



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

(21) PI 0715027-0 A2



* B R P I 0 7 1 5 0 2 7 A 2 *

(22) Data de Depósito: 11/09/2007

(43) Data da Publicação: 28/05/2013
(RPI 2212)

(51) Int.Cl.:

A61K 38/00

(54) Título: MODIFICAÇÕES DOS PEPTÍDEOS DERIVADOS DA CUPREDOXINA E SEUS MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO

(30) Prioridade Unionista: 11/09/2006 US 60/843,388

(73) Titular(es): THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS

(72) Inventor(es): ANANDA CHAKRABARTY, TAPAS DAS GUPTA

(74) Procurador(es): MIRANDA, LYNCH & KNEBLEWSKI LTDA

(86) Pedido Internacional: PCT US2007078136 de 11/09/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/033820 de 20/03/2008

(57) Resumo: MODIFICAÇÕES DOS PEPTÍDEOS DERIVADOS DA CUPREDOXINA E SEUS MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO. A presente invenção proporciona peptídeos modificados derivados da cupredoxina com atividade farmacológica que aperfeiçoou as propriedades farmacocinéticas e seus métodos de uso no tratamento de mamíferos que sofrem de vários problemas relacionados com as atividades farmacológicas. As modificações dos peptídeos derivados da cupredoxina incluem variantes da sequência de aminoácidos e derivações estruturais que aumentam a meia-vida plasmática do peptídeo, aumentam a atividade específica da atividade farmacológica, reduzem a imunogenicidade e reduzem a biotransformação dos peptídeos. Os peptídeos modificados derivados da cupredoxina podem ser usados em métodos para o tratamento de mamíferos com câncer, problemas relacionados com a angiogênese inadequada, infecções virais e bacterianas, e especificamente HIV e malária, problemas relacionados com a sinalização da efrina e para transferir compostos de carga, incluindo compostos diagnósticos, nas células de câncer.

MODIFICAÇÕES DOS PEPTÍDEOS DERIVADOS DA CUPREDOXINA E SEUS MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO

REFERÊNCIA CRUZADA COM OS PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica o benefício, de acordo com 35 U.S.C. §§ 119 e 120, do
5 pedido provisório norte-americano série No. 60.843.388, depositado em 11 de setembro
de 2006, que reivindica prioridade para o Pedido de patente norte-americana No.
11/244,105, depositado em 6 de outubro de 2005, que reivindica prioridade para o
Pedido de Patente Provisória Norte-Americana No. 60/616,782, depositado em 7 de
outubro de 2004, o Pedido de Patente Provisória Norte-Americana No. 60/680,500,
10 depositado em 13 de maio de 2005 e o Pedido de Patente Provisória Norte-Americana
No. 60/700,297, depositado em 19 de julho de 2005. O teor na íntegra desses pedidos está
incorporado à presente por referência.

DECLARAÇÃO DE INTERESSE GOVERNAMENTAL

O objeto do presente pedido é apoiado por uma concessão de pesquisa do *National*
15 *Institutes of Health* (NIH), Bethesda, Maryland, EUA (Número da Concessão ES 04050-
18). O governo pode deter certos direitos sobre a presente invenção.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a peptídeos modificados derivados da cupredoxina
com atividade farmacológica que aperfeiçoou as propriedades farmacocinéticas, assim
20 como os métodos para usá-los para o tratamento de mamíferos que sofrem de várias
condições relacionadas às atividades farmacológicas. As modificações dos peptídeos
derivados da cupredoxina incluem variantes da sequência de aminoácidos e derivações
estruturais que podem aumentar a meia-vida plasmática do peptídeo, aumentar a
atividade farmacológica específica, reduzir a imunogenicidade e/ou reduzir a

biotransformação dos peptídeos. Os peptídeos modificados derivados da cupredoxina podem ser usados em métodos para o tratamento de mamíferos com câncer, problemas relativos à angiogênese inadequada, infecções virais e bacterianas e especificamente o HIV e a malária, problemas relacionados com a sinalização da efrina e para transferir compostos de carga, incluindo compostos diagnósticos, nas células de câncer.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A azurina cupredoxina da *Pseudomonas aeruginosa* é uma nova e promissora molécula terapêutica e diagnóstica. Duas proteínas redox elaboradas pela *P. aeruginosa*, a azurina cupredoxina e o citocromo c_{551} (Cyt c_{551}) entram nas células J774 e mostram significativa atividade citotóxica para as células de câncer humano quando comparadas às células normais. Zaborina *et al.*, Microbiology 146: 2521-2530 (2000). A azurina também pode entrar nas células do melanoma humano UISO-Mel-2 ou nas células de câncer humano de mama MCF-7. Yamada *et al.*, PNAS 99:14098-14103 (2002); Punj *et al.*, Oncogene 23:2367-2378 (2004); Yamada *et al.*, Cell. Biol. 7:14181431 (2005). Além disso, a azurina da *P. aeruginosa* entra preferencialmente nas células do sarcoma de células reticulares muríneas J774, forma um complexo e estabiliza a proteína supressora do tumor p53, aumenta a concentração intracelular do p53 e induz a apoptose. Yamada *et al.* Infection and Immunity, 70:7054-7062 (2002). A azurina também provocou um aumento significativo da apoptose nas células de osteosarcoma humano quando comparadas às células não cancerosas. Ye *et al.*, Ai Zheng 24:298-304 (2003). A rusticianina do *Thiobacillus ferrooxidans* pode também entrar nos macrófagos e induzir a apoptose. Yamada *et al.*, Cell Cycle 3:1182-1187 (2004); Yamada *et al.*, Cell. Micro. 7:1418-1431 (2005). A plastocianina do *Phormidium laminosum* e a pseudoazurina do

Achromobacter cycloclastes também são citotóxicos para os macrófagos. Patente dos EUA No. 20060040269, publicada em 23 de fevereiro de 2006.

Sabe-se também agora, que a azurina tem outras atividades farmacológicas de importância terapêutica, sendo conhecida como inibidora da angiogênese nas células endoteliais vasculares umbilicais humanas (HUVECs). Pedido de patente norte-americana No. 11:488.693, depositado em 19 de julho de 2006. A azurina da *P. aeruginosa* é também conhecida por sua capacidade de inibir o crescimento da infecção HIV-1 nas células sanguíneas mononucleares periféricas e inibir a parasitemia de eritrócitos de mamíferos infectados pela malária. Chaudhari *et al.*, Cell Cycle. 5: 1642-1648 (2006). Sabe-se também que a azurina da *P. aeruginosa* também interfere no sistema de sinalização da efrina em várias células e tecidos de mamíferos. Pedido de patente norte-americana No. 11:436.592, depositado em 19 de maio de 2006.

Verificou-se que a azurina e, em particular, dois peptídeos derivados da azurina, um 18-mer e um 28-mer, são úteis do ponto de vista terapêutico e diagnóstico. Entretanto, a eficácia de um agente terapêutico no corpo do paciente depende de vários fatores. Além da atividade do próprio medicamento terapêutico, também existem propriedades farmacocinéticas do medicamento terapêutico e de como se refere aos vários processos que ocorrem após a administração do medicamento, isto é, absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Essas propriedades farmacocinéticas do medicamento descrevem como e até que ponto esses processos biológicos influenciam na eficácia do medicamento administrado, e essas propriedades incluem a meia-vida do medicamento na corrente sanguínea, o metabolismo hepático de primeira passagem do medicamento, o volume de distribuição do medicamento, o grau de ligação da albumina do medicamento, etc. Cada uma dessas propriedades farmacocinéticas pode ter um profundo efeito sobre a eficácia do medicamento.

O local de absorção do medicamento na corrente sanguínea do paciente depende da via de administração. Por exemplo, medicamentos de administração oral podem ser absorvidos mais em um local do trato alimentar que em outro, devido à natureza química e física do medicamento. A absorção por administração parenteral, por outro lado, não é
5 somente mais rápida que a administração oral, mas os níveis sanguíneos são bem mais previsíveis, devido à considerável menor perda do medicamento, particularmente na administração intravenosa. A biodisponibilidade é a fração do medicamento administrado que atinge a circulação sistêmica.

A distribuição do medicamento pela corrente sanguínea para o fluido extracelular
10 (interstício) e/ou para as células dos tecidos pode ser alterada pelos vários aspectos do medicamento. A distribuição do medicamento no corpo pode ser expressa como o “volume de distribuição do medicamento”, que é um volume hipotético do líquido em que o medicamento está disseminado. A estrutura do medicamento pode influenciar sua distribuição, dado que medicamentos hidrofóbicos se movimentam mais prontamente
15 pela maioria das membranas biológicas, e assim podem ser distribuídos dentro das células dos tecidos. Um medicamento também pode estar ligado a proteínas sanguíneas, sendo assim tardia sua passagem pelos tecidos circundantes. Por exemplo, quando na corrente sanguínea o naproxeno estiver 99% ligado a proteínas plasmáticas, a penicilina G estará 60% ligada, a amoxicilina somente 20% ligada e o minoxidil não está ligado.
20 Howard C. Ansel *et al.*, *Pharmaceutical Dosage Forms and Delivery Systems* 129 (Lippincott, Williams and Wilkins 1999). Um medicamento ligado não está nem exposto aos processos de detoxificação do corpo, nem é removido da corrente sanguínea por filtração pelos glomérulos renais.

O medicamento ligado é mencionado como a porção inativa, enquanto a porção não ligada é considerada como a porção ativa. A porção ligada do medicamento serve como reservatório do medicamento, que é então liberada na corrente sanguínea sob forma ativa não ligada quando o nível de medicamento livre não é mais suficiente para garantir a saturação protéica. Portanto, um medicamento que é ligado na corrente sanguínea permanecerá no

5 corpo por períodos de tempo mais longos e exigirá dosagem menos frequente.

O metabolismo do medicamento no paciente também afeta sua eficácia. Muitos medicamentos passam por biotransformação antes de serem excretados pelo corpo. A biotransformação de um medicamento pode resultar em uma forma do medicamento que

10 seja mais solúvel em água, ou ionizada, menos capaz de ligar proteínas no plasma e nos tecidos, menos capaz de penetrar nas membranas celulares e demais aspectos que tornam os medicamentos menos farmacologicamente ativos. O medicamento biotransformado pode, portanto, ser tornado menos tóxico e mais rapidamente excretado. Existem quatro formas principais por meio das quais os medicamentos são biotransformados: oxidação,

15 redução, hidrólise e conjugação. As reações de oxidação são primariamente catalisadas pelas oxidases ligadas ao retículo endoplasmático dentro das células hepáticas. As reações de redução são catalisadas pelas reductases primariamente nos intestinos e no fígado. O rompimento hidrolítico é catalisado pelas esterases primariamente no fígado. A conjugação glucuronídea, o caminho mais comum de biotransformação de um

20 medicamento, ocorre por meio de uma combinação do medicamento com o ácido glucurônico, dando uma formação iônica ao medicamento que é facilmente eliminada do corpo. Christensen *et al.*, J. Pharm. Pharmacol. 37:91-95 (1985). Outros processos de biotransformação que aumentam a eliminação incluem a metilação e acilação.

A excreção do medicamento pelo corpo pode ocorrer por vários caminhos. Os rins

desempenham um papel dominante na eliminação do medicamento pela urina. Entretanto, o medicamento também pode ser eliminado do plasma pelo fígado. Particularmente, com medicamentos de administração oral, o fígado pode desempenhar um importante papel na determinação da meia-vida plasmática do medicamento.

5 O que é necessário são peptídeos derivados da cupredoxina que possuam as atividades farmacológicas das cupredoxinas e que tenham propriedades farmacocinéticas em mamíferos. Em particular, serão agentes terapêuticos e diagnósticos particularmente eficazes os peptídeos derivados da cupredoxina que sejam estáveis no corpo do paciente e mantenham uma grande atividade farmacológica específica, assim como tenham uma
10 longa meia-vida plasmática.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Um aspecto da invenção provê um peptídeo isolado e modificado derivado da cupredoxina que é uma variante ou derivado de um peptídeo derivado da cupredoxina. Na configuração, o peptídeo isolado e modificado, derivado da cupredoxina tem melhores
15 propriedades farmacocinéticas quando comparado com o peptídeo não modificado derivado da cupredoxina. As melhores propriedades farmacocinéticas podem ser um ou mais peptídeos (1) menos susceptíveis à biotransformação no paciente, (2) que sejam excretados do corpo do paciente em proporções mais lentas, (3) que tenham maior estabilidade de suas estruturas terciárias e (4) que tenham maior meia-vida plasmática.

