péptido anfifílico e o segundo péptido anfifílico pode situar-se numa faixa de cerca de 1:1 a cerca de 1000:1. Em algumas formas de realização, a razão entre o primeiro péptido anfifílico e o segundo péptido anfifílico pode situar-se numa faixa de cerca de 2:1 a cerca de 500:1. Em algumas formas de realização, a razão entre o primeiro péptido anfifílico e o segundo péptido anfifílico pode situar-se numa faixa de cerca de 3:1 a cerca de 200:1. Em outras formas de realização, a razão entre o primeiro péptido anfifílico e o segundo péptido anfifílico pode situar-se numa faixa de cerca de 5:1 a cerca de 100:1.

Em algumas formas de realização, a partícula peptídica mista pode compreender adicionalmente um agente ativo descrito no presente documento. O agente ativo pode estar presente na partícula peptídica mista em quaisquer quantidades, por exemplo, dependendo da capacidade de carregamento da partícula peptídica e/ou capacidade de ligação do primeiro ou segundo péptido anfifílico. Em algumas formas de realização, a razão entre o agente ativo e os segundos péptidos anfifílicos pode situar-se numa faixa de cerca de 1:1000 a 1:1. Em algumas formas de realização, a razão entre o agente ativo e os segundos péptidos anfifílicos pode ser ou cerca de 1:100 a cerca de 1:10. Em algumas formas de realização, a razão entre o agente ativo e o segundo péptido anfifílico pode situar-se numa faixa de cerca de 01:50 a cerca de 1:5. Em algumas formas de realização, a razão entre o agente ativo e o segundo péptido anfifílico pode situar-se numa faixa de cerca de 1:10 a cerca de 1:2.

Em algumas formas de realização, a partícula peptídica mista pode compreender adicionalmente sobre sua superfície externa um ligando descrito no presente documento. Conforme anteriormente descrito neste documento, a seleção de um ligando pode ser determinada com base numa molécula alvo (por exemplo, mas sem se limitar a, células, bactérias, proteínas, ácidos nucleicos) à qual a partícula peptídica mista se liga. Exemplos não limitadores de um ligando podem incluir um ligando de receptor de superfície celular ou uma proteína como um anticorpo. Em algumas formas de realização, o ligando pode ser covalentemente ligado a pelo menos um de entre o primeiro e o segundo péptido anfifílico, por exemplo, o segmento de peptidilo hidrofílico de pelo

menos um de entre o primeiro e o segundo péptido anfifílico.

A partícula peptídica mista descrita no presente documento pode ser utilizada para encapsular qualquer agente ativo descrito no presente documento. Sem o desejo de se vincular à teoria, a presença do segundo péptido anfifílico na partícula peptídica mista pode fornecer uma carga catiónica para ligação a moléculas de ácido nucleico. Dessa forma, em algumas formas de realização, o agente ativo pode incluir uma molécula de ácido nucleico. Um aspeto adicional fornecido no presente documento se refere aa utilização de uma ou mais formas de realização da partícula peptídica mista compreendendo um primeiro péptido anfifílico e um segundo péptido anfifílico descrito no presente documento para a aplicação de uma molécula de ácido nucleico a uma célula. Consequentemente, em algumas formas de realização, a partícula peptídica mista para utilização na aplicação de uma molécula de ácido nucleico a uma célula compreende um primeiro péptido anfifílico, um segundo péptido anfifílico, e uma molécula de ácido nucleico. Em algumas formas de realização, a partícula peptídica mista pode compreender uma pluralidade (por exemplo, pelo menos 2 ou mais) de moléculas de ácido nucleico ou oligonucleótidos (por exemplo, ADN ou ARN incluindo, mas sem se limitar a, siARN, shARN, miARN, ou qualquer combinação dos mesmos). Em algumas formas de realização, as moléculas de ácido nucleico ou oligonucleótidos podem ser desenhadas para utilização em intervenção terapêutica, por exemplo, terapia génica ou terapia com siARN.

### Montagem de partícula peptídica

As partículas peptídicas descritas no presente documento podem ser montadas por um procedimento de uma única etapa. Por exemplo, as partículas peptídicas podem ser convenientemente montadas a partir de péptido anfifílico dissolvido por meio de adição de água: uma emulsão espontaneamente formada como uma mistura ternária (péptido, solvente orgânico, H<sub>2</sub>O) é colocada na região de duas fases (péptido, H<sub>2</sub>O). Embora o processo de emulsificação se assemelhe ao efeito ouzo, as gotículas de péptido anfifílico endurecem formando partículas sólidas à medida que o solvente orgânico é removido. As moléculas neutras bem como carregadas migram eficientemente para a fase dispersa e ficam aprisionadas durante a formação de partícula.

Em geral, as partículas peptídicas que compreendem um agente ativo e um ligando podem ser montadas em cerca de 15 minutos utilizando o procedimento descrito no presente documento. Adicionalmente, o sistema permite o ajuste direto de tamanho de partícula e aprisiona os agentes ativos em densidade muito alta.

Sem o desejo de se vincular à teoria, a simplicidade do sistema e protocolo de formação se originam na interação planejada de todos os componentes envolvidos de uma partícula peptídica: péptidos anfifílicos não só consistem em material de matriz, como substitui as rotinas de encapsulação devido à sua alta afinidade a outros componentes como um ligando e/ou um agente ativo. O processo de encapsulação de agente ativo se assemelha, mais provavelmente, a uma extração líquida de duas fases

em que o agente ativo escapa da fase aquosa e se acumula em gotículas peptídicas. Adicionalmente, a solubilidade do péptido em solventes orgânicos suaves permite a dissolução simultânea e automontagem de todos os componentes envolvidos. A presença de um ligando durante a emulsificação dos péptidos pode resultar na formação de uma coroa de ligando. Adicionalmente, a presença do ligando pode permitir o ajuste direto de tamanho de partícula devido à sua atividade de superfície e, dessa forma, estabilização precoce da emulsão peptídica.

#### Composições farmacêuticas

Para administração a um indivíduo, partículas peptídicas e complexos agente ativo - péptido anfifílico descritos no presente documento podem ser fornecidas em composições farmaceuticamente aceitáveis. Essas composições farmaceuticamente aceitáveis compreendem uma partícula ou um agente ativo - complexo péptido anfifílico formulado juntamente com um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis (aditivos) e/ou diluentes. Conforme descrito em detalhes abaixo, as composições farmacêuticas descritas no presente documento podem ser especialmente formuladas para administração em forma sólida ou líquida, inclusive aqueles adaptados para o seguinte: (1) administração oral, por exemplo, sachês (soluções ou suspensões aquosas ou não aquosas), gavagens, pastilhas, drageias, cápsulas, pílulas, comprimidos (por exemplo, aqueles direcionados para absorção bucal, sublingual e sistémica), bólus, pós, grânulos, pastas para aplicação na língua; (2) administração parentérica, por exemplo, por injeção subcutânea, intramuscular, intravenosa ou epidural como, por exemplo, uma solução ou suspensão

estéril, ou formulação de libertação sustentada; (3) aplicação tópica, por exemplo, como um creme, pomada, ou um emplastro de libertação controlada ou aplicado por aspersão à pele; (4) de modo intravaginal ou intrarretal, por exemplo, como um pessário, creme ou espuma; (5) de modo sublingual; (6) ocular; (7) transdérmico; (8) transmucosa; ou (9) nasal. Adicionalmente, os compostos podem ser implantados em um paciente ou injetados utilizando um sistema de libertação de fármacos. Veja-se, por exemplo, Urquhart, et al., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24: 199 a 236 (1984); Lewis, ed. "Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals" (Plenum Press, New York, 1981); Patente nº US No. 3.773.919. e Patente nº US 3.270;960.

Como utilizado no presente documento, o termo "farmaceuticamente aceitável" refere-se àqueles compostos, materiais, complicações, e/ou formas de dosagem que são, dentro do escopo do bom julgamento médico, adequados para utilização em contato com os tecidos de seres humanos e animais sem toxicidade excessiva, irritação, resposta alérgica, ou outro problema ou complicações compatíveis com uma razão benefício/risco razoável.

Como utilizado no presente documento, o termo "transportador farmaceuticamente aceitável" significa um material, composição ou veículo farmaceuticamente aceitável, como uma carga líquida ou sólida, diluente, excipiente, auxiliar de fabrico (por exemplo, lubrificante, talco, estearato de magnésio, cálcio ou zinco, ou ácido estérico), ou material de encapsulação de solvente, envolvido na condução ou transporte do composto

em questão a partir de um órgão, ou parte do corpo, para outro órgão ou parte do corpo. Cada transportador deve ser "aceitável" no sentido de ser compatível com os outros ingredientes da formulação e não prejudicial ao paciente. Alguns exemplos de materiais que podem servir como transportadores farmaceuticamente aceitáveis incluem: (1) açúcares, como lactose, glicose e sacarose; (2) amidos, como amido de milho e amido de batata; (3) celulose, e seus derivados, como carboximetil celulose sódica, metilcelulose, etil-celulose, celulose microcristalina e acetato de celulose; (4) tragacanto em pó; (5) malte; (6) gelatina; (7) agentes lubrificantes, como estearato de magnésio, lauril sulfato de sódio e talco; (8) excipientes, como manteiga de cacau e ceras para supositório; (9) óleos, como óleo de amendoim, óleo de semente de algodão, óleo de açafrão, óleo de gergelim, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de soja; (10) glicóis, como propileno glicol; (11) polióis, como glicerina, sorbitol, manitol e polietileno glicol (PEG); (12) ésteres, como oleato de etilo e laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, como hidróxido de magnésio e hidróxido de alumínio; (15) ácido algínico; (16) água isenta de pirogênio; (17) solução salina isotónica; (18) solução de Ringer; (19) álcool etílico; (20) soluções tamponadas com pH; (21) poliésteres, policarbonatos e/ou polianidridos; (22) agentes avolumadores, como polipéptidos e aminoácidos (23) componente sérico, como albumina sérica, HDL e LDL; (22) álcoois C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, como etanol; e (23) outras substâncias compatíveis não tóxicas empregadas em formulações farmacêuticas. Agentes umectantes, agentes corantes, agentes desmoldantes, agentes de revestimento, agentes adoçantes, agentes flavorizantes, agentes aromatizantes,

conservante e antioxidantes também podem estar presentes na formulação. Os termos como "excipiente", "transportador", "transportador farmaceuticamente aceitável" ou similares são utilizados de forma intercambiável no presente documento.

Como utilizado no presente documento, o termo "administrar" refere-se à colocação de uma composição em um indivíduo por um método ou via que resulta em localização pelo menos parcial da composição em um sítio desejado de modo que o efeito desejado seja produzido. As vias de administração incluem tanto administração local como sistémica. Em geral, a administração local resulta em mais agente terapêutico sendo aplicado a um local específico em comparação com o corpo inteiro do indivíduo, enquanto, a administração sistémica resulta em aplicação do agente terapêutico essencialmente ao corpo inteiro do indivíduo.

A administração a um indivíduo pode ser através de qualquer via adequada conhecido na técnica incluindo, mas sem se limitar a, vias orais ou parentéricas, incluindo administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, transdérmica, aérea (aerossol), pulmonar, nasal, retal e tópica (incluindo bucal e sublingual).

Modos de administração exemplificadores incluem, mas não se limitam a, injeção, infusão, instilação, inalação ou ingestão. "Injeção" inclui, mas não se limita a, injeção e infusão intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intraventricular, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular,

intra-articular, subcapsular, subaracnoide, intraespinhal, intracerebroespinhal e intraesternal. Em algumas formas de realização dos aspectos descritas no presente documento, a administração é realizada por infusão ou injeção intravenosa.

Como utilizado no presente documento, um "indivíduo" significa um humano ou animal. Em geral, o animal é um vertebrado como um primata, roedor, animal doméstico ou animal de caça. Primatas incluem chimpanzés, macacos cynomolgus, macacos-aranha e macacos, por exemplo, Rhesus. Roedores incluem murganhos, ratos, marmotas, furões, coelhos e hamsters. Animais domésticos e de caça incluem vacas, cavalos, porcos, cervo, bisonte, búfalo, espécies felinas, por exemplo, gato doméstico, espécies caninas, por exemplo, cão, raposa, lobo, espécies aviárias, por exemplo, galinha, ema, avestruz, e peixe, por exemplo, truta, peixe-gato e salmão. O paciente ou indivíduo inclui qualquer subconjunto dos anteriormente mencionados, por exemplo, todos descritos acima, porém excluindo um ou mais grupos ou espécies como seres humanos, primatas ou roedores. Em certas formas de realização dos aspectos descritos no presente documento, o indivíduo é um mamífero, por exemplo, um primata, por exemplo, um ser humano. Os termos, "paciente" e "indivíduo" são utilizados de forma intercambiável no presente documento. Os termos, "paciente" e "indivíduo" são utilizados de forma intercambiável no presente documento. Um indivíduo pode ser do sexo masculino ou feminino.

De preferência, o indivíduo é um mamífero. O mamífero pode ser um ser humano, primata não humano, murganho,

rato, cão, gato, cavalo, ou vaca, porém não é limitado a esses exemplos. Mamíferos exceto seres humanos podem ser vantajosamente utilizados como indivíduos que representam modelo animais de distúrbios associados à doença autoimune ou inflamação. Além disso, os métodos e composições descrito no presente documento podem ser utilizados para tratar animais domésticos e/ou animais de estimação.

#### Kits

Um aspecto adicional fornecido no presente documento se refere a um kit que compreende uma partícula peptídica, uma formulação que compreende uma partícula peptídica, ou componentes para produzir uma partícula peptídica ou uma formulação que compreende uma partícula peptídica descrita no presente documento.

Em algumas formas de realização, as composições ou kits para produzir uma ou mais formas de realização de uma partícula peptídica ou uma partícula peptídica mista são fornecidos no presente documento. Em algumas formas de realização, a composição ou kit pode compreender um péptido anfifílico descrito no presente documento. O péptido anfifílico produzido na composição ou kit pode ser fornecido em um recipiente. Dependendo da escolha de um usuário de uma partícula peptídica ou partícula mista descrita no presente documento a ser produzida, em algumas formas de realização, a composição ou kit pode compreender um primeiro péptido anfifílico e um segundo péptido anfifílico descritos no presente documento. O péptido anfifílico pode ser fornecido em pó ou pó liofilizado. Em algumas formas de realização, a

composição ou kit pode compreender adicionalmente pelo menos um reagente, por exemplo, para reconstituição do péptido anfifílico em pó, para emulsificação de uma mistura de montagem de partícula, ou ambos. Em algumas formas de realização, a composição ou kit pode compreender adicionalmente um ligando descrito no presente documento, por exemplo, fornecido em um recipiente separado. Em algumas formas de realização, a composição ou kit pode compreender adicionalmente um agente ativo a ser encapsulado na partícula peptídica. O agente ativo pode ser fornecido em um recipiente separado.

Além dos componentes mencionados acima, o kit pode incluir material informativo. O material informativo pode ser descriptivo, instrucional, comercial ou outro material que se refira aos métodos descritos no presente documento e/ou a utilização dos agregados para os métodos descritos no presente documento. Por exemplo, o material informativo descreve métodos para administrar a partícula a um indivíduo. O kit também pode incluir um dispositivo de aplicação.

Numa forma de realização, o material informativo pode incluir instruções para administrar a formulação de maneira adequada, por exemplo, em uma dose, forma de dosagem, ou modo de administração adequado (por exemplo, uma dose, forma de dosagem, ou modo de administração descrito no presente documento). Numa outra forma de realização, o material informativo pode incluir instruções para identificar um indivíduo adequado, por exemplo, um ser humano, por exemplo, um ser humano adulto. O material informativo dos kits não é limitado em

sua forma. Em muitos casos, o material informativo, por exemplo, instruções, é fornecido em material impresso, por exemplo, um texto impresso, desenho e/ou fotografia, por exemplo, um rótulo ou folha impressa. Entretanto, o material informativo também pode ser fornecido em outros formatos, como braile, material legível por computador, gravação de vídeo ou gravação de áudio. Numa outra forma de realização, o material informativo do kit é uma informação de ligação ou contato, por exemplo, um endereço físico, endereço de email, hiperlink, site da web ou número de telefone, em que um usuário do kit pode obter informações substantivas sobre a formulação e/ou sua utilização nos métodos descritos no presente documento. Naturalmente, o material informativo também pode ser fornecido em qualquer combinação de formatos.

Em algumas formas de realização, os componentes individuais da formulação podem ser fornecidos em um recipiente. Alternativamente, pode ser desejado fornecer os componentes da formulação separadamente em dois ou mais recipientes, por exemplo, um recipiente para uma preparação de péptido anfifílico e pelo menos outro para um composto transportador. Os componentes diferentes podem ser combinados, por exemplo, de acordo com instruções fornecidas com o kit. Os componentes podem ser combinados de acordo com um método descrito no presente documento, por exemplo, para preparar e administrar uma composição farmacêutica.

Além da formulação, a composição do kit pode incluir outros ingredientes, como um solvente ou tampão, um estabilizante ou um conservante e/ou um segundo agente para tratar uma condição ou distúrbio descrito no

presente documento. Alternativamente, os outros ingredientes podem ser incluídos no kit, porém em composições ou recipientes diferentes da formulação. Em tais formas de realização, o kit pode incluir instruções para misturar a formulação e os outros ingredientes, ou para utilizar o oligonucleótido juntamente com os outros ingredientes.

A formulação pode ser fornecida em qualquer forma, por exemplo, forma líquida, seca ou liofilizada. É preferencial que a formulação seja substancialmente pura e/ou estéril. Quando a formulação é fornecida em uma solução líquida, a solução líquida é, de preferência, uma solução aquosa, com uma solução aquosa estéril sendo preferida. Quando a formulação é fornecida como uma forma seca, a reconstituição geralmente é feita pela adição de um solvente adequado. O solvente, por exemplo, água estéril ou tampão, pode, opcionalmente, ser fornecido no kit.

Em algumas formas de realização, o kit contém recipientes, divisores ou compartimentos separados para a formulação e material informativo. Por exemplo, a formulação pode ser contida numa garrafa, frasco ou seringa, e o material informativo pode ser contido numa bainha de plástico ou pacote. Em outras formas de realização, os elementos separados do kit são contidos dentro de um único recipiente não dividido. Por exemplo, a formulação é contida numa garrafa, frasco ou seringa que tem anexado à mesma o material informativo sob a forma de um rótulo.

Em algumas formas de realização, o kit inclui uma pluralidade, por exemplo, um pacote, de recipientes individuais, cada um contendo uma ou mais formas de dosagem unitária da formulação. Por exemplo, o kit inclui uma pluralidade de seringas, ampolas, pacotes de folha metálica, ou embalagens blister, cada um contendo uma única dose unitária da formulação. Os recipientes dos kits podem ser herméticos e/ou impermeáveis.

*As formas de realização dos vários aspectos descritos no presente documento podem ser ilustradas pelos seguintes parágrafos numerados.*

1. Uma partícula peptídica que compreende um péptido anfifílico, sendo que o péptido anfifílico compreende um segmento de peptidilo hidrofóbico e um segmento de peptidilo hidrofílico, em que o segmento de peptidilo hidrofóbico compreende uma sequência de aminoácidos de  $(Trp-Leu)_m - (Trp)_n$  ou  $(Leu-Trp)_p - (Leu)_q$ , em que cada Trp é D-Trp ou L-Trp e cada Leu é D-Leu ou L-Leu, m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 5, e n e q são, independentemente, 0 ou 1, desde que quando Trp for D-Trp, então Leu seja L-Leu, e quando Trp for L-Trp, então Leu seja D-Leu, ou vice-versa; e

em que o segmento de peptidilo hidrofílico compreende uma sequência de aminoácidos de  $(Lys)_r$ , em que r é um número inteiro de 1 a 15, e

em que a partícula peptídica compreende adicionalmente sobre sua superfície externa um ligando.

2. A partícula peptídica do parágrafo 1, em que r é um número inteiro de 2 a 5.
3. A partícula peptídica do parágrafo 1 ou 2, em que r é um número inteiro igual a 3.
4. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 1 a 3, em que pelo menos um resíduo de Lys do segmento de peptidilo hidrofílico ou o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico é acetilado.
5. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 1 a 4, em que todos os resíduos de Lys do segmento de peptidilo hidrofílico são acetilados.
6. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 1 a 5, em que o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico é acetilado.
7. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 1 a 6, em que o segmento de peptidilo hidrofóbico é ligado à terminação C do segmento de peptidilo hidrofílico.
8. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 1 a 7, em que Leu é D-Leu.
9. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 1 a 8, em que Trp é L-Trp.
10. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 1 a 9, em que Lys é L-Lys.

11. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 1 a 10, em que m ou p é entre 1 e 3.
12. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 1 a 11, em que m ou p é 3.
13. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 1 a 12, em que n ou q é 1.
14. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 1 a 13, em que o péptido anfifílico compreende a sequência de aminoácidos de (L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Tip)-(D-Leu)-(L-Trp)-X, em que X está ausente ou NH<sub>2</sub>.
15. A partícula peptídica de parágrafo 14, em que pelo menos um dos resíduos de L-Lys é acetilado.
16. A partícula peptídica de parágrafo 14 ou 15, em que o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico é acetilado.
17. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 1 a 16, em que o péptido anfifílico tem um comprimento de cerca de 5 a cerca de 25 resíduos de aminoácidos.
18. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 1 a 17, em que pelo menos uma ligação amida de cadeia principal do péptido anfifílico é uma ligação de substituição de amida.
19. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 1 a 18, em que o péptido anfifílico compreende um β-aminoácido, um γ-aminoácido, ou uma combinação dos

mesmos.

20. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 1 a 19, em que pelo menos um de entre o segmento de peptidilo hidrofóbico ou o segmento de peptidilo hidrofílico compreende pelo menos uma mutação pontual.

21. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 1 a 20, em que o ligando inclui um ligando de recetor de superfície celular ou um anticorpo.

22. A partícula peptídica de parágrafo 21, em que o ligando de recetor de superfície celular inclui transferrina, EGF, folato, ou qualquer combinação dos mesmos.

23. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 1 a 22, em que a espessura do ligando presente sobre a superfície externa da partícula peptídica situa-se na faixa de cerca de 1 nm a cerca de 100 nm.

24. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 23, em que a espessura do ligando presente sobre a superfície externa da partícula peptídica é cerca de 10 nm.

25. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 1 a 24, em que o ligando é covalentemente ligado ao péptido anfifílico.

26. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 1 a 25, em que o ligando é covalentemente ligado ao segmento de peptidilo hidrofílico do péptido anfifílico.

27. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 1 a 26, em que uma razão entre o ligando e o péptido anfifílico situa-se na faixa de cerca de 1:10 a cerca de 1:1.000.000.
28. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 1 a 27, em que a partícula tem um tamanho de cerca de 5 nm a cerca de 5.000 nm.
29. A partícula peptídica de parágrafo 28, em que a partícula tem um tamanho de cerca de 30 nm a cerca de 150 nm.
30. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 1 a 29, em que a partícula peptídica compreende uma mistura de um péptido anfifílico completamente acetilado de qualquer um dos parágrafos 1 a 29, e um péptido anfifílico parcialmente acetilado de qualquer um dos parágrafos 1 a 29.
31. A partícula peptídica de parágrafo 30, em que a razão entre o péptido anfifílico completamente acetilado e o parcialmente acetilado situa-se na faixa de cerca de 95:5 a cerca de 1:1.
32. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 30 a 31, em que a partícula peptídica compreende adicionalmente um péptido anfifílico não acetilado.
33. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 1 a 32, que compreende adicionalmente um agente ativo.

34. A partícula peptídica de parágrafo 33, em que o agente ativo é disperso dentro da partícula.
35. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 33 a 34, em que o agente ativo não tem carga líquida.
36. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 33 a 34, em que o agente ativo tem uma carga líquida.
37. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 33 a 36, em que o agente ativo é selecionado do grupo consistindo em proteínas, péptidos, antígenos, anticorpos ou porções dos mesmos, moléculas semelhantes a anticorpo, enzimas, ácidos nucleicos, aptâmeros, moléculas pequenas, antibióticos, agentes farmaceuticamente ativos, agentes terapêuticos, agentes de contraste, e quaisquer combinações dos mesmos.
38. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 33 a 37, em que o agente ativo é um agente farmaceuticamente ativo ou um agente terapêutico.
39. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 33 a 38, em que o agente ativo é uma molécula de ácido nucleico.
40. A partícula peptídica de parágrafo 39, em que a molécula de ácido nucleico inclui siARN, miARN, shARN, ou quaisquer combinações dos mesmos.
41. A partícula peptídica de parágrafo 39, em que a molécula de ácido nucleico é ADN.

42. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 33 a 41, em que uma razão entre o agente ativo para o péptido anfifílico situa-se na faixa de cerca de 1:1 a cerca de 1:10.000.

43. A partícula peptídica de parágrafo 42, em que a razão do agente ativo para o péptido anfifílico situa-se na faixa de cerca de 1:1 a cerca de 1:100, ou de cerca de 1:1 a cerca de 1:10.

44. Utilização da partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 33 a 43 para aplicação direcionada de um agente ativo.

45. A utilização de parágrafo 44, em que o agente ativo é impermeável à célula quando o mesmo é aplicado a uma célula por si.

46. Utilização de uma composição que compreende um péptido anfifílico carregado positivamente como um agente de penetração ou agente de transferência celular, em que o péptido anfifílico de carga positiva compreende um segmento de peptidilo hidrofóbico e um segmento de peptidilo hidrofílico,

em que o segmento de peptidilo hidrofóbico compreende uma sequência de aminoácidos de  $(Trp-Leu)_m - (Trp)_n$  ou  $(Leu-Trp)_p - (Leu)_q$ , em que cada Trp é D-Trp ou L-Trp e cada Leu é D-Leu ou L-Leu, m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 5, e n e q são, independentemente, 0 ou 1, desde que quando Trp for D-Trp, então Leu seja L-Leu, e quando Trp for L-Trp, então Leu seja D-Leu, ou vice-versa;

em que o segmento de peptidilo hidrofílico compreende uma sequência de aminoácidos de  $(\text{Lys})_r$ , em que  $r$  é um número inteiro de 1 a 15; e

em que pelo menos um dos resíduos ou o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico não é acetilado.

47. A utilização de parágrafo 46, em que todos os resíduos de Lys e o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico não são acetilados.

48. A utilização de parágrafo 46 ou 47, em que  $r$  é um número inteiro de 2 a 5.

49. A utilização de qualquer um dos parágrafos 46 a 48, em que  $r$  é um número inteiro igual a 3.

50. A utilização de qualquer um dos parágrafos 46 a 49, em que o segmento de peptidilo hidrofóbico é ligado à terminação C do segmento de peptidilo hidrofílico.

51. A utilização de qualquer um dos parágrafos 46 a 50, em que Leu é D-Leu.

52. A utilização de qualquer um dos parágrafos 46 a 51, em que Trp é L-Trp.

53. A utilização de qualquer um dos parágrafos 46 a 52, em que Lys é L-Lys.

54. A utilização de qualquer um dos parágrafos 46 a 53, em que  $m$  ou  $p$  é entre 1 e 3.

55. A utilização de qualquer um dos parágrafos 46 a 54, em que m ou p é 3.
56. A utilização de qualquer um dos parágrafos 46 a 55, em que n ou q é 1.
57. A utilização de qualquer um dos parágrafos 46 a 56, em que o péptido anfifílico tem um comprimento de cerca de 5 a cerca de 25 resíduos de aminoácidos.
58. A utilização de qualquer um dos parágrafos 46 a 57, em que pelo menos uma ligação amida de cadeia principal do péptido anfifílico é uma ligação de substituição de amida.
59. A utilização de qualquer um dos parágrafos 46 a 58, em que o péptido anfifílico compreende um  $\beta$ -aminoácido, um  $\gamma$ -aminoácido, ou uma combinação dos mesmos.
60. A utilização de qualquer um dos parágrafos 46 a 59, em que pelo menos um de entre o segmento de peptidilo hidrofóbico ou o segmento de peptidilo hidrofílico compreende pelo menos uma mutação pontual.
61. A utilização de qualquer um dos parágrafos 46 a 60, em que a partícula tem um tamanho de cerca de 5 nm a cerca de 5.000 nm.
62. A utilização de parágrafo 61, em que a partícula tem um tamanho de cerca de 30 nm a cerca de 150 nm.
63. A utilização de qualquer um dos parágrafos 46 a 62, em que o péptido anfifílico compreende a sequência de

aminoácidos de (L-Lys) - (L-Lys) - (L-Lys) - (L-Trp) - (D-Leu) - (L-Trp) - (D-Leu) - (L-Trp) - (D-Leu) - (L-Trp) - X, em que X está ausente ou NH<sub>2</sub>.

64. A utilização de qualquer um dos parágrafos 46 a 63, em que a composição compreende adicionalmente uma molécula de ácido nucleico a ser aplicada a uma célula.

65. Uma partícula peptídica que compreende um primeiro péptido anfifílico e um segundo péptido anfifílico, sendo que o primeiro e o segundo péptido anfifílico cada um, compreende independentemente um segmento de peptidilo hidrofóbico e um segmento de peptidilo hidrofílico,

em que o segmento de peptidilo hidrofóbico compreende uma sequência de aminoácidos de (Trp-Leu)<sub>m</sub> -(Trp)<sub>n</sub> ou (Leu-Trp)<sub>p</sub> -(Leu)<sub>q</sub>, em que cada Trp é D-Trp ou L-Trp e cada Leu é D-Leu ou L-Leu, m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 5, e n e q são, independentemente, 0 ou 1, desde que quando Trp for D-Trp, então Leu seja L-Leu, e quando Trp for L-Trp, então Leu seja D-Leu, ou vice-versa; e

em que o segmento de peptidilo hidrofílico compreende uma sequência de aminoácidos de (Lys)<sub>r</sub>, em que r é um número inteiro de 1 a 15, e

em que o grupo amino de terminação N e todos os resíduos de Lys do primeiro péptido anfifílico são acetilados; e em que pelo menos o grupo amino de terminação N ou um dos resíduos de Lys do segundo péptido anfifílico não é acetilado.

66. A partícula peptídica de parágrafo 65, em que nenhum de entre o grupo amino de terminação e os resíduos de Lys do segundo péptido anfifílico é acetilado.
67. A partícula peptídica de parágrafo 65 ou 66, que compreende adicionalmente um agente ativo.
68. A partícula peptídica de parágrafo 67, em que o agente ativo inclui uma molécula de ácido nucleico.
69. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 65 a 68, em que a razão entre o agente ativo e o segundo péptido anfifílico está numa faixa de cerca de 1:1000 a 1:1, ou cerca de 1:100 a cerca de 1:10.
70. A partícula peptídica de parágrafo 69, em que a razão do agente ativo para o segundo péptido anfifílico está situada em uma faixa de cerca de 1:10 a cerca de 1:2.
71. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 65 a 70, em que a razão entre o primeiro péptido anfifílico e o segundo péptido anfifílico situa-se em uma faixa de cerca de 1:1 a cerca de 1000:1, ou cerca de 5:1 a cerca de 100:1.
72. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 65 a 71, que compreende adicionalmente sobre sua superfície externa um ligando.
73. A partícula peptídica de parágrafo 72, em que o ligando inclui um ligando de recetor de superfície celular ou um anticorpo.

74. A partícula peptídica de parágrafo 73, em que o ligando de recetor de superfície celular inclui transferrina, EGF, folato, ou qualquer combinação dos mesmos.

75. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 65 a 74, em que a espessura do ligando presente sobre a superfície externa da partícula peptídica situa-se na faixa de cerca de 65 nm a cerca de 100 nm.

76. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 75, em que a espessura do ligando presente sobre a superfície externa da partícula peptídica é cerca de 10 nm.

77. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 65 a 76, em que o ligando é covalentemente ligado a pelo menos um de entre o primeiro e o segundo péptido anfifílico.

78. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 65 a 77, em que o ligando é covalentemente ligado ao segmento de peptidilo hidrofílico de pelo menos um de entre o primeiro e o segundo péptido anfifílico.

79. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 65 a 78, em que uma razão entre o ligando e o péptido anfifílico situa-se na faixa de cerca de 1:10 a cerca de 1:1.000.000.

80. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 65 a 79, em que r é um número inteiro de 2 a 5.

81. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 65 a 80, em que r é um número inteiro igual a 3.
82. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 65 a 81, em que o segmento de peptidilo hidrofóbico é ligado à terminação C do segmento de peptidilo hidrofílico.
83. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 65 a 82, em que Leu é D-Leu.
84. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 65 a 83, em que Trp é L-Trp.
85. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 65 a 84, em que Lys é L-Lys.
86. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 65 a 85, em que m ou p é entre 65 e 3.
87. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 65 a 86, em que m ou p é 3.
88. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 65 a 87, em que n ou q é 1.
89. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 65 a 88, em que o primeiro e o segundo péptido anfifílico, cada um, independentemente tem um comprimento de cerca de 5 a cerca de 25 resíduos de aminoácidos.
90. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 65 a 89, em que pelo menos uma ligação amida de cadeia

principal do primeiro ou do segundo péptido anfifílico é uma ligação de substituição de amida.

91. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 65 a 90, em que pelo menos um de entre o primeiro e o segundo péptido anfifílico compreende um  $\beta$ -aminoácido, um  $\gamma$ -aminoácido, ou uma combinação dos mesmos.

92. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 65 a 91, em que pelo menos um de entre o segmento de peptidilo hidrofóbico ou o segmento de peptidilo hidrofílico compreende pelo menos uma mutação pontual.

93. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 65 a 92, em que a partícula peptídica tem um tamanho de cerca de 5 nm a cerca de 5.000nm.

94. A partícula peptídica de parágrafo 93, em que a partícula peptídica tem um tamanho de cerca de 30 nm a cerca de 150 nm.

95. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 65 a 94, em que o primeiro e o segundo péptido anfifílico, cada um, compreende a sequência de aminoácidos de (L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-X, em que X está ausente ou NH<sub>2</sub>.

96. Utilização da partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 65 a 95 para aplicação de uma molécula de ácido nucleico a uma célula.

97. A utilização de parágrafo 96, em que a molécula de ácido nucleico inclui siARN, miARN, shARN, ou quaisquer combinações dos mesmos.

98. A utilização de parágrafo 96, em que a molécula de ácido nucleico inclui ADN.

99. Um péptido anfifílico que compreende um segmento de peptidilo hidrofóbico e um segmento de peptidilo hidrofílico,

em que o segmento de peptidilo hidrofóbico compreende uma sequência de 2 a 10 D- e L-aminoácidos alternados selecionados de entre alanina, valina, isoleucina, leucina (Leu), fenilalanina, tirosina ou triptofano (Trp), e

em que o segmento de peptidilo hidrofílico compreende aminoácidos carregados ou não carregados, porém polares, ou derivados dos mesmos.

100. O péptido anfifílico de parágrafo 99, em que o segmento de peptidilo hidrofóbico compreende uma sequência de aminoácidos de  $(Trp-Leu)_m - (Trp)_n$  ou  $(Leu-Trp)_p - (Leu)_q$ , em que cada Trp é D-Trp ou L-Trp e cada Leu é D-Leu ou L-Leu, m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 20, e n e q são, independentemente, 0 ou 1, desde que quando Tip for D-Trp, então Leu seja L-Leu, e quando Trp for L-Trp, então Leu seja D-Leu, ou vice-versa;

101. O péptido anfifílico de parágrafo 99 ou 100, em que o segmento de peptidilo hidrofílico compreende pelo menos

uma carga presente tanto na terminação N como em um resíduo de aminoácidos.

102. O péptido anfifílico de parágrafo 101, em que a pelo menos uma carga é tanto uma carga catiónica como aniónica.

103. O péptido anfifílico de parágrafo 99 ou 100, em que o segmento de peptidilo hidrofílico compreende aminoácidos não carregados, porém polares.

104. O péptido anfifílico de qualquer um dos parágrafos 99 a 103, em que o segmento de peptidilo hidrofílico compreende pelo menos uma carga e pelo menos um aminoácido não carregado, porém polar.

105. O péptido anfifílico de qualquer um dos parágrafos 99 a 104, em que ao segmento de peptidilo hidrofóbico um polímero é ligado covalentemente.

106. O péptido anfifílico de qualquer um dos parágrafos 99 a 105, em que pelo menos um grupo amino no péptido anfifílico é acetilado.

107. O péptido anfifílico de parágrafo 102, em que a pelo menos uma carga catiónica está num resíduo de aminoácidos selecionado do grupo que consiste em Lys, Arg, His, e quaisquer combinações dos mesmos.

108. O péptido anfifílico de parágrafo 102, em que a pelo menos uma carga aniónica está num resíduo de aminoácidos selecionado do grupo que consiste em Asp ou Glu, e quaisquer combinações dos mesmos.

109. O péptido anfifílico de parágrafo 103, em que o pelo menos um resíduo de aminoácidos não carregado, porém polar é selecionado do grupo consistindo em Ser, Thr, Asn ou Gln, e quaisquer combinações dos mesmos.

110. O péptido anfifílico de parágrafo 105, em que o polímero é selecionado do grupo consistindo em PEG, PGG, PEO, policaprolactona, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, poli-hidroxialcanoatos, dextrans, polianidridos, PLA-PGA, poliortoéster, polifumarato, hidrogéis, quaisquer polímeros biocompatíveis e/ou biocompatíveis reconhecidos na técnica, e quaisquer combinações dos mesmos.

111. O péptido anfifílico de qualquer um dos parágrafos 99 a 110, em que o segmento de peptidilo hidrofílico compreende uma sequência de aminoácidos de  $(\text{Lys})_r$ , em que  $r$  é um número inteiro de 1 a 15.

112. O péptido anfifílico de parágrafo 111, em que  $r$  é 3.

113. O péptido anfifílico de qualquer um dos parágrafos 99 a 112, em que o pelo menos um grupo amino é um grupo amino de terminação N do péptido anfifílico.

114. O péptido anfifílico de qualquer um dos parágrafos 99 a 113, em que o pelo menos um grupo amino está num resíduo de Lys do segmento de peptidilo hidrofílico.

115. O péptido anfifílico de qualquer um dos parágrafos 99 a 114, em que todos os grupos amino no segmento de peptidilo hidrofílico são acetilados.

116. O péptido anfifílico de qualquer um dos parágrafos 99 a 115, em que o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico e pelo menos um dos grupos amino no segmento de peptidilo hidrofílico são acetilados.

117. O péptido anfifílico de qualquer um dos parágrafos 99 a 116, em que o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico e todos os grupos amino no segmento de peptidilo hidrofílico são acetilados.