20 Além disso, o peptídeo isolado pode ter pelo menos uma atividade farmacológica de uma cupredoxina. As atividades farmacológicas específicas de interesse incluem (1) a entrada em uma célula de câncer de mamífero, (2) a não entrada em células não-cancerígenas de mamíferos, (3) a entrada em células pré-malignantes de mamíferos, (4) a eliminação de células de câncer de mamíferos, (5) a eliminação de células pré-malignantes

de mamíferos, (6) a inibição do crescimento de células de câncer em mamíferos, (7) a inibição da infecção HIV-1, (8) a inibição da parasitemia dos eritrócitos infectados pela malária, (9) a interferência com o sistema de sinalização da efrina e (10) a inibição da angiogênese.

5 O peptídeo modificado derivado da cupredoxina pode provir de uma cupredoxina de *Pseudomonas aeruginosa*, *Phormidium laminosum*, *Ulva pertussis*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Achromobacter cycloclastes*, *Pseudomonas syringa*, *Neisseria meningitidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Chloroflexus aurantiacus* e *Neisseria gonorrhoeae*. A cupredoxina pode ser azurina, plastocianina, 10 rusticianina, pseudoazurina, auracianina, stelacianina, proteína básica do pepino e proteína tipo azurina. Em configurações específicas, a cupredoxina pode ser uma das SEQ ID NOS: 1-12. O peptídeo isolado modificado derivado da cupredoxina pode ser um truncamento da cupredoxina. Em configurações específicas, o peptídeo pode ser uma das SEQ ID NOS: 13-47. Em outras configurações específicas, SEQ ID NOS: 1-12 são pelo 15 menos cerca de 90% idênticas ao peptídeo isolado.

Em algumas configurações, o peptídeo isolado modificado derivado da cupredoxina pode ser menos susceptível à hidrólise. Especificamente, o peptídeo isolado pode ter um ou mais resíduos de asparagina ou serina na sequência do peptídeo derivado da cupredoxina que são substituídos por outro resíduo aminoácido, especificamente um 20 ácido glutâmico ou resíduo de treonina.

Em algumas configurações, o peptídeo isolado modificado derivado da cupredoxina é menos susceptível à deamidação. Em configurações específicas, um ou mais resíduos de glicina do peptídeo derivado da cupredoxina são substituídos por outro resíduo aminoácido, especificamente um resíduo de treonina ou alanina. Em algumas

configurações, podem ser substituídos um ou mais resíduos de glicina no peptídeo derivado da cupredoxina que são equivalentes aos resíduos 58 ou 63 de *Pseudomonas aeruginosa* azurina (SEQ ID NO: 1). Em outra configuração específica, o peptídeo isolado pode compreender SEQ ID NO: 30.

5 Em algumas configurações, o peptídeo isolado modificado derivado da cupredoxina é menos susceptível à oxidação. Especificamente, o peptídeo isolado pode ter um ou mais resíduos de metionina ou cisteína do peptídeo derivado da cupredoxina substituídos por outro resíduo aminoácido, especificamente um resíduo de leucina ou valina. Em uma configuração específica, são substituídos um ou mais resíduos de
10 metionina do peptídeo derivado da cupredoxina que são equivalentes aos resíduos 56 ou 64 de *Pseudomonas aeruginosa* azurina (SEQ ID NO: 1). Em outra configuração específica, o peptídeo isolado pode compreender SEQ ID NO: 31 ou SEQ ID NO: 32.

Em algumas configurações, o peptídeo isolado modificado derivado da cupredoxina pode ser menos susceptível à formação de dicetopiperazina e ácido
15 piroglutâmico. Especificamente, o peptídeo isolado pode ter um resíduo de glicina nas posições 1, 2 ou 3 do N-terminal do peptídeo derivado da cupredoxina substituído por outro resíduo aminoácido. Além disso, o peptídeo isolado pode ter um resíduo de prolina na posição 3 do N-terminal do peptídeo derivado da cupredoxina substituído por outro resíduo aminoácido. Também, o peptídeo isolado pode ter um resíduo de asparagina no
20 N-terminal do peptídeo derivado da cupredoxina substituído por outro resíduo aminoácido.

Em algumas configurações, o peptídeo isolado modificado derivado da cupredoxina pode ser menos susceptível à racemização. Especificamente, o peptídeo isolado pode ter um ou mais resíduos aminoácidos do peptídeo derivado da cupredoxina substituídos pelo

D-isômero do resíduo aminoácido. Em uma configuração específica, todos os resíduos aminoácidos do peptídeo derivado da cupredoxina são substituídos pelos D-isômeros dos resíduos aminoácidos. Em outra configuração específica, o peptídeo isolado compreende SEQ ID NO: 45. Em algumas configurações, o peptídeo isolado modificado derivado da cupredoxina pode ser menos susceptível à degradação. Especificamente, o N-terminal do peptídeo derivado da cupredoxina pode ser acetilado. Além disso, o C-terminal do peptídeo derivado da cupredoxina pode ser amidado. Em uma configuração específica, o peptídeo isolado é SEQ ID NO: 33. Em algumas configurações, o peptídeo isolado e modificado, derivado da cupredoxina é modificado para aumentar a estabilidade de sua estrutura terciária. Especificamente, o peptídeo isolado pode ser modificado para aumentar a estabilidade de pelo menos uma α -hélice. Em algumas configurações, pelo menos um resíduo aminoácido de glicina, prolina, serina, ácido aspártico, alanina, treonina, valina, glutamina, asparagina, cisteína, histidina, lisina e arginina do peptídeo derivado da cupredoxina é substituído por leucina, isoleucina, fenilalanina, ácido glutâmico, tirosina, triptofano ou metionina. Em uma configuração específica, o resíduo substituído do peptídeo derivado da cupredoxina pode estar dentro dos resíduos equivalentes 53-56, 58-64 e 68-70 da *P. aeruginosa* azurina. Em outras configurações específicas, a glutamina no resíduo equivalente ao resíduo 57 da *P. aeruginosa* azurina pode ser substituída por um resíduo triptofano, podendo a treonina em um resíduo equivalente ao resíduo 52 da *P. aeruginosa* azurina ser substituído por um resíduo triptofano, a treonina em um resíduo equivalente ao resíduo 61 da *P. aeruginosa* azurina ser substituído por um resíduo triptofano e/ou a glicina em um resíduo equivalente ao resíduo 63 da *P. aeruginosa* azurina podendo ser substituída por um resíduo triptofano. Em outras configurações específicas, o peptídeo isolado compreende uma das SEQ ID NOS: 34-44.

Em outras configurações, o peptídeo isolado pode ter dois ou mais resíduos de lisina do peptídeo derivado da cupredoxina substituídos por resíduos de ϵ -(3,5-dinitrobenzoil)-lisina em um espaçamento $i(i\pm 4)$. Especificamente, os resíduos substituídos do peptídeo derivado da cupredoxina podem estar dentro dos resíduos equivalentes aos resíduos 53-56, 58-64 e 68-70 da *P. aeruginosa* azurina.

Em outras configurações, o peptídeo isolado pode ter pares de resíduos histidina-cisteína ou histidina-histidina substituídos no peptídeo derivado da cupredoxina em um espaçamento $i(i+4)$, e pelo menos de Cu, Zn, Cd e Ru. Em uma configuração específica, o peptídeo isolado pode ter os resíduos substituídos do peptídeo derivado da cupredoxina dentro de resíduos equivalentes aos resíduos 53-56, 58-64 e 68-70 da *P. aeruginosa* azurina.

Em outra configuração, o peptídeo isolado pode ter um ou mais pares de resíduos aminoácidos nativos no peptídeo derivado da cupredoxina substituídos por α,α -aminoácidos não naturais dissustituídos por cadeias de olefinas que correspondem aos aminoácidos nativos. O peptídeo isolado pode ter os resíduos substituídos do peptídeo derivado da cupredoxina dentro dos resíduos equivalentes aos resíduos 53-56, 58-64 e 68-70 da *P. aeruginosa* azurina.

Em algumas configurações, o peptídeo modificado derivado da cupredoxina pode ter uma ou mais moléculas PEG (polietilenoglicol) ligadas de forma covalente ao peptídeo derivado da cupredoxina. Especificamente, o peptídeo isolado pode ter uma ou mais moléculas PEG ligadas de forma covalente a um ou mais resíduos de cisteína do peptídeo derivado da cupredoxina. Em configurações específicas, o peptídeo isolado pode ter uma ou mais moléculas PEG ligadas de forma covalente a um ou mais resíduos de cisteína equivalentes a um ou mais resíduos 3, 6 e 112 da *Pseudomonas aeruginosa* azurina (SEQ

ID NO: 1). Em outra configuração, um resíduo de cisteína pode ser substituído no peptídeo derivado da cupredoxina, podendo ser ligado de forma covalente a uma molécula PEG.

Em outra configuração, o peptídeo isolado pode ter uma ou mais moléculas PEG ligadas de forma covalente ao peptídeo derivado da cupredoxina em uma lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, treonina, tirosina, grupo amino N-terminal e ácido carboxílico C-terminal. Em configurações específicas, o peptídeo isolado tem um ou mais resíduos de lisina ou de ácidos carboxílicos C-terminais ligados de forma covalente a uma molécula PEG. Em outra configuração, um ou mais
10 resíduos de lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, treonina e tirosina podem ser substituídos no peptídeo derivado da cupredoxina e podem ser ligados de forma covalente a uma molécula PEG. Em outras configurações, uma ou mais moléculas PEG podem ser ligadas de forma covalente a um ou mais grupos amino do peptídeo derivado da cupredoxina, ou randomicamente ligados de forma covalente ao
15 peptídeo derivado da cupredoxina.

O peso molecular médio das moléculas PEG por peptídeo derivado da cupredoxina é cerca de 200 a cerca de 100.000 daltons. O peptídeo derivado da cupredoxina pode ser ligado de forma covalente a uma ou mais moléculas PEG ramificadas, especificamente em que a molécula PEG ramificada tem cerca de 50 kDa. O peptídeo derivado da
20 cupredoxina pode ser ligado de forma covalente a uma ou mais moléculas PEG lineares, especificamente em que a molécula PEG linear tem cerca de 5 kDa.

Outro aspecto da invenção é uma composição farmacêutica que pode compreender um peptídeo modificado derivado da cupredoxina e um veículo farmaceuticamente aceitável.

Outro aspecto da invenção é um método para tratar condições de mamíferos que pode compreender a administração ao mamífero, de uma quantidade terapeuticamente eficaz dos peptídeos modificados derivados da cupredoxina. Em configurações específicas, o mamífero é humano.

5 Outro aspecto da invenção é um peptídeo isolado que compreende, ou consiste de forma alternativa, na sequência aminoácida

$X_1SX_2AADX_3X_4X_5VVX_6DX_7X_8ASGLDKDYLKPDX_9$ (SEQ ID NO: 48): em que X_1 é selecionado do grupo que consiste em L e acetilado-L; X_2 é selecionado do grupo que consiste em T e W; X_3 é selecionado do grupo que consiste em M, L e V; X_4 é
10 selecionado do grupo que consiste em Q e W; X_5 é selecionado do grupo que consiste em G e A; X_6 é selecionado do grupo que consiste em T e W; X_7 é selecionado do grupo que consiste em G, T e W; X_8 é selecionado do grupo que consiste em M, L e V; e X_9 é selecionado do grupo que consiste em D e amidado-D.

Outro aspecto da invenção é um peptídeo isolado que compreende, ou que consiste
15 alternativamente na sequência aminoácida

$X_1DPKLYDKDLGSAX_2X_3DX_4VVX_5X_6X_7DAAX_8SX_9$ (SEQ ID NO: 49): em que X_1 é selecionado do grupo que consiste em D e acetilado-D; X_2 é selecionado do grupo que consiste em M, L e V; X_3 é selecionado do grupo que consiste em G, T e W; X_4 é selecionado do grupo que consiste em T e W; X_5 é selecionado do grupo que consiste em
20 G e A; X_6 é selecionado do grupo que consiste em Q e W; X_7 é selecionado do grupo que consiste de M, L e V; X_8 é selecionado do grupo que consiste em T e W; e X_9 é selecionado do grupo que consiste em L e amidado-L.

Outro aspecto da invenção é um peptídeo isolado que compreende, ou consiste nas sequências de SEQ ID NOS: 50-3506.

BREVE DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

SEQ ID NO: 1 é a sequência aminoácida de wt-azurina da *Pseudomonas aeruginosa*.

5 SEQ ID NO: 2 é a sequência aminoácida de plastocianina do *Phormidium laminosum*.

SEQ ID NO: 3 é a sequência aminoácida da rusticianina do *Thiobacillus ferrooxidans*.

SEQ ID NO: 4 é a sequência aminoácida de pseudoazurina do *Achromobacter cycloclastes*.

10 SEQ ID NO: 5 é a sequência aminoácida de azurina da *Pseudomonas syringae*.

SEQ ID NO: 6 é a sequência aminoácida de Laz da *Neisseria gonorrhoeae*.

SEQ ID NO: 7 é a sequência aminoácida de Laz da *Neisseria meningitides*.

SEQ ID NO: 8 é a sequência aminoácida de azurina de *Vibrio parahaemolyticus*.

15 SEQ ID NO: 9 é a sequência aminoácida de azurina da *Bordetella bronchiseptica*.

SEQ ID NO: 10 é a sequência aminoácida da auracianina A da *Chloroflexus aurantiacus*.

SEQ ID NO: 11 é a sequência aminoácida da auracianina B da *Chloroflexus aurantiacus*.

20 SEQ ID NO: 12 é a sequência aminoácida da azurina da *Bordetella pertussis*.

SEQ ID NO: 13 é a sequência aminoácida do fragmento aminoácido 50-77 de wt-azurina da *Pseudomonas aeruginosa*.

SEQ ID NO: 14 é a sequência aminoácida do fragmento aminoácido 50-67 de wt-azurina da *Pseudomonas aeruginosa*.

SEQ ID NO: 15 é a sequência aminoácida do fragmento aminoácido 36-128 de wt-azurina da *Pseudomonas aeruginosa*.

SEQ ID NO: 16 é a sequência aminoácida do fragmento aminoácido 36-89 de wt-azurina da *Pseudomonas aeruginosa*.

5 SEQ ID NO: 17 é a sequência aminoácida do fragmento aminoácido 36-77 de wt-azurina da *Pseudomonas aeruginosa*.

SEQ ID NO: 18 é a sequência aminoácida do fragmento aminoácido 36-50 de wt-azurina da *Pseudomonas aeruginosa*.

10 SEQ ID NO: 19 é a sequência aminoácida do fragmento aminoácido 50-66 de wt-azurina da *Pseudomonas aeruginosa*.

SEQ ID NO: 20 é a sequência aminoácida do fragmento aminoácido 67-77 de wt-azurina da *Pseudomonas aeruginosa*.

SEQ ID NO: 21 é a sequência aminoácida do fragmento aminoácido 57-89 da auracianina B da *Chloroflexus aurantiacus*.

15 SEQ ID NO: 22 é a sequência aminoácida do fragmento aminoácido 50-77 da azurina da *Bordetella pertussis*.

SEQ ID NO: 23 é a sequência aminoácida do fragmento aminoácido 89-115 da proteína Laz da *Neisseria meningitidis*.

20 SEQ ID NO: 24 é a sequência aminoácida do fragmento aminoácido 53-70 de wt-azurina da *Pseudomonas aeruginosa*.

SEQ ID NO: 25 é a sequência aminoácida do fragmento aminoácido 53-64 de azurina da *Pseudomonas aeruginosa*.

SEQ ID NO: 26 é a sequência aminoácida do fragmento aminoácido 51-77 de azurina da *Pseudomonas aeruginosa*.

SEQ ID NO: 27 é a sequência aminoácida do fragmento aminoácido 51-77 de azurina da *Pseudomonas syringae*.

SEQ ID NO: 28 é a sequência aminoácida do fragmento aminoácido 52-78 de azurina da *Vibrio parahaemolyticus*.

5 SEQ ID NO: 29 é a sequência aminoácida do fragmento aminoácido 51-77 de azurina da *Bordetella bronchiseptica*.

SEQ ID NO: 30 é uma sequência artificial de uma forma variante da região aminoácida 50-77 da *Pseudomonas aeruginosa* azurina.

10 SEQ ID NO: 31 é uma sequência artificial de uma forma variante da região aminoácida 50-77 da *Pseudomonas aeruginosa* azurina.

SEQ ID NO: 32 é uma sequência artificial de uma forma variante da região aminoácida 50-77 da *Pseudomonas aeruginosa* azurina.

SEQ ID NO: 33 é uma sequência artificial de uma forma variante da região aminoácida 50-77 da *Pseudomonas aeruginosa* azurina.

15 SEQ ID NO: 34 é uma sequência artificial de uma forma variante da região aminoácida 50-77 da *Pseudomonas aeruginosa* azurina.

SEQ ID NO: 35 é uma sequência artificial de uma forma variante da região aminoácida 50-77 da *Pseudomonas aeruginosa* azurina.

20 SEQ ID NO: 36 é uma sequência artificial de uma forma variante da região aminoácida 50-77 da *Pseudomonas aeruginosa* azurina.

SEQ ID NO: 37 é uma sequência artificial de uma forma variante da região aminoácida 50-77 da *Pseudomonas aeruginosa* azurina.

SEQ ID NO: 38 é uma sequência artificial de uma forma variante da região aminoácida 50-77 da *Pseudomonas aeruginosa* azurina.

SEQ ID NO: 39 é uma sequência artificial de uma forma variante da região aminoácida 50-77 da *Pseudomonas aeruginosa* azurina.

SEQ ID NO: 40 é uma sequência artificial de uma forma variante da região aminoácida 50-77 da *Pseudomonas aeruginosa* azurina.

5 SEQ ID NO: 41 é uma sequência artificial de uma forma variante da região aminoácida 50-77 da *Pseudomonas aeruginosa* azurina.

SEQ ID NO: 42 é uma sequência artificial de uma forma variante da região aminoácida 50-77 da *Pseudomonas aeruginosa* azurina.

10 SEQ ID NO: 43 é uma sequência artificial de uma forma variante da região aminoácida 50-77 da *Pseudomonas aeruginosa* azurina.

SEQ ID NO: 44 é uma sequência artificial de uma forma variante da região aminoácida 50-77 da *Pseudomonas aeruginosa* azurina.

SEQ ID NO: 45 é uma sequência artificial de uma forma variante da região aminoácida 50-77 da *Pseudomonas aeruginosa* azurina.

15 SEQ ID NO: 46 é a sequência aminoácida conservada de azurinas, em que D é o ácido aspártico, G é glicina, Y é tirosina, K é lisina e X é qualquer aminoácido.

SEQ ID NO: 47 é a sequência aminoácida conservada de azurinas, em que D é o ácido aspártico, G é glicina, Y é tirosina, K é lisina e X é qualquer aminoácido.

20 SEQ ID NO: 48 é uma sequência artificial das modificações na azurina 50-77 da *Pseudomonas aeruginosa*.

SEQ ID NO: 49 é uma sequência artificial das modificações no D-isômero de azurina 50-77 da *Pseudomonas aeruginosa*.

SEQ ID NO: 50-3506 são sequências artificiais de peptídeos modificados derivados da cupredoxina.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. A Figura 1 mostra as imagens das varreduras completas dos camundongos que receberam as injeções de p18 marcado. O p18 IRDye® marcado (125 µg) foi injetado de forma intravenosa e os camundongos atímicos foram observados por varredura nos períodos indicados de tempo para a detecção da coloração marcada em tumores e órgãos usando o Sistema de Imagem Infra-vermelho Odyssey®.

Figura 2. A Figura 2 mostra as imagens das varreduras completas dos camundongos e de órgãos de camundongos que receberam as injeções de p18 marcado. 125 µg de p18 marcado IRDye® em 120 h pós-injeção i.v. (imediatamente antes do sacrifício). Os órgãos retirados e observados por varredura estão mostrados na direita. O sinal p18 foi visto a partir dos rins e dos tumores Mel-2.

Figura 3. Tumor subcutâneo Mel-2 com 125ug de p18 marcado IRDye® administrado i.v. 3 semanas após a injeção das células Mel-2, sendo a varredura infra-vermelha Odyssey® feita 48 horas depois. As imagens registradas com o canal 800 nm representam o sinal p18 específico do IRDye®, e as do canal 700 nm representam o fundo. O sinal p18 foi visto a partir dos rins e dos tumores Mel-2

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS CONFIGURAÇÕES

Definições

Como usado na presente, o termo "célula" inclui tanto o singular como o plural do termo, a menos que especificamente descrito como uma "única célula."

Como usado na presente, os termos "polipeptídeo," "peptídeo," e "proteína" são usados de forma intercambiável para se referir a um polímero de resíduos aminoácidos. Os termos se aplicam a polímeros aminoácidos em que um ou mais resíduos aminoácidos

são um análogo químico artificial de um aminoácido correspondente de ocorrência natural. Os termos também se aplicam aos polímeros aminoácidos de ocorrência natural. Os termos "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" também recebem modificações que incluem, sem limitações, glicosilação, anexação lipídica, sulfatação, gama-carboxilação dos
5 resíduos de ácido glutâmico, hidroxilação e ADP-ribosilação. Será visto que os polipeptídeos nem sempre são totalmente lineares. Por exemplo, os polipeptídeos podem ser ramificados como resultado de ubiquinação e podem ser circulares (com ou sem ramificação), geralmente como resultado de eventos de pós-translação, incluindo evento ou eventos de processamento natural produzidos pela manipulação humana e que não
10 ocorrem de forma natural. Os polipeptídeos circulares, ramificados e circulares ramificados podem ser sintetizados por processo natural de não translação, bem como por métodos totalmente sintéticos. Um peptídeo sintético é feito sem a ajuda de componentes celulares. Os métodos sintéticos para a fabricação de peptídeos são bem conhecidos na técnica, estando disponíveis comercialmente. Além disso, esta invenção
15 contempla o uso tanto de variantes aminoterminais contendo metionina e sem metionina da proteína da invenção.

Como usado na presente, o termo "condição" inclui desvios anatômicos e fisiológicos do normal que constituem um problema do estado normal do animal vivo ou de um de seus órgãos, que interrompe ou que modifica o desempenho das funções
20 corporais.

Como usado na presente, o termo "inibir o crescimento celular" significa reduzir a velocidade ou cessar a divisão celular e/ou da expansão celular. Este termo também inclui a inibição do desenvolvimento celular ou o aumento da morte celular.

Como usado na presente, o termo "sofrendo de" inclui atualmente a exibição de

sintomas de uma condição, tendo uma condição até sem sintomas observáveis, na recuperação de uma condição e na recuperação de uma condição.

Como usado na presente, o termo "tratamento" inclui evitar, reduzir, parar ou reverter a progressão ou a severidade da condição ou dos sintomas associados a uma
5 condição que esteja sendo tratada. Assim, o termo "tratamento" inclui a administração médica, terapêutica e/ou profilática, como seja adequado.

Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" é uma quantidade eficaz para evitar, reduzir, parar ou reverter o desenvolvimento, ou para aliviar, parcial ou totalmente, uma determinada condição, ou os sintomas existentes de uma determinada condição para a
10 qual o indivíduo esteja sendo tratado. A determinação de uma quantidade terapeuticamente eficaz é bem compreendida pelos técnicos no assunto.