118. O péptido anfifílico de qualquer um dos parágrafos 99 a 117, em que o segmento de peptidilo hidrofóbico é ligado à terminação C do segmento de peptidilo hidrofílico.

119. O péptido anfifílico de qualquer um dos parágrafos 99 a 118, em que Leu é D-Leu.

120. O péptido anfifílico de qualquer um dos parágrafos 99 a 119, em que Trp é L-Trp.

121. O péptido anfifílico de qualquer um dos parágrafos 99 a 120, em que Lys é L-Lys.

122. O péptido anfifílico de qualquer um dos parágrafos 99 a 121, em que m ou p é entre 1 e 3.

123. O péptido anfifílico de parágrafo 122, em que m ou p é 3.

124. O péptido anfifílico de qualquer um dos parágrafos 99 a 123, em que n ou q é 1.

125. O péptido anfifílico de qualquer um dos parágrafos 99 a 124, em que o péptido anfifílico compreende a sequência de aminoácidos de (L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp), em que pelo menos um dos resíduos de L-Lys é acetilado.

126. O péptido anfifílico de qualquer um dos parágrafos 99 a 125, em que o péptido anfifílico compreende a sequência de aminoácidos de Ac-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp).

127. O péptido anfifílico de parágrafo 126, em que pelo menos um dos resíduos de L-Lys é acetilado.

128. O péptido anfifílico de qualquer um dos parágrafos 99 a 127, em que o péptido anfifílico compreende a sequência de aminoácidos de Ac-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-X, em que X está ausente ou NH<sub>2</sub>.

129. O péptido anfifílico de qualquer um dos parágrafos 99 a 128, em que o péptido anfifílico tem um comprimento de cerca de 5 a cerca de 25 resíduos de aminoácidos.

130. O péptido anfifílico de qualquer um dos parágrafos 99 a 129, em que pelo menos uma ligação amida de cadeia principal é uma ligação de substituição de amida.

131. O péptido anfifílico de qualquer um dos parágrafos 99 a 130, em que o péptido anfifílico compreende pelo menos um β-aminoácido, γ-aminoácido, ou quaisquer combinações dos mesmos.

132. O péptido anfifílico de qualquer um dos parágrafos 99 a 131, em que pelo menos um de entre o segmento de peptidilo hidrofóbico ou o segmento de peptidilo hidrofílico compreende pelo menos uma mutação pontual.

133. Uma partícula que compreende um ou mais péptidos anfifílicos de qualquer um dos parágrafos 99 a 132.

134. A partícula de parágrafo 133, que compreende adicionalmente um ligando.

135. A partícula de parágrafo 133 ou 134, em que o ligando é um ligando de recetor de superfície celular ou um anticorpo.

136. A partícula de parágrafo 135, em que o ligando de recetor de superfície celular é transferrina, ou EGF ou folato.

137. As partículas de qualquer um dos parágrafos 133 a 136, em que o ligando está presente sobre uma superfície externa da partícula.

138. A partícula de qualquer um dos parágrafos 133 a 137, em que o ligando é adsorvido sobre a superfície externa da partícula.

139. A partícula de parágrafo 137 ou 138, em que uma espessura do ligando presente sobre a superfície externa da partícula situa-se na faixa de cerca de 1 nm a cerca de 100 nm.

140. A partícula peptídica de parágrafo 139, em que a espessura do ligando presente sobre a superfície externa da partícula é cerca de 10 nm.

141. A partícula peptídica de qualquer um dos parágrafos 133 a 140, em que o ligando é covalentemente ligado ao péptido anfifílico.

142. A partícula de qualquer um dos parágrafos 133 a 141, em que o ligando é covalentemente ligado ao segmento de peptidilo hidrofílico do péptido anfifílico.

143. A partícula de qualquer um dos parágrafos 133 a 142, que compreende adicionalmente um agente ativo.

144. A partícula de parágrafo 143, em que o agente ativo é disperso dentro da partícula.

145. A partícula de qualquer um dos parágrafos 143 a 144, em que o agente ativo não tem carga líquida.

146. A partícula de qualquer um dos parágrafos 143 a 144, em que o agente ativo tem uma carga líquida.

147. A partícula de qualquer um dos parágrafos 143 a 146, em que o agente ativo compreende pelo menos um grupo aromático.

148. A partícula de qualquer um dos parágrafos 143 a 147, em que o agente ativo é selecionado do grupo consistindo em proteínas, péptidos, antígenos, anticorpos ou porções dos mesmos, moléculas semelhantes a anticorpo, enzimas, ácidos nucleicos, aptâmeros, moléculas pequenas, antibióticos, agentes farmaceuticamente ativos, agentes terapêuticos, agentes de contraste, e quaisquer combinações dos mesmos.

149. A partícula de qualquer um dos parágrafos 143 a 148, em que o agente ativo é um agente farmaceuticamente ativo.

150. A partícula de qualquer um dos parágrafos 143 a 149, em que o agente ativo é uma molécula de ácido nucleico.

151. A partícula de parágrafo 150, em que a molécula de ácido nucleico é siARN miARN ou shARN.

152. A partícula de parágrafo 150, em que a molécula de ácido nucleico é ADN.

153. A partícula de qualquer um dos parágrafos 143 a 152, em que uma razão entre o agente ativo e os péptidos anfifílicos situa-se na faixa de 1:1 a 1:100.000.

154. A partícula de parágrafo 153, em que a razão entre o agente ativo e os péptidos anfifílicos situa-se na faixa de 1:1 a cerca de 1:1 000.

155. A partícula de qualquer um dos parágrafos 134 a 154, em que uma razão entre o ligando e os péptidos anfifílicos situa-se na faixa de cerca de 1:10 a cerca de 1:1.000.000.

156. A partícula de qualquer um dos parágrafos 133 a 155, em que a partícula tem um tamanho de cerca de 5 nm a cerca de 5.000 nm.

157. A partícula de parágrafo 156, em que a partícula tem um tamanho de cerca de 30 nm a cerca de 150 nm.

158. A partícula de qualquer um dos parágrafos 133 a 157, em que a partícula compreende uma mistura de péptidos anfifílicos completamente acetilados e parcialmente acetilados de qualquer um dos parágrafos 99 a 132.

159. A partícula de parágrafo 158, em que a razão entre os péptidos anfifílicos completamente acetilados e o parcialmente acetilados situa-se na faixa de cerca de 95:5 a cerca de 1:1.

160. A partícula de qualquer um dos parágrafos 133 a 159, em que a partícula compreende adicionalmente péptidos anfifílicos não acetilados.

161. Um método de utilização de um composto de péptido anfifílico como um sistema de aplicação.

162. O método de parágrafo 161, em que o sistema de aplicação é um sistema de aplicação direcionada.

163. O método de parágrafo 161 ou 162, em que o sistema de aplicação serve para propósitos terapêuticos ou diagnósticos.

164. Utilização de composições peptídicas como péptido de penetração ou agente de transferência, respetivamente.

Algumas definições seleccionadas

Exceto onde especificado em contrário ou implícito do contexto, os termos e frases a seguir incluem os significados fornecidos abaixo. Exceto onde explicitamente indicado em contrário, ou evidente a

partir do contexto, os e frases abaixo não excluem o significado que o termo ou frase adquiriu na técnica à qual o mesmo pertence. As definições são fornecidas para ajudar a descrever formas de realização específicas dos aspectos descritos no presente documento, e não se destinam a limitar a invenção reivindicada, devido ao facto de o escopo da invenção ser limitado apenas pelas reivindicações. Adicionalmente, exceto onde exigido em contrário pelo contexto, os termos no singular devem incluir pluralidades e os termos no plural devem incluir o singular.

Como utilizado no presente documento, o termo "compreendendo" ou "compreende" é utilizado em referência a composições, métodos e respetivo(s) componente(s) do(s) mesmo(s), que são essenciais para a invenção, ainda aberto à inclusão de elementos não especificados, sejam ou não essenciais. Adicionalmente, o termo "compreendendo" ou "compreende" inclui "consistindo essencialmente em" e "consistindo em".

Como utilizado no presente documento, o termo "consistindo essencialmente em" refere-se àqueles elementos exigidos para uma determinada forma de realização. O termo permite a presença de elementos adicionais que não afetam materialmente a(s) característica(s) funcional(is) básica(s) e inovador(as) daquela forma de realização da invenção.

O termo "consistindo em" refere-se a composições, métodos e respetivos componentes dos mesmos conforme descrito no presente documento, que são exclusivos de qualquer elemento não citado naquela descrição da forma de

realização.

Exceto nos exemplos operacionais, ou onde indicado em contrário, todos os números que expressam quantidades de ingredientes ou condições de reação utilizadas no presente documento devem ser entendidos como modificados em todos os casos pelo termo "cerca de". O termo "cerca de" quando utilizado em conjunto com percentagens pode significar  $\pm 1\%$ .

Os termos no singular "um", "uma", e "o" incluem referências no plural exceto onde o contexto indicar claramente em contrário. De modo similar, a palavra "ou" destina-se a incluir "e" exceto onde o contexto indicar claramente em contrário.

Embora métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos no presente documento possam ser utilizados na prática ou teste desta divulgação, métodos e materiais adequados são descritos a seguir. O termo "compreende" significa "inclui". A abreviação, "por exemplo" é derivada do latim exempli gratia, e é utilizada no presente documento para indicar um exemplo não-limitador. Dessa forma, a abreviação "e.g." é sinônimo do termo "por exemplo".

O termo "estatisticamente significativo" ou "significativamente" refere-se ao significado estatístico e, em geral, significa dois desvios padrão (2SD) acima ou abaixo de um nível de referência. O termo refere-se à evidência estatística que há uma diferença. É definida como a probabilidade de tomar uma decisão de rejeitar a hipótese nula quando a hipótese nula for realmente

verdadeira. A decisão é geralmente tomada utilizando-se o valor p.

O termo "nanoesfera" significa uma partícula tendo uma razão de aspetto de no máximo 3:1. O termo "razão de aspetto" significa a razão entre o eixo geométrico mais longo de um objeto até o eixo geométrico mais curto do objeto, em que os eixos não são necessariamente perpendiculares.

O termo "dimensão mais longa" de uma partícula significa a trajetória direta mais longa da partícula. O termo "trajetória direta" significa a trajetória mais curta contida dentro da partícula entre dois pontos sobre a superfície da partícula. Por exemplo, uma partícula helicoidal poderia ter uma dimensão mais longa correspondente ao comprimento da hélice se a mesma for estendida em uma linha reta.

O termo "nano-haste" significa uma partícula tendo uma dimensão mais longa de no máximo 200 nm, e tendo uma razão de aspetto de 3:1 a 20:1.

O termo "nanoprisma" significa uma partícula tendo pelo menos duas faces não paralelas conectadas por uma borda comum.

O "comprimento" de uma partícula significa a dimensão mais longa da partícula.

A "largura" de uma partícula significa a média das larguras da partícula; e o "diâmetro" de uma partícula significa a média dos diâmetros da partícula.

A dimensão "média" de uma pluralidade de partículas significa a média daquela dimensão para a pluralidade. Por exemplo, o "diâmetro médio" de uma pluralidade de nanoesferas significa a média dos diâmetros das nanoesferas, em que um diâmetro de uma única nanoesfera é a média dos diâmetros daquela nanoesfera.

Como utilizado no presente documento, o termo "saís farmaceuticamente aceitáveis" refere-se aos saís não tóxicos ou saís de amónio quaternário convencionais de um composto, por exemplo, de ácidos orgânicos ou inorgânicos não tóxicos. Esses saís podem ser preparados *in situ* no processo de fabrico de veículo de administração ou forma de dosagem, ou reagindo-se separadamente um composto purificado em sua forma de base ou ácido livre com um ácido ou base orgânico ou inorgânico adequado, e isolar o sal, dessa forma, formado durante a purificação subsequente. Os saís não tóxicos convencionais incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos como sulfúrico, sulfâmico, fosfórico, nítrico, e similares; e os saís preparados a partir de ácidos orgânicos como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, palmítico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutâmico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenossulfónico, metanossulfónico, etano dissulfônico, oxálico, isotioníco, e similares. Veja-se, por exemplo, Berge et al., "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1 a 19 (1977).

Em algumas formas de realização dos aspetos descritos no presente documento, os saís representativos incluem os saís de bromidrato, cloridrato, sulfato, bissulfato,

fosfato, nitrato, acetato, succinato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, gluco-heptonato, lactobionato, e laurilsulfonato e similares.

Como utilizado no presente documento, uma razão pode ser uma razão molar ou razão entre o peso ou razão molar.

Como utilizado no presente documento, um "péptido penetrante celular" ou "péptido de penetração celular" é definido como péptido que tem permeabilidade da membrana e é capaz de cruzar a membrana biológica ou uma barreira fisiológica. Os péptidos penetrantes celulares (CPPs) também são chamados de péptidos permeáveis a células, domínios de transdução de proteína (PTD) ou sequências de translocação de membrana (MTS). Os CPPs têm a capacidade de translocar *in vitro* e/ou *in vivo* as membranas celulares de mamífero e entrar nas células e dirigir um composto conjugado de interesse, como um fármaco ou marcador, para um destino celular desejado, por exemplo, no citoplasma (citosol, retículo endoplasmico, aparelho de Golgi, etc.) ou o núcleo. Consequentemente, o CPP pode dirigir ou facilitar a penetração de um composto de interesse através de uma membrana de fosfolipídeo, mitocondrial, endossômica ou nuclear. O CPP também pode dirigir um composto de interesse a partir de fora da célula através da membrana plasmática, e para dentro do citoplasma ou para um local desejado dentro da célula, por exemplo, o núcleo, o ribossoma, a mitocôndria, o retículo endoplasmico, um lisossoma, ou um peroxissoma. Alternativamente, ou adicionalmente, o CPP pode dirigir um composto de interesse através das barreiras hematoencefálica, transmucosa, hematorretinal, cutâneas,

gastrointestinal e/ou pulmonar.

A penetração através de uma membrana biológica ou uma barreira fisiológica pode ser determinada por vários processos, por exemplo, por um teste de penetração tendo uma primeira etapa de incubação para o CPP conjugado a um marcador na presença de células de cultura, seguido de uma etapa de fixação e, então, divulgação da presença do péptido marcado dentro da célula. Numa outra forma de realização, a etapa de divulgação pode ser realizada com uma incubação do CPP na presença de anticorpos marcados e dirigida contra o CPP, seguido de detecção no citoplasma ou em proximidade imediata do núcleo celular, ou mesmo dentro do mesmo, da reação imunológica entre a sequência de aminoácidos do CPP e os anticorpos marcados. A divulgação também pode ser feita marcando-se uma sequência de aminoácidos no CPP e detetando-se a presença da marcação nos compartimentos celulares. Os testes de penetração celular são bem conhecidos pelos peritos na especialidade. Entretanto, por exemplo, um teste de penetração celular foi descrito no pedido de patente mencionado acima Nº WO 97/02840.

Como utilizado no presente documento, o termo "agente de transfeção" ou "reagente de transfeção" refere-se a um composto que se liga a ou complexa a um composto e aumenta sua entrada nas células. Em geral, o termo agente de transfeção é utilizado para compostos que aumentam a aplicação de ácidos nucleicos a uma célula.

Até o ponto que ainda não foi indicado, será entendido pelos peritos na especialidade que qualquer uma das várias formas de realização no presente documento

descritas e ilustradas pode ser adicionalmente modificada para incorporar recursos mostrados em quaisquer outras formas de realização divulgadas no presente documento.

Os exemplos a seguir ilustram algumas formas de realização e aspetos da invenção. Os exemplos a seguir não limitam a invenção de forma alguma.

## **EXEMPLOS**

### **Materiais e métodos exemplificadores (para Exemplos 1 a 2)**

**Materiais Exemplificadores:** Todas as substâncias químicas e reagentes incluindo rosa bengala (RB) (Aldrich 330000, 95%) e 5-carbóxi-fluoresceína (CF) (Sigma-Aldrich C0537, 99%) foram obtidos junto à Sigma-Aldrich e utilizados sem purificação adicional exceto onde especificado em contrário abaixo. Os aminoácidos protegidos com Fmoc e reagentes de acoplamento foram adquiridos junto à IRIS Biotech e Novabiochem. Placas de cristalização de 24 poços foram adquiridas junto à Hampton Research (Cryschem Plate).

**Síntese de Péptido:** Todos os péptidos foram sintetizados em fase sólida utilizando química de grupo de proteção de Fmoc. As etapas individuais da síntese são mencionadas na Tabela 1. Resina Rink Amide AM (200 mg, carregamento: 0,4 mmol/g a 0,8 mmol/g) foi utilizada como fase sólida em uma seringa de 10 mL. Todas as reações foram realizadas em dimetilformamida (DMF) anteriormente tratada com óxido de alumínio para reduzir a abundância de aminas livres. Os aminoácidos Fmoc foram dissolvidos em DMF (0,5 M)

antes da síntese. O grupo de proteção de Fmoc foi fissurado duas vezes para cada etapa de acoplamento utilizando piperidina em DMF (40%). 1H-benzotriazólio 1-[bis(dimetilamino)metíleno]-5-cloro-, hexafluorofosfato (1-), 3-óxido (HCTU) foi utilizado como um agente de acoplamento e N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) dissolvida em 1-metil-2-pirrolidinona (NMP) como uma base. Todos os acoplamentos foram executados com 4 equivalentes (eq) de aminoácido, HCTU (4 eq) e DIPEA(12 eq) em relação à capacidade de carregamento de resina. Após cada etapa de acoplamento, o grupo amino terminal não reagido foi terminado por acetilação com uma solução de anidrido acético (5 eq) e DIPEA em DMF (5 eq).

*Tabela 1: Etapas Automatizadas Da Síntese De Péptido Em Fase Sólida De Fmoc Em Batelada*

[Etapa]	Solvente/Reagente	Repetição	Tempo (min)	Descrição
1	40 % de Piperidina/DMF	1	5	Desproteção Fmoc
2	40 % de Piperidina/DMF	1	10	Desproteção Fmoc
3	DMF:	5	1	Lavagem
4	4 eq de aminoácido com proteção Fmoc, 4 eq de HCTU, 12 eq de DIPEA	1	60	Acoplamento <sup>(a)</sup>
5	DMF:	2	1	Lavagem
6	5 eq de anidrido acético, 5 eq de DIPEA	1	20	Proteção Terminal <sup>(b)</sup>
7	DMF:	3	1	Lavagem

---

<sup>(a)</sup> Em DMF Alox/NMP; <sup>(b)</sup> Em DMF Alox; em que DMF Alox é DMF anteriormente tratado com óxido de alumínio

---

O mesmo protocolo foi aplicado numa síntese aumentada utilizando a resina Rink Amide AM (5 g) em que a reação foi realizada em um reator de vidro em fase sólida de 500 mL utilizando 3 eq de aminoácidos e reagentes de acoplamento. O pH foi mantido constante em 9 ao longo da reação e a resina foi sondada para grupos amino livres utilizando-se um teste Kaiser e trinitrobenzeno sulfonato (TNBS) após cada etapa de acoplamento e clivagem. Não houve necessidade de NMP como um cossolvente.

Os rendimentos totais variam, em geral, entre 10% e 15% em ~95% de pureza que é típica para a síntese de péptidos em fase sólida.

Após a síntese, a resina peptídica foi lavada com DMF, álcool isopropílico, DMF, diclorometano e éter dietílico antes de a mesma ser seca de um dia para o outro em uma linha de vácuo. A clivagem de péptidos da resina e a remoção de grupos de proteção foi realizada com TFA frio (95%), trietilsilano (2,5%) e H<sub>2</sub>O (2,5%). A mistura de clivagem gelada foi adicionada à resina e incubada durante 2h a 3 h à temperatura ambiente. O coquetel de clivagem filtrado foi precipitado e lavado com éter di-isopropílico frio (40 mL). O sólido branco foi seco de um dia para o outro em uma linha de vácuo.

Purificação de Péptido: Todos os péptidos foram purificados em Shimadzu Prominence HPLC com os parâmetros mencionados na Tabela 2. Os péptidos crus foram triturados e dissolvidos em uma mistura de DMF e acetonitrilo (4 mL, 1:1) e diluídos com H<sub>2</sub>O (0,1% de TFA)

a um volume final de 20 mL. A gelificação de produto cru é eliminada sob essas condições solventes. A amostra foi subsequentemente filtrada através de um filtro para seringa PTFE de 0,45 µm e bombeada em uma coluna Merck LiChrospher 100, RP-18e (5 µm, 250-10) em uma taxa de fluxo de 4 mL/min e eluída com um gradiente linear de água (0,1% de TFA) para acetonitrilo (MeCN). A eluição de amostra foi seguida de absorção em 280 nm e recolhida de acordo com volumes de fração fixos de 5 mL. A presença de péptido de produto foi quantificada por espectrometria de massa (Figura 1A) e quantificada em séries de HPLC analítica (Figura 1B). As frações contendo mais de 80% de produto (A<sub>280</sub>) foram aplicadas a uma segunda etapa de purificação no mesmo material de cromatografia realizada com ácido acético (2%) na fase aquosa. As frações contendo mais de 95% de produto foram combinadas, neutralizadas com amónia e liofilizadas.

*Tabela 2: Parâmetros De Purificação Por Hplc*

<b>Característica</b>	<b>Preparativa</b>	<b>Analítica</b>
Solvente A	H <sub>2</sub> O bidist, 0,1 % de TFA ou 2% de AcOH	H <sub>2</sub> O bidist, 0,1% de TFA
Solvente B:	MeCN	MeCN
Coluna	LiChrospher 100, RP-18e (5µm), 250 a 10	LiChrospher 100, RP-18e (5µm), 250 a 4,6
Gradiente	% de B → 95% de B, 20% de B → 70% de B, 120 min	30 min
Injetado	De acordo com os requisitos	25 µL
Volume		

Taxa de fluxo	5 mL/min	1,5 mL/min
Deteção	A <sub>280</sub>	A <sub>280</sub>
Fracionamento	λ > 500 mAU	-
Tamanho de fração	5mL	-

---

*Modificações Após a Purificação:* A acetilação de aminas primárias com terminação N e lisinas foi realizada em péptido purificado dissolvido em DMF aplicando-se um excesso de 40 vezes de anidrido acético e DIPEA. A completude da reação foi controlada por espectrometria de massa antes de a mistura de reação ser purificada novamente de acordo com o processo anteriormente descrito.

*Formação e Co-Montagem de Grânulos:* CD3ac e rosa bengala (RB) foram dissolvidos em H<sub>2</sub>O:EtO em uma razão de 1:1 e misturados para produzir concentrações finais de RB de 61,5 x 10<sup>-6</sup> M, 184,5 x 10<sup>-6</sup> M, 307,5 x 10<sup>-6</sup> M, 615 x 10<sup>-6</sup> M e 922,5 x 10<sup>-6</sup> M. A concentração de CD3ac foi mantida constante em 615 x 10<sup>-6</sup> M. A troca de solvente por H<sub>2</sub>O foi realizada por contraevaporação em placas de cristalização de gota depositada de 24 poços; 50 µL, solução pré-misturada de CD3ac e RB foi aplicada a um poço de gota depositada e contraevaporada quatro vezes contra 1 mL de H<sub>2</sub>O durante 16 h. Todas as experiências foram realizadas em triplicado. Esferas de CD3ac precipitaram-se antes de ca. 30 minutos e foram sedimentadas durante as próximas 5 h.

Para quantificar a quantidade de RB encapsulada, o pélete de grânulo foi ressuspenso após o equilíbrio de solvente e normalizado com H<sub>2</sub>O a um volume final de 100 µL. Subsequentemente, todas as amostras foram centrifugadas durante 30 minutos em 20 000 g, antes de 80 mL de sobrenadante serem separados. A fração de pélete restante foi diluída a 1:1 com 20 µL de DMSO para dissolver as montagens peptídicas. A concentração de RB em frações de pélete e sobrenadante foi determinada por medições de absorção e corrigida para RB nos 20 µL restantes da fração de pélete.

*Estimativa de Volume de Grânulo e Coeficiente de Partição:* Para estimar a densidade de precipitados de CD3ac, os grânulos (concentração inicial de  $307,5 \times 10^{-6}$  M CD3ac) foram preparados suficientemente grandes para exceder o limite de difração de luz visível. Uma baixa concentração de RB ( $10 \times 10^{-6}$  M) foi co-precipitada para permitir que uma estimativa do diâmetro de granulo por microscopia de fluorescência confocal (1,35 µm) e facilitar a contagem em um hemocitómetro (Hausser Scientific). Uma média de 72 esferas foi contada num volume celular observado de  $250.000 \mu\text{m}^3$  que é igual a uma fração de volume de grânulo de  $3,71 \times 10^{-4}$ . Uma solução de 50 µL de  $307,5 \times 10^{-6}$  M CD3ac, dessa forma, contém um volume de grânulo total de 18,6 nl e a densidade de CD3ac pode ser determinada ( $\rho_{\text{CD3ac}} \approx 1,35 \text{ g/cm}^3$ ). O coeficiente de partição logarítmico de RB numa solução aquosa de grânulos de CD3ac foi calculado de acordo com

$$\log P_{\text{CD3ac/H}_2\text{O}} = \log\left(\frac{[RB]_{\text{CD3ac}}}{[RB]_{\text{H}_2\text{O}}}\right) \quad (1)$$

*Espectroscopia de Ultravioleta-Visível:* Medições de

absorção foram realizadas num Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Os coeficientes de extinção de CD3ac em H<sub>2</sub>O:Etanol:DMSO 1:1:2 ( $21,780 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , 280 nm) e rosa bengala em H<sub>2</sub>O:DMSO 1:1 ( $11,639 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , 562 nm) foram obtidos. DMSO foi utilizado para dissolver CD3ac precipitado após a montagem e para reduzir a evaporação de solvente durante o tempo de preparação visto que o volume de amostra medido equivale a apenas 4 µL. Se necessário, a amostra foi adicionalmente diluída com H<sub>2</sub>O:EtOH:DMSO 1:1:2 para produzir intensidades de absorção na faixa linear do instrumento. As concentrações de RB foram determinadas por pesagem antes da co-montagem. Após a co-precipitação de CD3ac e RB, as frações de pélete e sobrenadante foram diluídas a 1:1 com DMSO (CD3ac montado se dissolve em uma solução de H<sub>2</sub>O:DMSO 1:1).

*Dicroísmo Circular (CD):* Experiências de CD foram realizadas num Applied Photophysics Chirascan em QS cadinhos (1 mm de comprimento de trajetória). As concentrações de amostra foram ajustadas para produzir valores de dynode entre 300 V e 500 V na faixa de comprimento de onda medido. As medições em branco foram realizadas com água imediatamente antes das medições de amostra. Cada espectro foi calculado pela média a partir de três varrimentos em intervalos de comprimento de onda de 1 nm, cada uma das duas preparações de amostra independentes. Todos os espectros foram atenuados aplicando-se o algoritmo Savitzky Golay de 2<sup>a</sup> ordem. Os dados de CD são relatados em unidades molares (deg cm  $2 > \text{dmol}^{-1}$ ), mostrados como elipticidade molar em graus.

*Microscopia Eletrónica de Varrimento:* A Microscopia

eletrônica de varriamento (SEM) foi realizada em um Hitachi S-4800. Os suportes de amostra SEM foram arrefecidos a -196°C antes de uma gota da suspensão de grânulo ser diretamente aplicada à superfície de metal frio. A amostra congelada sobre a placa foi subsequentemente liofilizada, submetida à pulverização catódica com platina e analisada.

*Dispersão Dinâmica de Luz:* A Dispersão dinâmica de luz foi medida em um sistema de goniómetro baseado em plataforma ALV/CGS-8F equipado com um ALV/-5000/E correlacionador e um laser de Argônio-Ião cm um comprimento de onda de 633 nm (35 mW) em ângulos de dispersão entre 30° e 150°. Um correlacionador ALV-5000/E calcula a função de autocorrelação de intensidade de fotões  $g_2(t)$ . Todas as experiências foram realizadas em T = 293 K e avaliados por ajuste cumulativo de segunda ordem (considerando-se o formato de partícula esférico anteriormente determinado por SEM). As polidispersidades foram determinadas pelo algoritmo contin em todos os ângulos e nunca excederam 0,11. As medições dependentes angulares foram medidas nas etapas de 10° a partir de 30° a 150°. Para evitar a influência de dispersão múltipla, experiências dependentes de concentração foram realizadas. Tanto para dependência angular como de concentração, um raio hidrodinâmico foi calculado a partir da fórmula de Stokes

$$r_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (2)$$

em que  $r_h$  é o raio hidrodinâmico de partículas esféricas, D é a constante de difusão,  $k_B$  é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta e  $\eta$  é a viscosidade de água. Um gráfico de  $1/r_h$  versus ângulo (concentração)

foi plotado e o raio hidrodinâmico ( $rh_0$ ) foi calculado por extração das medições tanto de concentração como angular para zero.

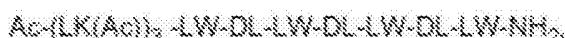
*Espectrometria de Massas:* A Espectrometria de massas foi realizada em um LTQ-Orbitrap (Thermo Scientific). 5  $\mu\text{L}$  de uma solução de CD3ac ( $10 \times 10^{-6} \text{ M}$ ,  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$  2:1) foram carregados em uma coluna capilar de 100  $\mu\text{m}$  recheada com Magic C18 AQ (3  $\mu\text{m}$  de diâmetro de partícula). O péptido foi eluído em um gradiente 30 min de  $\text{H}_2\text{O}$  (4% de ácido fórmico) a MeCN. O orbitrap foi ajustado para o modo positivo e uma resolução de 10.000.

*Microscopia Confocal:* Imagens de microscopia confocal foram obtidas em um microscópio invertido motorizado Nikon Ti equipado com DIC, ótica de fase e epifluorescência, um disco giratório Yokagawa CSU-10 confocal com linhas de laser de 488 nm, 568 nm e 647 nm. Uma câmara CCD arrefecida por ORCA-AG Hamamatsu foi utilizada para confocal, e um ORCA-R2 Hamamatsu foi utilizado para imageamento de campo amplo. CD3ac ( $615 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) foi co-dissolvido com (a) RB ( $10 \times 10^{-6} \text{ M}$ ), (b) CF ( $10 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) e (c) RB e CF (ambos  $10 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) em um volume de 50  $\mu\text{L}$  50% de EtOH, cada, e contraevaporado contra água. A suspensão resultante foi normalizada com  $\text{H}_2\text{O}$  a um volume total de 50  $\mu\text{L}$  por amostra e subsequentemente aplicada ao microscópio confocal.

### ***Exemplo 1: Nanopartículas De Cd3ac Peptídicas Sólidas - Caracterização Estrutural***

Os péptidos hidrofóbicos convencionais são, em geral, difíceis de sintetizar e purificar, e os mesmos também

são, em geral, difíceis de dissolver e tendem a se precipitar em estruturas amorfas em solução aquosa. De acordo com vários aspectos e formas de realização descritos no presente documento, um CD3ac peptídico desenhado de novo consiste em dez aminoácidos:



em que LK(Ac) = L-lisina acetilada; LW = L-triptofano; DL = D-leucina, demonstra propriedades diferentes de outros materiais peptídicos: CD3ac se dissolve prontamente na maioria dos solventes orgânicos (EtOH, iPrOH, DMSO, DMF, MeCN) e precipita-se em esferas semelhantes a grânulos uniformemente estruturados mediante troca de solvente por água (Figura 2A).

O péptido CD3ac (massa 1652,910 g/mol; pureza >95%, A280) pode ser considerado anfifílico visto que sua sequência é dividida em duas secções: um bloco hidrofóbico que consiste em L-triptofano e D-leucina alternados, e um bloco hidrofílico que consiste em três L-lisinas acetiladas. Os termos "hidrofílico" e "hidrofóbico" como utilizado no presente documento não são absolutos, porém descrevem a polaridade relativa dentro da sequência de aminoácidos, por exemplo, de CD3ac. Embora o péptido CD3ac seja hidrofóbico, o mesmo pode ser sintetizado em alto rendimento e purificado com procedimentos padrão em material cromatográfico C18 de fase reversa (veja-se a Secção Materiais e Métodos descrita anteriormente), em comparação com péptidos hidrofóbicos convencionais.

CD3ac é capaz de se precipitar em agregados esféricos na faixa de tamanho coloidal, e pode fazê-lo de forma

consistente e reproduzível. A troca de solvente foi realizada por diálise ou, para reduzir o consumo de material, por contra-evaporação contra água em placas de cristalização de 24 poços. A distribuição de tamanho da suspensão de grânulos de péptidos resultante foi medida por microscopia eletrónica de varrimento (SEM, Figuras 2A a 2C), e dispersão dinâmica de luz dependente de concentração e ângulo (DLS, Figuras 3A a 3B). Ambos os métodos divulgam um raio de partícula de cerca de 260 nm. O raio da esfera pode ser influenciado pela concentração de CD3ac inicialmente dissolvido (antes da troca de solvente) e situa-se na faixa entre cerca de 200 nm e cerca de 1500 nm correspondentes a concentrações iniciais de CD3ac entre  $61,5 \times 10^{-6}$  M a  $923 \times 10^{-6}$  M. Os dados de DLS mostrados nas Figuras 3A a 3B se referem a partículas de CD3ac formadas de CD3ac inicialmente dissolvido em  $123 \times 10^{-6}$  M. As partículas peptídicas obtidas (grânulos) têm baixa polidispersidade sem a necessidade de procedimentos de dimensionamento como sonicação ou extrusão, que são comumente aplicadas para obter uma distribuição estreita de tamanho, por exemplo, em suspensões de lípidos.

A estrutura secundária pode exercer, em parte, uma função essencial na montagem de grânulos de CD3ac. Sem o desejo de se ater a qualquer teoria, devido à dispersão de luz, pode ser difícil obter dados de dicroísmo circular quantificáveis de suspensões coloidais contendo partículas maiores que 50 nm de diâmetro. Dessa forma, quatro derivados estruturais de CD3ac (CD1, CD2, CD3 e CD4), que não são acetilados e, portanto, são carregados e solúveis em água (veja-se a Tabela 3) foram sintetizados.

*Tabela 3: Sequências de aminoácidos e massa molecular de péptidos sintetizados exemplificadores e derivados dos mesmos*

[Nome]	Sequência	MW (Da)
CD1	H-LK-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NI-1 <sub>2</sub>	1228,680
CD2	1-1-LK-LK-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH <sub>2</sub>	1356,775
CD3	1-1-LK-LK-LK-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH <sub>2</sub>	1484,870
CD4	H-LK-LK-LK-LK-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH <sub>2</sub>	1612,965
CD3ac	AC-LK (AC)-LK (AC)-LK (AC)-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH <sub>2</sub>	1652,910
LCD3	H-LK-LK-LK-LW-LL-LW-LL-LW-LL-LW-NI-1 <sub>2</sub>	1484,870
LCD3ac	AC-LK (AC)-LK (AC)-LK (AC)-LW-LL-LW-LL-LW-LL-LW-NH <sub>2</sub>	1652,910

A Figura 4 mostra espectros de dicroísmo circular de CD1 a CD4 em água. Em geral, os péptidos de poli-L-lisina carregados adotam uma estrutura secundária espiral aleatória e exibem elipticidades negativas entre 180 nm e 210 nm; é apresentado no presente documento que os péptidos com sequências de oligo-lisina mais curtas mostram elipticidades aumentadas nessa faixa de comprimento de onda. Também, um espectro espiral aleatório típico tem pouca ou nenhuma influência sobre as elipticidades acima de 210 nm; dessa forma, a faixa de comprimento de onda entre 210 nm e 260 nm pode ser atribuída quase inteiramente à influência da sequência alternada de L-Trp e D-Leu. Por exemplo, a intensidade e posição do pico em 223 nm permanece inalterada visto que o número de resíduos de lisina fixados é variado, indicando que a estrutura secundária de unidades de

repetição de LW-DL é pouco ou não afetada pelo comprimento de oligo-lisina ligada a N-terminal - possivelmente não influenciada pela presença de múltiplas cargas catiônicas nos resíduos de lisina ligados.

Os espectros de dicroísmo circular dos CD4-CD1 podem ser teoricamente extrapolados para um CD0 imaginário, que poderia não conter qualquer lisina, para obter um espectro máximo em cerca de 196 nm e 223 nm. Espectros similares não foram observados em péptidos hidrofóbicos sintéticos anteriores, porém foram relatados anteriormente em estudos estruturais de gramicidina A, um péptido antibiótico de 15 aminoácidos derivado da bactéria que vive no solo *Bacillus brevis* [16, 17].

O motivo de estrutura secundária de gramicidina é uma hélice amplo raramente observado na natureza e versátil em termos de passo helicoidal, destreza manual e configuração dimérica (estrutura quaternária) [17c,18], dependendo da constante dielétrica de seu ambiente [19]. Embora a gramicidina A contenha um motivo alternado de L-Trp e D-Leu, CD3ac apresentado no presente documento é diferente de gramicidina em vários aspectos, por exemplo, sequência peptídica e comprimento, modificações significativas de formilo e etanolamina ligadas de modo terminal presentes em gramicidina. Por exemplo, a sequência de gramicidina é hidrofóbica ao longo de seu comprimento, porém CD3ac apresentado no presente documento é anfifílico devido à adição N-terminal de pelo menos uma L-lisina (por exemplo, 1 L-lisina, 2 L-lisinas, ou 3 L-lisinas) e acetilação de pelo menos um grupo amino do péptido anfifílico.

Sem o desejo de se ater a qualquer teoria, uma sequência repetida de LW-DL pode resultar em um conjunto de ângulos phi e psi distintamente diferentes daqueles observados em alfa-hélices isoladas, folhas beta e espirais aleatórias, e ser mais provavelmente governada por impedimento estérico; ligações de hidrogénio intramoleculares estáveis podem ser ocasionalmente observadas em péptidos comparativamente curtos [20]. Embora tais estruturas secundárias e ligações de hidrogénio intramoleculares possam existir em CD3ac, CD3ac provavelmente é muito curto para dobrar sobre si mesmo.

A importância de estrutura secundária em relação à montagem semelhante a grânulos foi demonstrada por LCD3ac, um péptido de constituição idêntica (sequência de aminoácidos), porém totalmente composta de L-aminoácidos. LCD3ac se precipita em estrutura amorfa na faixa de tamanho de micrómetros (Figura 5A) e o espectro de dicroísmo circular de LCD3 carregado tem características  $\alpha$ -helicoidais dominantes (Figura 5B). Os dados combinados de SEM e dicroísmo circular indicam que o recurso de precipitação esférica depende, pelo menos em parte, da presença de D-Leu e da estrutura secundária específica induzida pelo mesmo.

***Exemplo 2: Nanopartículas Peptídicas Cd3ac Sólidas – Encapsulação De Carga***

CD3ac é o primeiro péptido sintetizado por química Fmoc que forma partículas sólidas na faixa de tamanho de nano- e micrómetros e é promissor para aplicações de libertação de fármacos. Embora as esferas de CD3ac precipitadas, em algumas formas de realização, em geral, não se adiram

umas às outras e não tenham afinidade observável com superfícies de vidro ou plástico, as mesmas podem encapsular moléculas de carga durante sua formação. CD3ac foi co-dissolvido com  $10 \times 10^{-6}$  M 5-carboxifluoresceína (CF),  $10 \times 10^{-6}$  M de 4,5,6,7-tetracloro-2',4',5',7'-tetraiodofluoresceína (RB) e uma mistura equimolar de ambos os corantes, respectivamente. A experiência foi realizada em pH 5 em que RB é carregada, porém CF é amplamente protonado exibindo baixa solubilidade em solução aquosa. O volume de solvente foi reajustado para 50  $\mu\text{L}$  após a contraevaporação, de modo que o contraste de fluorescência entre os antecedentes e grânulos peptídicos possa determinar pelo menos qualitativamente a acumulação de carga dentro das esferas.

CF bem como RB são absorvidos por grânulos de CD3ac, em vez de independente do estado de carga do corante (Figuras 6A a 6C). Entretanto, os grânulos carregados com CF agregam-se a montagens semelhantes à uva (Figura 6B) enquanto as esferas carregadas com RB não se aderem umas às outras (Figura 6A), mais provavelmente devido à exibição de RB carregada sobre ou próxima à superfície de grânulo.

O corante hidrofóbico como CF e corante relativamente hidrofílico como RB podem ser encapsulados por grânulos de CD3ac. Sem o desejo de se vincular à teoria, moléculas convidadas podem se pré-associar a CD3ac inicialmente (em solução) e montagem mediante a remoção de etanol. A extensão de pré-associação e, dessa forma, eficiência de co-montagem, poderiam depender da afinidade de compostos hospedeiros e convidados; no caso de derivados de xanteno como CF e RB, a interação de estruturas de anel

deslocalizadas poderia contribuir para sua pré-associação a CD3ac.

Para analisar a composição molar de grânulos de CD3ac carregados, o teor de corante de grânulos de CD3ac carregados com RB foi quantificado. RB é prontamente disponível e solúvel em etanol bem como água. Sem ater-se à teoria, a solubilidade em água é obrigatória para evitar a precipitação de carga fora dos grânulos peptídicos mediante troca de solvente. Além disso, a absorção de luz de RB não é fortemente bruscamente arrefecida em misturas de água e DMSO, isso permite a quantificação conveniente e precisa por densidade ótica. Brevemente, CD3ac e RB foram co-dissolvidos em razões de concentração variadas em 50% de EtoH. 50 µL foram aplicados a placas de cristalização de 24 poços e contraevaporados quatro vezes a 1 mL de H<sub>2</sub>O durante 16 h. Todas as experiências foram realizadas em triplicado. Esferas de CD3ac geralmente se precipitam após cerca de 30 minutos, dependendo da concentração de RB. Após o equilíbrio de solvente, o pélete de grânulo formado foi ressuspenso e normalizado com H<sub>2</sub>O a um volume final de 100 µL. As amostras foram centrifugadas durante 30 minutos em 20.000 g, antes de 80 µL de sobrenadante serem separados. Subsequentemente, a fração de pélete restante foi diluída a 1:1 com 20 µL de DMSO para dissolver as montagens peptídicas. Ao contrário de etanol, a utilização de DMSO ajuda a reduzir a evaporação de amostra e produz valores de absorção estáveis durante pelo menos 5 minutos (o volume de amostra para uma experiência UV-Vis é 4 µL, veja-se a secção Materiais e Métodos Exemplificadores anteriormente descrita).

Os dados de quantificação de co-montagem estão resumidos na Figura 7A. A concentração de CD3ac foi mantida constante em  $615 \times 10^{-6}$  M nas experiências descritas no presente documento. A razão molar de corante inicialmente dissolvido para péptido é fornecida como  $[RB]_i/[CD3ac]_i$ . Por exemplo, em  $[RB]_i/[CD3ac]_i = 1$  como a condição inicial experimental, após a formação de grânulos, cerca de um terço da composição molar da esfera ( $nRB_p/nCD3ac_p$ ) é RB (círculos abertos conforme mostrado na Figura 7A) e aproximadamente 25% de corante inicialmente dissolvido foram carregados em grânulos de CD3ac ( $nRB_p/nRB_p$ , triângulos abertos conforme mostrado na Figura 7A). Conforme mostrado na Figura 7B, a absorção de frações de pélete e sobrenadante em 280 nm (absorção máxima de triptofanos) indica que o CD3ac se precipita quase quantitativamente na presença de uma ampla faixa de concentração de RB (a razão molar de RB para CD3ac  $[RB]_i/[CD3ac]_i$  nas experiências descritas no presente documento abrange 1,5 ordem de magnitude). A adição de concentrações maiores de RB pode resultar em mais moléculas de corante co-montadas dentro de grânulos de CD3ac; entretanto, a relação de RB inicialmente dissolvido e co-montado não é linearmente proporcional, e a eficiência de co-montagem ( $nRB_p/nRB_i$ ) alcançará um limite de saturação.

A eficiência de encapsulação de RB em grânulos de CD3ac pode equivaler a pelo menos cerca de 30% p/p ou pelo menos cerca de 40 mol-% ou mais em razões de concentração analisadas, isso corresponde a um aumento de cerca de 900 vezes de concentração de RB ou um coeficiente de separação logarítmico de RB em CD3ac/H<sub>2</sub>O de 2,95. Eficiências similares ou ainda maiores são contempladas

para moléculas de carga hidrofóbica; entretanto, a quantificação precisa de compostos insolúveis em água pode ser propensa a artefactos devido à precipitação de carga fora dos grânulos peptídicos mediante **troca de solvente**.

A capacidade de CD3ac pré-associar e co-precipitar eficientemente RB é considerável, pelo menos parcialmente devido ao facto de RB ser duplamente carregada e solúvel em água. De facto, sua solubilidade em água é cerca de cinco vezes maior do que em etanol. Como apresentado no presente documento, a montagem de grânulo de CD3ac não é inibida pela presença de concentrações equimolares de RB, e é contemplado que, sem se ater à teoria, o péptido e corante interagem principalmente por interações aromáticas resultando, em vez disso, em ligação não específica (em comparação, por exemplo, com avidina/biotina). Essa funcionalidade pode complementar as propriedades de encapsulação de nanopartículas lipídicas sólidas bem como sistemas vesiculares.

É apresentada no presente documento uma sequência altamente hidrofóbica de 10 aminoácidos sintetizados e purificados em altos rendimentos e quantidades preparativas. O péptido (CD3ac) pode ser montado em grânulos uniformemente conformados de baixa polidispersidade de tamanho na ausência de quaisquer estratégias de moldagem. As medições de dicroísmo circular de derivados carregados de CD3ac indicam uma relação estrutural com gramicidina D,L-helicoidal e a função essencial de D-Leu em relação à sua estrutura secundária específica. LCD3, que contém exclusivamente L-aminoácidos, exibe características  $\alpha$ -helicoidais e se

precipita de modo amorfo em seu estado acetilado. CD3ac pode encapsular tanto compostos hidrofílicos como hidrofóbicos com eficiências que excedem as estratégias de encapsulação existentes [15], por exemplo, resultando em coeficiente de separação logarítmicos de pelo menos 2,95, e a eficiência de encapsulação não é limitada pela concentração das espécies hidrofílicas em solução, a menos que a mesma alcance um limite de saturação.

De acordo com vários aspectos e formas de realização descritos no presente documento, o estado de partícula peptídica sólida em conjunto com uma encapsulação de carga altamente eficiente pode ser utilizado para reduzir a degradação de substâncias farmacêuticas sensíveis e dispendiosas e aplicado para libertar cargas úteis altas dentro das células. Tal sistema de libertação de fármacos peptídicos pode aprisionar e acumular moléculas convidadas (por exemplo, agentes ativos) em um procedimento de uma única etapa conveniente. Portanto, é apresentado no presente documento um sistema de libertação de fármaco não-polimérico baseado em bloco de construção de aminoácidos naturais e síntese por química Fmoc, que pode aumentar a caixa de ferramentas atual de espécies coloidais e é promissor para aplicações médicas.

***Exemplo 3. Nanopartículas de CD3ac com uma coroa de proteína para aplicação de fármacos a células***

Como descrito nos Exemplos 1 e 2, as nanopartículas peptídicas de CD3ac podem ser montadas a partir de CD3ac dissolvido por adição de água: uma emulsão se forma espontaneamente como a mistura ternária (CD3ac, solvente orgânico, H<sub>2</sub>O) é colocada na região de duas fases (CD3ac,

$\text{H}_2\text{O}$ ). O processo de emulsificação é semelhante ao efeito ouzo (8), entretanto, as gotículas de CD3ac endurecem formando partículas sólidas à medida que o solvente orgânico é removido. Os Exemplos 1 e 2 demonstram que moléculas neutras bem como aromáticas carregadas podem migrar para a fase dispersa e ficar aprisionadas durante a formação de partículas (5).

No Exemplo 3, é apresentado no presente documento um novo sistema de libertação de fármacos que consiste na matriz peptídica de CD3ac, carga aprisionada (Flutax-2) e uma coroa de transferrina, opcionalmente marcada com Alexa Fluor 568 (Tfn-AF568) para propósitos de visualização. Para avaliar a disposição espacial dos reagentes em partículas de CD3ac automontadas, os péptidos CD3ac foram dissolvidos juntamente com Flutax-2 e Tfn-AF568 em 50% de EtOH e o teor de EtOH foi reduzido nas etapas conforme mostrado posteriormente em Materiais e Métodos Exemplificadores. As Figuras 8A a 8I mostram imagens de fluorescência das nanopartículas de transportador de fármaco peptídico de CD3ac resultantes. Nessa forma de realização, as nanopartículas de CD3ac tinham cerca de 3  $\mu\text{m}$  de diâmetro, o tamanho desenhado para ser suficientemente grande de modo a distinguir a distribuição de fluorescência no núcleo e na superfície por microscopia ótica convencional. Sem se ater à teoria, nanopartículas peptídicas de CD3ac menores ou maiores podem ser produzidas. Tfn-AF568 mostra um anel brilhante de fluorescência na periferia de partícula enquanto a fluorescência de Flutax-2 é igualmente distribuída ao longo da partícula (Figuras 8A a 8C). A eficiência de aprisionamento foi medida determinando-se o coeficiente de separação de Flutax-2 entre as partículas peptídicas e

água (Figuras 9A a 9D). O coeficiente de separação de Flutax-2 entre as partículas peptídicas e água foi determinado como 5,25, isto é, sob condições experimentais aplicadas, mais de 80% de Flutax-2 co-dissolvido escapam da fase aquosa e ficam aprisionados nas partículas. Tal valor de coeficiente de separação é consideravelmente alto para um composto solúvel em água. As proteínas são, em geral, ativas em superfície e podem ser adsorvidas em interfaces sólido-líquido. Consequentemente, procurou-se determinar se as partículas em contato com soluções proteicas podem ficar cobertas com uma camada de proteínas chamada de "coroa de proteína" (10). Com isso, foi avaliado se a borda pronunciada de fluorescência vermelha representa uma coroa que consiste em Tfn-AF568. Para avaliar isso, as partículas descritas no presente documento foram incubadas durante 6 horas em 50 µg/mL de tripsina. A borda desapareceu enquanto a distribuição espacial da carga de Flutax-2 permaneceu inalterada (Figuras 8D a 8F). A quantificação de perfis de nível de cinza indicou que a intensidade da borda de Tfn-AF568 foi reduzida em 3 vezes após a incubação de tripsina (Figura 8G). Ao mesmo tempo, a remoção da coroa de Tfn-AF568 resultou num aumento de fluorescência verde de Flutax-2 até um fator de 13 (Figura 8H), originando-se na sobreposição espectral de absorção de Tfn-AF568 e emissão de Flutax-2. Em conjunto, essas experiências indicam que a automontagem de CD3ac, Flutax-2 e Tfn-AF568 resulta na formação de partículas com Flutax-2 aprisionado e uma coroa de Tfn-AF568 adsorvida em superfície. A tripsinização das partículas automontadas pode resultar em degradação proteolítica de Tfn-Af568 seguido de dessorção de superfície dos fragmentos (Figura 8I).

As partículas para aplicação de fármacos têm, em geral, entre 8 nm e 200 nm de diâmetro visto que é menos provável que essa faixa de tamanho seja eliminada pelos rins e fígado (4). Também, a endocitose mediada por receptor, um mecanismo possível para a absorção de partículas contendo fármacos alvejadas, é dependente de tamanho e mais eficiente para partículas menores que cerca de 150 nm (11). Para reduzir o tamanho de partícula de CD3ac, concentrações peptídicas mais baixas foram dissolvidas antes da emulsificação: As Figuras 10A a 10C mostram imagens de microscopia de fluorescência de partículas peptídicas preparadas a partir de 492 µM, 246 µM e 123 µM de CD3ac, montadas na presença de 10 µg/mL de Tfn-AF568. As diferenças de tamanho resultantes são resumidas na Figura 10D por perfis de intensidade de fluorescência associada a partículas. O anel característico, ainda visível em 492 µM, não pode ser observado em partículas menores devido ao limite de difração de luz visível, embora a microscopia ótica confirme a presença de Tfn-AF568 em partículas menores que 300 nm (Figura 10E). Para confirmar a formação de coroa de Tfn-AF568 sobre as nanopartículas ( $d < 100$  nm), a microscopia eletrónica de transmissão (TEM) foi aplicada.

Para propósitos de brevidade, ***PNP<sub>CD3ac</sub>*** é utilizado no presente documento como um acrónimo para nanopartículas peptídicas de CD3ac automontadas na presença de carga (por exemplo, Flutax-2 utilizado no presente documento) e coroa (por exemplo, Tfn-AF568 utilizado no presente documento). As Figuras 10F a 10I mostram imagens TEM de partículas de PNP em várias configurações: PNP<sub>Flutax-2</sub>

(Figuras 10F a 10G) e ***PNP<sub>Tfn-AF568</sub>*** (Figuras 10H a 10I). Ambas as amostras foram coradas com acetato de uranila,

separando-se as partículas brilhantes e o fundo escuro. PNPFlutax-2 foram detetados em grandes números, e distribuídos de maneira uniforme sobre o filme de carbono (Figura 10F). Em contrapartida, apenas algumas partículas

poderiam ser detetadas na ~~PNP<sup>70-100</sup>~~<sup>Tfn-AF568</sup> amostra; em vez disso, as mesmas se aglomeraram (Figura 10H), indicando o processo de desidratação e evaporação de água residual durante a preparação de amostra e, dessa forma, a afinidade diferencial ao suporte de carbono hidrofóbico. Uma ampliação maior (Figura 10I) mostra uma borda de contraste intermediário sobre a interface de nanopartícula. A espessura média da mesma de 9,85 nm (desvio padrão = 2,1, n = 99) está de acordo com o diâmetro de proteína esperado (12). Embora ambas as amostras sejam preparadas pelo mesmo protocolo, o diâmetro médio de PNPFlutax -2 (100 nm, Figura 10J) era

~~PNP<sup>70-100</sup>~~<sup>Tfn-AF568</sup> duas vezes aquele de ~~PNP<sup>70-100</sup>~~<sup>Tfn-AF568</sup> (51 nm, excluindo a coroa, Figura 10K). Sem o desejo de se vincular à teoria, o tamanho médio de partículas peptídicas depende não só parcialmente da concentração de péptidos como também parcialmente da presença de molécula ativas em superfície que estabilizam a emulsão precoce no processo de separação de fases (8). Dessa forma, essas análises por microscopia eletrónica indicam que os diâmetros de partícula peptídica podem ser controlados até dez nanómetros, por exemplo, ao modular parâmetros de processamento diferentes, por exemplo, mas sem se limitar a, concentração de péptidos e/ou concentração e/ou tipos de moléculas ativas de superfície. Juntamente com as imagens de microscopia de fluorescência das Figuras 8A a 8F, as imagens TEM indicam a presença de uma coroa de Tfn-AF568 sobre PNPs.

***Exemplo 4. Aplicação de Flutax-2 a células CHO por nanopartículas de CD3ac com uma coroa de proteína***

A ligação seletiva a receptores de transferrina (TfR) depende da funcionalidade da coroa de proteína: sua função pode ser comprometida por desnaturação de proteína, impedimento estérico (aglomeração) ou orientação desfavorável em relação à superfície de PNPs. A acumulação de PNPs sobre as superfícies celulares pode ser atribuído a interações específicas e/ou associações não específicas de coroa-recetor. Por exemplo, as forças eletrostáticas (Coulomb) e eletrodinâmicas (Van der Waals) podem contribuir para associação não específica (13-15). Para testar a funcionalidade da coroa detetada mediando-se a ligação específica, o número de PNPs associadas à superfície celular foi correlacionado à densidade de TfR disponível utilizando-se protocolos experimentais independentes: a) ligação de PNP por Tfn em solução; e b) comparação de ligação de PNP entre células de ovário de hamster chinês que expressam TfR (CHO) e células TRVb, que são derivadas de tecido ovariano de hamster chinês que é desprovido de TfR endógeno, porém expressa TfR2 (16). As Figuras 11A a 11H mostram imagens de microscopia de células CHO incubadas durante uma hora com *PNP<sub>Tfn=AF388</sub>*. Uma acumulação significativa de PNPs foi detetada dentro do perímetro celular projetado (Figuras 11A a C) que poderia ser bloqueado incubando-se as células CHO com 17 µM de Tfn não marcado (Figura 11D a 11F). Isso indica que as interações de PNP com a superfície celular dependem de TfR livremente valente. A Figura 11G mostra que a densidade de TfR inferior em TRVb resulta em uma taxa de associação significativamente

reduzida de  $\text{PNP}_{\text{Tfn}-\text{AF568}}$ . A incubação de TRVb com 17  $\mu\text{M}$  de Tfn não bloqueado bloqueia a ligação de  $\text{PNP}_{\text{Tfn}-\text{AF568}}$  indicando que nessas células  $\text{PNP}_{\text{Tfn}-\text{AF568}}$  interage principalmente através do TfR2 recetor de baixa abundância. A aplicação de Tfn em excesso não só pode competir com as PNPs por TfR como também trocar Tfn-AF568 fluorescente na coroa de partícula por Tfn não fluorescente. Para avaliar essa possibilidade, a distribuição de intensidade de fluorescência de PN Tfn-AF 568>incubado a 37°C na presença e ausência de 17  $\mu\text{M}$  de Tfn após 24 horas foi comparada e houve diferenças insignificantes (Figuras 9C a 9D). Isso indica que a taxa de ligação mediada por TfR de PNPs sobre a superfície celular é muito mais rápida do que a troca de proteína sobre a superfície de PNP. Juntamente com os resultados apresentados nas Figuras 11A a 11H, as PNPs são mostradas ligando-se a TfR especificamente através da coroa de Tfn-AF568.

Embora  $\text{PNP}_{\text{Tfn}-\text{AF568}}$  possa se ligar a células através de interações com TfR, Tfn poderia se dissociar da coroa de PNP antes de a internalização ocorrer, e/ou a diferença de tamanho entre proteínas de Tfn simples e uma NP pode afetar a absorção celular. Dessa forma, procurou-se em seguida determinar se as partículas podem ser internalizadas por células. A distinção entre PNPs associados e internalizados pode não ser simples devido ao formato plano de células aderentes à superfície e uma resolução z limitada de microscopia ótica. Como anteriormente mostrado, a remoção de Tfn-AF568 da superfície de partícula pode ser detetada por um desvio pronunciado de razão de fluorescência verde para vermelha

(G/R). Com isso, a distribuição de G/R foi medida para distinguir entre PNPs associadas e internalizadas em células, conforme mostrada nas Figuras 12A a 12M, respetivamente. As células CHO foram fixadas e imageadas após 1 hora (Figuras 12A a 12E) e após 6 horas (Figuras

12G a 12K) de incubação com ~~PNP<sup>7nm-488</sup>~~. Após 1 hora, a distribuição de G/R mostrou um pico estreito em torno de 1,5 para ambas as PNPs dentro (Figura 12E, barras pretas) e fora (Figura 12E, barras cinzas) do perímetro celular. Conforme mostrado na Figura 12K, após 6 horas, a população de PNPs dentro do perímetro celular (barras pretas) exibiu um desvio significativo em direção a valores mais altos de G/R, enquanto a distribuição de G/R de PNPs fora do perímetro celular (barras cinzas) permaneceu confinada em torno de 1,5. Sem o desejo de se vincular à teoria, é contemplado que após a incubação durante 1 hora, a maior parte de PNPs ainda não alcançou um compartimento lisossómico e aquelas que foram internalizadas ainda têm uma coroa intacta contendo Tfna-AF568; após seis horas, a maior parte de PNPs foi transportada para dentro de lisossomas e suas coroas de proteína foram proteoliticamente digeridas. Os produtos de degradação menores podem se dissociar da superfície de partícula devido a forças de Van der Waals mais fracas (17). Em analogia a um aumento em G/R após a remoção da coroa por tripsina (Figura 8H), a digestão proteolítica da coroa de PNP em lisossomas pode produzir um aumento nos valores de G/R de PNPs internalizadas. Isso é corroborado pelos valores de G/R não carregados de PNPs detetados sobre a superfície de vidro. As alterações em G/R podem ser utilizadas no presente documento como um indicador qualitativo de PNPs internalizadas (devido à cinética de digestão relativamente lenta) para demonstrar

que as PNPs com uma coroa de Tfn-AF568 podem entrar ou ser absorvidas pelas células, por exemplo, por endocitose mediada por clatrina através de TfR(18).

Para avaliar se a ligação e internalização de PNPs podem resultar na importação seletiva de carga de molécula pequena, a libertação de Flutax-2 encapsulado dentro das células foi analisada 24 horas após a adição de

*PNP<sup>Tfn-AF568</sup>* dentro das células (Figuras 13A a 13I). Flutax-2 é um derivado modificado Oregon Green (OG) de paclitaxel(19), um inibidor mitótico aplicado em terapia de câncer (20). Ao contrário de sua forma não marcada, Flutax-2 é carregado e solúvel em água na concentração aplicada e, consequentemente, não penetra a membrana celular. Dessa forma, foi utilizado um composto modelo para investigar a eficiência e especificidade de aplicação de molécula pequena por PNPs ao citosol. As células CHO foram incubadas durante 24 horas com 0,67 µM de Flutax-2, tanto dissolvidas em meio (Figuras 13A a

13C) como aprisionadas em *PNP<sup>Tfn-AF568</sup>* (Figuras 13D a 13G). A emissão de Flutax-2 no citosol foi calculada pela média para quantificar a quantidade de composto aplicado às células. A permeação direta de Flutax-2 dissolvido através de membranas celulares poderia não ser detetada visto que a fluorescência resultante não excedeu o nível de autofluorescência (Figura 13B e 13I). Por outro lado,

a incubação com *PNP<sup>Tfn-AF568</sup>* resultou em um sinal de fluorescência verde difuso forte (Figuras 13E e 13G), indicando a aplicação de Flutax-2 ao citosol. A aplicação foi significativamente reduzida por competição de interações PNP-célula com 17 µM de Tfn dissolvidos e não marcado em meio de cultura celular (Figura 13H). Também,

a taxa total de aplicação era significativamente mais baixa para células de TRVb, que expressam apenas TfR2 (Figura 13H).

É apresentado no presente documento um sistema de libertação de fármacos alvejado que consiste em matriz peptídica de CD3ac, Flutax-2 impermeável à membrana celular como uma carga e TfRn-AF568 como um ligando de receptor de superfície celular específico, de acordo com uma ou mais formas de realização descritas no presente documento. Todos os três componentes podem se automontar para formar partículas carregadas e funcionalizadas com fármaco mediante a aplicação de um procedimento de uma única etapa (por exemplo, uma única etapa de cerca de 15 minutos). Sem se ater à teoria, a simplicidade de sistema e protocolo de formação se origina na interação planejada de todos os componentes envolvidos: CD3ac não é só o material de matriz, porém substitui as rotinas de encapsulação devido à sua alta afinidade a moléculas aromáticas pequenas. O processo de absorção de carga provavelmente se assemelha a uma extração líquida de duas fases em que Flutax-2 escapa da fase aquosa e se acumula em gotículas de péptido, provavelmente devido à alta afinidade entre sistemas de anéis deslocalizados de triptofanos e Flutax-2. Adicionalmente, a solubilidade do péptido em solventes orgânicos suaves permite a dissolução simultânea e auto-montagem de todos os componentes envolvidos. A presença de TfRn-AF568 durante a emulsificação de CD3ac resulta na formação de uma coroa de proteína, alvejamento de PNPs contra TfR. Adicionalmente, a presença da proteína sobre a superfície de partícula pode permitir a modulação de tamanho de partícula devido à sua atividade de superfície e, dessa

forma, estabilização precoce da emulsão peptídica. Mediante a internalização de PNPs em compartimentos lisossómicos, a digestão proteolítica em uma escala de tempo de algumas horas pode remover a coroa e, por sua vez, libertar a carga aprisionada no citosol em uma escala de tempo de dias. A razão de fluorescência de verde encapsulado (por exemplo, Flutax-2 utilizado no presente documento) e os corantes vermelhos aderentes à superfície (por exemplo, TfN-AF568) pode desviar para um valor mais alto (por exemplo, por um fator de 13) à medida que a coroa é removida e esse desvio pode permitir uma descrição qualitativa de absorção de partícula celular. A ligação de PNP a TfR e faixa de tamanho das partículas indicam absorção de partículas, por exemplo, através de endocitose mediada por clatrina. Sem o desejo de se vincular à teoria, a libertação de carga pode voltar para a degradação proteolítica de PNPs no lisossoma. É provável que a estrutura de produtos de degradação de CD3ac carregados penetre as membranas lipídicas e pode resultar na rutura de lisossomas (21).

**Materiais e métodos exemplificadores (para exemplos 3 a 4)**

*Soluções-mãe:* Síntese e purificação de CD3ac foi descrita em Materiais e Métodos Exemplificadores para Exemplos 1 a 2 (Veja-se, por exemplo, Dittrich e Meier (2010) Macromolecular Bioscience 10: 1406). Brevemente, o péptido foi sintetizado em uma fase sólida utilizando química de grupo de proteção Fmoc e purificado em material de cromatografia C18 em fase reversa (RP) aplicando-se um gradiente de acetonitrilo e água. A pureza foi determinada por integração de pico de perfis

de eluição por RP-HPLC em A<sup>280</sup> e excede 95%. As soluções-mãe de CD3ac foram preparadas dissolvendo-se o péptido em EtOH:H<sub>2</sub>O (1:1 v/v). A concentração foi determinada por absorção (Thermo Scientific Nanodrop 2000) em 280 nm em uma mistura de EtOH:H<sub>2</sub>O:DMSO 1:1:2 considerando ε<sub>280</sub>= 21780. A concentração peptídica foi ajustada para 742 μM com EtOH:H<sub>2</sub>O (1:1 v/v), e alíquotas de 200 μL foram armazenadas a -80 °C até a utilização adicional. Tfn-AF568 (Invitrogen, T-23365) foi dissolvido em uma concentração de 500 μg/mL e armazenado a +4°C. Flutax-2 (Invitrogen, P22310) foi dissolvido em uma concentração de 40 μM em H<sub>2</sub>O:EtOH (1:1) e armazenado a -80°C.

*Montagem de partícula e formação de coroa:* PNPs foram montadas misturando-se as soluções-mãe de CD3ac, Tfn-AF568 e Flutax-2 para produzir concentrações finais de 123 μM de CD3ac, 6 μM de Flutax-2 e 10 μg/mL de Tfn-AF568 em H<sub>2</sub>O:EtOH (1:1, v/v). A emulsificação foi induzida por uma primeira etapa de diluição (1:1, H<sub>2</sub>O) seguido de um período de equilíbrio de 15 minutos antes de o teor de etanol ser adicionalmente reduzido para 25 % pela segunda etapa de diluição (1:1, H<sub>2</sub>O). Alíquotas de 50 μL da suspensão resultante foram aplicadas a placas de cristalização de gota depositada de 24 poços (Hampton Research, Cryschem) e contraevaporadas 3 vezes contra 1 mL de H<sub>2</sub>O durante seis horas.

*Experiências de Células Cultivadas:* Linhagens celulares CHO foram desenvolvidas em F12:DMEM 1:1 (Cellgro, 10-090) mais 10% de soro fetal bovino (Gibco). 2 x 10<sup>4</sup> células em 0,5 mL foram inoculadas sobre coberturas de vidro (VWR, 89015-724) em placas de 24 poços (Falcon, 353047) e incubadas por 16 horas. As células foram lavadas 1x com

PBS e incubadas durante mais 30 minutos em meio Ham F12 (Cellgro, 10-080) antes de 50 µL de solução de nanopartícula (NP) (como preparado acima) em 250 µL de F12 serem aplicados. A concentração de CD3ac utilizada em incubação celular, dessa forma, corresponde a 8,3 µg/mL, ignorando o peso de Flutax-2 e Tfn-AF568 associados. Em ensaios de competição, as células foram pré-incubadas por 30 minutos em meio F12 contendo 17 µM de Tfn (Sigma, T1283) antes de uma solução de 50 µL de PNP em 250 µL de F12 contendo 17 µM de Tfn ser adicionada. As amostras foram fixadas com 3 % de paraformaldeído (Sigma, P6148) em PBS, montadas em lâminas utilizando meio de montagem fluorescente (Dako, S3023) e analisadas dentro de 24 horas.

*Fluorimetria:* As experiências de fluorescência foram realizados em um leitor de placa BMG FLUOstar Omega em placas pretas de 384 poços (MP100-1, Matrical). Séries de diluição de Tfn-AF568 e Flutax-2 foram medidas em H<sub>2</sub>O:DMSO:FBS 6:3:1 (V:V:V) e os pontos de dados foram ajustados linearmente.

*Tabela 4: Parâmetros Exemplificadores Determinados A Partir De Regressão Linear De Dados*

	Tfn-AF568		Flutax-2	
	Valor	Erro Padrão	Valor	Erro Padrão
Interceção	4501,69	234,76	4809,00	85,56
Coeficiente angular	1,011x10 <sup>6</sup>	5750,49	5,573x10 <sup>10</sup>	2,515x10 <sup>8</sup>
R <sup>2</sup>	0,99977		0,99986	

Para determinar as eficiências de encapsulação de Flutax-2, PNPs foram montadas com o procedimento descrito acima na presença de uma concentração fixa de TfN-AF568 (10 µg/mL) e quantidades variadas de Flutax-2 (1,6 µM, 4 µM, 8 µM, 12,5 µM e 16 µM). Após a montagem em placas de cristalização (veja-se acima), as amostras de PNP foram normalizadas com H<sub>2</sub>O a 100 µL e centrifugadas durante 1 hora em 16.000 g antes de 80 µL serem separados da fração de pélete. Ambas as frações foram normalizadas a 133,3 µL em H<sub>2</sub>O:DMSO:FBS 6:3:1 (v:v:v) antes de 120 µL serem aplicados à placa de poço e a intensidade de fluorescência ser medida.

**Microscopia Eletrônica de Transmissão:** As amostras de PNP foram preparadas conforme descrito acima. 5 µL de PNPs suspensos em H<sub>2</sub>O foram aplicados a uma grade de cobre revestida com filme de carbono (400 square mesh, Electron Microscopy Sciences) e secos. A amostra foi corada com 10 µL de 1 % de acetato de uranilo durante um minuto. O excesso de corante foi removido com um papel filtro e subsequentemente aplicado a um Tecnai G 2>Spirit BioTWIN. **Microscopia:** As células fixas foram analisadas em um microscópio invertido Nikon Ti equipado com uma lente objetiva 60x Plan Apo NA 1.4. A fluorescência de DAPI foi excitada com um filtro 360/40 e recolhida como um filtro de emissão 460/50. A fluorescência de Oregon Green foi excitada com 360/40 e recolhida como um filtro de emissão 480/40. A fluorescência de AF568 foi excitada com 545/30 e recolhida como um filtro de emissão 620/60. As imagens foram adquiridas com uma câmara CCD refrigerada Hamamatsu ORCA R2 controlada com software MetaMorph 7. Gama, brilho e contraste foram ajustados em imagens exibidas (de forma idêntica para conjuntos de imagens comparadas) utilizando

o software ImageJ. Secções óticas de série z foram recolhidas com um tamanho de passo de 0,25 micron situando-se na faixa da lâmina de vidro para a PNP mais alta detetável utilizando um motor de foco Prior Proscan II. As amostras observadas após 1 hora e 6 horas de incubação de PNP são projeções de pilhas máximas (mescladas) de AF568 e canais de Oregon Green (OG). As amostras observadas após 24 horas foram obtidas por projeção média de fluorescência de Oregon Green e projeção máxima de pilhas de AF-568. A projeção média de OG foi utilizada para quantificar diferenças em fluorescência de Flutax-2 no citosol. Os perímetros celulares foram segmentados manualmente em imagens de DIC. A máxima de pontos de fluorescência foi extraída por ImageJ (v. 1.43u) utilizando uma tolerância a ruídos de 50 na classe pública MaximumFinder.

***Exemplo 5. Aplicação de nocodazol em células HeLa com uma ou mais formas de realização de nanopartículas de CD3ac***

A Figura 16A mostra uma forma de realização das nanopartículas de CD3ac, em que EGF (opcionalmente marcado com vermelho Texas para propósitos de visualização) é um ligando de alvejamento celular. Tais nanopartículas de CD3ac com EGF como um ligando podem ser absorvidas pelas células, conforme mostrado na Figura 16B. Para produzir grânulos de CD3ac encapsulados com nocodazol, em algumas formas de realização, 21 µM de CD3ac, 2 µg/mL de EGF (marcado com Vermelho Texas para propósito de visualização) e 20 a 40 µM de nocodazol foram dissolvidos em um solvente orgânico (Figura 17A ou 17G). A troca de solvente por água pode resultar na formação de uma emulsão e, dessa forma, nanopartículas

sólidas CD3ac contendo nocodazol e EGF. Em algumas formas de realização, pelo menos uma porção de EGF foi encapsulada em grânulos de CD3ac. Adicionalmente, EGF pode ser adsorvido sobre a superfície externa das microesferas de CD3ac, resultando em microesferas de CD3ac funcionalizadas com EGF.

Após a incubação de células HeLa em meio contendo tais partículas de CD3ac encapsuladas com duas concentrações diferentes de nocodazol (20  $\mu\text{M}$  ou 40  $\mu\text{M}$ ), imagens microscópicas fluorescentes (Figuras 17B a 17F e 17H a 17K) mostram que as partículas de CD3ac funcionalizadas com EGF foram absorvidas pelas células HeLa e o microtúbulo naquelas células HeLa tratadas com partículas de CD3ac funcionalizadas com EGF foi amplamente despolimerizado. Entretanto, as células HeLa tratadas com o sobrenadante de suspensões de CD3ac pré-incubadas e centrifugadas ainda contêm microtúbulos intactos. Isso indica que nocodazol pode ser aplicado às células pelas partículas de CD3ac funcionalizadas com EGF.

Sem o desejo de se vincular à teoria, a ligação e absorção de microesfera pelas células podem ocorrer através da interação de EGF adsorvido sobre a superfície das partículas de CD3ac com EGFR presente nas células HeLa.

#### ***Exemplo G. Alvejamento de nanopartícula de CD3ac com IgG***

O alvejamento de nanopartículas de CD3ac com IgG pode ser preparado em um procedimento de etapa única conforme descrito no presente documento. A Figura 18A mostra que anticorpos IgG (por exemplo, mas sem se limitar a, IgG

anti-transferrina ou IgG anti-coelho) podem ser absorvidos pela nanopartícula de CD3ac. Além disso, conforme mostrado na Figura 18B, a incubação das nanopartículas de CD3ac funcionalizadas com IgG anti-transferrina com transferrina A-546 gerou sinais de fluorescência (indicados por pontos brancos), indicando que a IgG está presente sobre a superfície de nanopartículas de CD3ac e permite a ligação da IgG com transferrina A-546. De modo similar, a incubação das nanopartículas de CD3ac funcionalizadas com IgG anti-transferrina com um anticorpo secundário (por exemplo, IgG anti-coelho pode ser utilizada se a IgG anti-transferrina estiver elevada em coelhos) também resultou na ligação da IgG presente sobre a superfície de nanopartículas de CD3ac com os anticorpos secundários (indicados por pontos brancos na Figura 18C). É provável que a orientação de IgG na interface das nanopartículas seja isotrópica ("aleatória"), por exemplo, o sítio de ligação ao antígeno e/ou o epítopo para os anticorpos secundários estão expostos e acessíveis.

***Exemplo 7. Aplicação de moléculas de ácido nucleico (por exemplo, ADN ou ARN) por partículas peptídicas (por exemplo, partículas peptídicas de CD3 ou partículas peptídicas mistas que compreendem péptidos CD3ac e CD3)***

A transfeção de ADN/siARN pode ser estabelecida por uma partícula peptídica que é i) carregada e ii) estável. Embora as partículas de CD3ac (sequência peptídica mostrada na Tabela 3) sejam insolúveis em água, as mesmas, em geral, não são carregadas e, portanto, é improvável que se liguem a moléculas de ácido nucleico (por exemplo, ADN ou ARN incluindo, mas sem se limitar a,

siARN). O péptido de CD3 (sequência peptídica mostrada na Tabela 3) contém 4 aminas primárias (3 lisinas + 1 terminação N) que podem ser tanto carregadas como acetiladas.