Como usado na presente, o termo "atividade farmacológica" significa o efeito de um medicamento ou de outro produto químico em um sistema biológico. O efeito de um produto químico pode ser benéfico (terapêutico) ou prejudicial (tóxico). Os produtos
15 químicos puros ou misturas podem ter origem natural (plantas, animais ou minerais) ou podem ser compostos sintéticos.

Como usado na presente, o termo "pré-malignante" significa pré-canceroso, ou antes que as células anormais se dividam sem controle.

Como usado na presente, o termo "propriedade farmacocinética" se refere a um
20 parâmetro que descreve a disposição de um agente ativo ou de um medicamento em um organismo ou hospedeiro. As propriedades farmacocinéticas representativas incluem: meia-vida plasmática, metabolismo hepático de primeira passagem, volume de distribuição, grau de proteína sérica sanguínea, ex. albumina, ligação, etc.

Como usado na presente, o termo "meia-vida plasmática" se refere ao tempo para

que a metade de um medicamento administrado seja eliminada do plasma de um paciente pelos processos biológicos, ex., biometabolismo, excreção, etc.

Como usado na presente, o termo "volume de distribuição" se refere à distribuição e ao grau de retenção de um medicamento pelos vários compartimentos dos organismos, ex. os espaços intracelulares e extracelulares, tecidos e órgãos, etc. Este fator é expresso como o "volume aparente de distribuição" ou V_d , que é o volume estimado do corpo em que foi distribuído o medicamento. Um grande V_d sugere que o medicamento foi mais amplamente distribuído pelo corpo e pode estar associado a uma maior meia-vida, porque uma menor porção do medicamento estará no plasma, sendo assim enviado aos pontos de eliminação, os rins e o fígado.

Como usado na presente, o termo "grau de ligação sérica sanguínea" se refere à propensão de um medicamento para ser ligado por uma proteína sérica sanguínea, como a albumina.

Como usado na presente, o termo "eficácia" se refere à efetividade de um determinado agente ativo para realizar seu objetivo pretendido, isto é, a capacidade de um agente ativo para provocar seu efeito farmacológico desejado.

Como usado na presente, o termo "atividade específica" se refere ao volume do produto formado por uma enzima em um dado período de tempo sob determinadas condições por miligrama da enzima. A atividade específica é igual à taxa de reação multiplicada pelo volume de reação dividido pela massa da enzima. No caso de um peptídeo de transporte, a atividade específica será a quantidade de peptídeo de transporte ou do complexo de carga do peptídeo de transporte internalizado de uma célula em um determinado período de tempo sob determinadas condições por miligrama do peptídeo de transporte ou do complexo de carga do peptídeo de

transporte.

Como usado na presente, o termo "substancialmente puro", quando usado para modificar uma proteína ou outro produto celular da invenção, se refere, por exemplo, a uma proteína isolada do meio de crescimento ou do teor células, sob a forma substancialmente isenta ou não adulterada por outras proteínas e/ou compostos inibidores ativos. O termo "substancialmente puro" se refere a um fator em uma quantidade de pelo menos cerca de 75% de peso seco da fração isolada ou pelo menos "75% substancialmente puro". Mais especificamente, o termo "substancialmente puro" se refere a um composto de pelo menos cerca de 85% de peso seco, composto ativo ou pelo menos "85% substancialmente puro." Mais especificamente, o termo "substancialmente puro" se refere a um composto de pelo menos cerca de 95%, de peso seco, composto ativo ou pelo menos "95% substancialmente puro." O termo "substancialmente puro" também pode ser usado para modificar uma proteína ou composto de fabricação sintética em que, por exemplo, a proteína sintética seja isolada dos reagentes e subprodutos de reação(ões) de síntese.

O termo "grau farmacêutico" como usado na presente, ao se referir a um peptídeo ou composto da invenção, é um peptídeo ou composto que esteja isolado substancial ou essencialmente dos componentes que normalmente acompanham o material quando encontrado em seu estado natural, incluindo reagentes de síntese e subprodutos, e substancial ou essencialmente, isolados dos componentes que prejudiquem seu uso como produto farmacêutico. Por exemplo, um peptídeo "grau farmacêutico" pode ser um isolado isento de qualquer carcinógeno. Em algumas ocasiões, o "grau farmacêutico" pode ser modificado pelo método desejado de administração, como "grau farmacêutico intravenoso", para especificar um peptídeo ou composto que seja substancial ou

essencialmente isolado de qualquer substância que torne a composição inadequada para administração intravenosa em um paciente. Por exemplo, um peptídeo "grau farmacêutico intravenoso" pode ser isolado de detergentes, como de SDS, e de agentes antibacterianos como da azida.

5 As frases "isolado," "purificado" ou "biologicamente puro" se referem ao material que seja substancial ou essencialmente isento de componentes que normalmente acompanha o material como encontrado em seu estado nativo. Assim, os peptídeos isolados, de acordo com a invenção, não contêm preferivelmente materiais normalmente associados aos peptídeos em seus ambientes *in situ*. Uma região "isolada" se refere a
10 uma região que não inclui toda a sequência do polipetídeo da região de onde provém. Um ácido nucléico "isolado", proteína, ou seu respectivo fragmento foi substancialmente removido de seu ambiente *in vivo*, de maneira que pode ser manipulado pelo técnico treinado, de forma sem limitações ao seqüenciamento do nucleotídeo, digestão com restrição, mutagênese direcionada para o local e subclonagem nos vetores de expressão de
15 um fragmento de ácido nucléico, assim como na obtenção da proteína ou do fragmento de proteína em quantidades substancialmente puras.

O termo "tipo selvagem", como usado na presente, significa que o peptídeo tem a mesma sequência daquele de ocorrência natural.

O termo "variante" como usado na presente com referência a um peptídeo é
20 relativo às variantes da sequência de aminoácidos que podem ter aminoácidos substituídos, retirados ou inseridos quando comparados ao polipetídeo do tipo selvagem. As variantes podem ser truncamentos do peptídeo do tipo selvagem. Uma "deleção" é a remoção de um ou mais aminoácidos do interior da proteína do tipo selvagem, enquanto um "truncamento" é a remoção de um ou mais aminoácidos de

um ou mais terminais da proteína do tipo selvagem. Assim, um peptídeo variante pode ser feito por manipulação dos genes que codificam o polipeptídeo. Pode ser feita uma variante pela alteração da composição básica ou das características do polipeptídeo, mas não de pelo menos algumas atividades farmacológicas fundamentais. Por exemplo, uma “variante” do peptídeo de trânsito *Pseudomonas aeruginosa* pode ser um peptídeo de trânsito *Pseudomonas aeruginosa* mudado que retém sua capacidade de entrar nas células do câncer. Em alguns casos, um peptídeo variante é sintetizado por aminoácidos não naturais, como os resíduos do ϵ -(3,5-dinitrobenzoil)-Lys. (Ghadiri & Fernholz, J. Am. Chem. Soc., 112:9633-9635 (1990)). Em algumas configurações, a variante não tem mais que 20, 19, 18, 17 ou 16 aminoácidos substituídos, retirados ou inseridos comparados ao peptídeo do tipo selvagem ou de uma sua porção. Em algumas configurações, a variante não tem mais que 15, 14, 13, 12 ou 11 aminoácidos substituídos, retirados ou inseridos comparados ao peptídeo do tipo selvagem ou de uma sua porção. Em algumas configurações, a variante não tem mais que 10, 9, 8 ou 7 aminoácidos substituídos, retirados ou inseridos comparados ao peptídeo do tipo selvagem ou de uma sua porção. Em algumas configurações, a variante não tem mais que 6 aminoácidos substituídos, retirados ou inseridos comparados ao peptídeo do tipo selvagem ou de uma sua porção. Em algumas configurações, a variante não tem mais que 5 ou 4 aminoácidos substituídos, retirados ou inseridos comparados ao peptídeo do tipo selvagem ou de uma sua porção. Em algumas configurações, a variante não tem mais que 3, 2 ou 1 aminoácidos substituídos, retirados ou inseridos comparados ao peptídeo do tipo selvagem ou de uma sua porção.

O termo “aminoácido” como usado na presente significa que um meio aminoácido que compreende qualquer resíduo aminoácido de ocorrência natural ou não natural ou sintético, isto é, qualquer meio que compreenda pelo menos uma carboxila e pelo menos um resíduo amina ligado diretamente por um, dois, três ou
5 mais átomos de carbono, normalmente um átomo de carbono (α). Um aminoácido pode ser um L-isômero ou um D-isômero de um aminoácido.

O termo “derivado” como usado na presente com referência a um peptídeo se refere a um peptídeo que é obtido do peptídeo individual. Uma derivação inclui modificações químicas do peptídeo, de maneira que aquele peptídeo ainda retenha
10 algumas de suas atividades farmacológicas fundamentais. Por exemplo, um "derivado" de um peptídeo de transporte *Pseudomonas aeruginosa* pode ser um peptídeo de transporte *Pseudomonas aeruginosa* quimicamente modificado que retenha sua capacidade de entrar nas células do câncer. As modificações químicas de interesse incluem, sem limitações, a amidação, acetilação, sulfatação, modificação de
15 polietilenoglicol (PEG), fosforilação ou glicosilação do peptídeo. Além disso, um peptídeo derivado pode ser uma fusão de um polipeptídeo com um composto químico, como, sem limitações, outro peptídeo, molécula de medicamento ou outro agente terapêutico ou farmacêutico ou uma sonda detectável.

O termo "identidade porcentual (%) da sequência aminoácida" é definido como a
20 porcentagem dos resíduos aminoácidos em um polipeptídeo que são idênticos aos resíduos aminoácidos em uma sequência candidata quando são alinhadas duas sequências. Para determinar a identidade aminoácida porcentual (%), são alinhadas sequências e, caso necessário, são introduzidas folgas para obter a máxima identidade % da sequência; as substituições conservadoras não são consideradas como parte da

identidade da sequência. Os procedimentos para o alinhamento da sequência aminoácida para a determinação da identidade porcentual são bem conhecidos pelos técnicos no assunto. São geralmente usados softwares de computador de domínio público como os softwares BLAST, BLAST2, ALIGN2 ou Megalign (DNASTAR) para alinhar as

5 sequências de peptídeos. Em uma configuração específica, é usado o Blastp (disponível no *National Center for Biotechnology Information, Bethesda MD*) utilizando parâmetros padrão de filtro de longa complexidade, *expect 10, word size 3, existence 11 e extension 1*. Quando as sequências aminoácidas estiverem alinhadas, a identidade porcentual (%) da sequência aminoácida de uma dada sequência aminoácida A em, com ou contra uma dada

10 sequência aminoácida B (que pode ser denominada de forma alternativa como uma dada sequência aminoácida A que tem ou que compreende uma determinada identidade sequencial porcentual (%) aminoácida em, com ou contra uma dada sequência aminoácida B) pode ser calculada como:

$$\text{identidade sequencial porcentual (\%) aminoácida} = X/Y * 100.$$

15 Em que:

X é o número de resíduos aminoácidos classificados como comparações idênticas pelo alinhamento sequencial do programa ou pelo alinhamento do algoritmo de A e B e

Y é o número total de resíduos aminoácidos em B.

Se o comprimento da sequência aminoácida A não for igual ao comprimento da

20 sequência aminoácida B, a identidade sequencial porcentual (%) aminoácida de A para B não será igual à identidade sequencial porcentual (%) aminoácida de B para A. Ao comparar maiores sequências com menores sequências, a menor sequência será a sequência "B". Por exemplo, ao comparar peptídeos truncados com o correspondente polipeptídeo do tipo selvagem, o peptídeo truncado será a sequência "B".

Geral

A presente invenção se refere a peptídeos derivados da cupredoxina que mantêm uma ou mais atividades farmacológicas da cupredoxina e que podem ter melhores propriedades farmacocinéticas, como melhor estabilidade, atividade específica, meia-vida na corrente sanguínea, e/ou menor imunogenicidade, entre outras. Além disso, a presente invenção se refere a compostos obtidos a partir de peptídeos modificados derivados da cupredoxina, que por sua vez também mantêm uma ou mais atividades farmacológicas da cupredoxina e que têm melhores propriedades farmacocinéticas. Finalmente, a invenção se refere a métodos de uso dos peptídeos modificados derivados da cupredoxina e compostos deles provenientes para o tratamento e/ou diagnóstico de várias condições sofridas por pacientes mamíferos, e para pesquisar várias condições sofridas por pacientes mamíferos.