Para avaliar a eficiência de transfeção celular utilizando-se péptidos CD3, as células HeLa foram incubadas com uma mistura de péptidos CD3 (com uma sequência peptídica mostrada na Tabela 3) e moléculas de ácido nucleico aniónicas (por exemplo, ADN de cadeia simples), ambas dissolvidas no meio de cultura celular em uma razão molar de cerca de 3,7: 1 (CD3: ssDNA). Para visualizar facilmente a presença de ssDNA dentro de uma célula, uma porção do ssDNA adicionada ao meio de cultura celular foi marcada com um marcador detetável (por exemplo, Alexa Fluor 488; AF488). Como mostrado nas Figuras 19A a 19B, a presença de péptidos CD3 no meio de cultura celular resulta em fluorescência aumentada no citosol (Figura 19A), em comparação com o controlo (Figura 19B). Dessa forma, uma mistura de péptidos anfifílicos com carga positivas descritos no presente documento (por exemplo, péptidos CD3) e moléculas de ácido nucleico aniónicas (por exemplo, ADN ou ARN incluindo, mas sem se limitar a, siARN) pode aumentar a eficiência de transfeção de células com moléculas de ácido nucleico, em comparação com a transfeção celular na ausência dos péptidos anfifílicos com carga positivas descritos no presente documento (por exemplo, péptidos CD3). Sem o desejo de se vincular à teoria, devido à estrutura anfifílica e grupos polares catiônicos dos péptidos descritos no presente documento (por exemplo, péptidos CD3), algumas formas de realização dos péptidos anfifílicos descritos no presente documento (por exemplo,

péptidos CD3) podem ser utilizadas como péptidos de penetração celular ou agentes de transfeção celular.

Procurou-se em seguida determinar se os péptidos anfifílicos não acetilados (por exemplo, péptidos CD3) podem se automontar na presença de moléculas de ácido nucleico para formar artigos de péptido contendo ácido nucleico. Para esta finalidade, uma mistura de péptidos CD3, ssDNA, e transferrina foi submetida à eletroforese em agarose (visto que quaisquer partículas peptídicas formadas poderiam ser muito grandes para migração através do gel de agarose). Algum ssDNA na mistura foi marcado para a visualização de seu movimento em gel de agarose, enquanto a transferrina marcada (por exemplo, AF568-Tfn) foi adicionada à mistura de péptido-ácido nucleico para monitorar a presença de partículas peptídicas. (Como anteriormente descrito nos Exemplos 3 a 6, um ligando (por exemplo, transferrina) adicionado a uma mistura peptídica, em geral, se forma sobre a superfície externa das partículas peptídicas). Conforme mostrado na Figura 20A, a co-localização de sinal de Tfn-AF568 e sinal de ssDNA-AF488 na zona de carregamento da agarose após a eletroforese durante cerca de 40 minutos indica que as partículas peptídicas foram formadas a partir da mistura que compreende péptidos CD3 e moléculas de ácido nucleico (por exemplo, AF488-ssDNA) e, dessa forma, eram incapazes de migrar para dentro do gel de agarose ao longo do tempo, enquanto outras moléculas de proteínas em excesso (por exemplo, ssDNA e Tfn) migraram em direção ao ânodo. A eficiência de co-precipitação de péptidos anfifílicos não acetilados (por exemplo, péptidos CD3) e moléculas de ácido nucleico (por exemplo, ssDNA) também foi avaliada e quantificada, por exemplo, por um método de cromatografia

HP-WAX (troca aniónica fraca). por exemplo, os péptidos CD3 e ssDNA foram co-precipitados para formar partículas peptídicas contendo ssDNA antes da centrifugação e separação de sobrenadante e pélete, ambos os quais foram, então, submetidos a uma máquina de cromatografia HP-WAX. Conforme mostrado na Figura 20B, a maioria dos péptidos CD3 e ssDNA foi detetada no pélete das partículas peptídicas, em comparação às quantidades no sobrenadante, indicando que a formação de partículas peptídicas contendo ssDNA pelo método de co-precipitação é altamente eficiente.

Será observado que uma mistura de péptidos CD3 e moléculas de ácido nucleico pode se automontar para formar partículas estáveis em água pura; entretanto, os mesmos geralmente não são estáveis e se dissolvem, respondendo ao aumento de resistências a sal e temperaturas mais elevadas.

Sem limitação, há dois métodos exemplificadores para reduzir a solubilidade de nanopartículas peptídicas contendo ácido nucleico (por exemplo, ADN ou ARN incluindo siARN). Por exemplo, a primeira abordagem pode implicar uma mistura de péptidos completamente acetilados (por exemplo, CD3ac com uma sequência peptídica conforme mostrado na Tabela 3) e péptidos parcialmente e/ou não acetilados (por exemplo, CD3 com uma sequência peptídica conforme mostrado na Tabela 3) durante a montagem de partícula. Mesmo que CD3 seja solúvel em água, o mesmo pode se co-precipitar com CD3ac. Dessa forma, uma carga líquida da nanopartícula peptídica pode ser facilmente modulada, por exemplo, ao controlar a concentração ou razão molar de péptidos parcialmente e/ou não acetilados

(por exemplo, CD3) e péptidos completamente acetilados (por exemplo, CD3ac). Somente a título de exemplo, mais CD3ac pode aumentar a estabilidade de partícula enquanto mais CD3 pode render capacidades de carregamento superiores para siARN/ADN bem como um maior potencial para penetrar as membranas celulares devido a suas cargas líquidas. O elemento perito na especialidade pode determinar a razão ideal de CD3 para CD3ac em nanopartículas peptídicas mistas para aplicações particulares, por exemplo, aplicação de siARN ou ADN. Em algumas formas de realização, os péptidos parcialmente e/ou não acetilados (por exemplo, CD3) podem estar presentes entre 5 mol % e 50 mol % em nanopartículas peptídicas mistas. Em algumas formas de realização, os péptidos completamente acetilados (por exemplo, CD3ac) podem estar presentes entre 5 mol % e 95 mol % em nanopartículas peptídicas mistas. Em várias formas de realização, a concentração ou razões molares dos péptidos parcialmente e/ou não acetilados (por exemplo, CD3) para péptidos completamente acetilados (por exemplo, CD3ac) pode situar-se na faixa de cerca de 1: 100 a cerca de 50:1; ou de cerca de 1:50 a cerca de 10:1, ou de cerca de 1:20 a cerca de 1:1.

Consequentemente, em algumas formas de realização, uma mistura de péptidos anfifílicos completamente acetilados (por exemplo, péptidos CD3ac), os péptidos anfifílicos parcialmente acetilados ou não acetilados (por exemplo, péptidos CD3) e moléculas de ácido nucleico podem ser preparados para formar partículas peptídicas estáveis contendo moléculas de ácido nucleico (por exemplo, ADN ou ARN incluindo siARN). Por exemplo, para demonstrar a formação de partículas peptídicas contendo ácido nucleico

estáveis em condições fisiológicas, os péptidos CD3ac foram adicionados a uma mistura de péptidos CD3 e ADN de cadeia simples (ssDNA) em uma razão molar de cerca de 11:1,8: 1 (CD3ac: CD3: ssDNA). Foi constatado que a presença de péptidos CD3ac estabiliza as partículas peptídicas contendo ssDNA em condições fisiológicas. Todos os três componentes se co-precipitaram para formar partículas peptídicas contendo ssDNA que eram estáveis na resistência ao sal correspondente.

Em algumas formas de realização, um ligando (por exemplo, transferrina) também pode ser adicionado à mistura que compreende péptidos anfifílicos completamente acetilados (por exemplo, péptidos CD3ac), péptidos anfifílicos parcialmente acetilados ou não acetilados (por exemplo, péptidos CD3), e moléculas de ácido nucleico (por exemplo, ADN ou ARN incluindo siARN) para formar partículas peptídicas estáveis contendo ácido nucleico contra a proteína à qual o ligando se liga (Veja-se, por exemplo, Exemplos 3 a 6 para algumas formas de realização das partículas peptídicas descritas no presente documento para utilização em aplicação direcionada de um agente ativo). Por exemplo, transferrina (Tfn marcada com AF568 para facilidade de visualização por imageamento) foi adicionada à mistura para formar partículas peptídicas estáveis contendo ácido nucleico contra receptores de transferrina presentes sobre a superfície celular. Conforme discutido no Exemplo 3, o ligando (por exemplo, Tfn) está, geralmente, presente sobre a superfície externa das partículas peptídicas.

Para determinar a eficiência de aplicação de partículas peptídicas contendo ácido nucleico a células, as células

HeLa foram incubadas com partículas peptídicas contendo ácido nucleico (por exemplo, formadas a partir de uma mistura de péptidos CD3ac, péptidos CD3 e ssDNA conforme descrito acima). Conforme discutido anteriormente, alguns ssDNA na mistura foram marcados com um marcador detetável (por exemplo, AF488) para facilidade de visualização por imageamento. Além disso, TfN-AF568 foi adicionada para formar partículas peptídicas contendo ácido nucleico como um meio para visualizar as partículas peptídicas formadas. Conforme mostrado na Figura 21, o sinal de fluorescência de TfN-AF568 das partículas peptídicas formadas co-localizadas com o sinal de fluorescência de AF488-ssDNA no citosol, indicando que as partículas peptídicas contendo ssDNA são estáveis em condições fisiológicas e aplicadas às células (por exemplo, células HeLa).

Procurou-se em seguida determinar o efeito de cargas líquidas de artigos peptídicos contendo ácido nucleico sobre sua estabilidade numa condição fisiológica, por exemplo, no sero. Conforme mostrado na Tabela 5 abaixo, as partículas peptídicas estáveis são geralmente formadas quando a razão de cargas catiônicas para cargas aniónicas das partículas peptídicas contendo ácido nucleico está próxima a zero (por exemplo, entre cerca de 5 e cerca de 0, ou entre cerca de 3 e cerca de 0). A razão de carga pode ser ajustada por razões molares de moléculas de ácido nucleico aniónicas (por exemplo, ssDNA), e péptidos anfifílicos catiônicos descritos no presente documento (por exemplo, péptidos anfifílicos parcialmente acetilados ou não acetilados como CD3) em uma mistura de montagem peptídica. Sem o desejo de se vincular à teoria, uma carga líquida negativa de partículas peptídicas (por

exemplo, uma razão entre cargas catiónicas para cargas aniónicas é menor que 1) pode ajudar a impedir a agregação de partículas.

Sem o desejo de se vincular à teoria, embora as cargas líquidas de artigos peptídicos contendo ácido nucleico possam influenciar a estabilidade de partícula em condições fisiológicas, a quantidade de péptidos anfifílicos completamente acetilados (por exemplo, péptidos CD3ac) em relação a péptidos anfifílicos não acetilados (por exemplo, péptidos CD3) também pode contribuir para a estabilidade de partícula. Por exemplo, conforme discutido anteriormente, uma mistura de péptidos anfifílicos não acetilados (por exemplo, péptidos CD3) e moléculas de ácido nucleico pode se automontar para formar partículas; entretanto, as mesmas, em geral, não são estáveis e se dissolvem, respondendo ao aumento de resistências ao sal e temperaturas mais elevadas. Ao contrário, as partículas peptídicas formadas de péptidos anfifílicos completamente acetilados (por exemplo, péptidos CD3ac) são mais estáveis. Consequentemente, o aumento da razão molar de péptidos anfifílicos completamente acetilados (por exemplo, CD3ac) para péptidos anfifílicos não acetilados (por exemplo, CD3) pode aumentar a estabilidade das partículas peptídicas resultantes numa condição fisiológica, por exemplo, no soro, que está de acordo com os dados mostrados na Tabela 5.

*Tabela 5. Efeitos de razões de carga (ou razões molares) em uma mistura peptídica sobre a estabilidade de partículas peptídicas resultantes no soro*

A <b>composição</b> de mistura de montagem peptídica	Razão molar (ssDNA: CD3ac: CD3)	Razão de carga <b>(catião: anião)</b>	Estabilidade no soro
CD3 1,23e-04 M	1:200:200	33.065	Menos estável
CD3ac 1,23e-04 M			
ssDNA 6,20e-07 M			
CD3 1,23e-05 M	1:200:20	3,306	Estável
CD3ac 1,23e-04 M			
ssDNA 6,20e-07 M			
CD3M 1,23e-06	1:200:2	0.331	Estável
CD3acM 1,23e-04			
ssDNAM 6,20e-07			

A segunda abordagem para reduzir a solubilidade de nanopartículas peptídicas contendo ADN/siARN pode envolver síntese personalizada de um único péptido com um grau de acetilação, por exemplo, variando de acetilação de pelo menos um grupo amino no segmento de peptidilo hidrofílico do péptido anfifílico descrito no presente documento para concluir a acetilação de todos os grupos amino no segmento de peptidilo hidrofílico do péptido anfifílico descrito no presente documento. Somente a título de exemplo, um péptido anfifílico pode ser sintetizado de forma personalizada com um grau de acetilação entre CD3 e CD3ac. Por exemplo, um péptido anfifílico pode ser sintetizado de forma personalizada com pelo menos um grupo carregado ou não acetilado, por exemplo, na terminação N, incluindo pelo menos dois grupos carregados ou não acetilados ou pelo menos três

grupos carregados ou não acetilados. Numa forma de realização, o péptido anfifílico pode ser desenhado para ser catiónico (por exemplo, para aplicação de siARN ou ADN) ao modular as cargas em direção a ou sobre sua terminação N (por exemplo, com acetilação) para produzir o caráter anfifílico da molécula. Por exemplo, pelo menos um grupo amino (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ou mais grupos amino, dependendo do número de grupos amino presentes no segmento de peptidilo hidrofílico) do segmento de peptidilo hidrofílico do péptido anfifílico descrito pode permanecer não acetilado, e pelo menos um grupo amino (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ou mais grupos amino, dependendo do número de grupos amino presentes no segmento de peptidilo hidrofílico) do segmento de peptidilo hidrofílico do péptido anfifílico descrito pode ser acetilado. Em certas formas de realização, tal péptido anfifílico pode compreender uma sequência de aminoácidos de H-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH<sub>2</sub>. Em algumas formas de realização, tal péptido anfifílico pode compreender uma sequência de aminoácidos de H-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH<sub>2</sub>. Em formas de realização alternativas, o péptido anfifílico pode compreender uma sequência de aminoácidos de H-LK-LK-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH<sub>2</sub>. A razão de grupos amino acetilados para grupos amino não acetilados em um péptido anfifílico pode controlar as propriedades catiónicas e aniónicas dos péptidos anfifílicos descritos no presente documento. Em algumas formas de realização, a razão de grupos amino acetilados para grupos amino não acetilados em um péptido anfifílico pode ser menor que 1, cerca de 1, ou maior que 1.

***Exemplo 8. Estabilidade de partículas peptídicas contendo ácido nucleico (por exemplo, partículas peptídicas CD3 ou partículas peptídicas mistas que compreendem péptidos CD3ac e CD3)***

A estabilidade de partículas peptídicas CD3 contendo ácido nucleico foi caracterizada em água pura. Abaixo é uma formulação de partícula peptídica CD3 exemplificadora que compreende adicionalmente moléculas de ácido nucleico (por exemplo, ssDNA) e um ligando (por exemplo, transferrina, Tf<sub>n</sub>):

Formulação De Partícula Peptídica 1 (CD3 + ssDNA + Tf<sub>n</sub>)

21 µM CD3 (H-LK-LK-LK-LW-DL-LW-DL-LW-DL-NH<sub>2</sub>)<sup>4+</sup>

5,4 µM (5'-TTGTGCCGCCTTGCAGGTGTATC-3')<sup>24-</sup>

0,24 µM (AF488-5'-TTGTGCCGCCTTGCAGGTGTATC-3')<sup>24-</sup>

4,14 ug/mL de Tf<sub>n</sub>-AF568

Para avaliar a estabilidade de partículas peptídicas formadas a partir da formulação 1 (PNP1) em água, uma amostra das partículas peptídicas PNP1 foi agitada em um tubo eppendorf durante cerca de 15 minutos, cada, aproximadamente à temperatura ambiente ou a cerca de 37 °C. A amostra de PNP1 foi, então, centrifugada para girar as partículas peptídicas e o sobrenadante foi recolhido para análise adicional. A concentração de Tf<sub>n</sub>-AF568 no sobrenadante foi medida e quantificada por intensidade de fluorescência. Conforme mostrado na Figura 22A, uma concentração maior de Tf<sub>n</sub>-AF568 foi detetada no sobrenadante da amostra de PNP1 agitada a uma temperatura de cerca de 37 °C do que aproximadamente à temperatura ambiente, indicando que a estabilidade de partículas de PNP1 em água é dependente de temperatura e mais

partículas de PNP1 tendem a se dissociar a uma temperatura mais elevada, dessa forma, libertando uma quantidade maior de Tf<sub>n</sub>-AF568 no sobrenadante.

Um estudo de curso do tempo da estabilidade de PNP1 em água também foi realizado. As amostras das partículas de PNP1 foram agitadas em tubos eppendorf contendo água a uma temperatura de cerca de 4 °C ou cerca de 37 °C. Em cada ponto de tempo predeterminado (como indicado na Figura 22B), uma amostra de PNP1 foi, então, centrifugada para girar as partículas peptídicas e o sobrenadante foi recolhido para análise adicional. A concentração de Tf<sub>n</sub>-AF568 no sobrenadante foi medida e quantificada por intensidade de fluorescência. Similar à Figura 22A, A Figura 22B mostra que a estabilidade de partículas de PNP1 em água é dependente de temperatura e as partículas de PNP1 tendem a se dissociar mais rápido a uma temperatura mais elevada, por exemplo, a uma temperatura maior que 4 °C.

Procurou-se em seguida comparar a estabilidade de partículas de PNP1 e partículas peptídicas formadas a partir da formulação 2 (PNP2), conforme mostrado abaixo, em meio de cultura celular, por exemplo, contendo cerca de 10% de soro.

Formulação De Partícula Peptídica 2 (CD3ac + CD3 + ssDNA + Tf<sub>n</sub>)

123µM CD3ac (Ac-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH<sub>2</sub>)

21 µM CD3 (H-LK-LK-LK-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH<sub>2</sub>)<sup>4+</sup>

5,4 µM (5'-TTGTGCCGCCTTGCAGGTGTATC-3')<sup>24-</sup>

0,24  $\mu\text{M}$  (AF488-5'-TTGTGCCGCCTTGCAGGTGTATC-3')<sup>24-</sup>

4,14 ug/mL de Tfn-AF568

As células HeLa foram incubadas com partículas PNP1 ou PNP2 durante cerca de 30 minutos a temperaturas de cerca de 4 °C e 37 °C. Visto que as células HeLa, em geral, realizam endocitose mediada por clatrina a cerca de 37 °C, porém não a cerca de 4°C, qualquer Tfn-AF 568 dissolvida no meio será internalizada pelas células. Dessa forma, após a incubação, as células foram fixadas com paraformaldeído para imageamento e deteção da intensidade de fluorescência. Conforme mostrado nos painéis superiores da Figura 22C, um sinal de fluorescência de Tfn-AF568 difuso e mais forte foi detetado no citosol quando as células foram incubadas com as partículas de PNP1 a cerca de 37 °C, em comparação com fluorescência de Tfn-AF568 mais pontuada detetada nas células incubadas a cerca de 4 °C. Entretanto, esse contraste não foi observado nas células incubadas com partículas de PNP2, conforme mostrado nos painéis inferiores da Figura 22C. Em vez disso, sinais de fluorescência de Tfn-AF568 pontuados e comparáveis foram observados em ambas as células incubadas a cerca de 4 °C e cerca de 37 °C, na presença das partículas de PNP2. Essas constatações indicam que as partículas de PNP1 tendem a se dissociar a cerca de 37 °C, dessa forma, libertando Tfn-AF568 no meio de cultura, que é, então, internalizada pelas células; embora as partículas de PNP2 pareçam ser mais estáveis no soro (por exemplo, cerca de 10% de soro) a cerca de 37 °C durante pelo menos cerca de 30 minutos, dessa forma, mantendo a maior parte da Tfn-AF568 nas partículas de PNP2 e/ou sobre a superfície das partículas de PNP2.

Comparando-se as células na Figura 22C com o controlo negativo (isto é, células incubadas na presença de ssDNA sem péptidos CD3 ou CD3ac) mostrado na Figura 22D, a intensidade de fluorescência de AF488-ssDNA no controlo negativo é significativamente mais baixa que aquela nas células incubadas com partículas de PNP1 ou PNP2 contendo ssDNA. Isso indica que as partículas de PNP1 ou PNP2 podem ser utilizadas para facilitar a transfeção celular, e aplicar uma molécula de ácido nucleico (por exemplo, ADN ou ARN) a uma célula. É observado que a fluorescência de AF488-ssDNA também foi detetada nas células incubadas na presença de partículas de PNP1 ou PNP2 a cerca de 4 °C. Sem o desejo de se vincular à teoria, embora seja improvável que a transfeção celular na presença de partículas de PNP1 ou PNP2 a cerca de 4 °C seja dependente de TfR (recetor de transferrina), isso é provavelmente causado por transporte passivo através da membrana celular na presença de péptidos CD3 como discutido no Exemplo 7.

#### Referências (para exemplos 1 a 2)

- [1] H. Goesmann, C. Feldmann, Angew. Chem., Int. Ed., 2010, 49, 1362.
- [2] [2a] Y. Kakizawa, R. Nishio, T. Hirano, Y. Koshi, M. Nukiwa, M. Koiwa, J. Michizoe, N. Ida, J. Control Release 142, 8; [2b] K. Kita-Tokarczyk, J. Grumelard, T. Haefele, W. Meier, Polymer 2005, 46, 3540; [2c] L. Zhang, J. M. Chan, F. X. Gu, J.-W. Rhee, A. Z. Wang, A. F. Radovic-Moreno, F. Alexis, R. Langer, O. C. Farokhzad, ACS Nan 2008, 2, 1696; [2d] A. Blanazs, S. P. Armes, A. J. Ryan, Macromol. Rapid Commun. 2009, 30, 267; [2e] T. Smart, H.

Lomas, M. Massignani, M. V. Flores-Merino, L. R. Perez, G. Battaglia, *Nano Today* 2008, 3, 38.

[3] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces: With Applications to Colloidal and Biological Systems*, American Chemical Society, 1985, p. 296.

[4] [4a] S. Rai, R. Paliwal, P. N. Gupta, K. Khatri, A. K. Goyal, B. Vaidya, S. P. Vyas, *Curr. Nanosci.* 2008, 4, 30; [4b] Y. Liu, K. Li, J. Pan, B. Liu, S.-S. Feng, *Biomaterials* 2009, 31, 330.

[5] D. Nishit, M. Samir, *Adv. Funct. Mater.* 2009, 9999, NA-NA.

[6] C. Lo Presti, H. Lomas, M. Massignani, T. Smart, G. Battaglia, *J. Mater. Chem.* 2009, 19, 3576.

[7] U.K. Slotta, S. Rammensee, S. Gorb, T. Scheibel, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2008, 47, 4592.

[8] S. Raman, G. Machaidze, A. Lustig, U. Aebi, P. Burkhard, *Nanomedicine* 2006, 2, 95.

[9] [9a] M. Nigen, C. Gaillard, T. Croguennec, M.-N. Madec, S. Bouhallab, *Biophys. Chem.* 2009, 146, 30; [9b] M. Nigen, T. Croguennec, D. Renard, S. Bouhallab, *Biochemistry* 2007, 46, 1248.

[10] T. E. Rajapaksa, M. Stover-Hamer, X. Fernandez, H. A. Eckelhoefer, D. D. Lo, T. E. Rajapaksa, *J. Control Release* 2009.

- [11] [11a] Q. Sun, S. Cai, B. R. Peterson, Q. Sun, J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 10064. [11b] S. Yang, D. J. Coles, A. Esposito, D. J. Mitchell, I. Toth, R. F. Minchin, S. Yang, J. Controlled Release 2009, 135, 159.
- [12] M. G. Ryadnov, A. Bella, S. Timson, D. N. Woolfson, J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 13240.
- [13] [13a] L. Aulisa, H. Dong, J. D. Hartgerink, Biomacromolecules 2009, 10, 2694; [13b] K. J. Channon, G. L. Devlin, C. E. MacPhee, J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 12520; [13c] J. Ryu, C. B. Park, Angew. Chem., Int. Ed. 2009, 48, 4820, S4820/4821-S4820/ 4826; [13d] H. Dong, S. E. Paramonov, J. D. Hartgerink, J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 13691; [13e] Y. Zimenkov, S. N. Dublin, R. Ni, R. S. Tu, V. Breedveld, R. P. Apkarian, V. P. Conticello, J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 6770.
- [14] Vydac, <http://www.nestgrp.com/pdf/Vapp/AN9802.pdf> 2010.
- [15] [15a] H. M. Redhead, S. S. Davis, L. Illum, J. Controlled Release 2001, 70, 353; [15b] W. Lin, M. C. Garnett, S. S. Davis, E. Schacht, P. Ferruti, L. Illum, J. Controlled Release 2001, 71, 117.
- [16] W. R. Veatch, E. T. Fossel, E. R. Blout, Biochemistry 1974, 13, 5249.
- [17] [17a] D. A. Kelkar, A. Chattopadhyay, Biochim. Biophys. Acta, Biomembr. 2007, 1768, 2011; [17b] R. D. Hotchkiss, R. Dubos, J. Biol. Chem. 1940, 132, 791; [17c] R. D. Hotchkiss, R. Dubos, J. Biol. Chem. 1940, 132, 793.

[18] [18a] D. W. Urry, D. F. Mayers, J. Haider, Biochemistry 1972, 11, 487; [18b] Y. Chen, A. Tucker, B. A. Wallace, J. Mol. Biol. 1996, 264, 757; [18c] D. A. Doyle, B. A. Wallace, J. Mol. Biol. 1997, 266, 963.

[19] [19a] F. Heitz, A. Heitz, Y. Trudelle, Biophys. Chem. 1986, 24, 149; [19b] S. V. Sychev, N. A. Nevskaya, S. Iordanov, E. N. Shepel, A. I. Miroshnikov, V. T. Ivanov, Bioorg. Chem. 1980, 9, 121.

[20] L. Eidenschink, B. L. Kier, K. N. L. Huggins, N. H. Andersen, Proteins: Struct., Funct., Bioinf. 2009, 75, 308.

Referências (para exemplos 3 a 4)

- (1) Multifunctional nanocarriers. Adv Drug Deliv 58, 1532-1555 (2006).
- (2) Stark. Nanoparticles in Biological Systems. Angew Chem Int Ed, n-a, doi: 10.1002/anie.200906684 (2011).
- (3) Soussan, E., Cassel, S., Blanzat, M. & Rico-Lattes, I. Drug delivery by soft matter: matrix and vesicular carriers. ACIE 48, 274-288, doi:10.1002/anie.200802453 (2009).
- (4) Nel, A. E. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. Nat Mater 8, 543-557, doi:10.1038/nmat2442 (2009).
- (5) Dittrich, C. & Meier, W. Solid Peptide Nanoparticles: Structural Characterization and Quantification of Cargo

Encapsulation. *Macromolecular Bioscience* 10, 1406–1415, doi:10.1002/mabi.201000221 (2010).

(6) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am* 85, 2149–2154, doi:10.1021/ja00897a025 (1963).

(7) Nilsson, B. L., Soellner, M. B. & Raines, R. T. Chemical synthesis of proteins. *Annu Rev Bioph Biom* 34, 91–118, doi:10.1146/annurev.biophys.34.040204.144700 (2005).

(8) Sitnikova, N. L., Sprik, R., Wegdam, G. & Eiser, E. Spontaneously formed trans-anethol/water/alcohol emulsions: mechanism of formation and stability. *LAGMUIR* 21, 7083–7089, doi:10.1021/la0468161 (2005).

(9) Ashley, C. E. et al. The targeted delivery of multicomponent cargos to cancer cells by nanoporous particle-supported lipid bilayers. *Nature*, doi:10.1038/nmat2992 (2011).

(10) Monopoli, M. P. et al. Physical-Chemical Aspects of Protein Corona: Relevance to in Vitro and in Vivo Biological Impacts of Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 2525–2534, doi:10.1021/ja107583h (2011).

(11) Ehrlich, M. et al. Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *CEL* 118, 591–605, doi:10.1016/j.cell.2004.08.017 (2004).

(12) MacGillivray, R. T. A. et al. Two High-Resolution Crystal Structures of the Recombinant N-Lobe of Human

Transferrin Reveal a Structural Change Implicated in Iron Release. Biochemistry 37, 7919-7928, doi:10.1021/bi980355j (1998).

(13) Min, Y., Akbulut, M., Kristiansen, K., Golan, Y. & Israelachvili, J. The role of interparticle and external forces in nanoparticle assembly. Nat. Mater. 7, 527-538, doi:10.1038/nmat2206 (2008).

(14) Fleck, C. C. & Netz, R. R. Electrostatic colloid-membrane binding. Europhys. Lett. 67, 314-320, doi:10.1209/epl/i2004-10068-x (2004).

(15) Dagastine, R. R. et al. Dynamic Forces Between Two Deformable Oil Droplets in Water. Science (Washington, DC, United States) 313, 210-213, doi:10.1126/science.1125527 (2006).

(16) McGraw, T. E., Greenfield, L. & Maxfield, F. R. Functional expression of the human transferrin receptor cADN in Chinese hamster ovary cells deficient in endogenous transferrin receptor. JCB 105, 207-214, doi:10.2307/1612534 (1987).

(17) Parhi, P., Golas, A., Bamthip, N., Noh, H. & Vogler, E. A. Volumetric interpretation of protein adsorption: Capacity scaling with adsorbate molecular weight and adsorbent surface energy. Biomaterials 30, 6814-6824, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.005 (2009).

(18) Harding, C., Heuser, J. & Stahl, P. Recetor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin recetor in rat reticulocytes. JCB 97, 329-

339, doi:10.2307/1610388 (1983).

(19) Lillo, M. P., Cañadas, O., Dale, R. E. & Acuña, A. U. Location and properties of the taxol binding center in microtubules: a picosecond laser study with fluorescent taxoids. *Biochemist* 41, 12436-12449 (2002).

(20) Jordan, M. A. & Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Can* 4, 253-265, doi:10.1038/nrc1317 (2004).

(21) Stewart, K. M., Horton, K. L. & Kelley, S. O. Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine. *Org Biomol Chem* 6, 2242-2255, doi:10.1039/b719950c (2008).

(22) Hyuk, I. S., Jeong, U. & Xia, Y. Polymer hollow particles with controllable holes in their surfaces. *Nat. Mater.* 4, 671-675, doi:10.1038/nmat1448 (2005).

Estas publicações são fornecidas apenas para sua divulgação antes da data de depósito do presente pedido. Nesse sentido, nada pode ser interpretado como uma admissão de que os inventores não estão autorizados a anteceder tal divulgação em virtude da invenção anterior ou por qualquer outro motivo. Todas as declarações quanto à data ou representação quanto aos conteúdos desses documentos estão baseadas em informações disponíveis aos requerentes e não constituem qualquer admissão quanto à exatidão das datas ou conteúdos desses documentos.

## REIVINDICAÇÕES

1. Uma partícula peptídica que compreende um péptido anfifílico, sendo que o péptido anfifílico compreende um segmento de peptidilo hidrofóbico e um segmento de peptidilo hidrofílico,

em que o segmento de peptidilo hidrofóbico consiste essencialmente numa sequência de aminoácidos de (Trp-Leu)<sub>m</sub>-(Trp)<sub>n</sub> ou (Leu-Trp)<sub>p</sub>-(Leu)<sub>q</sub>, em que cada Trp é D-Trp ou L-Trp e cada Leu é D-Leu ou L-Leu, m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 5, e n e q são, independentemente, 0 ou 1, desde que quando Trp for D-Trp, então Leu seja L-Leu, e quando Trp for L-Trp, então Leu seja D-Leu, ou vice-versa; e

em que o segmento de peptidilo hidrofílico consiste essencialmente numa sequência de aminoácidos de (Lys)<sub>r</sub>, em que r é um número inteiro de 1 a 15, e

em que a partícula peptídica compreende adicionalmente sobre a sua superfície externa um ligando para se ligar a uma célula alvo.

2. A partícula peptídica de acordo com a reivindicação 1, em que pelo menos um resíduo de Lys do segmento de peptidilo hidrofílico ou o grupo amino da terminação N do péptido anfifílico é acetilado.

3. A partícula peptídica de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 2, em que o péptido anfifílico compreende a sequência de aminoácidos de (L-Lys)-(L-Lys)-

(L-Lys) - (L-Trp) - (D-Leu) - (L-Trp) - (D-Leu) - (L-Trp) - (D-Leu) - (L-Trp) - X, em que X está ausente ou NH<sub>2</sub>; opcionalmente em que pelo menos um dos resíduos de L-Lys é acetilado, e/ou o grupo amino da terminação N do péptido anfifílico é acetilado.

4. A partícula peptídica de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, em que o ligando inclui um ligando de recetor de superfície celular ou um anticorpo.

5. A partícula peptídica de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, em que a partícula peptídica compreende uma mistura de um péptido anfifílico completamente acetilado de qualquer das reivindicações 1 a 4, e um péptido anfifílico parcialmente acetilado de qualquer das reivindicações 1 a 4, e opcionalmente um péptido anfifílico não acetilado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

6. A partícula peptídica de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5, que compreende adicionalmente um agente ativo.

7. A partícula peptídica de acordo com a reivindicação 6, para utilização num método de tratamento de um indivíduo por terapêutica, em que o método compreende administrar a partícula peptídica ao indivíduo.

8. A partícula peptídica de acordo com a reivindicação 6, para utilização num método de tratamento de um tecido doente num indivíduo, em que o método compreende administrar a partícula peptídica ao indivíduo e em que a partícula peptídica compreende um agente ativo que

compreende um material radioativo.

9. A partícula peptídica para utilização de acordo com a reivindicação 8, em que o tecido doente é um tumor ou uma malformação arteriovenosa.

10. Utilização *in vitro* da partícula peptídica, de acordo com a reivindicação 6, para aplicação direcionada de um agente ativo.

11. Utilização *in vitro* de uma composição que comprehende um péptido anfifílico com carga positiva como um agente de penetração ou agente de transfeção celular, em que o péptido anfifílico com carga positiva comprehende um segmento de peptidilo hidrofóbico e um segmento de peptidilo hidrofílico,

em que o segmento de peptidilo hidrofóbico comprehende uma sequência de aminoácidos de  $(Trp-Leu)^m-(Trp)^n$  ou  $(Leu-Trp)^p-(Leu)^q$ , em que cada Trp é D-Trp ou L-Trp e cada Leu é D-Leu ou L-Leu, m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 5, e n e q são, independentemente, 0 ou 1, desde que quando Trp for D-Trp, então, Leu seja L-Leu, e quando Trp for L-Trp, então, Leu seja D-Leu, ou vice-versa;

em que o segmento de peptidilo hidrofílico comprehende uma sequência de aminoácidos de  $(Lys)^r$ , em que r é um número inteiro de 1 a 15; e

em que pelo menos um dos resíduos de Lys ou o grupo amino da terminação N do péptido anfifílico não é acetilado; opcionalmente

em que todos os resíduos de Lys ou o grupo amino de terminação N do péptido anfifílico não são acetilados.

12. A utilização *in vitro* de acordo com a reivindicação 11, em que o péptido anfifílico compreende a sequência de aminoácidos de (L-Lys) - (L-Lys) - (L-Lys) - (L-Trp) - (D-Leu) - (L-Trp) - (D-Leu) - (L-Trp) - (D-Leu) - (L-Trp) - X, em que X está ausente ou NH<sub>2</sub>.

13. A utilização *in vitro* de acordo com qualquer das reivindicações 11 a 12, em que a composição compreende adicionalmente uma molécula de ácido nucleico a ser aplicada a uma célula.

14. Uma partícula peptídica que compreende um primeiro péptido anfifílico e um segundo péptido anfifílico, sendo que o primeiro e o segundo péptido anfifílico, cada um, compreende independentemente um segmento de peptidilo hidrofóbico e um segmento de peptidilo hidrofílico, em que o segmento de peptidilo hidrofóbico consiste essencialmente numa sequência de aminoácidos de (Trp-Leu)<sub>m</sub> - (Trp)<sub>n</sub> ou (Leu-Trp)<sub>p</sub> - (Leu)<sub>q</sub>, em que cada Trp é D-Trp ou L-Trp e cada Leu é D-Leu ou L-Leu, m e p são, independentemente, um número inteiro de 1 a 5, e n e q são, independentemente, 0 ou 1, desde que quando Trp for D-Trp, então Leu seja L-Leu, e quando Trp for L-Trp, então Leu seja D-Leu, ou vice-versa;

e

em que o segmento de peptidilo hidrofílico consiste essencialmente numa sequência de aminoácidos de (Lys)<sub>r</sub>, em que r é um número inteiro de 1 a 15, e

em que o grupo amino de terminação N e todos os resíduos de Lys do primeiro péptido anfifílico são acetilados;

e

em que pelo menos o grupo amino de terminação N ou um dos resíduos de Lys do segundo péptido anfifílico não é acetilado; opcionalmente em que nenhum de entre o grupo amino da terminação N e os resíduos de Lys do segundo péptido anfifílico é acetilado.

15. A partícula peptídica de acordo com a reivindicação 14, que compreende adicionalmente um agente ativo; opcionalmente

em que o agente ativo inclui uma molécula de ácido nucleico.

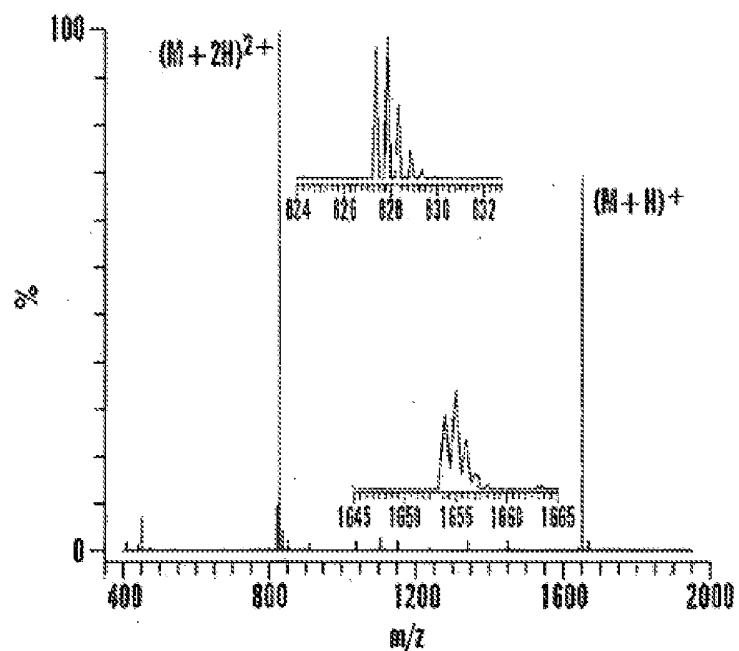
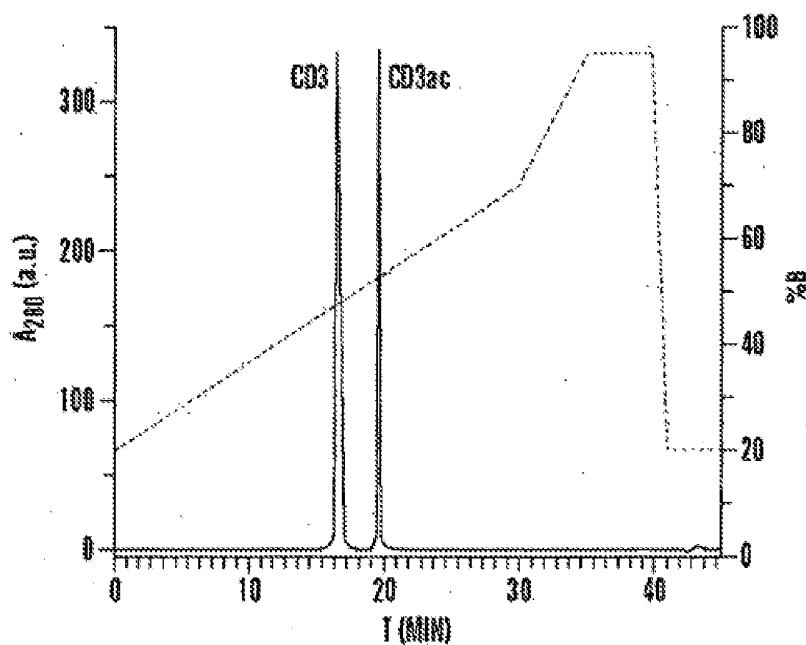
16. A partícula peptídica de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 15, que compreende adicionalmente sobre a sua superfície externa um ligando.