Composições

A invenção se refere a peptídeos que são modificações de peptídeos derivados da cupredoxina com melhores propriedades farmacocinéticas. Em algumas configurações, esses peptídeos modificados derivados da cupredoxina retêm pelo menos uma atividade farmacológica da cupredoxina. Em algumas configurações, os peptídeos modificados derivados da cupredoxina são isolados, substancialmente puros ou de grau farmacêutico. Em configurações específicas, os peptídeos modificados derivados da cupredoxina são intravenosos de grau farmacêutico.

As cupredoxinas e especificamente a azurina da *Pseudomonas aeruginosa*, são conhecidas como tendo várias atividades farmacológicas úteis para o tratamento e/ou o diagnóstico de pacientes mamíferos e para a realização de pesquisa de condições sofridas por pacientes mamíferos. Por exemplo, muitas proteínas da cupredoxina como a

Pseudomonas aeruginosa azurina, têm a capacidade de entrar especificamente e matar muitos tipos de células de câncer de mamíferos. Yamada *et al.*, Cell.Biol.7:1418-1431(2005); Hiraoka *et al.*, PNAS 101:6427-6432 (2004); Hiraoka *et al.* Biochem. Biophys. Res. Comm. 338:1284-1290 (2005); Pedido de patente norte-americana 5 11/244,105, depositado em 6 de outubro de 2005; Pedido de patente norte-americana No. 10/720.603, depositado em 24 de novembro de 2003; Pedido de patente norte-americana No. 10/047.710, depositado em 15 de janeiro de 2002; Pedido de patente norte-americana No.11/485.252 depositado em 13 de julho de 2006, todos expressamente incorporados à presente por referência na íntegra. A azurina da *P. aeruginosa* é também conhecida 10 como inibidora do crescimento da infecção viral ou bacteriana, e mais especificamente da infecção HIV-1 nas células mononucleares de sangue periférico, como também inibidora da parasitemia de células eritrócitos de mamíferos infectados pela malária. Chaudhari *et al.*, Cell Cycle. 5:1642-1648 (2006); Pedido de patente norte-americana No. 11/436.591, depositado em 19 de maio de 2006; Pedido de patente norte- 15 americana No. 11/436.590, depositado em 19 de maio de 2006, ambos expressamente incorporados à presente por referência na íntegra. A azurina da *P. aeruginosa* é também conhecida como interferente no sistema de sinalização da efrina em várias células e tecidos de mamíferos. Pedido de patente norte-americana No. 11/436.592, depositado em 19 de maio de 2006, expressamente incorporado à presente por referência na íntegra. 20 Além disso, os peptídeos derivados da *P. aeruginosa* azurina são conhecidos como inibidores da angiogênese em células de mamíferos, e especificamente em células endoteliais vasculares umbilicais humanas (HUVECs). Pedido de patente norte-americana No. 11/488.693, depositado em 19 de julho de 2006, expressamente incorporado à presente por referência na íntegra. Em algumas configurações, os peptídeos

modificados derivados da cupredoxina da invenção retêm pelo menos uma atividade farmacológica da cupredoxina da qual derivam. A atividade farmacológica da cupredoxina pode ser qualquer atividade útil de uma cupredoxina. As atividades farmacológicas de particular interesse incluem, sem limitações, a capacidade de especificamente entrar nas células de câncer de mamíferos, a incapacidade de entrar em células não cancerosas de mamíferos, a capacidade de entrar nas células pré-malignantes de mamíferos, a capacidade de matar células de câncer de mamíferos, a capacidade de matar células pré-malignantes de mamíferos, a capacidade inibir o crescimento de infecções virais ou bacterianas, a capacidade inibir a infecção HIV-1 nas células mononucleares de sangue periférico, a capacidade de inibir a parasitemia da malária nas células eritrócitos infectadas pela malária e a capacidade de inibir a angiogênese nas células de mamíferos, e especificamente HUVECs. São fornecidos métodos para a medição da quantidade de atividade farmacológica do peptídeo nos pedidos e publicações supra-referenciadas.

Os peptídeos derivados da cupredoxina podem ser qualquer cupredoxina, ou variante, derivado ou equivalente estrutural da cupredoxina. Em algumas configurações, o peptídeo derivado da cupredoxina retém pelo menos uma atividade farmacológica da cupredoxina. Em algumas configurações, a cupredoxina pode ser, sem limitações, azurina, plastocianina, rusticianina, pseudoazurina, auracianina ou proteína similar à azurina.

Os peptídeos derivados da cupredoxina podem provir de qualquer organismo, incluindo sem limitações a *Pseudomonas aeruginosa*, *Phormidium laminosum*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Achromobacter cycloclastes*, *Pseudomonas syringa*, *Neisseria meningitidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bordetella bronchiseptica*,

Chloroflexus aurantiacus e *Neisseria gonorrhoeae*. Em algumas configurações, a cupredoxina pode ser azurina, especificamente de um organismo incluindo, sem limitações, a *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Vibrio parahaemolyticus* ou *Bordetella bronchiseptica*.

5 Os peptídeos derivados da cupredoxina podem ser qualquer variante, derivado ou equivalente estrutural de uma cupredoxina. Os peptídeos derivados da cupredoxina também podem ser qualquer peptídeo da cupredoxina conhecido na técnica e/ou descritos nos pedidos anteriores, como no Pedido de patente norte-americana No. 11.244.105, depositado em 6 de outubro de 2005; Pedido de patente norte-americana No. 10/720.603,
10 depositado em 24 de novembro de 2003; Pedido de patente norte-americana No. 10/047.710, depositado em 15 de janeiro de 2002; Pedido de patente norte-americana No. 11/485.252, depositado em 13 de julho de 2006; Pedido de patente norte-americana No. 11/436.591, depositado em 19 de maio de 2006; Pedido de patente norte-americana No. 11/436.590, depositado em 19 de maio de 2006; Pedido de patente norte-americana No.
15 11/436.592, depositado em 19 de maio de 2006; e o Pedido de patente norte-americana No. 11/488.693, depositado em 19 de maio de 2006. Todos esses pedidos estão expressamente incorporados por referência à presente na íntegra. Em algumas configurações, o peptídeo está isolado. Em algumas configurações, o peptídeo é substancialmente puro ou de grau farmacêutico. Em outras configurações, o peptídeo está
20 em uma composição que compreende ou consiste essencialmente em peptídeo. Em outra configuração específica, o peptídeo não induz uma resposta imune em um mamífero e, mais especificamente em um humano. Os peptídeos derivados da cupredoxina podem ser variantes da sequência de aminoácidos que têm os aminoácidos substituídos, retirados ou inseridos quando comparados com a cupredoxina do tipo selvagem. Essas variantes

podem ser truncamentos da cupredoxina do tipo selvagem. Os peptídeos derivados da cupredoxina compreendem uma região de uma cupredoxina que é menor que o comprimento total do polipeptídeo do tipo selvagem. Em algumas configurações, os peptídeos derivados da cupredoxina compreendem mais que cerca de 10 resíduos, mais que cerca de 15 resíduos ou mais que cerca de 20 resíduos de uma cupredoxina truncada. Em algumas configurações, os peptídeos derivados da cupredoxina compreendem não mais que cerca de 100 resíduos, não mais que cerca de 50 resíduos, não mais que cerca de 40 resíduos. não mais que cerca de 30 resíduos ou não mais que cerca de 20 resíduos de uma cupredoxina truncada. Em algumas configurações, a cupredoxina tem para o peptídeo derivado da cupredoxina, e mais especificamente SEQ ID NOS: 1-12 pelo menos cerca de 70% da identidade da sequência aminoácida, pelo menos cerca de 80% da identidade da sequência aminoácida, pelo menos cerca de 90% da identidade da sequência aminoácida e pelo menos cerca de 95% da identidade da sequência aminoácida ou pelo menos cerca de 99% da identidade da sequência aminoácida.

Em configurações específicas, o peptídeo derivado da cupredoxina compreende resíduos de *P. aeruginosa* azurina 50-77, resíduos de azurina 50-67, ou resíduos de azurina 36-88. Em outras configurações, a variante da cupredoxina consiste em resíduos de *P. aeruginosa* azurina 50-77, resíduos de azurina 50-67, ou resíduos de azurina 36-88. Em outras configurações específicas, a variante consiste em resíduos equivalentes de uma cupredoxina diferente da azurina. Para determinar os resíduos equivalentes de outra cupredoxina, a sequência aminoácida cupredoxina individual será alinhada à sequência *Pseudomonas aeruginosa* azurina usando BLAST, BLAST2, ALIGN2 ou Megalign (DNASTAR), os relevantes resíduos localizados na sequência aminoácida *P. aeruginosa* azurina, e os relevantes resíduos encontrados na sequência aminoácida

cupredoxina individual, e o peptídeo equivalente assim projetado.

Em uma configuração da invenção, o peptídeo derivado da cupredoxina compreende pelo menos os aminoácidos 57 a 89 da auracianina B da *Chloroflexus aurantiacus* (SEQ ID NO: 21). Em outra configuração da invenção, o peptídeo derivado da cupredoxina
 5 compreende pelo menos os aminoácidos 51-77 da *Pseudomonas syringae* azurina (SEQ ID NO: 27). Em outra configuração da invenção, o peptídeo derivado da cupredoxina compreende pelo menos os aminoácidos 89-115 da *Neisseria meningitidis* Laz (SEQ ID NO: 23). Em outra configuração da invenção, o peptídeo derivado da cupredoxina compreende pelo menos os aminoácidos 52-78 da *Vibrio parahaemolyticus* azurina (SEQ
 10 ID NO: 28). Em outra configuração da invenção, o peptídeo derivado da cupredoxina compreende pelo menos os aminoácidos 51-77 da *Bordetella bronchiseptica* azurina (SEQ ID NO: 29).

Os peptídeos derivados da cupredoxina também incluem peptídeos feitos a partir de aminoácidos sintéticos que não ocorrem naturalmente. Por exemplo, os aminoácidas de
 15 ocorrência não natural podem ser integrados ao peptídeo variante para ampliar ou otimizar a meia-vida da composição na corrente sanguínea. Essas variantes incluem, sem limitações, D,L-peptídeos (diastereômero), (ver, por exemplo Futaki *et al.*, J. Biol. Chem. 276(8):5836-40 (2001); Papo *et al.*, Cancer Res. 64(16):5779-86(2004); Miller *et al.* Biochem. Pharmacol. 36(1):169-76, (1987); peptídeos contendo aminoácidos incomuns
 20 (ver, por exemplo Lee *et al.* J. Pept. Res. 63(2):69-84 (2004), aminoácido não natural contendo olefina seguido por corte de hidrocarbonetos (ver, por exemplo, Schafmeister *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 122:5891-5892 (2000); Walenski *et al.*, Science 305:1466-1470 (2004)), e peptídeos que compreendem resíduos de ϵ -(3,5-dinitrobenzoil)-Lys.

Em outras configurações, o peptídeo derivado da cupredoxina é um derivado de

uma cupredoxina. Os derivados de cupredoxina são modificações químicas do peptídeo, de maneira que o peptídeo ainda retenha algumas de suas atividades farmacológicas. Por exemplo, um "derivado" da azurina pode ser uma azurina quimicamente modificada que retenha sua capacidade de inibir o crescimento das células de câncer de mamíferos. As

5 modificações químicas de interesse incluem, sem limitações, o corte de hidrocarbonetos (*stapling*), amidação, acetilação, sulfatação, modificação de polietilenoglicol (PEG), fosforilação e glicosilação do peptídeo. Além disso, um peptídeo derivado pode ser uma fusão de uma cupredoxina, ou variante, derivado ou equivalente estrutural de um composto químico, e sem limitações, de outro peptídeo, molécula de medicamento ou de

10 outro agente terapêutico ou farmacêutico ou uma sonda detectável. Os derivados de interesse incluem modificações químicas pelas quais a meia-vida dos peptídeos e das composições da invenção pode ser prolongada ou otimizada na corrente sanguínea, como por vários métodos bem conhecidos dos técnicos no assunto, incluindo sem limitações, peptídeos circularizados (ver, por exemplo Monk et al., *BioDrugs* 19(4):261-78, (2005);

15 DeFreest et al., *J. Pept. Res.* 63(5):409-19 (2004)), modificações N- e C-terminais (ver, por exemplo Labrie et al., *Clin. Invest. Med.* 13(5):275-8, (1990)), e aminoácida não natural contendo olefina seguido pelo corte de hidrocarbonetos (ver, por exemplo Schafmeister et al., *J. AM. Chem. Soc.* 122:5891-5892 (2000); Walenski et al., *Science* 305:1466-1470 (2004)).

20 Em outra configuração, o peptídeo é um equivalente estrutural de uma cupredoxina ou um truncamento de uma cupredoxina. Os exemplos de estudos que determinam significativa homologia estrutural entre as cupredoxinas e demais proteínas incluem Toth et al. (*Developmental Cell* 1:82-92 (2001)). Especificamente, a significativa homologia estrutural entre uma cupredoxina e o equivalente estrutural é determinada usando o

algoritmo VAST. Gibrat *et al.*, Curr Opin Struct Biol 6:377-385 (1996); Madej *et al.*, Proteins 23:356-3690 (1995). Em configurações específicas, o valor p VAST de uma comparação estrutural de uma cupredoxina com o equivalente estrutural é menos que cerca de 10^{-3} , menos que cerca de 10^{-5} ou menos que cerca de 10^{-7} . Em outras configurações, a significativa homologia estrutural entre uma cupredoxina e o equivalente estrutural é determinada usando o algoritmo DALI. Holm & Sander, J. Mol. Biol. 233:123-138 (1993). Em configurações específicas, a classificação Z DALI de uma comparação estrutural pareada é menos que cerca de 3,5, pelo menos cerca de 7,0, ou pelo menos cerca de 10,0. Um específico peptídeo derivado da cupredoxina de interesse é uma função do domínio de entrada da cupredoxina com um composto de carga. Em algumas configurações, peptídeos derivados da cupredoxina podem entrar especificamente em uma célula de câncer de mamífero, e assim ser usada para dirigir um composto de carga para uma célula e especificamente para o interior de uma célula de câncer. A cupredoxina peptídeo de transporte compreende um domínio de entrada da cupredoxina. O termo " domínio de entrada da cupredoxina " se refere a um fragmento de uma cupredoxina que inclui a sequência amino que é necessária para a entrada da cupredoxina em uma célula de câncer de mamífero. Em configurações específicas, o peptídeo de transporte da cupredoxina é SEQ ID NOS: 13-17, ou resíduos equivalentes de outra cupredoxina. A presente invenção compreende peptídeos de transporte da cupredoxina complexados com compostos de carga que foram modificados para melhorar suas propriedades farmacocinéticas. O composto de carga assim como o peptídeo de transporte da cupredoxina, pode ser modificado pelos métodos descritos na presente para melhorarem as propriedades farmacocinéticas. Esses complexos podem então ser usados nos métodos da invenção para entregar o composto de carga nas células de câncer de mamíferos para o tratamento de pacientes que sofrem de

câncer. Os compostos de carga, entregues pelos materiais e métodos da presente invenção incluem, sem limitações, proteínas, lipoproteínas, polipeptídeos, peptídeos, polissacarídeos, ácidos nucleicos, incluindo ácidos nucleicos anti-senso, corantes, identificadores fluorescentes e radioativos, micropartículas ou nanopartículas, toxinas, moléculas inorgânicas e orgânicas, pequenas moléculas e medicamentos. Em algumas configurações, os medicamentos e toxinas matam as células do tumor. Esses peptídeos de transporte da cupredoxina e os complexos deles provenientes são providos no pedido de patente norte-americana No. 11:244.105, depositado em 6 de outubro de 2005, expressamente incorporado à presente por referência na íntegra.

Em algumas configurações, os resíduos aminoácidos nos peptídeos derivados da cupredoxina que são conservados entre as cupredoxinas com a desejada atividade farmacológica são conservados nos peptídeos modificados derivados da cupredoxina com melhores propriedades farmacocinéticas. Por exemplo, é sabido que no interior do domínio de entrada da cupredoxina da *Pseudomonas aeruginosa* azurina, são conservados vários resíduos entre as proteínas azurinas e similares à azurina de várias espécies, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Bordetella bronchiseptica*. Yamada *et al.*, Cell. Microbiol. 7:1418-1431 (2005). Em algumas configurações, o peptídeo derivado da cupredoxina retém um ou mais resíduos aminoácidos correspondentes aos resíduos 62, 63, 69, 72, 74 e 77 *P. aeruginosa* azurina (SEQ IS NO: 1). Em outra configuração, o peptídeo cupredoxina compreende uma sequência aminoácida conservada DGXXXXDXXYXKXXD (SEQ ID NO: 46) ou DGXXXXDXXYXKXXD (SEQ ID NO: 47), em que D é ácido aspártico, G é glicina, Y é tirosina, K é lisina e X é qualquer aminoácido.

Modificações

A presente invenção se refere a modificações de peptídeos derivados da cupredoxina que são variantes ou derivados, e em configurações específicas, mantêm uma ou mais atividades farmacológicas, e/ou que melhoram as propriedades farmacocinéticas do peptídeo. Essas modificações incluem, sem limitações, variantes e derivados dos peptídeos que podem aumentar a estabilidade, atividade específica, meia-vida plasmática e/ou reduzir a imunogenicidade do peptídeo derivado da cupredoxina, retendo a capacidade da cupredoxina para entrar nas células de câncer de mamíferos e/ou inibir o crescimento das células de câncer de mamíferos. Essas variantes incluem, sem limitações, aquelas que reduzem a hidrólise do peptídeo, reduzem a deamidação do peptídeo, reduzem a oxidação, reduzem a imunogenicidade e/ou aumentam a estabilidade estrutural do peptídeo. É contemplado que duas ou mais das modificações descritas na presente podem ser combinadas em um peptídeo modificado derivado da cupredoxina, assim como combinações de uma ou mais modificações descritas na presente com outras modificações para melhorar as propriedades farmacocinéticas bem conhecidas pelos técnicos no assunto. Muitos métodos para o projeto dessas variantes e derivados são bem conhecidos na técnica.

Biotransformação

Uma abordagem para melhorar as propriedades farmacocinéticas dos peptídeos é criar variantes e derivados dos peptídeos derivados da cupredoxina que sejam menos susceptíveis de biotransformação. A biotransformação pode reduzir a atividade farmacológica do peptídeo, assim como aumentar a taxa pela qual é eliminado do corpo do paciente. Uma maneira de fazer isso é determinar os aminoácidos e/ou as sequências aminoácidas que sejam mais prováveis de biotransformação e substituir esses

aminoácidos pelos que não sejam susceptíveis a este processo particular de transformação.

A hidrólise é geralmente um problema nos peptídeos contendo aspartato. O aspartato é susceptível à desidratação para formar um intermediário imida cíclico, fazendo com que o aspartato seja convertido no análogo isoaspartato potencialmente inativo e, por fim clivando a cadeia do peptídeo. Por exemplo, na presença do ácido aspártico — a prolina na sequência do peptídeo, a formação catalisada do ácido do intermediário imida cíclico pode resultar na clivagem da cadeia do peptídeo. De maneira similar, na presença do ácido aspártico-- a glicina na sequência do peptídeo, o intermediário cíclico pode ser hidrolisado seja na forma original do aspartato (inofensiva) ou no análogo isoaspartato. Eventualmente, toda a forma do aspartato pode ser completamente convertida em um análogo isoaspartato. Similarmente, sequências com serina também podem ser desidratadas para formarem um intermediário imida cíclico que pode clivar a cadeia do peptídeo. A clivagem do peptídeo pode resultar em meia-vida plasmática reduzida, assim como em uma atividade farmacológica específica reduzida do peptídeo.

É contemplado que a substituição de outros aminoácidos para asparagina e/ou serina na sequência do peptídeo derivado da cupredoxina pode resultar em um peptídeo com melhores propriedades farmacocinéticas, como maior meia-vida plasmática e maior atividade específica da atividade farmacológica do peptídeo. Em uma variante contemplada, em um ou mais resíduos de resíduo de asparaginas do peptídeo derivado da cupredoxina podem ser substituídos por outro resíduo aminoácido e, especificamente um resíduo do ácido glutâmico. Em outra variante contemplada, um ou mais resíduos de serina do peptídeo derivado da cupredoxina podem ser substituídos por outro resíduo aminoácido, e especificamente um resíduo de treonina. Em algumas variantes do

peptídeo derivado da cupredoxina, são substituídos um ou mais resíduos da asparagina e um ou mais resíduos da serina. Em algumas configurações, são feitas substituições conservadoras. Em outras configurações, são feitas substituições não conservadoras.

A deamidação dos resíduos aminoácidos é um problema particular na biotransformação. Essa reação catalisada por base frequentemente ocorre em sequências contendo asparagina--glicina ou glutamina--glicina e segue um mecanismo análogo à sequência ácido aspártico-glicina acima. A deamidação da sequência asparagina-glicina forma um intermediário imida cíclico que é subsequentemente hidrolisado para formar o análogo aspartato ou isoaspartato da asparagina. Além disso, o intermediário imida cíclico pode levar à racemização em análogos de ácido D-aspártico ou ácido D-isoaspártico de asparagina, todos podendo levar potencialmente a formas inativadas do peptídeo.

É contemplado que a deamidação nos peptídeos da cupredoxina pode ser evitada pela substituição de uma glicina, asparagina e/ou glutamina das sequências asparagina--glicina ou glutamina--glicina da cupredoxina por outro aminoácido e pode resultar em um peptídeo com melhores propriedades farmacocinéticas, como maior meia-vida plasmática e maior atividade específica da atividade farmacológica do peptídeo. Em algumas configurações, o um ou mais resíduos de glicina do peptídeo derivado da cupredoxina são substituídos por outro resíduo aminoácido. Em configurações específicas, um ou mais resíduos de glicina do peptídeo derivado da cupredoxina são substituídos por um resíduo de treonina ou de alanina. Em algumas configurações, o um ou mais resíduos de asparagina ou glutamina do peptídeo derivado da cupredoxina são substituídos por outro resíduo aminoácido. Em configurações específicas, um ou mais resíduos de asparagina ou glutamina do peptídeo derivado da cupredoxina são

substituídos por um resíduo de alanina. Em outras configurações específicas, a glicina nos resíduos 58 e/ou 63 da *P. aeruginosa* azurina (SEQ ID NO: 1), ou glicinas equivalentes de outras cupredoxinas, são substituídas por uma alanina ou uma treonina. Em outras configurações específicas, a metionina no resíduo 59 da *P. aeruginosa* azurina (SEQ ID NO: 1), ou um resíduo equivalente de metionina de outro peptídeo derivado da cupredoxina, é substituído por um resíduo alanina. Em outras configurações específicas, a glicina no resíduo 63 da *P. aeruginosa* azurina (SEQ ID NO: 1), ou um equivalente resíduo de glicina de outro peptídeo derivado da cupredoxina, é substituído por um resíduo treonina. Em algumas configurações, são feitas substituições conservadoras. Em outras configurações, são feitas substituições não conservadoras. Em configurações específicas, o peptídeo modificado derivado da cupredoxina da invenção compreende a seguinte sequência, em que os aminoácidos sublinhados são substituídos na sequência *Pseudomonas aeruginosa* azurina do tipo selvagem:

LSTAADMQAVVTDTMASGLDKDYLPDD (SEQ ID NO: 30)

A oxidação reversível e irreversível dos aminoácidos são outros processos biotransformadores que também podem apresentar um problema que pode reduzir a atividade farmacológica, e/ou meia-vida plasmática dos peptídeos derivados da cupredoxina. Os resíduos de cisteína e metionina são os resíduos predominantes que passam por oxidação reversível. A oxidação da cisteína é acelerada em maior pH, em que o tiol é mais facilmente deprotonado e forma prontamente ligações intracadeia ou intercadeia de dissulfeto. Essas ligações dissulfeto podem ser facilmente revertidas *in vitro* pelo tratamento com ditioneitol (DTT) ou cloridrato de tris(2-carboxietilfosfina) (TCEP). A metionina oxida por meio de ambos os caminhos químico e fotoquímico para

formar sulfóxido de metionina e ainda em metionina sulfona, ambos sendo quase impossíveis de reverter.