17. A partícula peptídica de acordo com qualquer das reivindicações 14 a 16, em que o primeiro e o segundo péptido anfifílico, cada um, compreende independentemente a sequência de aminoácidos de (L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-X, em que X está ausente ou NH<sub>2</sub>.

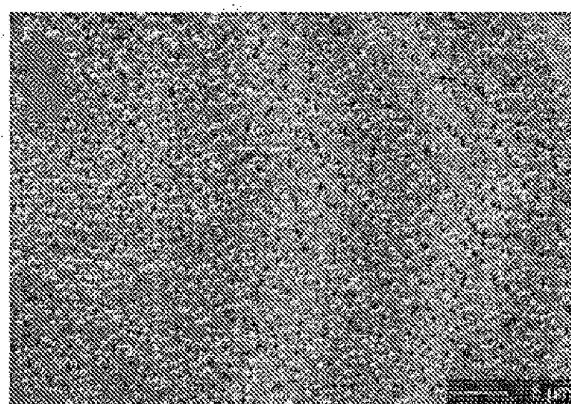
18. Utilização *in vitro* da partícula peptídica de acordo com qualquer das reivindicações 14 a 17, para aplicação de uma molécula de ácido nucleico a uma célula; opcionalmente, em que a molécula de ácido nucleico inclui

siARN, miARN, shARN, ADN, ou qualquer combinação dos mesmos.

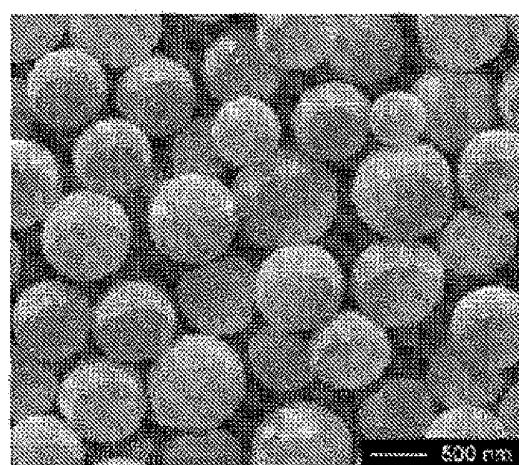
LISBOA, 12 DE JANEIRO DE 2017

**FIG. 1A****FIG. 1B**

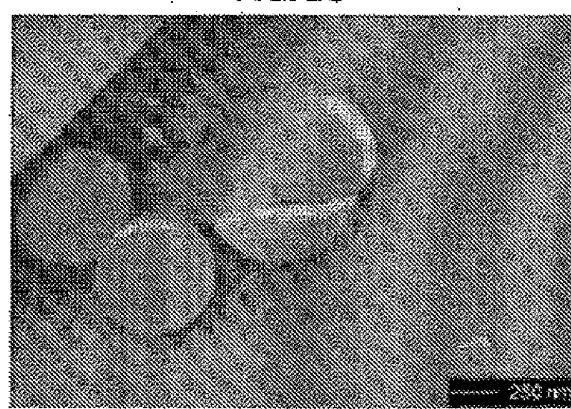
**FIG. 2A**

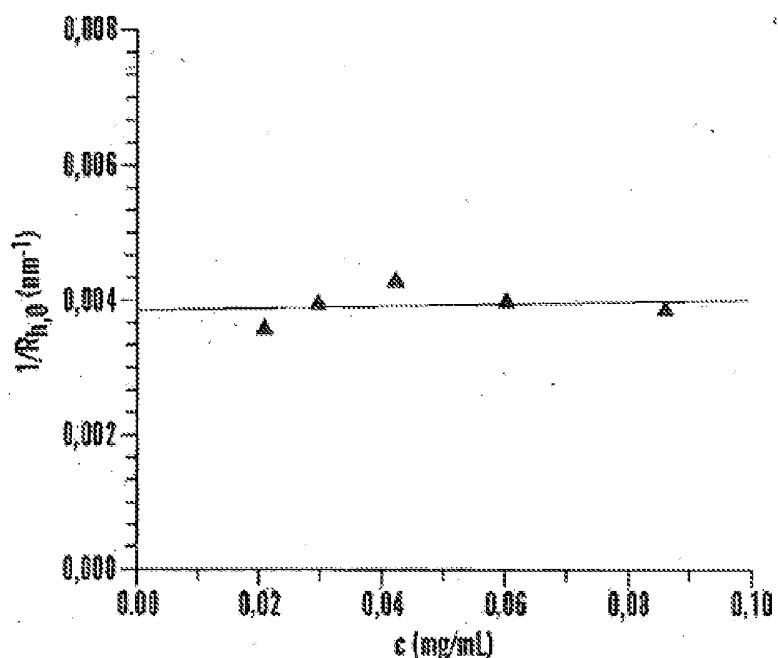
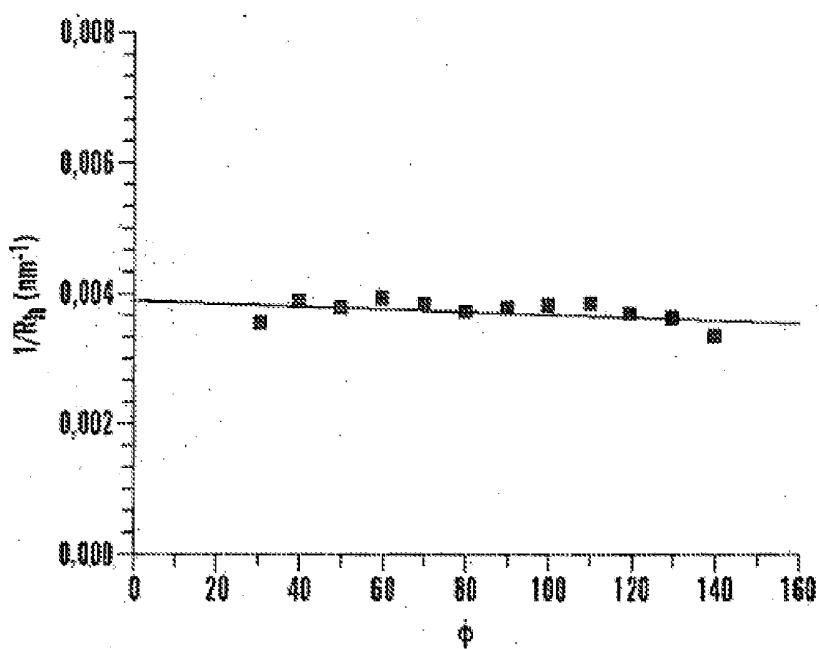


**FIG. 2B**

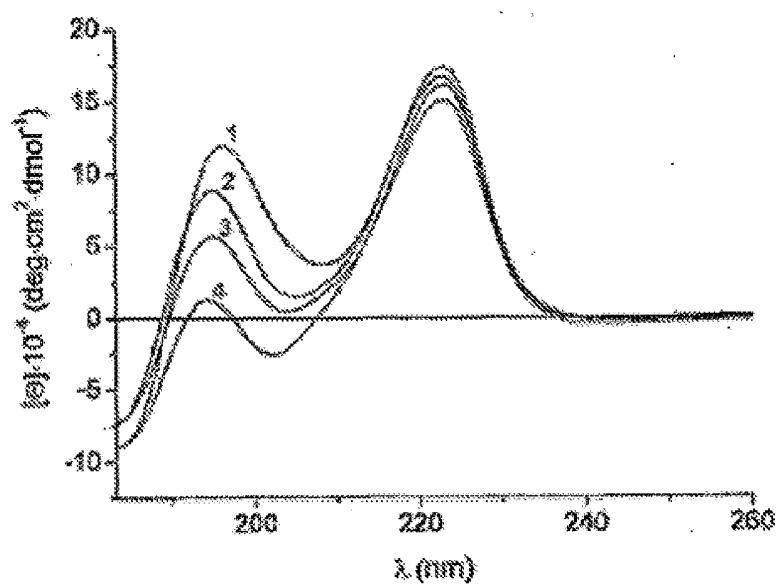


**FIG. 2C**

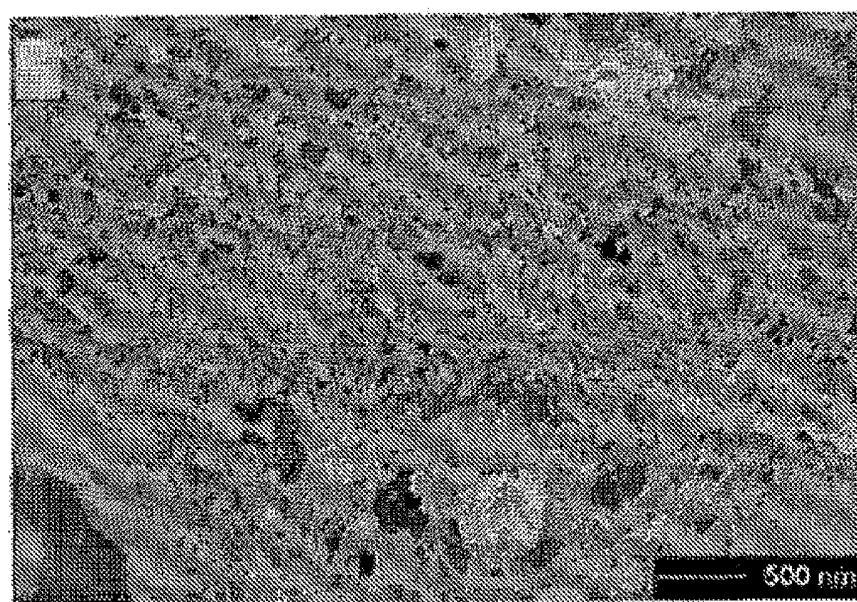


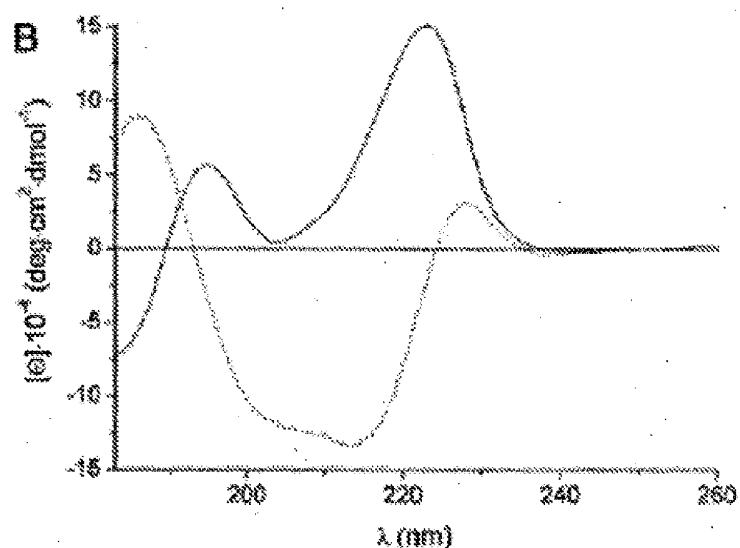
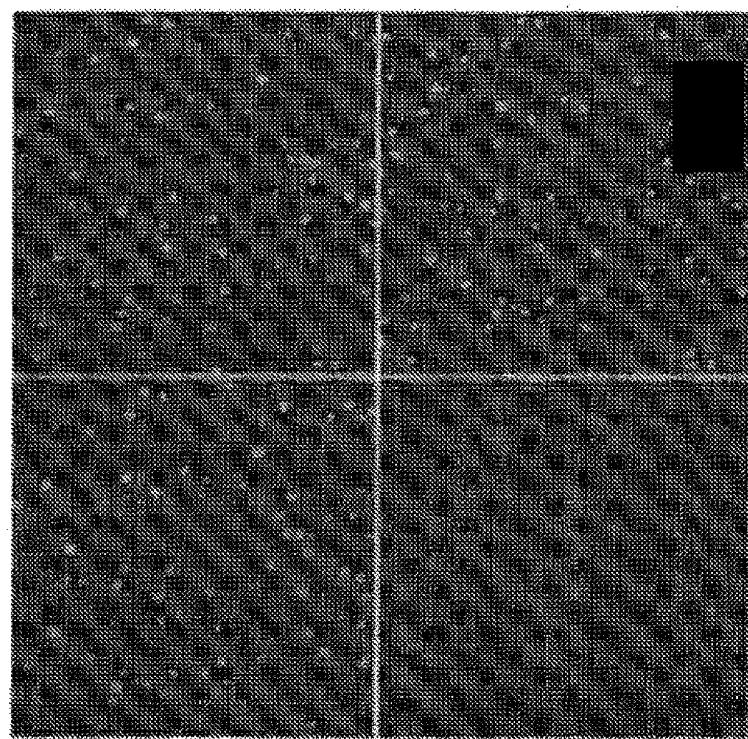
**FIG. 3A****FIG. 3B**

**FIG. 4**

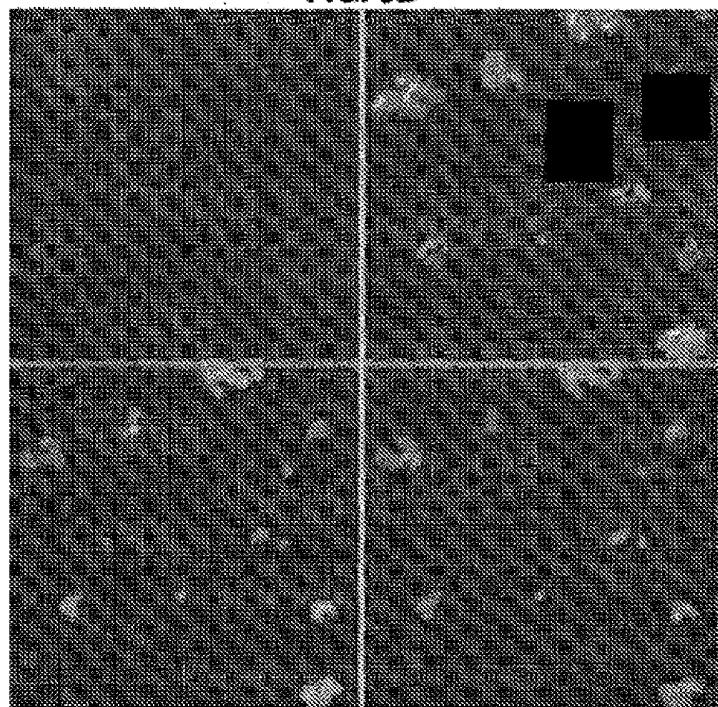


**FIG. 5A**

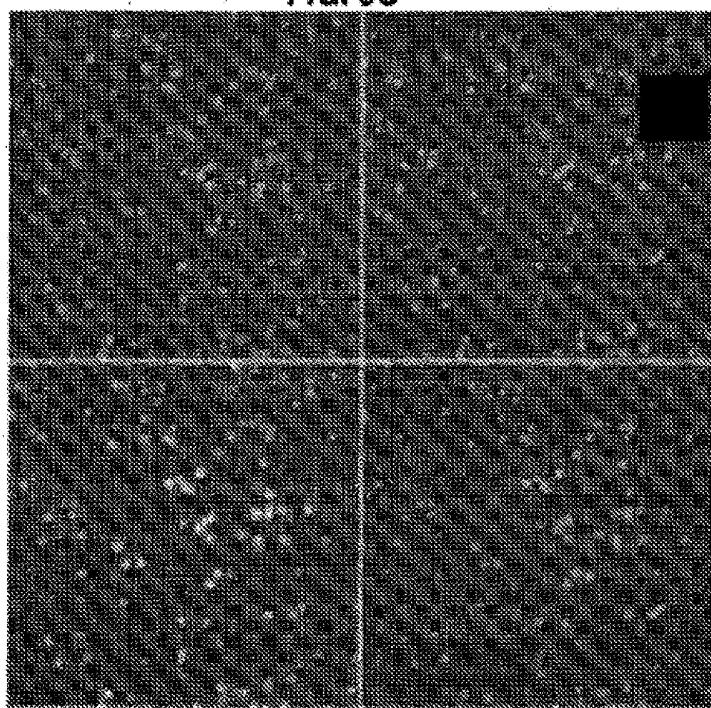


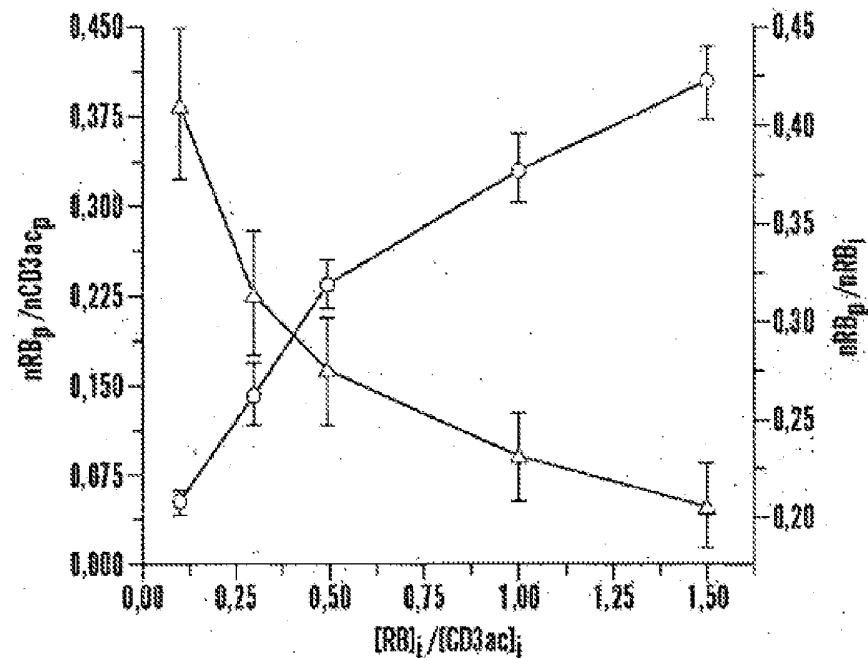
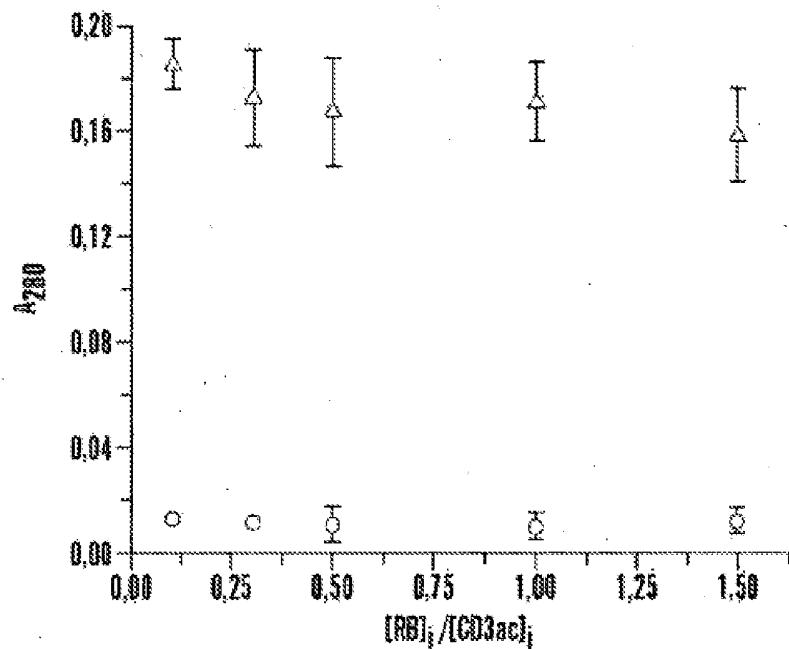
**FIG. 5B****FIG. 6A**

**FIG. 6B**



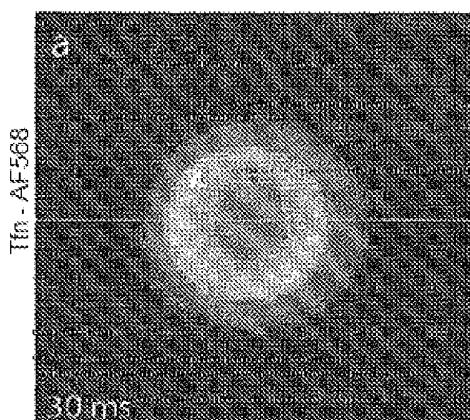
**FIG. 6C**



**FIG. 7A****FIG. 7B**

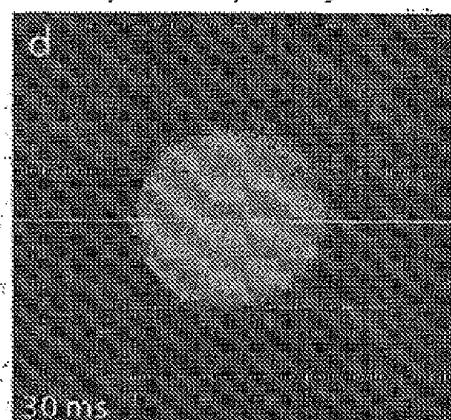
**FIG. 8A**

Antes da tripsinização



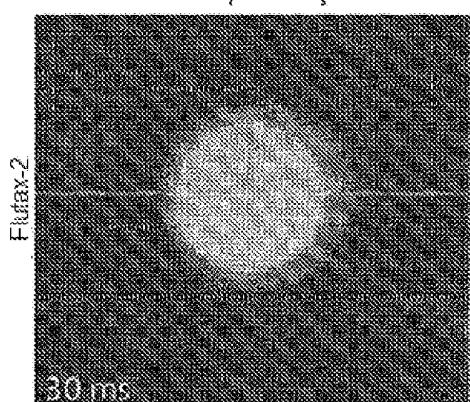
**FIG. 8D**

Depois da tripsinização



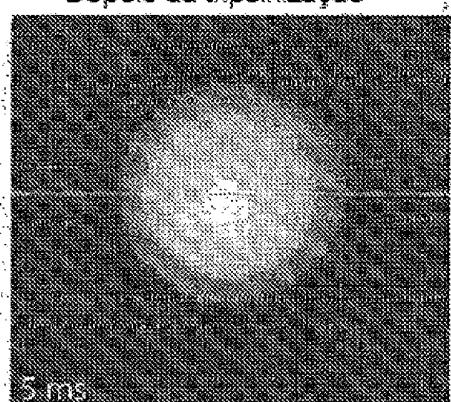
**FIG. 8B**

Antes da tripsinização



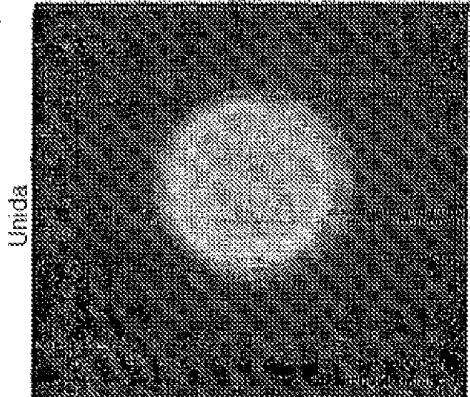
**FIG. 8E**

Depois da tripsinização



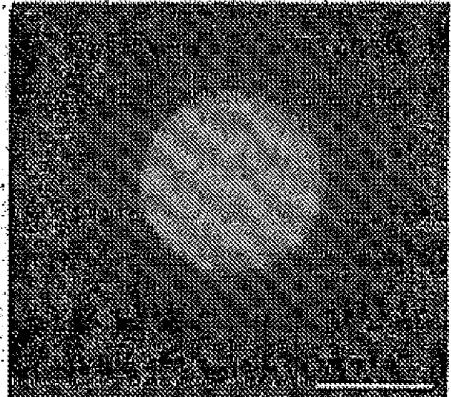
**FIG. 8C**

Antes da tripsinização

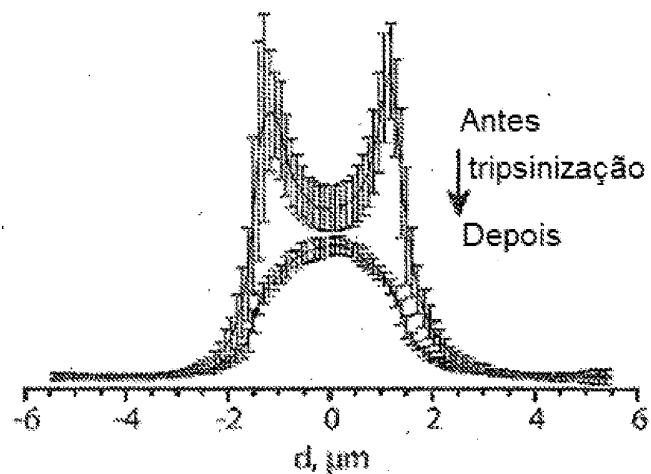


**FIG. 8F**

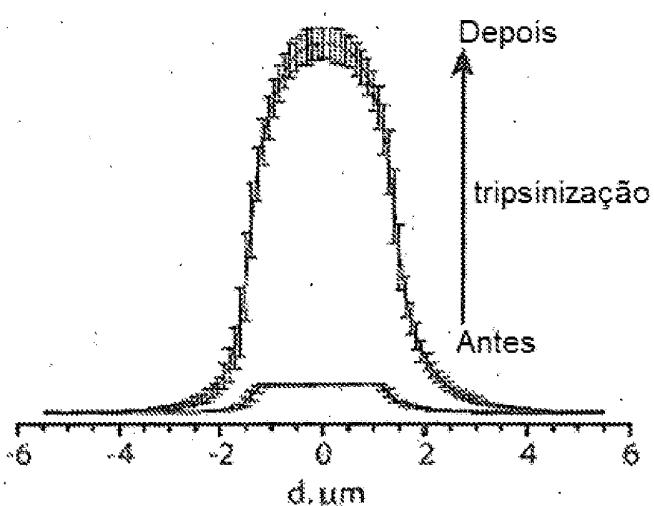
Depois da tripsinização



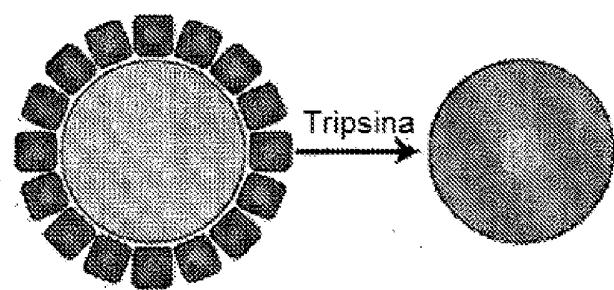
**FIG. 8G**

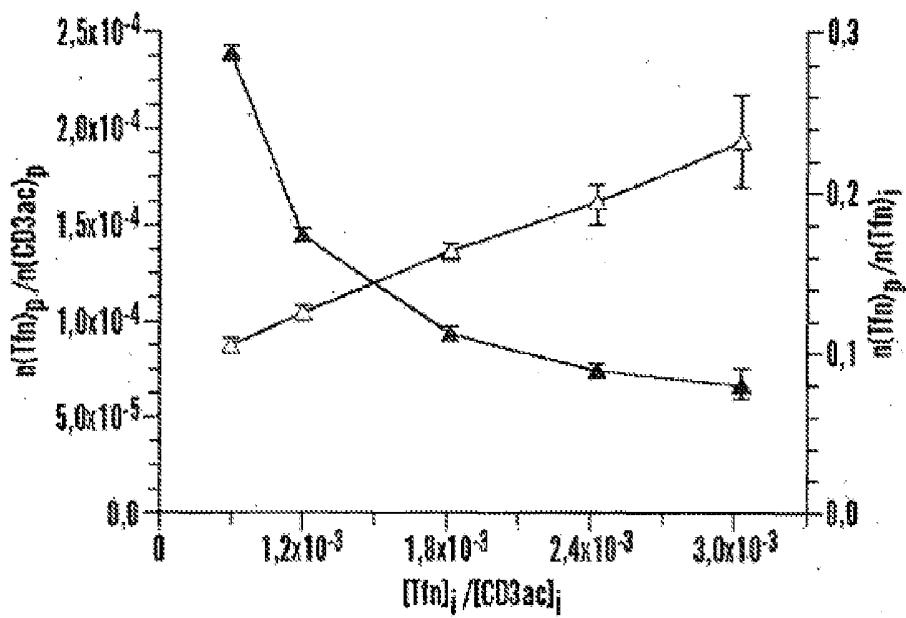
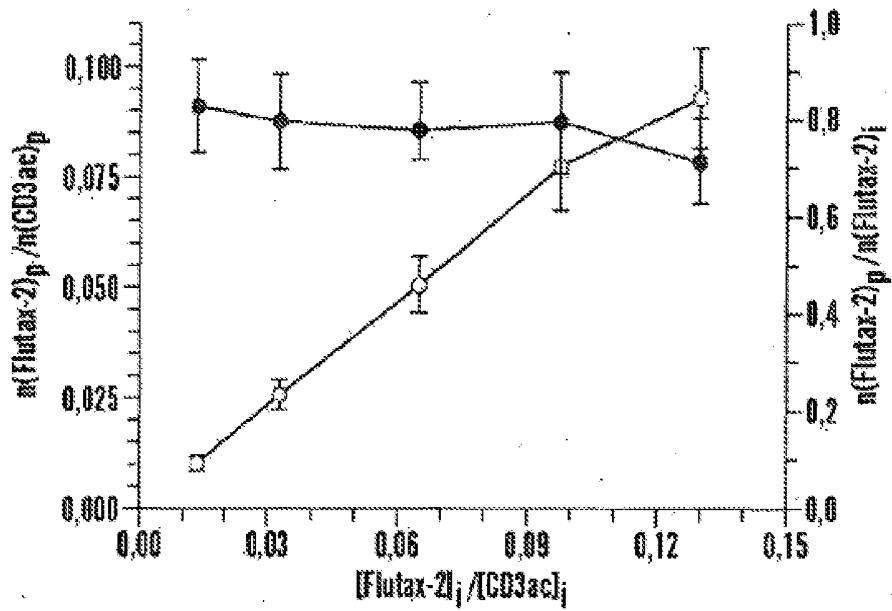


**FIG. 8H**

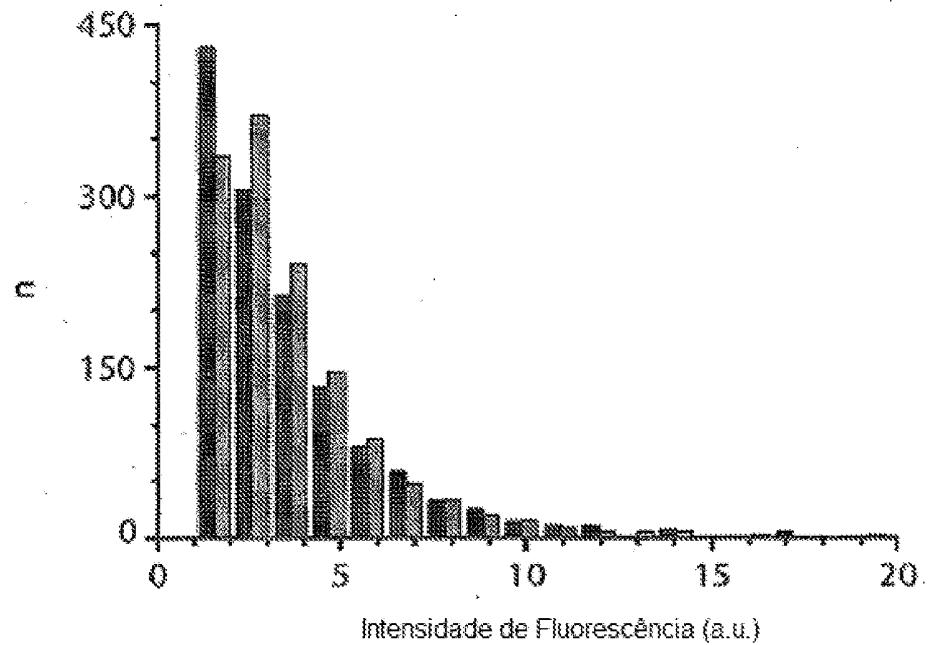


**FIG. 8I**

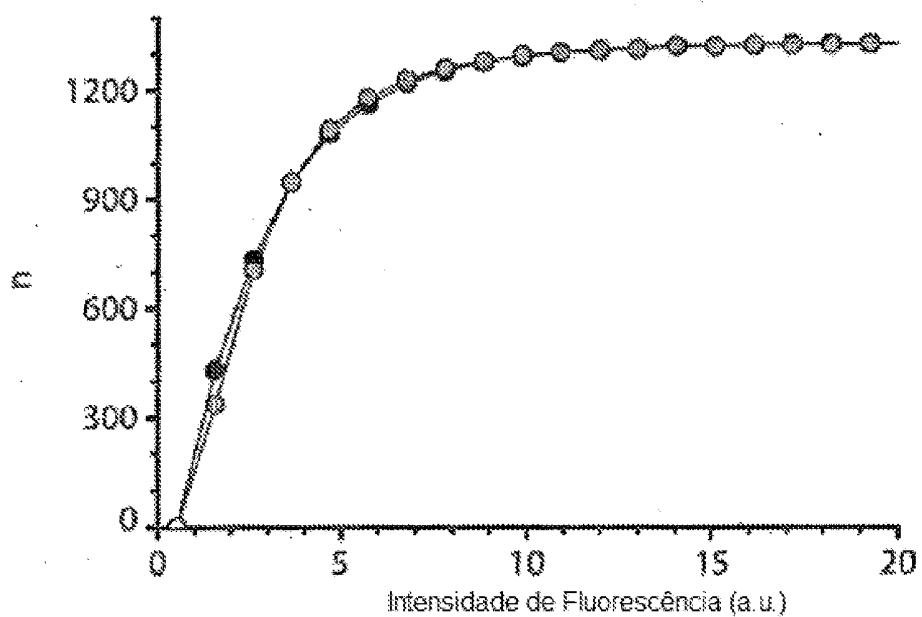


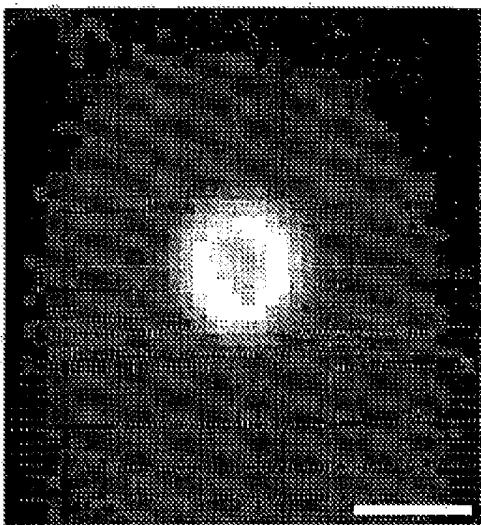
**FIG. 9A****FIG. 9B**

**FIG. 9C**

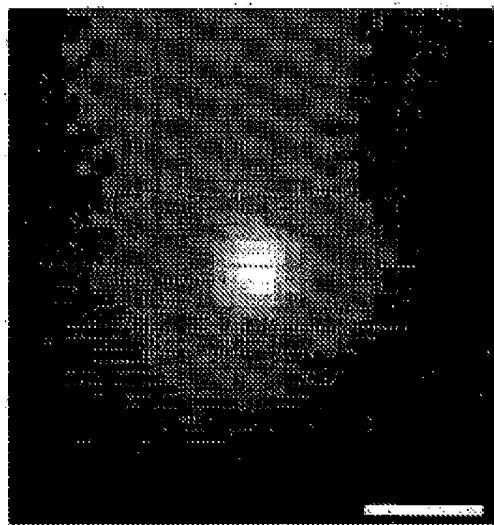


**FIG. 9D**

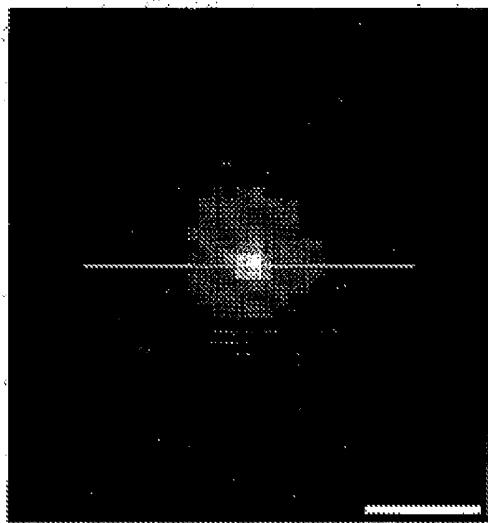




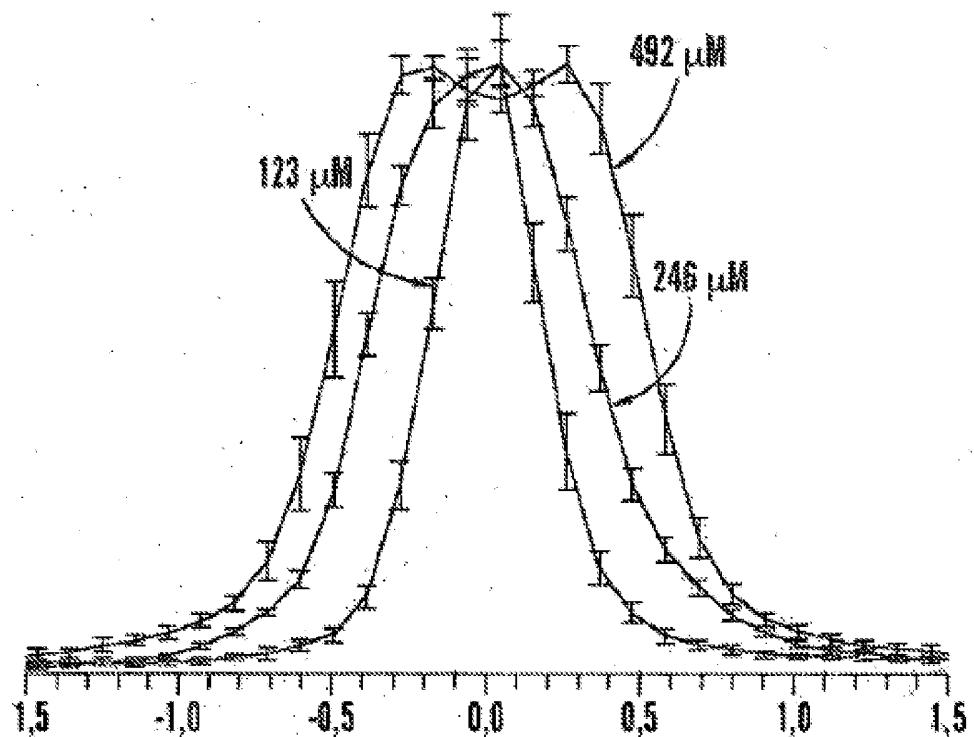
*FIG. 10A*



*FIG. 10B*

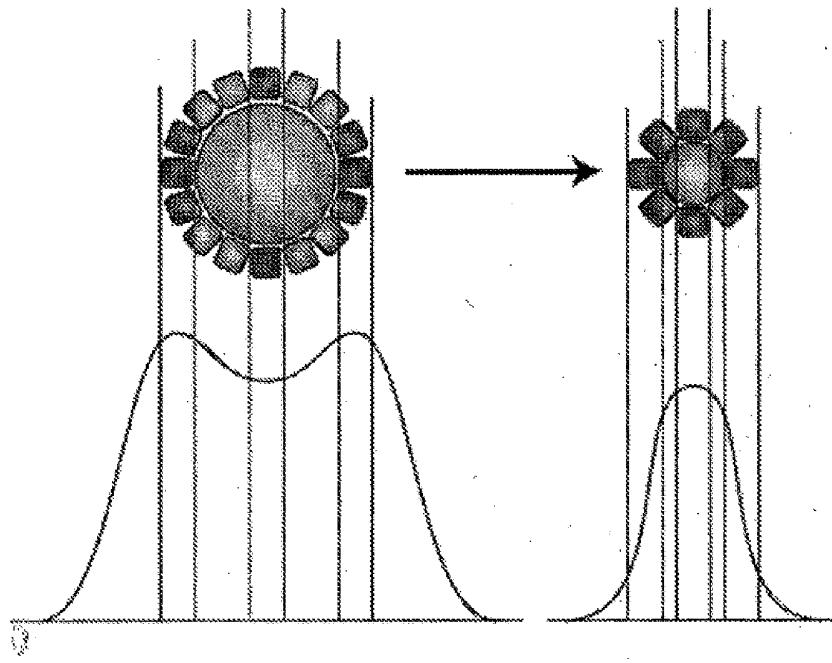


*FIG. 10C*

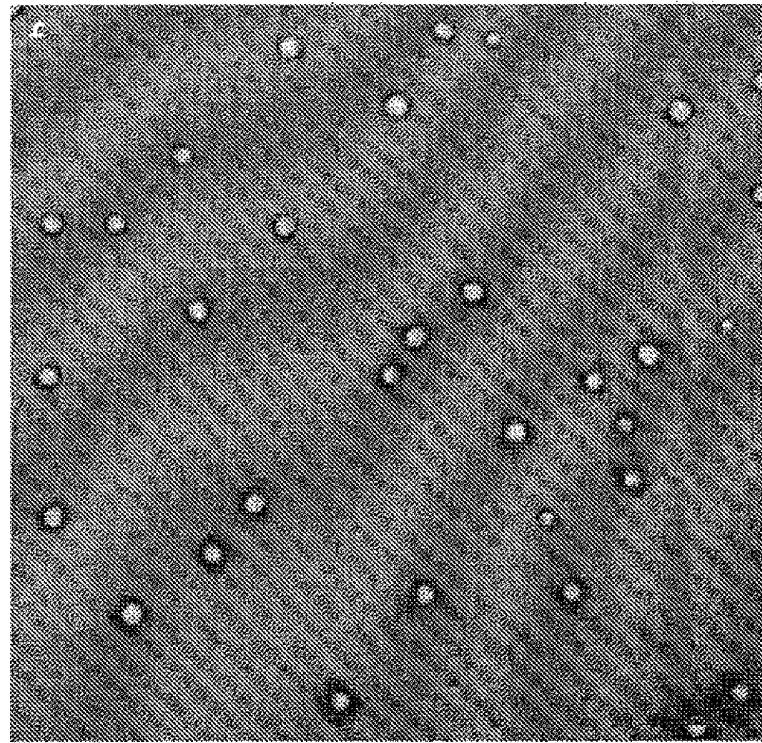


**FIG. 10D**

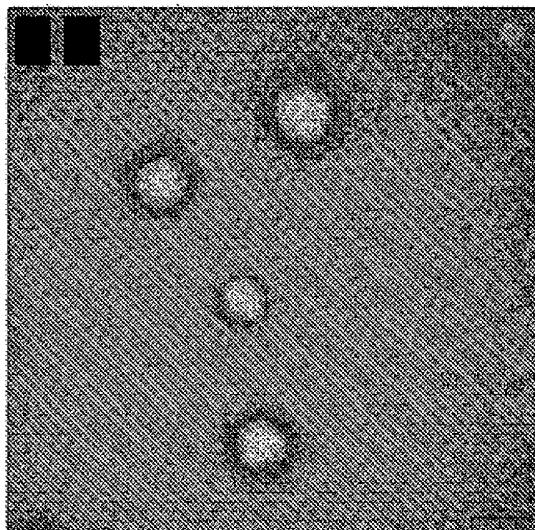
**FIG. 10E**



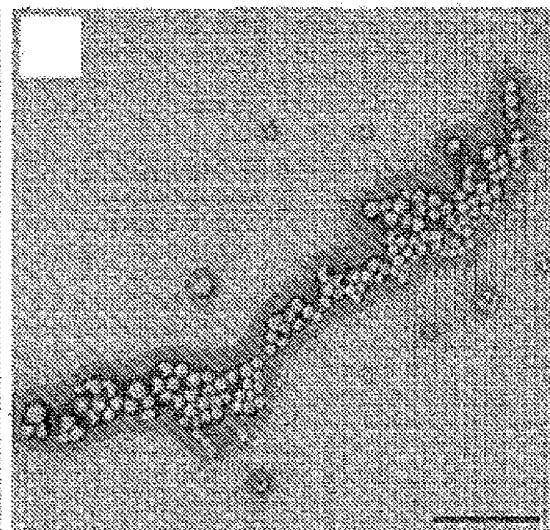
**FIG. 10F**



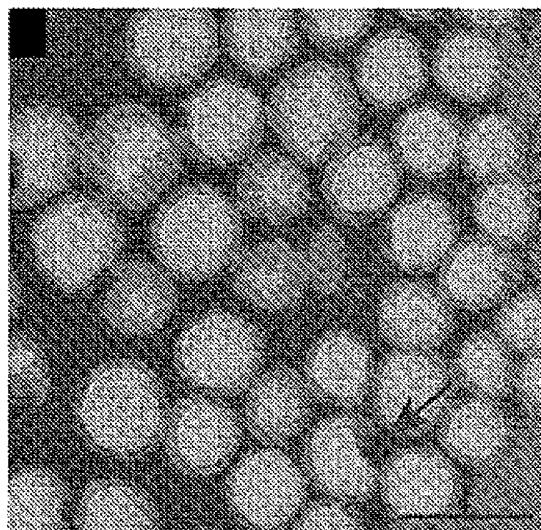
**FIG. 10G**

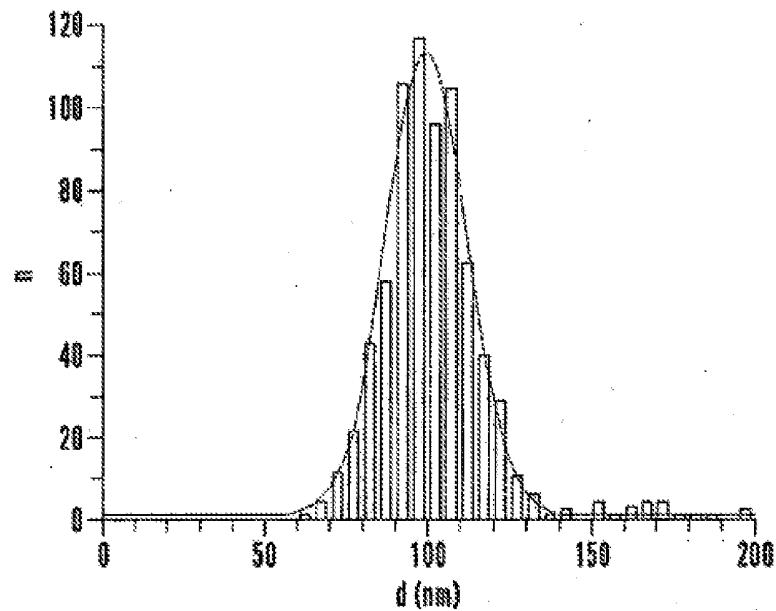


**FIG. 10H**

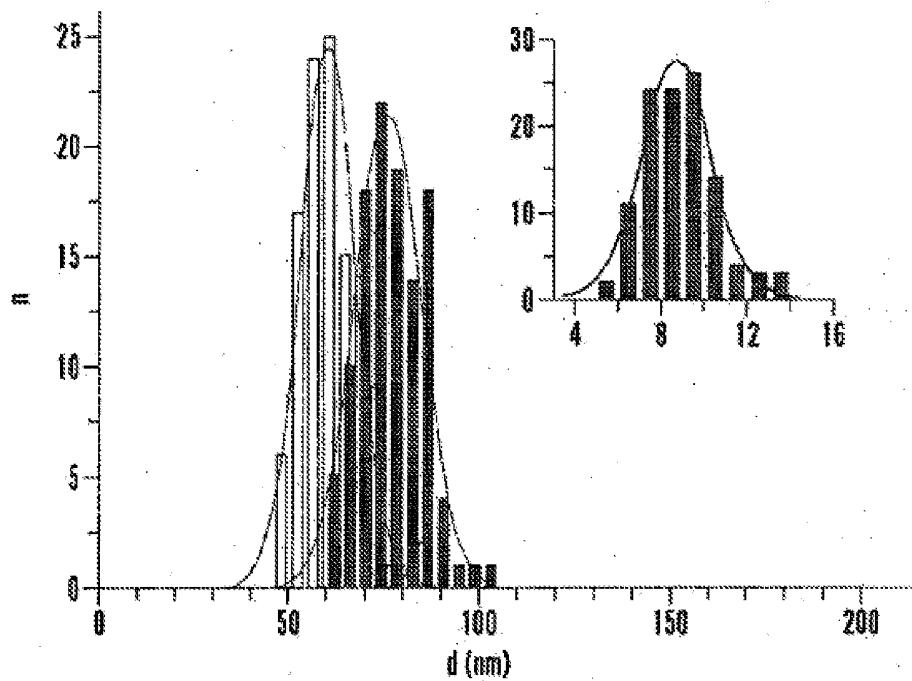


**FIG. 10I**

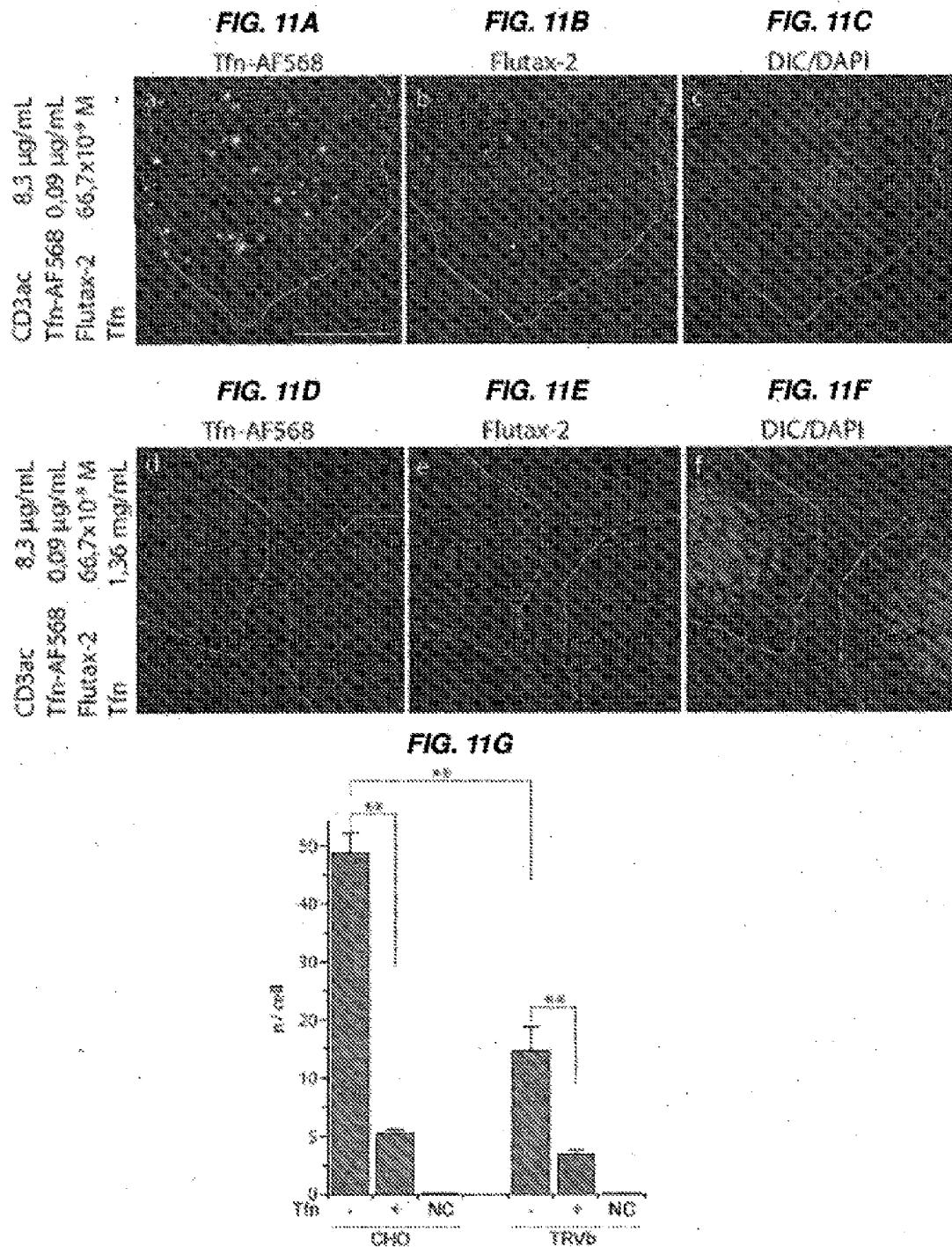


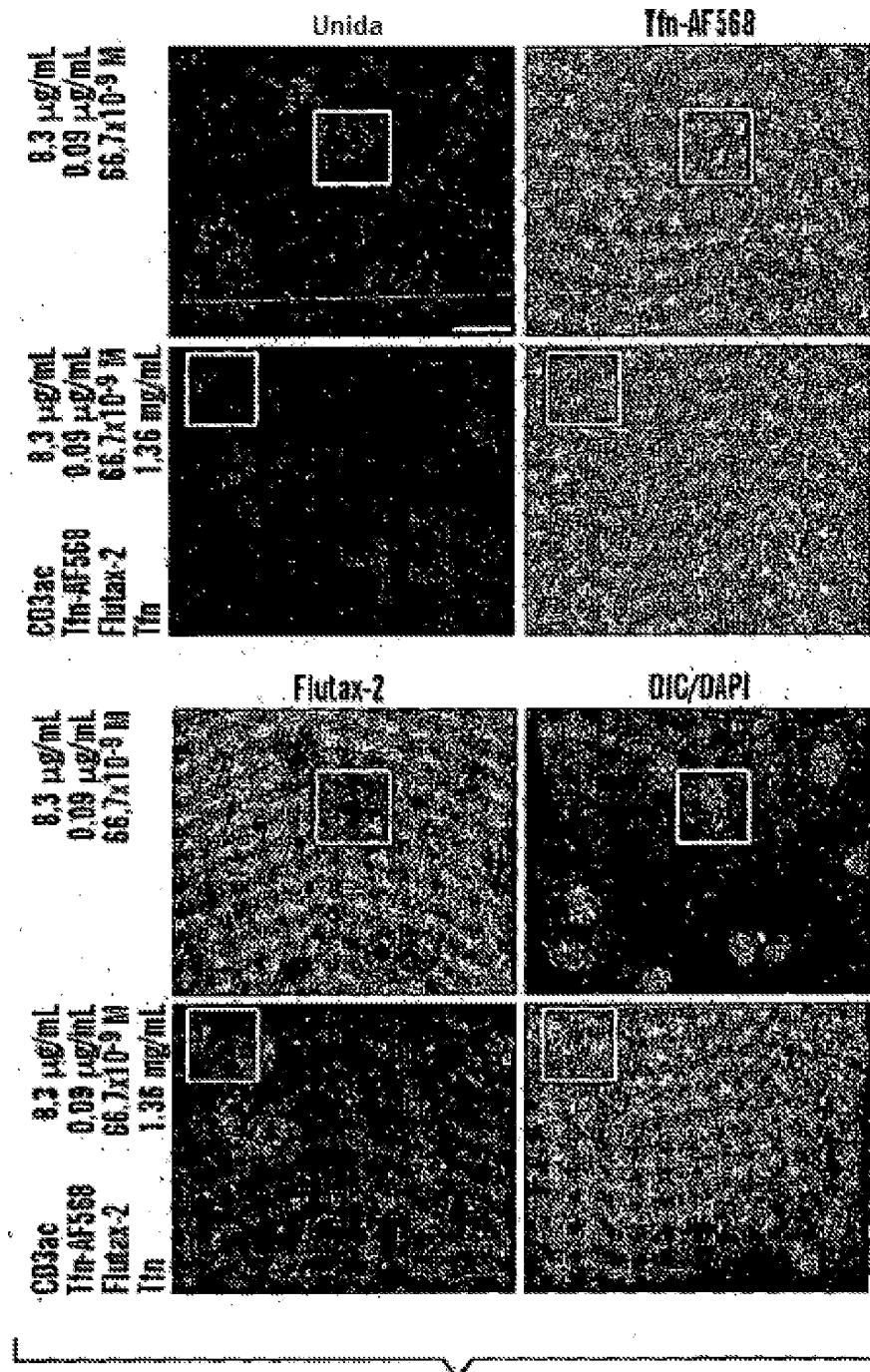


**FIG. 10J**

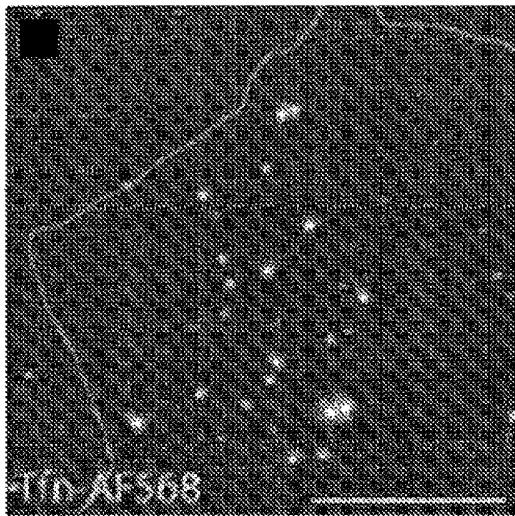


**FIG. 10K**

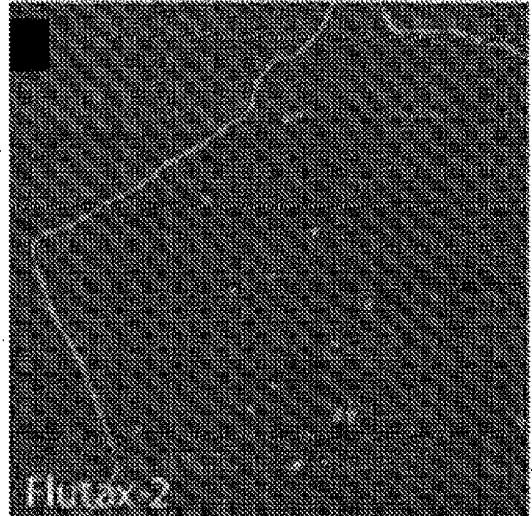


**FIG. 11H**

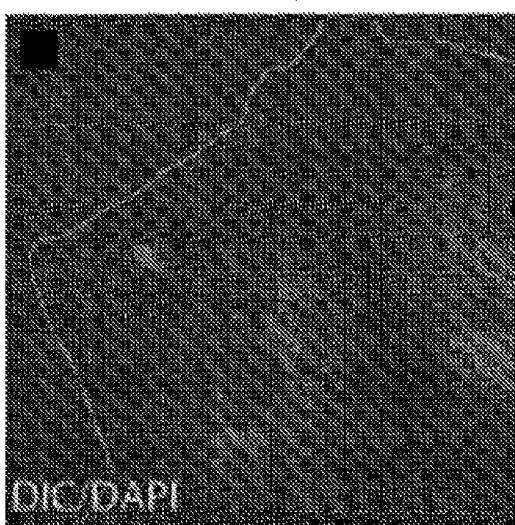
**FIG. 12A**



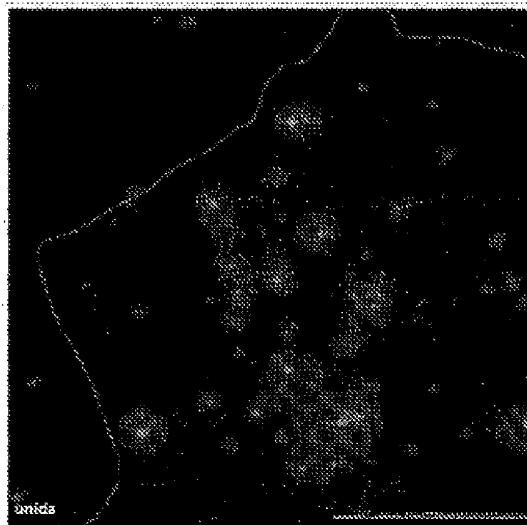
**FIG. 12B**

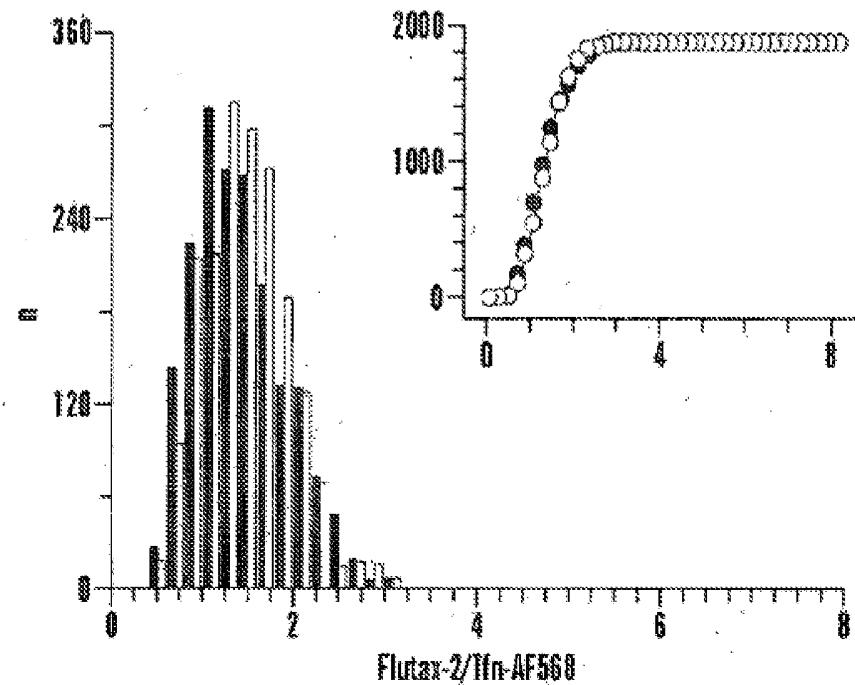


**FIG. 12C**

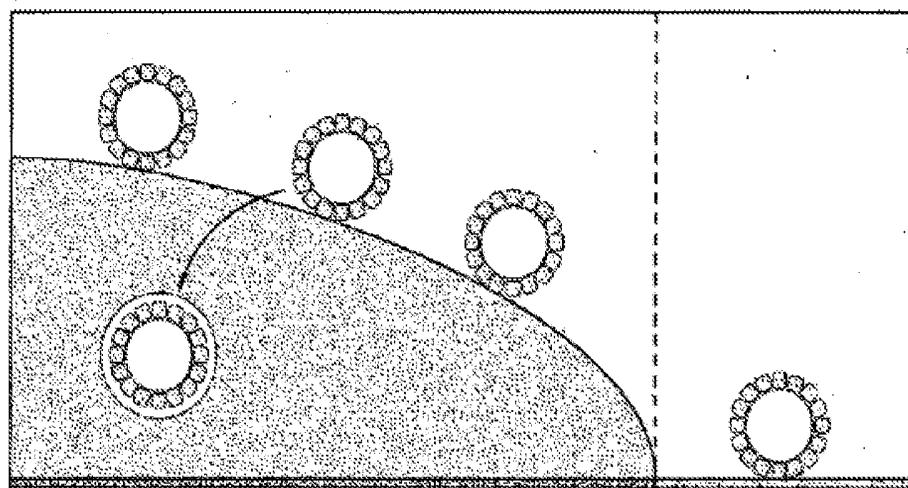


**FIG. 12D**



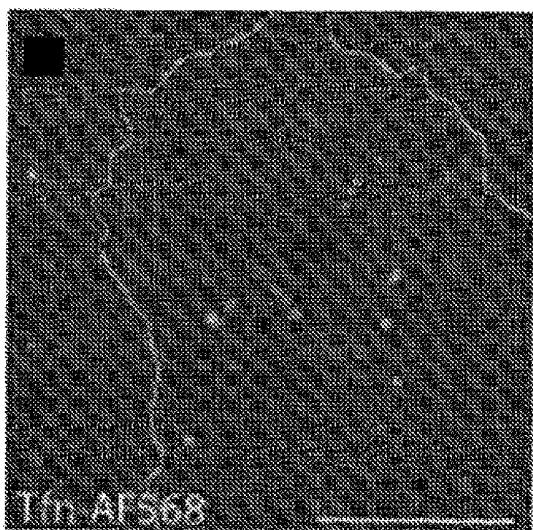


**FIG. 12E**



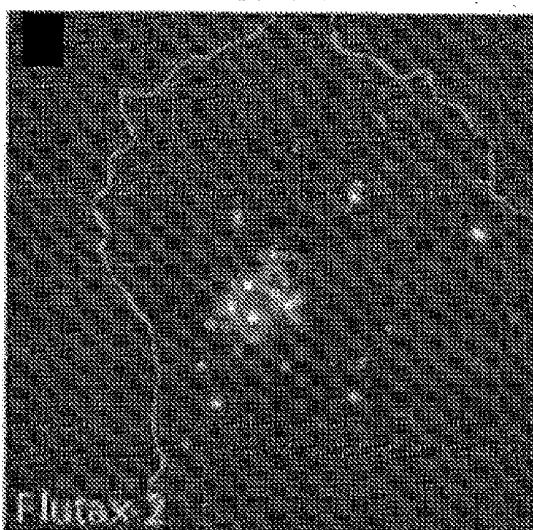
**FIG. 12F**

**FIG. 12G**



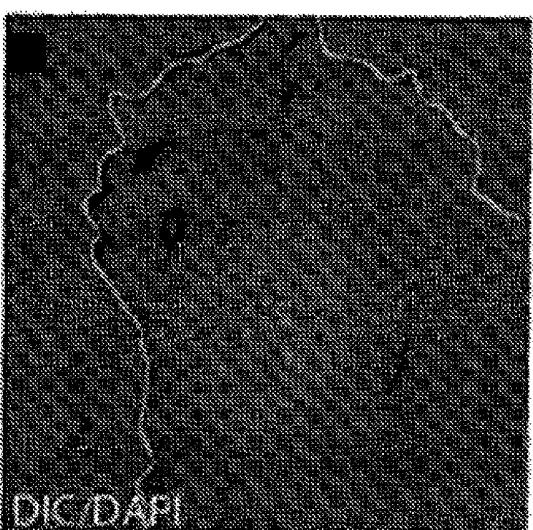
100x AFS/20

**FIG. 12H**



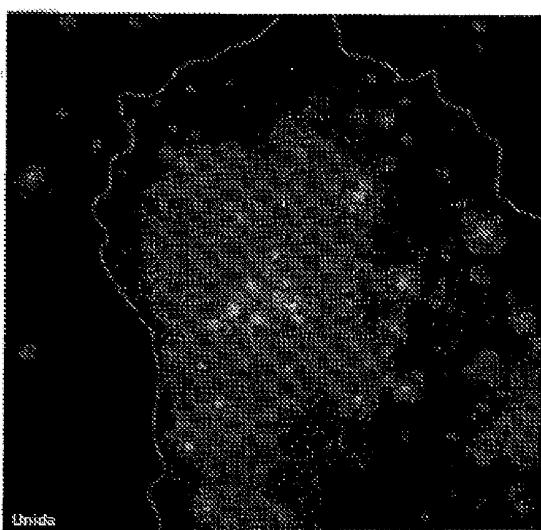
Fluorescence

**FIG. 12I**

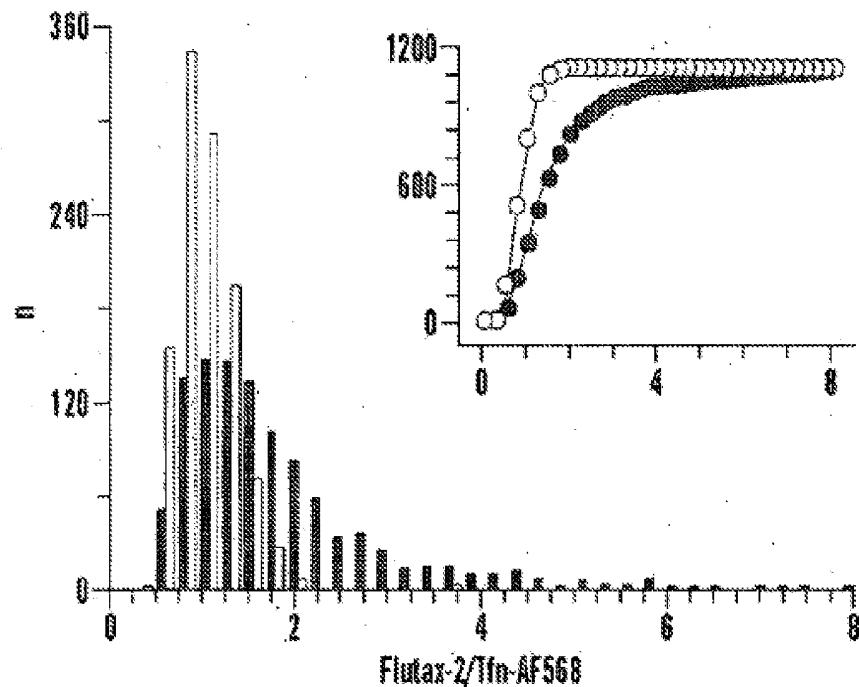


DIC/DAPI

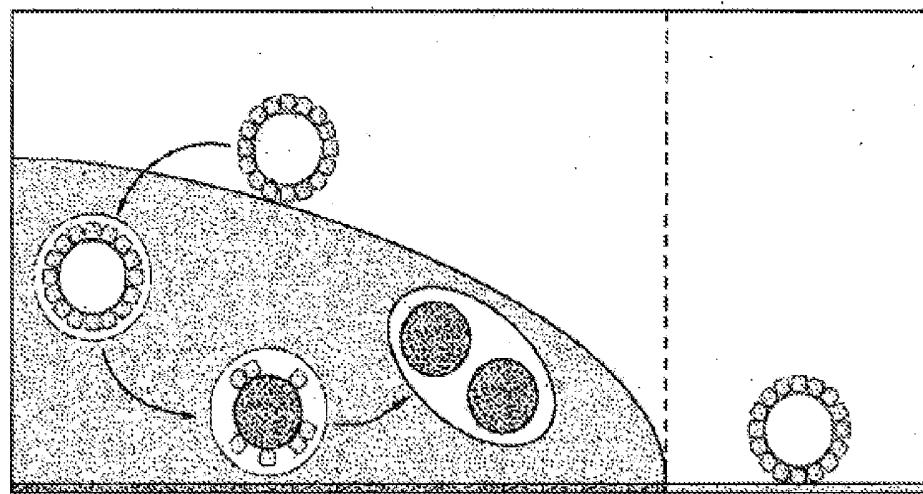
**FIG. 12J**



Unida

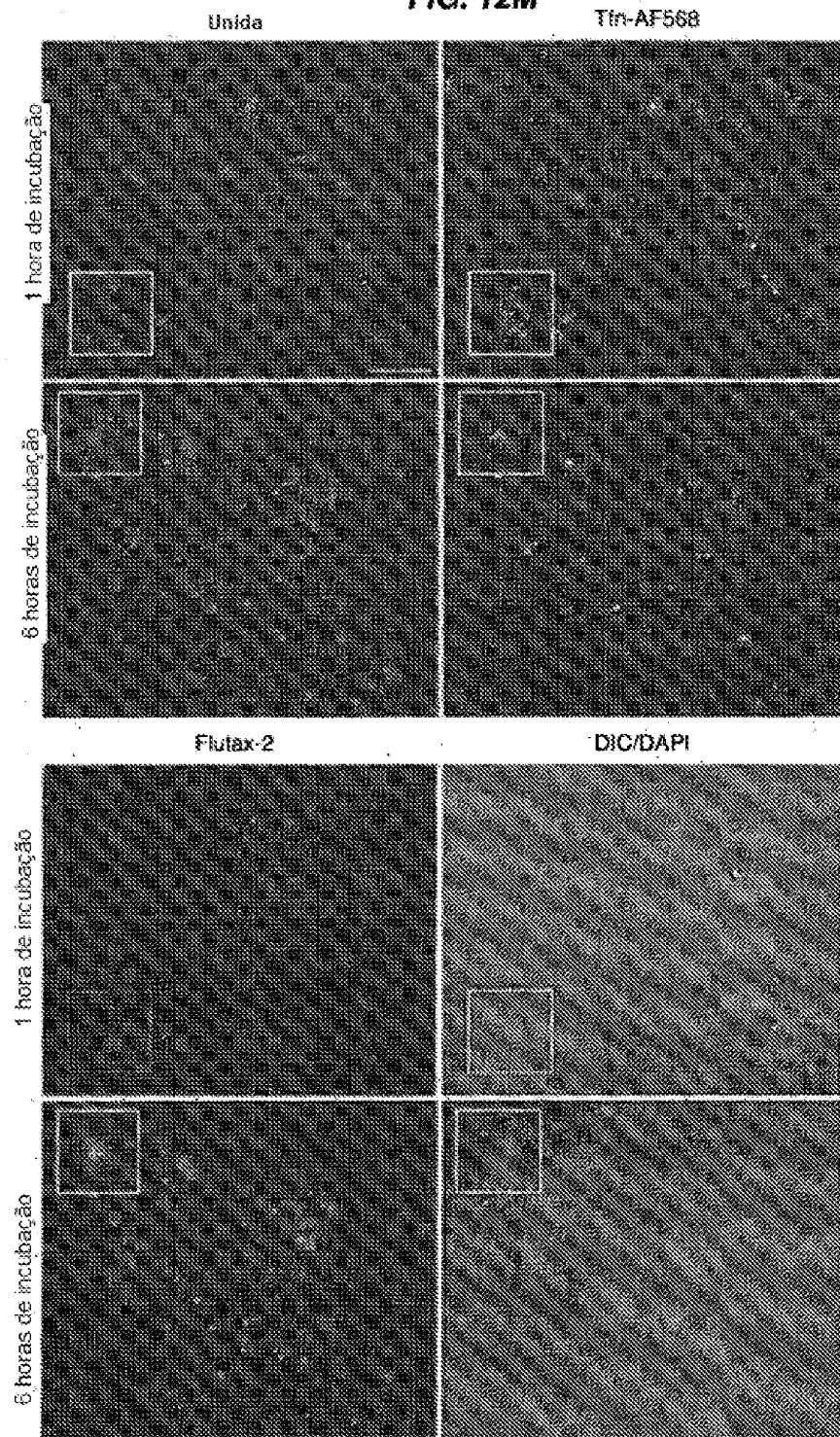


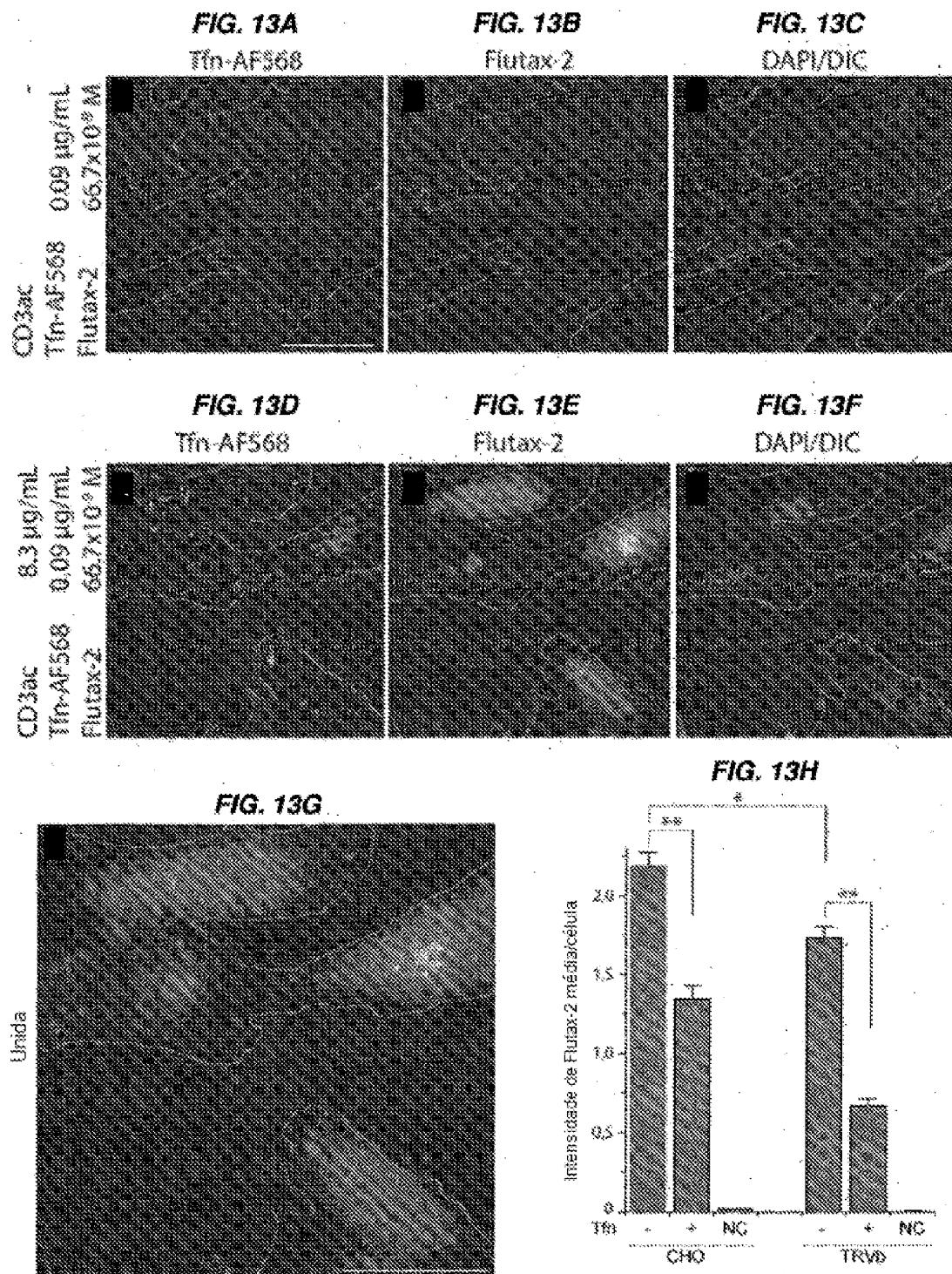
**FIG. 12K**

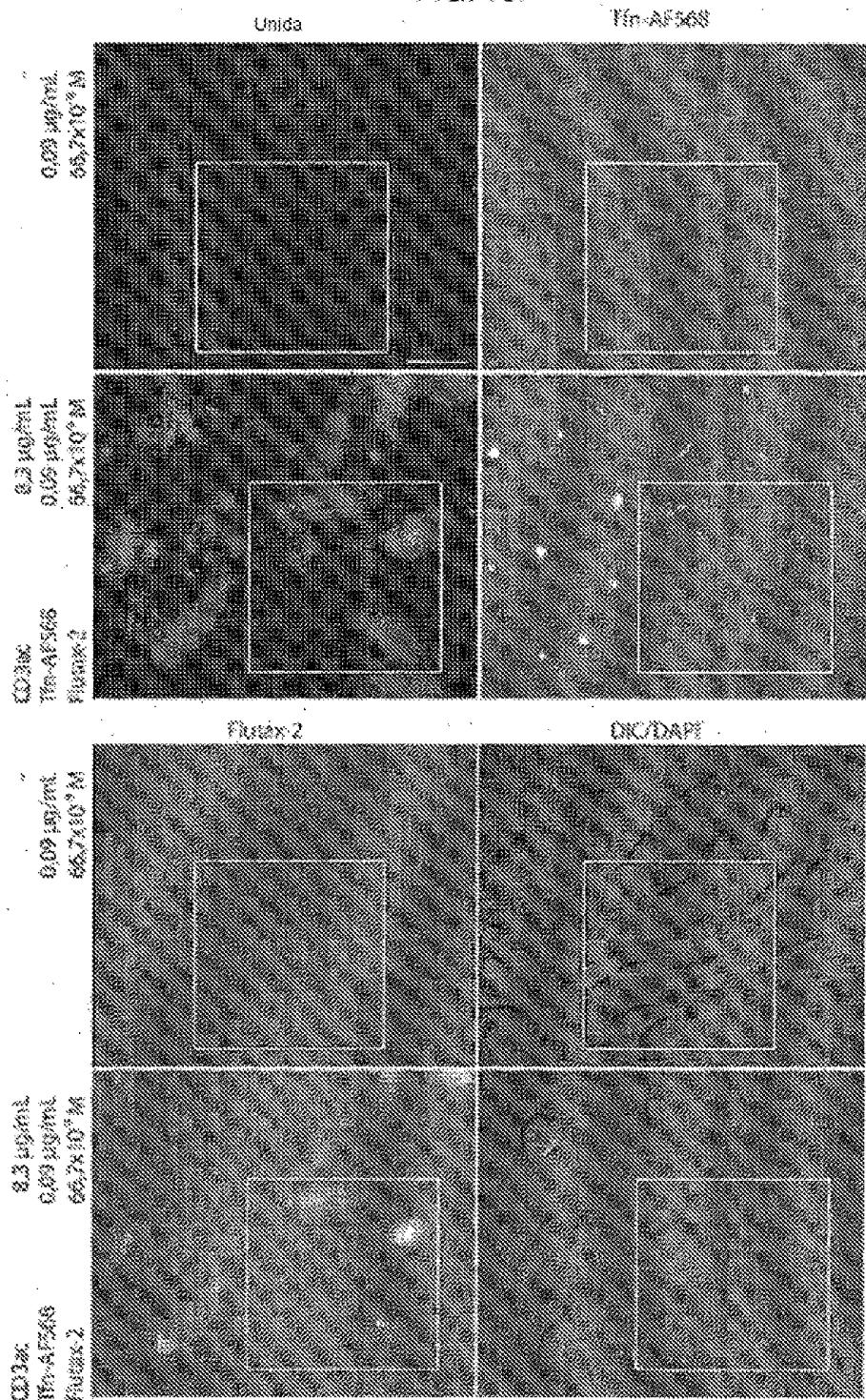


**FIG. 12L**

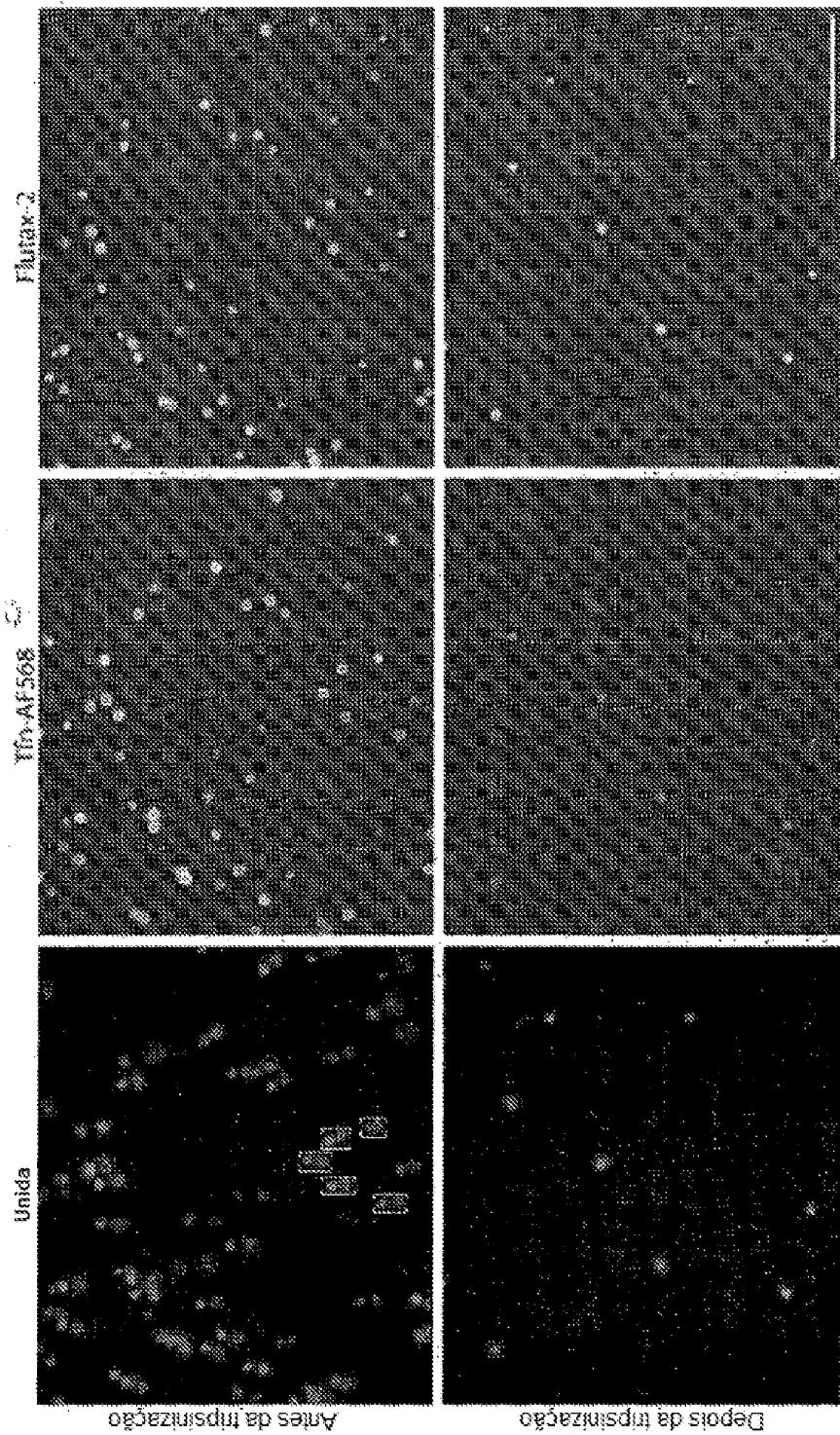
**FIG. 12M**

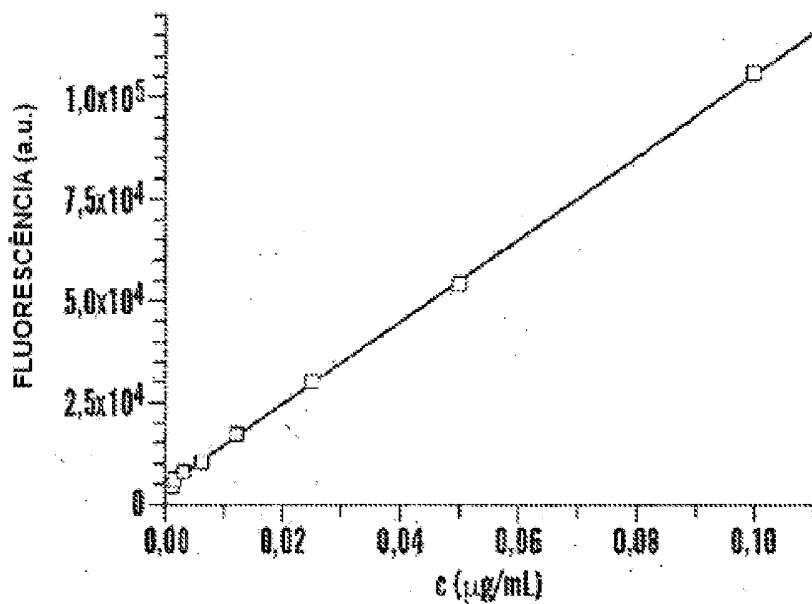