É contemplado que a oxidação nos peptídeos derivados da cupredoxina pode ser evitada pela substituição dos resíduos de metionina e/ou de cisteína por outros resíduos.

5 Em algumas configurações, um ou mais resíduos de metionina e/ou cisteína do peptídeo derivado da cupredoxina são substituídos por outro resíduo aminoácido. Em configurações específicas, o resíduo de metionina é substituído por um resíduo de leucina ou valina. Em outras configurações específicas, uma ou mais das metioninas nos resíduos 56 e 64 de *P. aeruginosa* azurina (SEQ ID NO: 1), ou resíduos equivalentes de
10 metioninas em outros peptídeos derivados da cupredoxina, são substituídos por leucina ou valina. Em algumas configurações, são feitas substituições conservadoras. Em outras configurações, são feitas substituições não conservadoras.

Em configurações específicas, os peptídeos de cupredoxina da invenção compreendem uma ou mais das seguintes sequências, em que o aminoácido sublinhado é
15 substituído na sequência *Pseudomonas aeruginosa* azurina do tipo selvagem:

LSTAADLQGVVTDGLASGLDKDYLPDD (SEQ ID NO: 31) ou

LSTAADVQGVVTDGVASGLDKDYLPDD (SEQ ID NO: 32).

Outro processo biotransformador que pode afetar a atividade farmacológica, a meia-vida plasmática e/ou a imunogenicidade dos peptídeos derivados da cupredoxina é
20 a formação da dicetopiperazina e do ácido piroglutâmico. A formação da dicetopiperazina normalmente ocorre quando a glicina está na terceira posição a partir do N-terminal, e mais especialmente se a prolina ou a glicina estiver na posição 1 ou 2. A reação envolve o ataque nucleofílico do nitrogênio N-terminal na amida carbonil entre o segundo e o terceiro aminoácidos, o que leva à clivagem dos primeiros dois

aminoácidos sob a forma de uma dicetopiperazina. Por outro lado, a formação do ácido piroglutâmico pode ser quase inevitável se a glutamina estiver no N-terminal. Esta é uma reação análoga em que o nitrogênio N-terminal ataca o carbono carbonil da cadeia lateral da glutamina para formar um análogo do peptídeo piroglutamídeo deaminado. Esta conversão também ocorre no peptídeo contendo asparagina no N-terminal, mas em muito menor incidência.

É contemplado que a formação da dicetopiperazina e do ácido piroglutâmico pode ser reduzida nos peptídeos derivados da cupredoxina pela substituição da glicina na posição 1,2, ou 3 do N-terminal, da prolina na posição 3 do N-terminal, ou da asparagina no N-terminal do peptídeo por outro resíduo aminoácido. Em algumas configurações, a glicina nas posições 1, 2 ou 3 do N-terminal do peptídeo derivado da cupredoxina é substituída por outro resíduo aminoácido. Em configurações específicas, o resíduo de glicina é substituído por um resíduo de treonina ou alanina. Em outra configuração, uma prolina na posição 3 do N-terminal do peptídeo derivado da cupredoxina é substituída por outro resíduo aminoácido. Em configurações específicas, a prolina é substituída por um resíduo de alanina. Em outra configuração, uma asparagina no N-terminal é substituída por outro resíduo aminoácido. Em configurações específicas, o resíduo de asparagina é substituído por um resíduo de glutamina. Em algumas configurações, são feitas substituições conservadoras. Em outras configurações, são feitas substituições não conservadoras.

Outro processo biotransformador que pode afetar a atividade farmacológica, a meia-vida plasmática e/ou a imunogenicidade do peptídeo derivado da cupredoxina é a racemização. Esse termo é usado de forma solta para se referir à perda total da integridade quiral do aminoácido ou do peptídeo. A racemização envolve a conversão base catalisada

de um enantiômero (normalmente a forma L) de um aminoácido em uma mistura 1:1 de enantiômeros L- e D-. Uma maneira para melhorar a estabilidade do peptídeo em geral é fazer um peptídeo retro-inverso (D-isômero). A dupla inversão da estrutura do peptídeo geralmente deixa a topologia superficial da cadeia lateral intacta e tem sido usada
 5 amplamente para estabilizar os peptídeos biologicamente ativos. Snyder *et al.*, PLoS Biol. 2:0186-0193 {2004). Um Tat D-aminoácido substituído é internalizado nas células, assim como o peptídeo L-aminoácido. Futaki *et al.* J.Biol. Chem. 276:5836-5840 (2001); Huq *et al.*, Biochemistry 38:5172-5177(1999). Em algumas configurações, um ou mais resíduos aminoácidos do peptídeo derivado da cupredoxina são substituídos por D-
 10 isômeros daqueles resíduos. Em uma configuração, o peptídeo derivado da cupredoxina é uma versão retro-inverso (D-isômero) do peptídeo derivado da cupredoxina. Em uma configuração específica, o peptídeo derivado da cupredoxina é DDPKLYDKDLGSAMGDTVVGQMDAATSL (SEQ ID NO: 45).

Outros métodos para a proteção de um peptídeo derivado da cupredoxina da
 15 degradação biotransformadora são a N-acetilação e a C-amidação. Esses derivados podem proteger o peptídeo da degradação e podem fazer com que o peptídeo derivado da cupredoxina imite melhor o estado de carga dos grupos alfa amino e carboxil na proteína nativa. Os peptídeos com a N-acetilação e/ou a C-amidação podem ser fornecidos comercialmente. Em uma configuração da invenção, o N-terminal do peptídeo derivado da
 20 cupredoxina pode ser acetilado. Em outra configuração da invenção, o C-terminal dos peptídeos derivados da cupredoxina podem ser amidados. Em uma configuração específica, o peptídeo modificado derivado da cupredoxina é

Acetilação-LSTAADMQGVVTDGMASGLDKDYLPDD-amidação (SEQ ID NO: 33).

Estabilização da Estrutura Terciária

A estabilidade da estrutura terciária do peptídeo derivado da cupredoxina afetará a maioria dos aspectos da farmacocinética, incluindo a atividade farmacocinética, meia-vida plasmática, e/ou imunogenicidade entre outros. Ver Kanovsky *et al.*, Cancer Chemother. Pharmacol. 52:202-208 (2003); Kanovsky *et al.*, PNAS 23:12438-12443 (2001). As hélices do peptídeo geralmente se desfazem em hélices randômicas, tornando-se mais susceptíveis ao ataque da protease e podem não penetrar bem na membrana celular. Schafmeister *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 122:5891-5892 (2000). Portanto, uma maneira para estabilizar a estrutura geral do peptídeo é estabilizar a estrutura α -hélice do peptídeo. A ligação do hidrogênio intramolecular associada à formação da hélice reduz a exposição do backbone de amida polar, reduzindo assim a barreira à penetração da membrana em um peptídeo de transporte, e assim aumentando as atividades farmacológicas relacionadas e aumentando a resistência do peptídeo à clivagem de protease. *Id.* *Pseudomonas aeruginosa* azurina (SEQ ID NO: 1) tem α -hélices nos resíduos 53-56, 58-64 e 68-70.

Um método para a estabilização de uma α -hélice é substituir a α -hélice rompendo os resíduos aminoácidos como glicina, prolina, serina e ácido aspártico ou resíduos aminoácidos de hélice neutra como alanina, treonina, valina, glutamina, asparagina, cisteína, histidina, lisina ou arginina com resíduos formadores de hélice, como a leucina, isoleucina, fenilalanina, ácido glutâmico, tirosina, triptofano e metionina. É contemplado que a α -hélice de peptídeos derivados da cupredoxina pode ser estabilizada substituindo um ou mais resíduos de glicina, prolina, serina e/ou ácido aspártico por outros aminoácidos. Em configurações específicas, resíduos de glicina, prolina, serina, ácido aspártico, alanina, treonina, valina, glutamina, asparagina, cisteína, histidina, lisina e/ou

arginina são substituídos por resíduos de leucina, isoleucina, fenilalanina, ácido glutâmico, tirosina, triptofano e/ou metionina. *Ver Lee et al.*, Cancer Cell Intl. 11:21 (2005). Em outras configurações específicas, podem ser substituídos um ou mais resíduos de serina ou glutamina nas α -hélices de um peptídeo derivado da cupredoxina. Em

5 configurações ainda mais específicas, podem ser substituídos os resíduos de serina e/ou glutamina nos resíduos 53-56, 58-64 e 68-70 da *P. aeruginosa* azurina (SEQ ID NO: 1), ou um resíduo equivalente de outros peptídeos derivados da cupredoxina. Em outra configuração específica, pode ser substituído o resíduo de glutamina no resíduo aminoácido 57 da *P. aeruginosa* azurina (SEQ ID NO: 1), ou um resíduo equivalente de

10 outro peptídeo derivado da cupredoxina, mais especificamente substituído por triptofano. Em outra configuração específica, pode ser substituído o resíduo de treonina no resíduo aminoácido 52 da *P. aeruginosa* azurina (SEQ ID NO: 1), ou um resíduo equivalente de outro peptídeo derivado da cupredoxina, mais especificamente substituído por triptofano. Em outra configuração específica, pode ser substituído o resíduo de treonina no resíduo

15 aminoácido 61 da *P. aeruginosa* azurina (SEQ ID NO: 1), ou um resíduo equivalente de outro peptídeo derivado da cupredoxina, mais especificamente substituído por triptofano. Em outra configuração específica, pode ser substituído o resíduo de glicina no resíduo aminoácido 63 da *P. aeruginosa* azurina (SEQ ID NO: 1), ou um resíduo equivalente de outro peptídeo derivado da cupredoxina, mais especificamente substituído

20 por triptofano. Em outra configuração específica, pode ser substituído um ou mais resíduos de treonina, glutamina ou glicinas nos resíduos aminoácidos 52, 57, 61 ou 63 da *P. aeruginosa* azurina (SEQ ID NO: 1), ou um resíduo equivalente de outro peptídeo derivado da cupredoxina, mais especificamente substituído por triptofano. Em configurações específicas, o peptídeo cupredoxina compreende uma das seguintes

sequências, em que o aminoácido sublinhado é substituído pela sequência da *Pseudomonas aeruginosa* azurina do tipo selvagem:

LSWAADMQGVVTDGMASGLDKDYLKPDD (SEQ ID NO: 34);

LSTAADMWGVVTDGMASGLDKDYLKPDD (SEQ ID NO: 35);

5 LSTAADMQGVVWDGMASGLDKDYLKPDD (SEQ ID NO: 36);

LSTAADMQGVVTDWMASGLDKDYLKPDD (SEQ ID NO: 37);

LSWAADMWGVVTDGMASGLDKDYLKPDD (SEQ ID NO: 38);

LSWAADMQGVVWDGMASGLDKDYLKPDD (SEQ ID NO: 39);

LSWAADMQGVVTDWMASGLDKDYLKPDD (SEQ ID NO: 40);

10 LSTAADMWGVVWDGMASGLDKDYLKPDD (SEQ ID NO: 41);

LSTAADMWGVVTDWMASGLDKDYLKPDD (SEQ ID NO: 42);

LSTAADMQGVVWDWMASGLDKDYLKPDD (SEQ ID NO: 43); ou

LSWAADMWGVVWDWMASGLDKDYLKPDD (SEQ ID NO: 44).

15 Em outras configurações, os aminoácidos equivalentes em outros peptídeos derivados da cupredoxina são substituídos por triptofano.