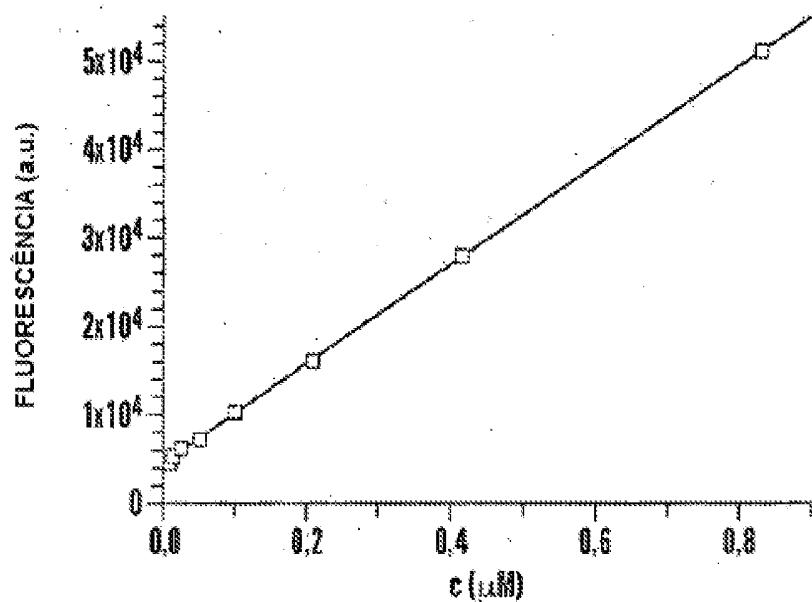
**FIG. 13I**

**FIG. 14**



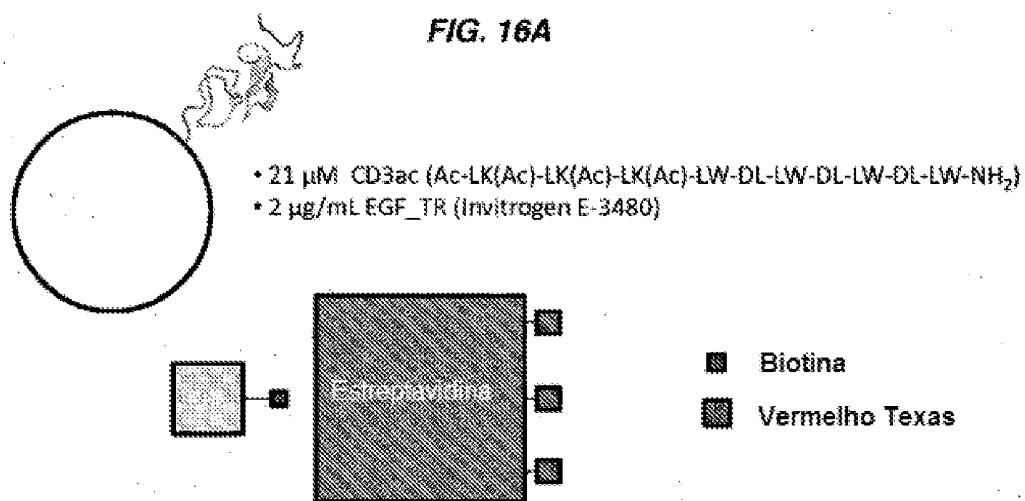


**FIG. 15A**



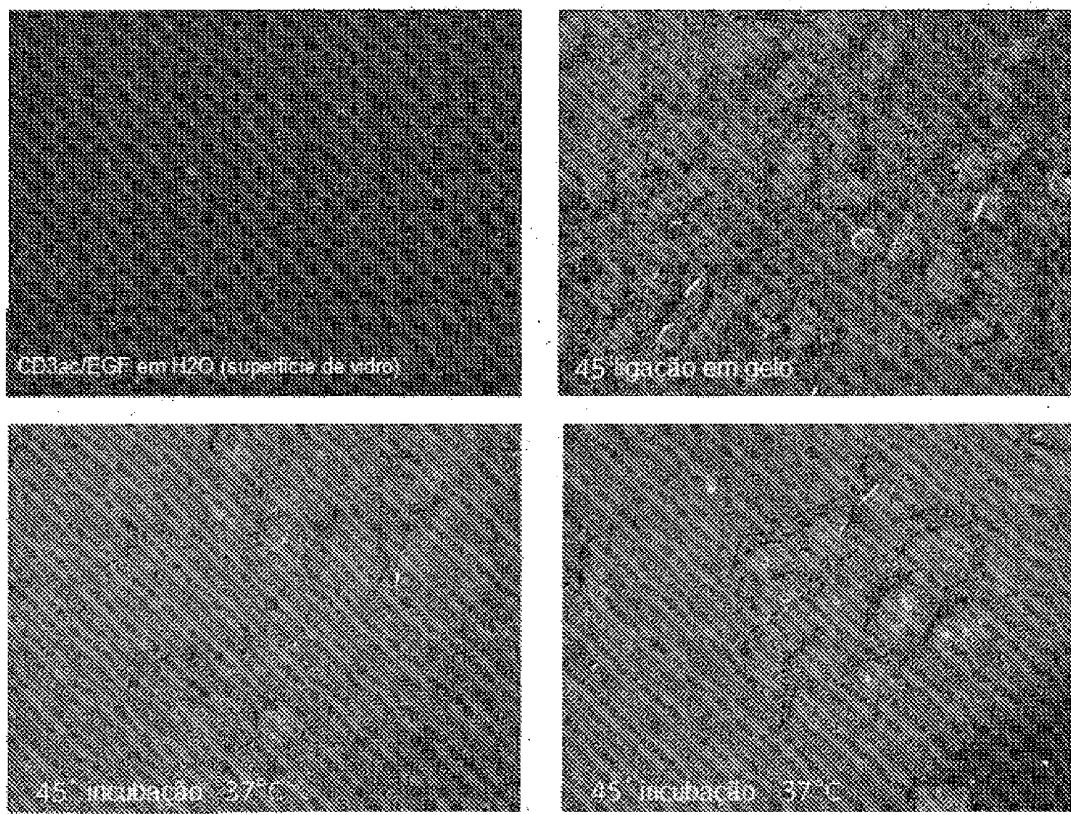
**FIG. 15B**

**FIG. 16A**



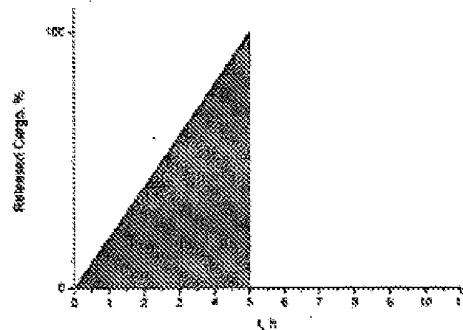
MW ~ 60'000

**FIG. 16B**



**FIG. 17A****PB1e**

- 21  $\mu$ M CD3ac (Ac-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH<sub>2</sub>)
- 2ug/mL de EGF marcado com Texas\_Red (EGF\_TR)
- 20  $\mu$ M de Nocodazol
- DMEM/PBS

**Controlo Negativo (NC)**

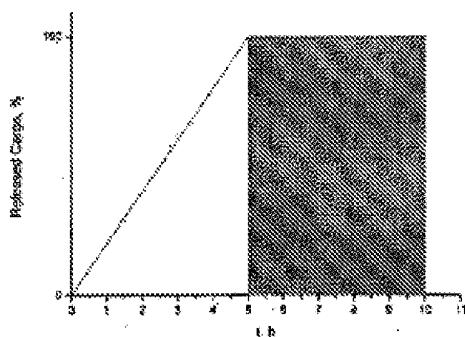
- DMEM/PBS

**PB1e Supernatant Control (PB1e\_sup)**

- 21  $\mu$ M CD3ac (Ac-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH<sub>2</sub>)
- 2  $\mu$ g/mL EGF\_TR
- 20  $\mu$ M de Nocodazol
- DMEM/PBS
- Incubar durante 5 h a 37°C
- Centrifugar 16.000g, 30 min
- Aplicar sobrenadante a células

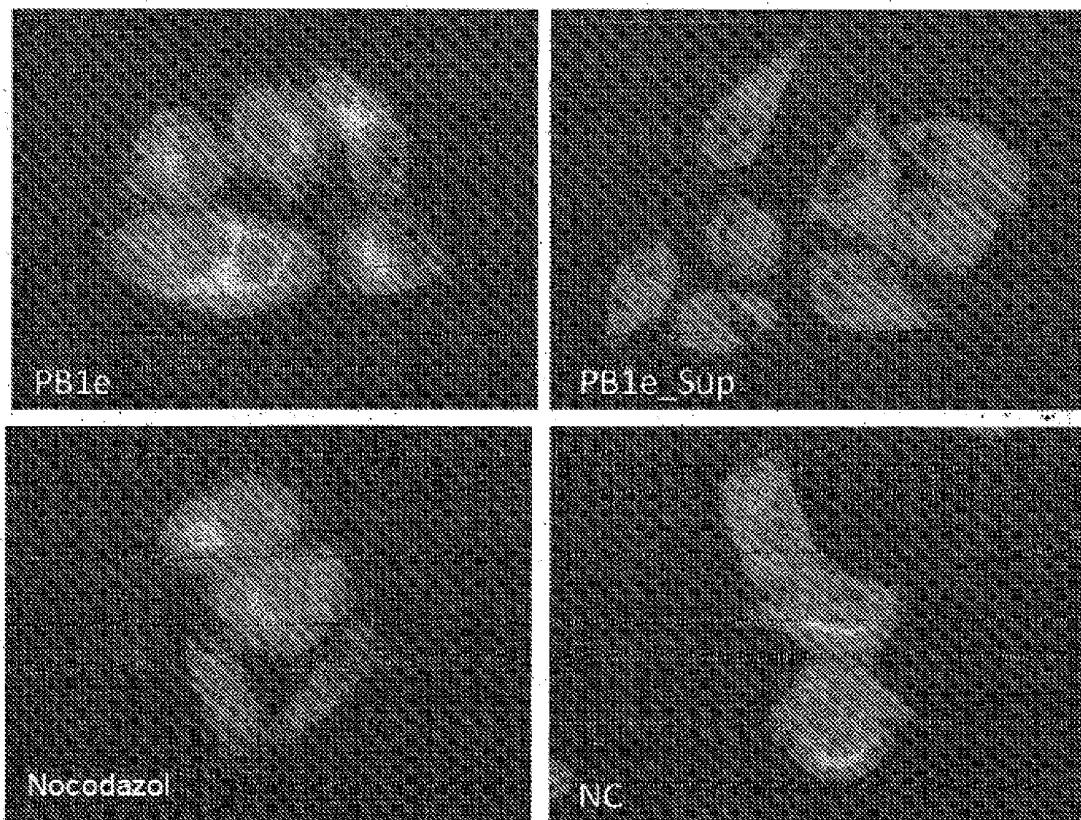
**Nocodazol (NOC)**

- 20  $\mu$ M de Nocodazol
- DMEM/PBS

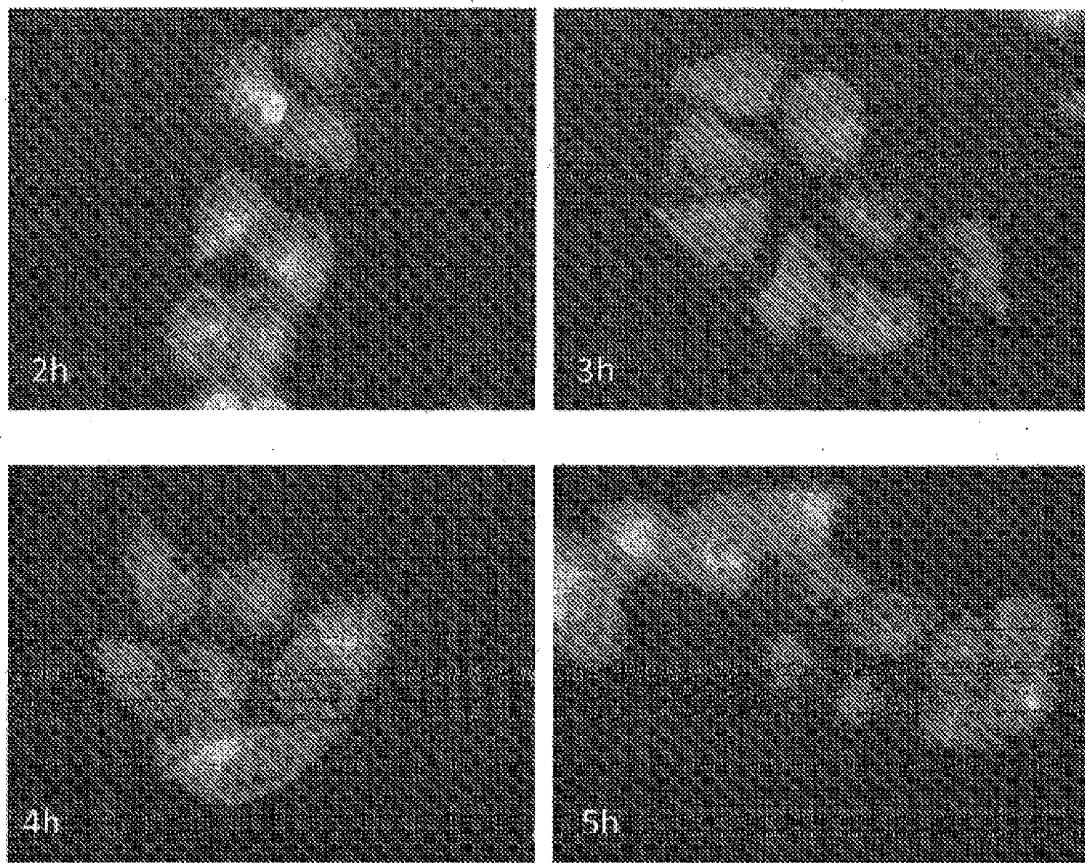


**FIG. 17B**

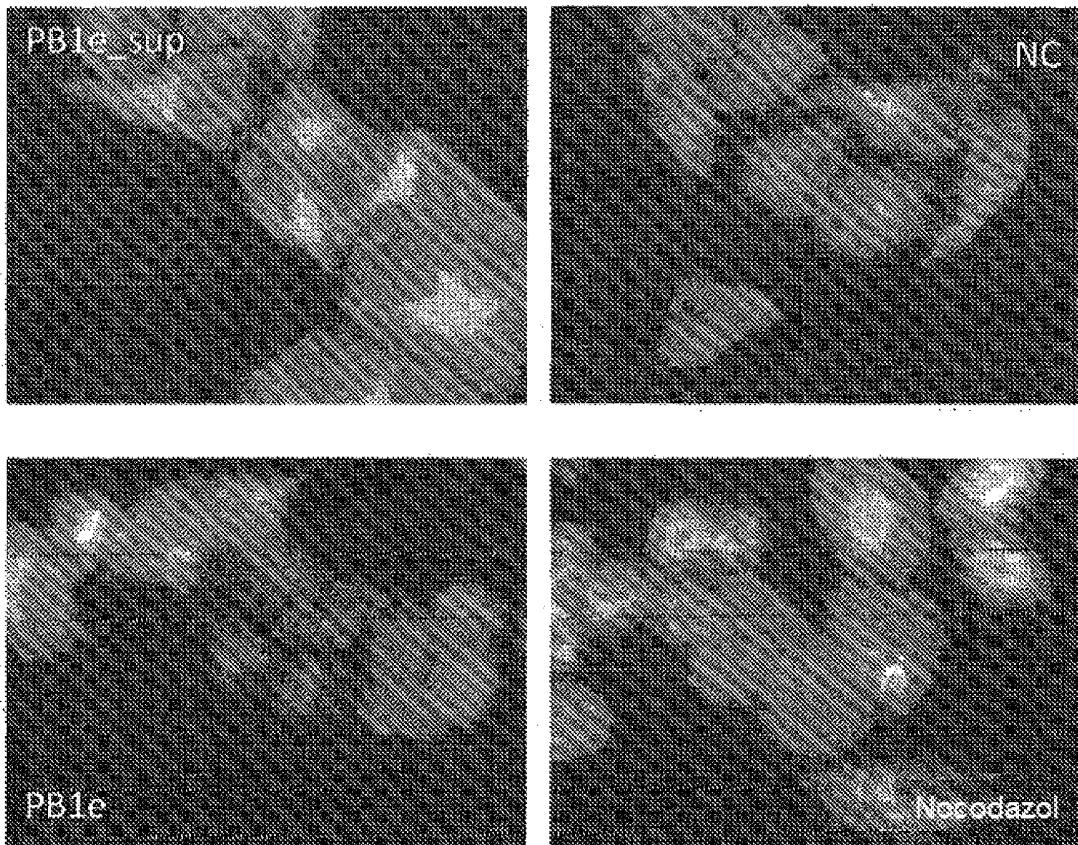
1 h de incubação a 37C



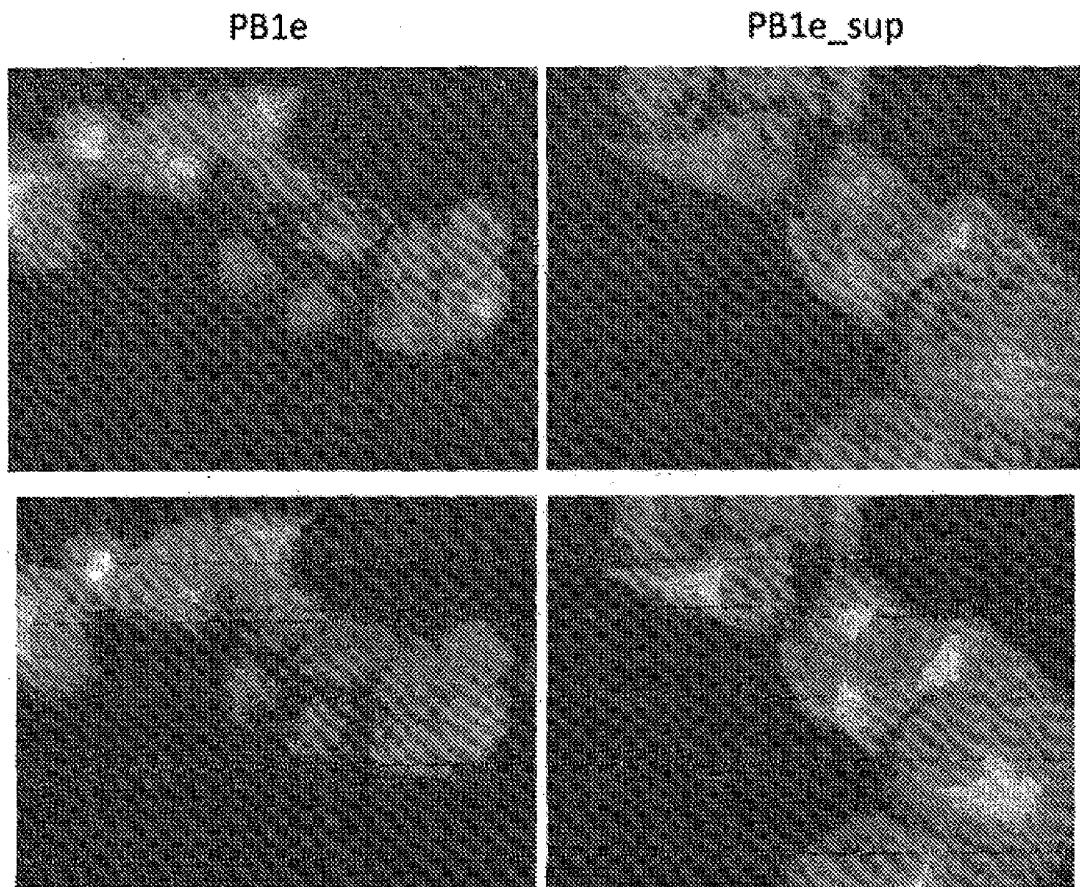
**FIG. 17C**



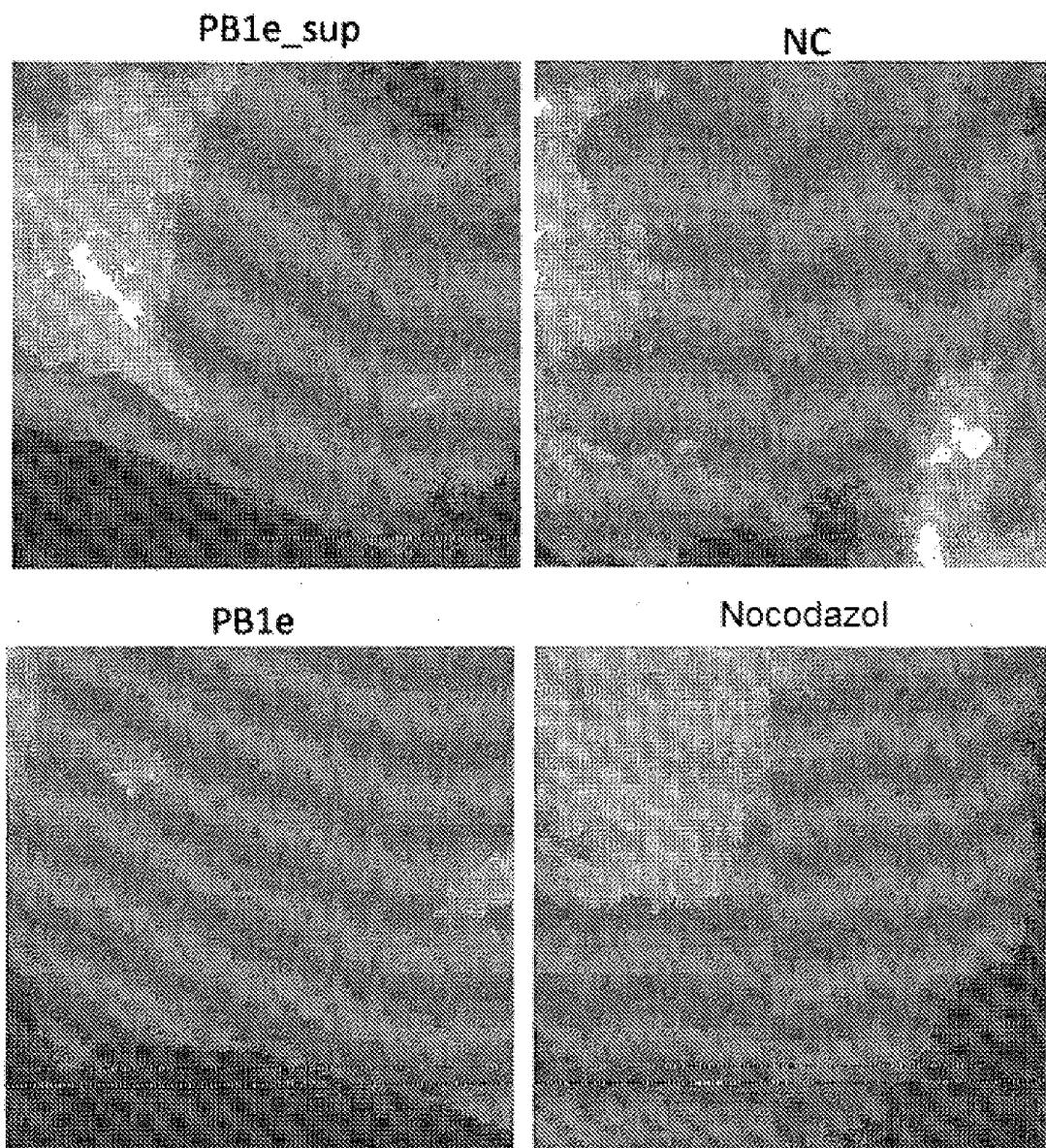
**FIG. 17D**



**FIG. 17E**

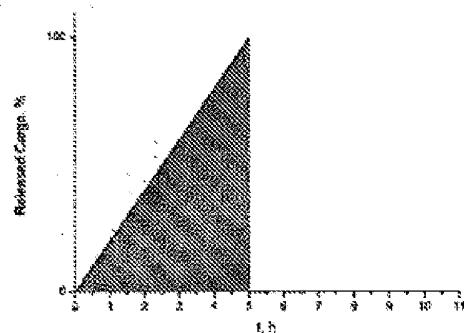


**FIG. 17F**



**FIG. 17G****PB1e**

- 21  $\mu$ M CD3ac (Ac-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH<sub>2</sub>)
- 2ug/mL de EGF marcado com Texas\_Red (EGF\_TR)
- 40  $\mu$ M de Nocodazol
- DMEM/PBS

**Controlo Negativo (NC)**

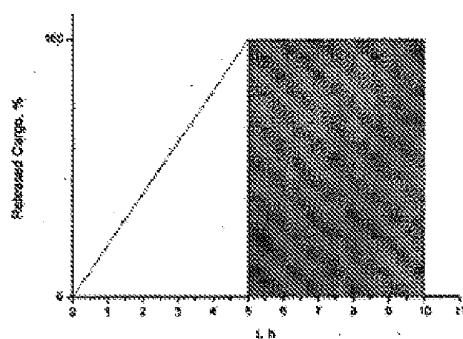
- DMEM/PBS

**Controlo de sobrenadante PB1e (PB1e\_sup)**

- 21  $\mu$ M CD3ac (Ac-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH<sub>2</sub>)
- 2  $\mu$ g/mL EGF\_TR
- 40  $\mu$ M de Nocodazol
- DMEM/PBS
- Incubar durante 5 h a 37°C
- Centrifugar 16.000g, 30 min
- Aplicar sobrenadante a células

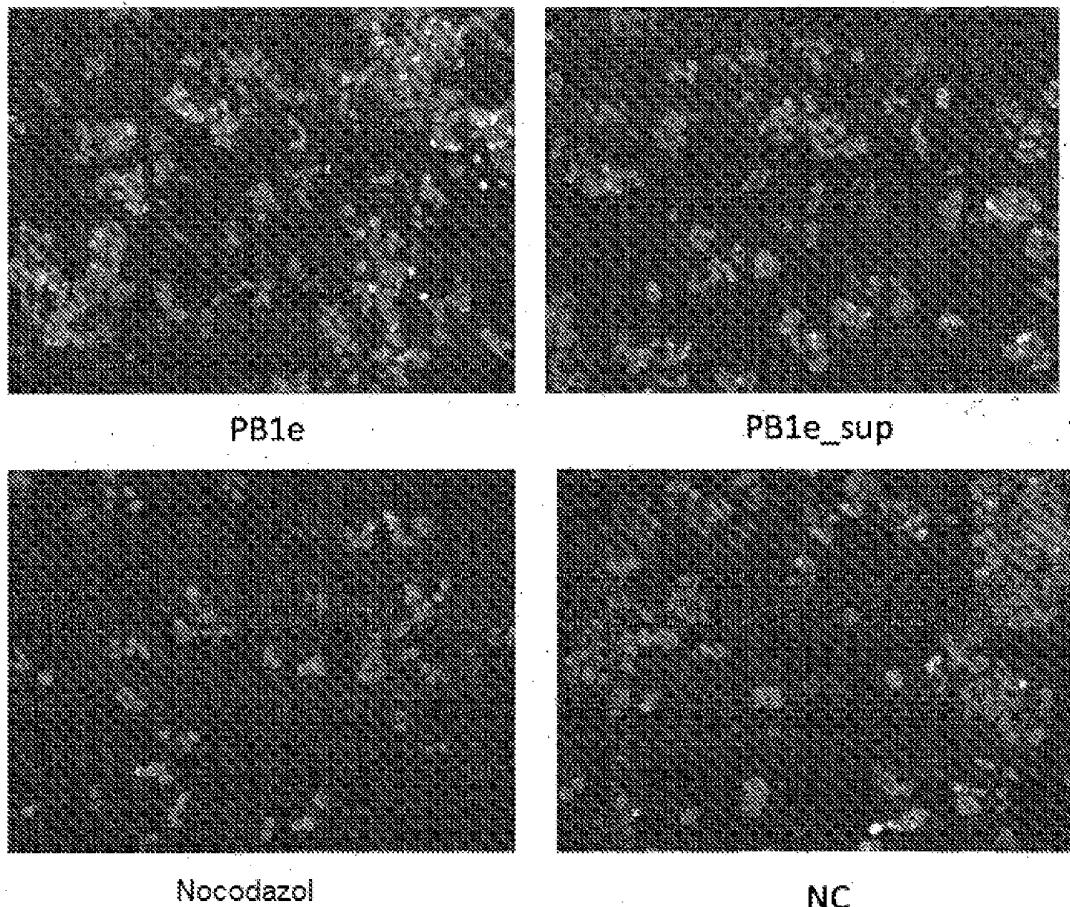
**Nocodazol (NOC)**

- 40  $\mu$ M de Nocodazol
- DMEM/PBS



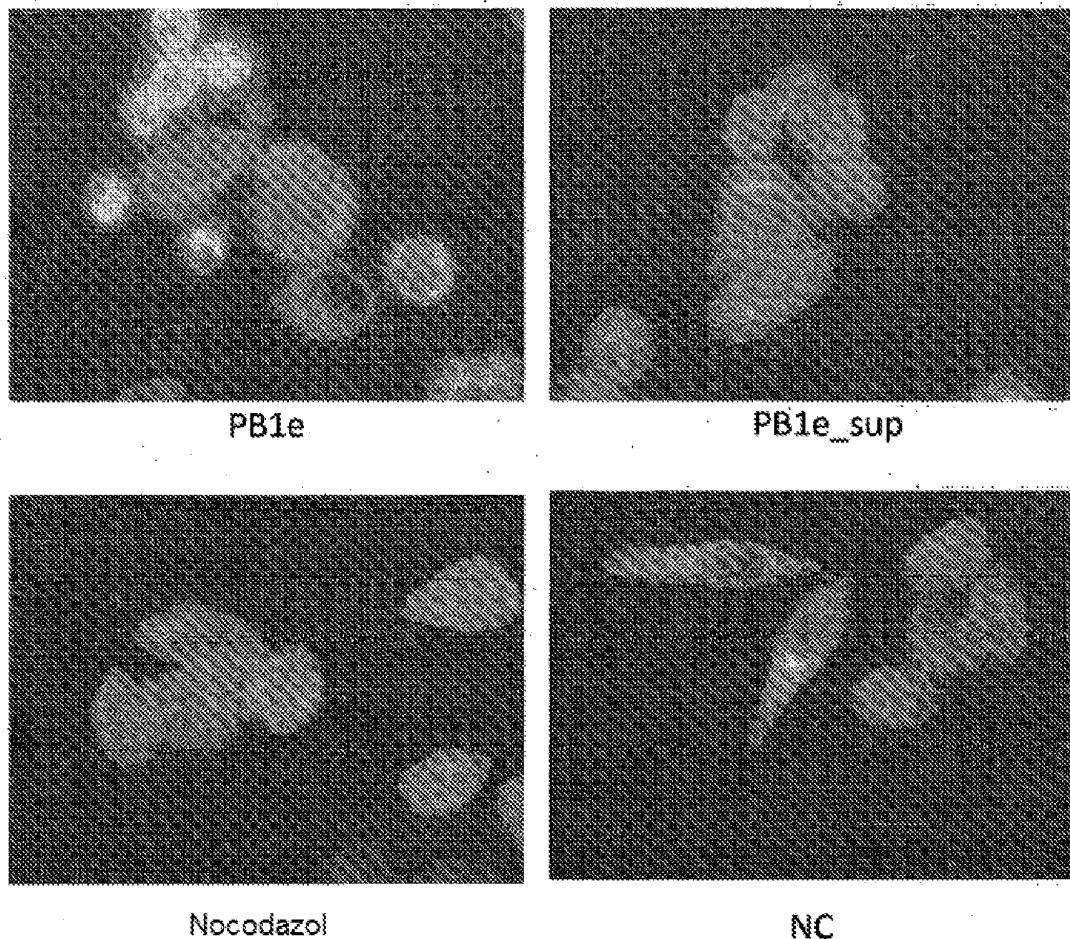
**FIG. 17H**

4 horas de incubação a 37°C, 10x



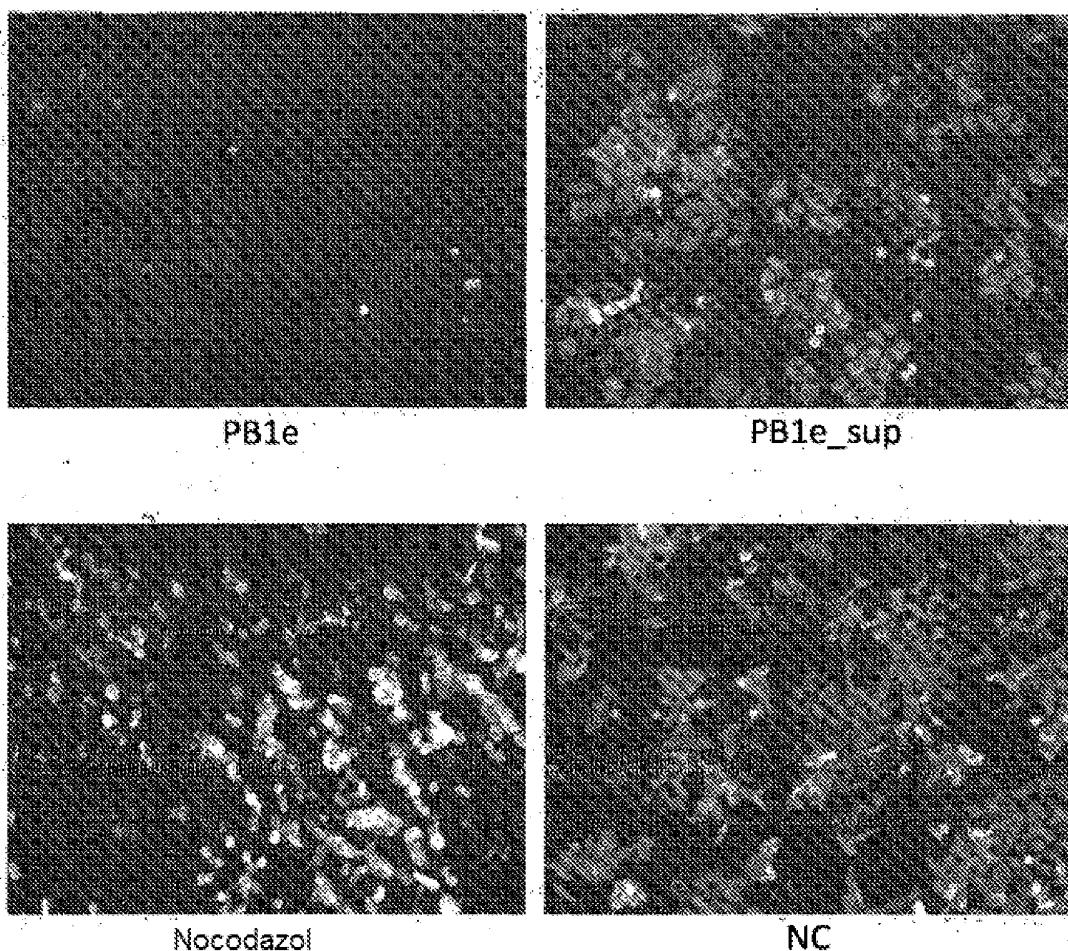
**FIG. 17I**

4 horas de incubação a 37°C, 60x



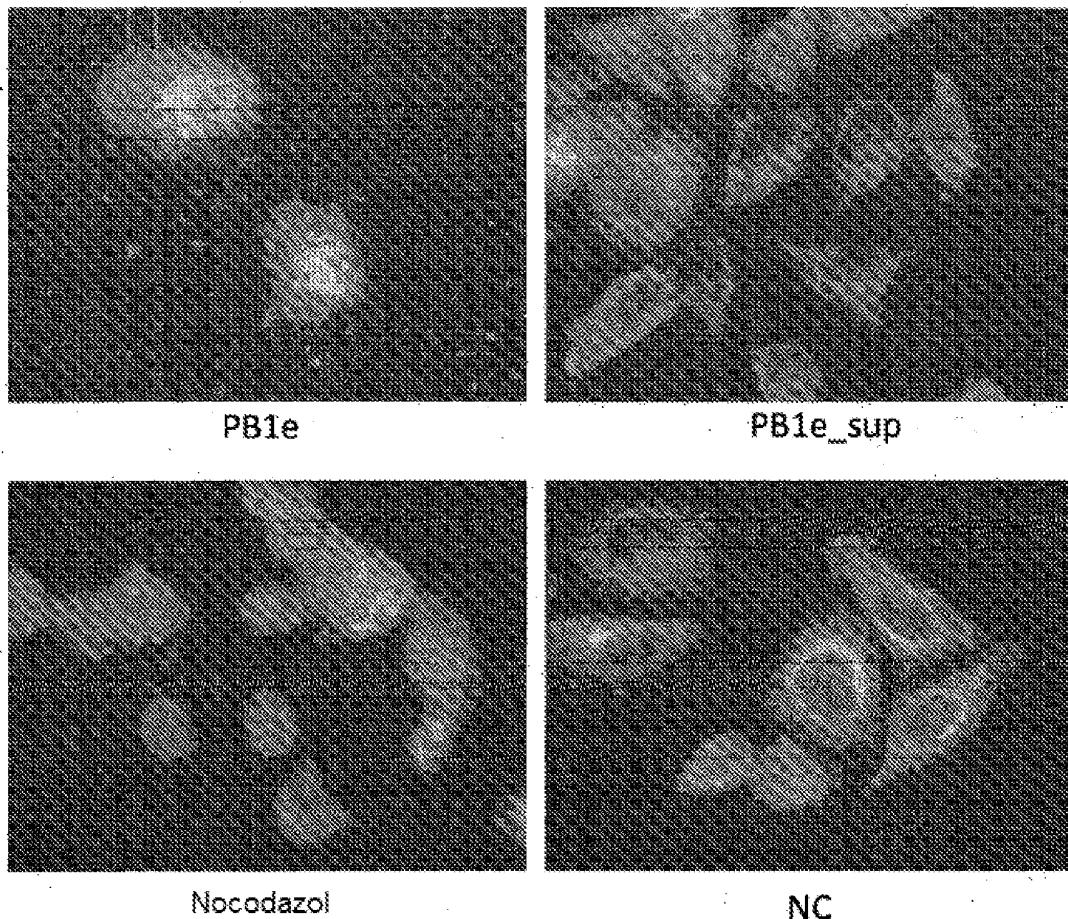
**FIG. 17J**

24 horas de incubação a 37°C, 10x

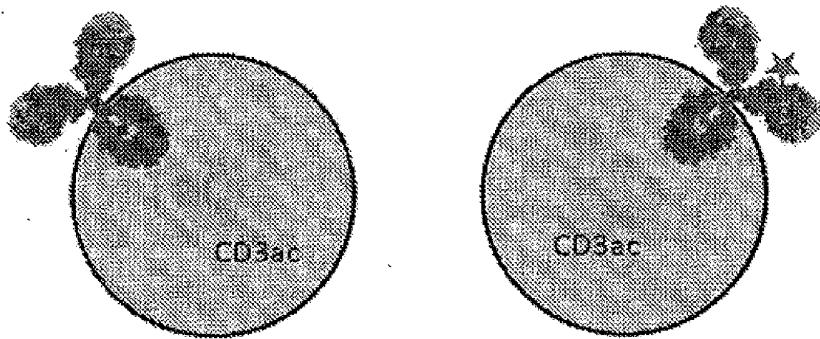


**FIG. 17K**

24 horas de incubação a 37 °C, 60x



**FIG. 18A**

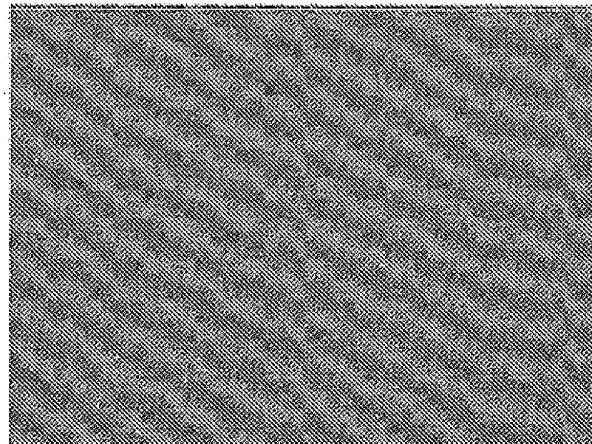
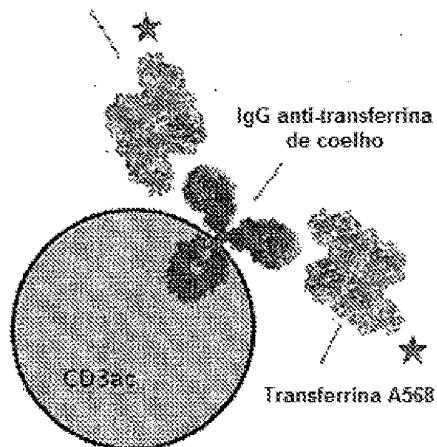


CD3ac & anticorpo primário (por exemplo, IgG anti-transferrina de coelho)

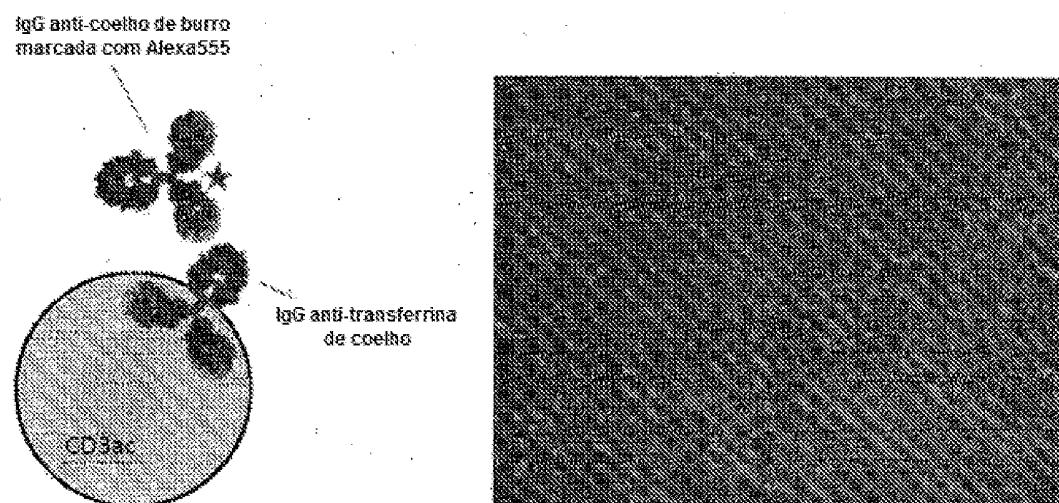
CD3ac & anticorpo secundário (por exemplo, IgG anti-coelho de burro (opcionalmente marcada com uma molécula fluorescente como Alexa 555))

**FIG. 18B**

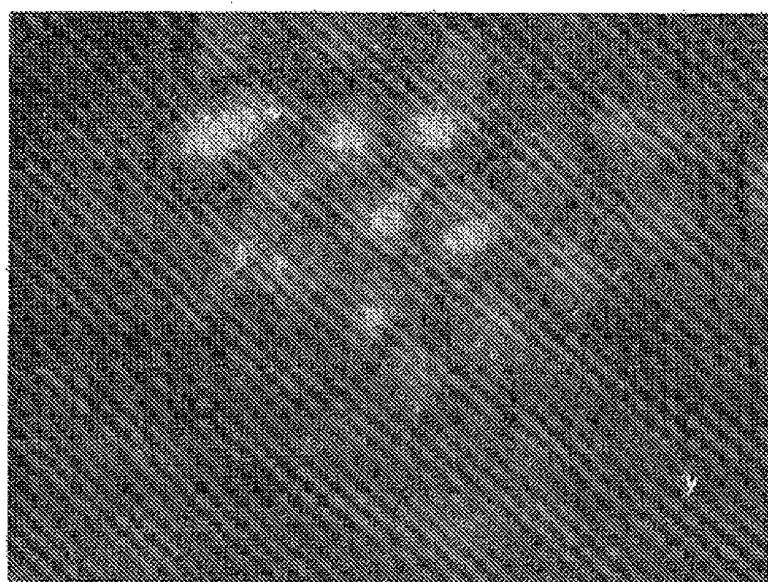
Transferrina A568



**FIG. 18C**

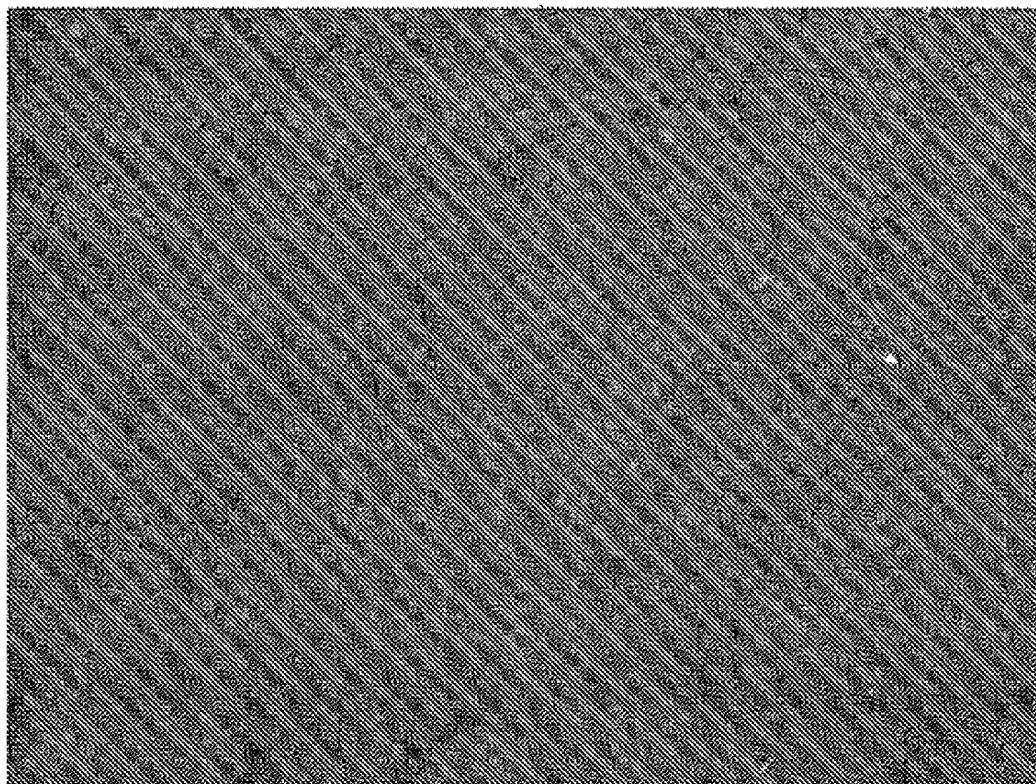


**FIG. 19A**



- 21 µM CD3 (H-LK-LK-LK-LW-DL-DL-LW-DL-LW-NH<sub>2</sub>)<sup>24</sup>
- 5,4 µM (5'-TTGTGCCGCCTTGCAGGTGTATC-3')<sup>24</sup>
- 0,24 µM (AF<sub>488</sub>-5'-TTGTGCCGCCTTGCAGGTGTATC-3')<sup>24</sup>

**FIG. 19B**



- 5,4 μM (5'-TTGTCCGCCCTTGCAGGTGTATC-3')<sup>24</sup>
- 0,24 μM (AF<sub>488</sub>-5'-TTGTCCGCCCTTGCAGGTGTATC-3')<sup>24</sup>

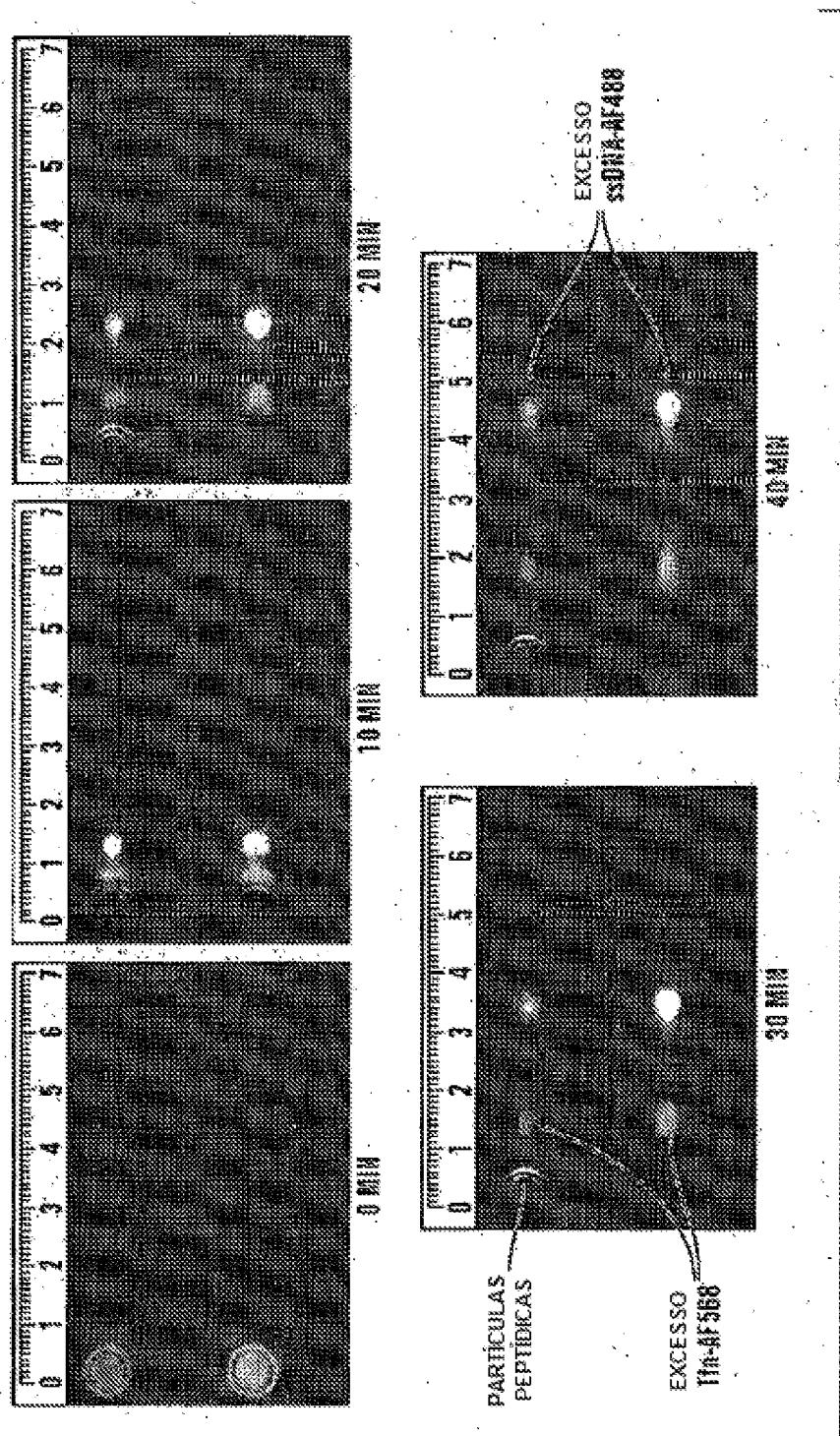


FIG. 20A

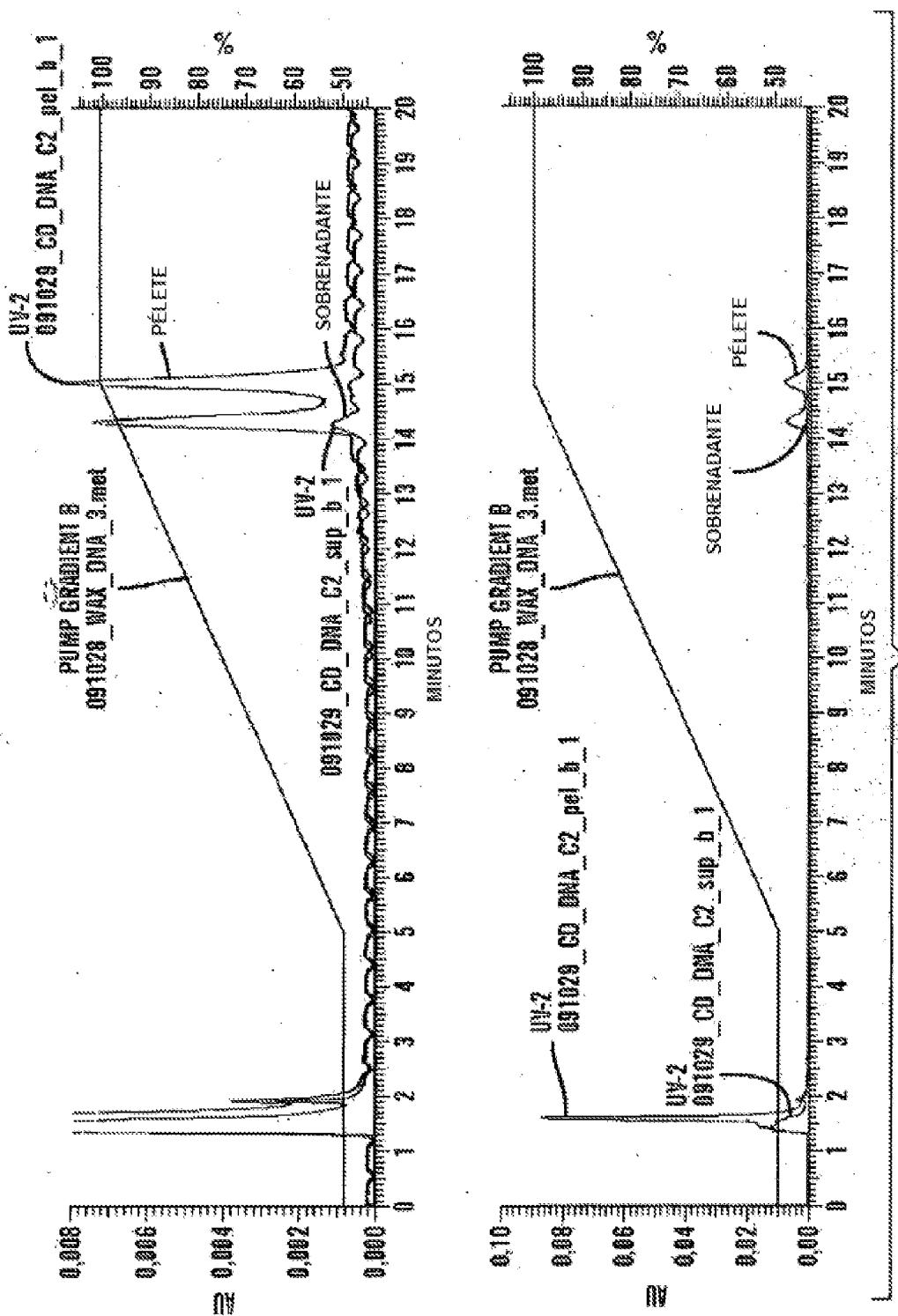
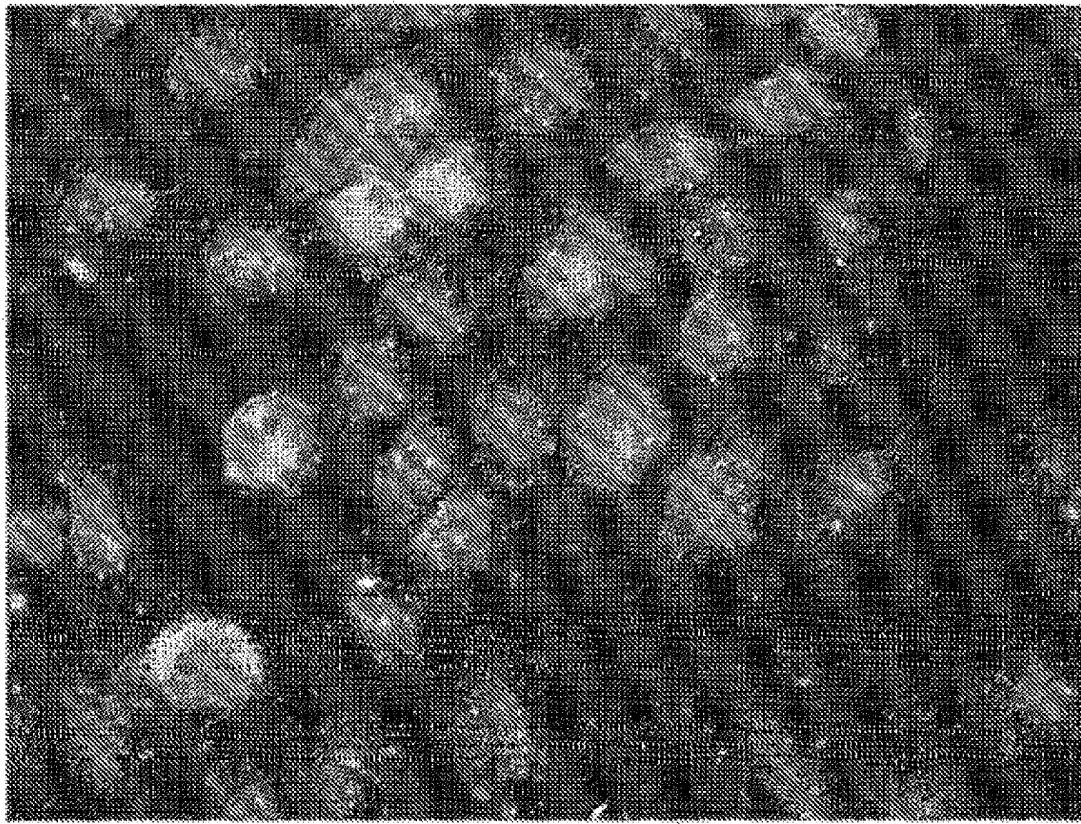
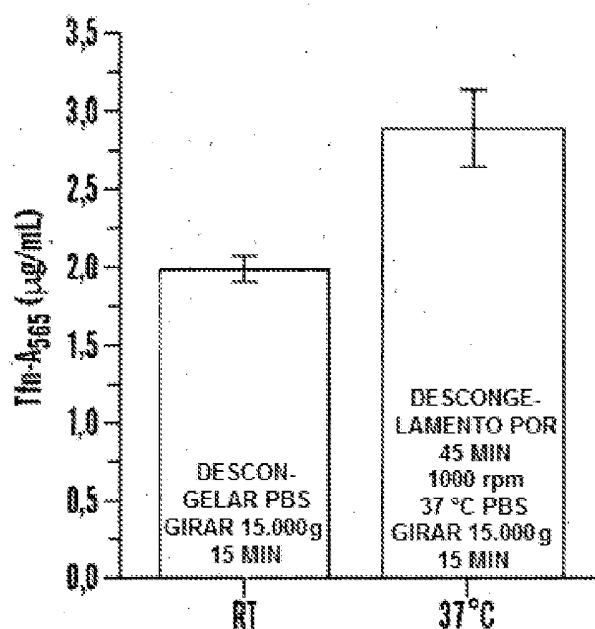
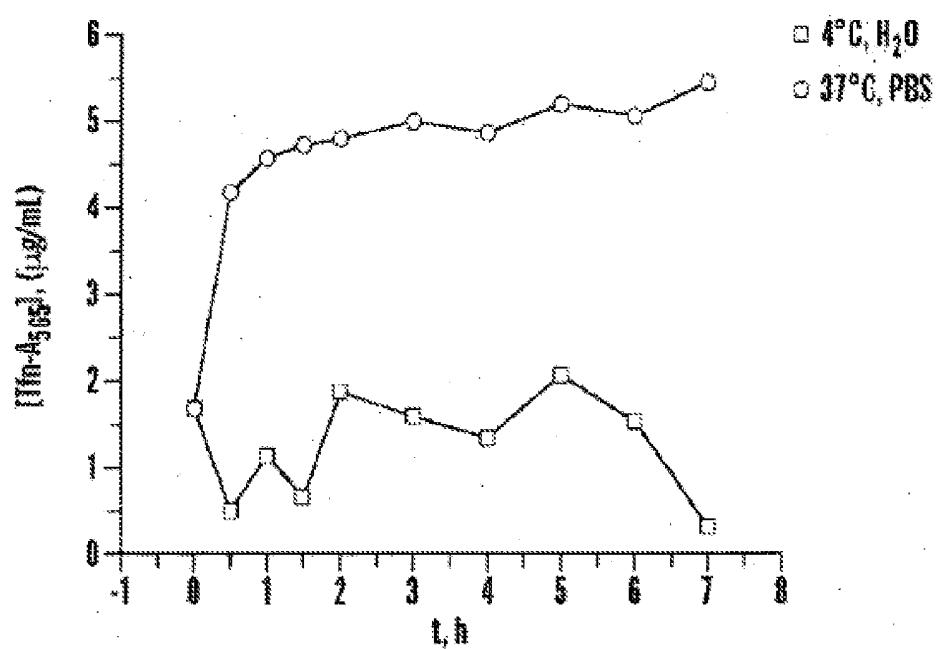


FIG. 20B

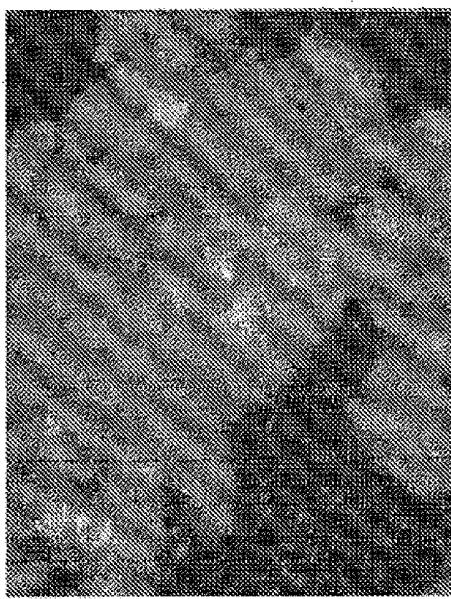
**FIG. 21**



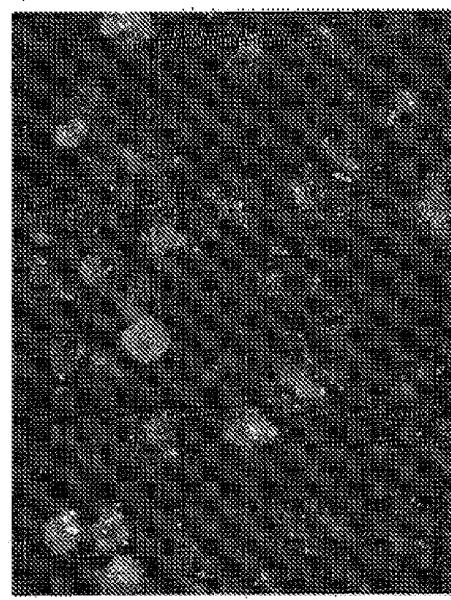
5,13 µM CD3ac (Ac-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH<sub>2</sub>)  
0,83 µM CD3 (H-LK-LK-LK-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH<sub>2</sub>)<sup>44</sup>  
0,45 µM (5'-TTGTGCCGCCTTGCAGGTGTATC-3')<sup>24</sup>  
20 nM (AF488-5'-TTGTGCCGCCTTGCAGGTGTATC-3')<sup>24</sup>  
4,14 ug/mL Tf<sub>n</sub>-AF568

**FIG. 22A****FIG. 22B**

37°C



4°C



LNP2

PNP2

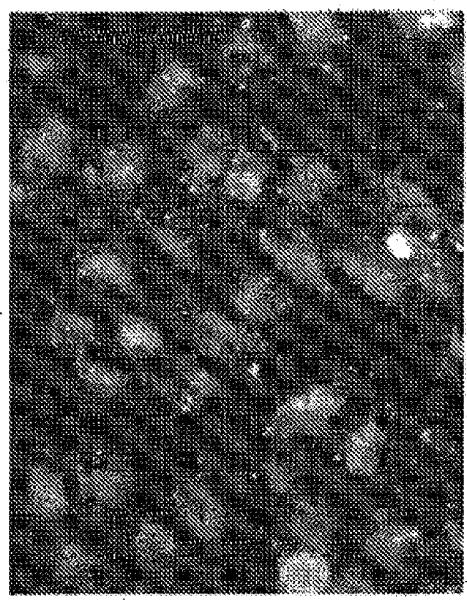
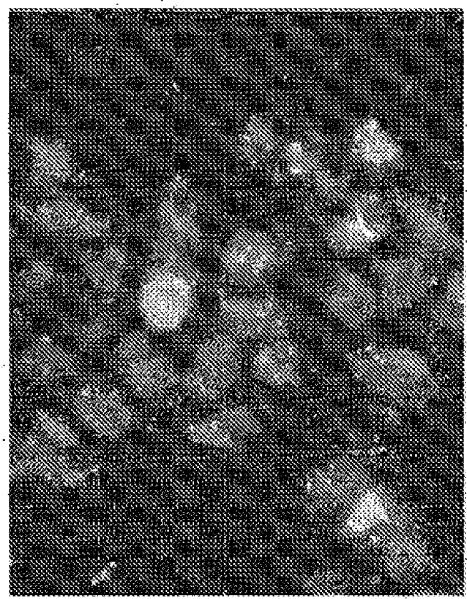


FIG. 22C

**FIG. 22D**