Outro método para estabilizar uma estrutura terciária de α -hélice envolve o uso de resíduos aminoácidos não naturais capazes de empilhamento π . Por exemplo, em Andrews and Tabor (Tetrahedron 55:11711-11743 (1999)), pares de resíduos ϵ -(3,5-dinitrobenzoil)-Lys foram substituídos na região α -hélice de um peptídeo em diferentes espaçamentos. Os resultados gerais mostraram que o espaçamento $i, (i+4)$ foi o arranjo estabilizador mais eficaz. O aumento da porcentagem de água, em até 90%, aumentou o teor helicoidal do peptídeo. Pares de resíduos ϵ -acil-Lys no mesmo espaçamento $i, (i+4)$ não tiveram o mesmo efeito estabilizador, indicando que a maior parte da estabilização surge das

20

interações π - π . Em uma configuração, o peptídeo derivado da cupredoxina pode ser modificado, de maneira que os resíduos de lisina sejam substituídos por resíduos ϵ -(3,5-dinitrobenzoil)-Lys. Em uma configuração específica, os resíduos de lisina podem ser substituídos por ϵ -(3,5-dinitrobenzoil)-Lys em um espaçamento $i, (i+4)$.

5 Outro método para estabilizar uma estrutura terciária de α -hélice usa as interações eletrostáticas entre cadeias laterais na α -hélice. Quando pares de resíduos His-Cys ou His-His foram substituídos nos peptídeos, em um arranjo $i, (i+4)$, os peptídeos mudaram de cerca de 50% helicoidais para cerca de 90% helicoidais na adição de íons de Cu, Zn ou Cd. Quando sais de rutênio (Ru) foram adicionados aos peptídeos His-His, foi formado um
10 complexo de troca-inerte, um complexo macrocíclico cis -[Ru-(NH₃)₄L₂]³⁺, em que L₂ são as cadeias laterais de duas histidinas, que melhoraram a estabilidade da hélice. Ghadiri and Fernholz, J. Am. Chem. Soc. 112, 9633-9635 (1990). Em algumas configurações, os peptídeos derivados da cupredoxina podem compreender complexos cis -[Ru-(NH₃)₄L₂]³⁺ macrocíclicos, em que L₂ são as cadeias laterais de duas histidinas. Em algumas
15 configurações, um ou mais pares de resíduos histidina-cisteína ou histidina-histidina podem ser substituídos em um arranjo $i, (i\pm 4)$ nas α -hélices do peptídeo derivado da cupredoxina. Em outras configurações, um ou mais pares de resíduos histidina-cisteína ou histidina-histidina podem ser substituídos em um arranjo $i, (i=4)$ nos resíduos 53-56, 58-64 e 68-70 da *P. aeruginosa* azurina (SEQ ID NO: 1), ou resíduos equivalentes de
20 outros peptídeos derivados da cupredoxina. Em algumas configurações, o peptídeo derivado da cupredoxina pode ainda compreender íons de Cu, Zn, Cd e/ou Ru.

Outro método para estabilizar uma estrutura terciária de α -hélice envolve a formação de ligações de dissulfeto entre as cadeias laterais da α -hélice. É também possível

estabilizar estruturas helicoidais por meio de ligações covalentes formais entre resíduos separados na sequência do peptídeo. O método natural comumente empregado é o uso de ligações de dissulfeto. Pierret *et al.*, Intl. J. Dept. Prot. Res., 46:471-479 (1995). Em algumas configurações, um ou mais pares de resíduos de cisteína são substituídos nas α -
5 hélices do peptídeo derivado da cupredoxina. Em outras configurações, um ou mais pares de resíduos são substituídos nos resíduos 53-56, 58-64 e 68-70 da *P. aeruginosa* azurina (SEQ ID NO: I), ou em resíduos equivalentes de outros peptídeos derivados da cupredoxina.

Outro método para estabilizar uma estrutura terciária de α -hélice é o método “*all-carbon cross-link*”. O método “*all-carbon cross-link*” comprovadamente aumenta a
10 estabilização da estrutura helicoidal, é resistente à protease e à permeabilidade celular. Walensky *et al.*, Science, 305, 1466-1470 (2004). Aminoácidos não naturais α - α -dissubstituídos contendo cadeias portadoras de olefinas são incorporados aos peptídeos. A metátese da olefina catalisada pelo rutênio gera um “grampo” hidrocarboneto para
15 ligar cruzado com a hélice. Schafmeister *et al.*, J. A. Chem. Soc., 122, 5891-5892 (2000); Walensky *et al.*, *id.*. Aminoácidos não naturais, contendo cadeias portadoras de olefinas, podem ser sintetizadas de acordo com a metodologia fornecida em

Schafmeister *et al.* (*id.*) and Williams and Im (J. Am. Chem. Soc., 113:9276-9286 (1991)). Em algumas configurações, os peptídeos derivados da cupredoxina são
20 estabilizados por grampos totais de hidrocarbonetos. Em configurações específicas, um ou mais pares de aminoácidos não naturais α - α -dissubstituídos contendo cadeias portadoras de olefinas correspondendo aos aminoácidos nativos são substituídos nas α -hélices do peptídeo derivado da cupredoxina. Em outras configurações, um ou mais pares

de aminoácidos não naturais α - α -disubstituídos contendo cadeias portadoras de olefinas correspondendo aos aminoácidos nativos são substituídos nos resíduos 53-56, 58-64 e 68-70 da *P. aeruginosa* azurina (SEQ ID NO: 1), ou resíduos equivalentes de outros peptídeos derivados da cupredoxina.

5 Em algumas configurações, o peptídeo modificado derivado da cupredoxina pode compreender $X_1SX_2AADX_3X_4X_5VVX_6DX_7X_8ASGLDKDYLKPDX_9$ (SEQ ID NO:48), em que X_1 é L ou acetilado-L, X_2 é T ou W, X_3 é M, L ou V, X_4 é Q ou W, X_5 é G ou A, X_6 é T ou W, X_7 é G, T ou W, X_8 é M, L ou V, e X_9 é D ou amidado-D. Em outras configurações, o peptídeo modificado derivado da cupredoxina pode consistir em

10 $X_1SX_2AADX_3X_4X_5VVX_6DX_7X_8ASGLDKDYLKPDX_9$ (SEQ ID NO:48), em que X_1 é L ou acetilado-L, X_2 é T ou W, X_3 é M, L ou V, X_4 é Q ou W, X_5 é G ou A, X_6 é T ou W, X_7 é G, T ou W, X_8 é M, L ou V, e X_9 é D ou amidado-D. Em outras configurações, o peptídeo modificado derivado da cupredoxina pode compreender

15 $X_1DPKLYDKDLGSAX_2X_3DX_4VVX_5X_6X_7DAAX_8SX_9$ (SEQ ID NO:49), em que X_1 é D ou acetilado-D, X_2 é M, L ou V, X_3 é G, T ou W, X_4 é T ou W, X_5 é G ou A, X_6 é Q ou W, X_7 é M, L ou V, X_8 é T ou W e X_9 é L ou amidado-L. Em outras configurações, o peptídeo modificado derivado da cupredoxina pode consistir em

20 $X_1DPKLYDKDLGSAX_2X_3DX_4VVX_5X_6X_7DAAX_8SX_9$ (SEQ ID NO:49), em que X_1 é D ou acetilado-D, X_2 é M, L ou V, X_3 é G, T ou W, X_4 é T ou W, X_5 é G ou A, X_6 é Q ou W, X_7 é M, L ou V, X_8 é T ou W e X_9 é L ou amidado-L. Os peptídeos específicos de interesse estão listados na Tabela 3.

PEGilação

A ligação covalente do PEG aos medicamentos de importância terapêutica e diagnóstica prolongou a meia-vida plasmática do medicamento *in vivo*, e/ou reduziu

suas imunogenicidades e antigenicidades. Harris and Chess, *Nature Reviews Drug Discovery* 2:214-221 (2003). Por exemplo, a ligação PEG melhorou as propriedades farmacocinéticas de muitas proteínas terapêuticas, incluindo as interleucinas (Kaufman *et al.*, *J. Biol. Chem.* 263:15064 (1988); *Tsutsumi et al.*, *J. Controlled Release* 33:447 (1995)), interferons (*Kita et al.*, *Drug Des. Delivery* 6:157 (1990)), catalase (Abuchowski *et al.*, *J. Biol. Chem.* 252:3582 (1977)), superóxido dismutase (Beauchamp *et al.*, *Anal. Biochem.* 131:25 (1983)), e adenosina deaminase (Chen *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta* 660:293 (1981)), entre outros. O FDA aprovou o PEG para ser usado como veículo ou base em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos, incluindo formulações injetáveis, tópicas, retais e nasais. O PEG mostra pequena toxicidade, sendo eliminado do corpo intacto, seja pelos rins (para PEGs < 30 kDa) ou pelas fezes (para PEGs > 20 kDa). O PEG é altamente solúvel em água.

A PEGilação de um peptídeo terapêutico pode ser usada para aumentar o tempo de vida do peptídeo na corrente sanguínea do paciente pela redução da ultrafiltração renal, e reduzindo assim a eliminação do medicamento do corpo. O mascaramento da carga pode afetar a permeação renal. O mascaramento da carga pode ser uma consequência da modificação paramquímica do grupo funcional da proteína ionizável, isto é, das aminas ou carboxilas. Em particular, os procedimentos mais comuns, para a produção de derivados de proteína-PEG envolve a conversão dos grupos amino protéicos em amidas, com a consequente perda de cargas positivas, e isto pode alterar a ultrafiltração protéica. Como as macromoléculas aniônicas são limpas pela ultrafiltração renal mais lentamente que as neutras ou positivas, pode-se esperar que a conjugação PEG aos grupos amino prolongue a permanência do peptídeo PEGilado na corrente sanguínea.

A dimensão molecular e a ultrafiltração globular também podem afetar a ultrafiltração renal dos peptídeos terapêuticos. O corte do peso molecular para a eliminação renal das proteínas globulares nativas é considerado com sendo cerca de 70 kDa, que é próximo ao peso molecular da albumina sérica. Assim, as proteínas, com peso molecular superior a 70 kDa são principalmente eliminadas do corpo por caminhos diferentes da ultrafiltração renal, como pela via hepática, digestão proteolítica e *clearance* pelo sistema imunológico. Portanto, o aumento da dimensão do peptídeo terapêutico por PEGilação pode reduzir a ultrafiltração renal daquela forma de peptídeo da corrente sanguínea do paciente.

Além disso, a PEGilação de um peptídeo terapêutico pode reduzir a imunogenicidade daquele peptídeo, assim como proteger o peptídeo das enzimas proteolíticas, das células fagocitárias e de outros fatores que exigem o contato direto com o peptídeo terapêutico. A estrutura do tipo guarda-chuva do PEG ramificado, em particular, dá melhor proteção que o PEG linear para a abordagem das enzimas proteolíticas, anticorpos, células fagocitárias, etc. Caliceti ant Veronese, Adv. Drug. Deliv. Rev. 55:1261-12778 (2003).

Em algumas configurações, os peptídeos derivados da cupredoxina são modificados para terem uma ou mais moléculas PEG ligadas de forma covalente a uma molécula de cisteína. Uma ligação covalente não precisa, necessariamente ser uma ligação covalente diretamente de uma molécula PEG no peptídeo derivado da cupredoxina, mas pode ser ligada de forma covalente a uma ou mais moléculas de ligação que, por sua vez são ligadas de forma covalente entre si e/ou ao peptídeo derivado da cupredoxina. Em algumas configurações, o peptídeo derivado da cupredoxina tem um local específico de PEGilação. Em configurações específicas, a(s) molécula(s) PEG podem estar ligadas de forma

covalente aos resíduos de cisteína 3, 26 e/ou 112 da *P. aeruginosa* azurina (SEQ ID NO: 1). Em outras configurações, um ou mais resíduos de cisteína podem ser substituídos no peptídeo derivado da cupredoxina sendo PEGilado. Em algumas configurações, o método para PEGilar o peptídeo derivado da cupredoxina pode ser NHS, animação redutora, malimídico ou epoxídico, entre outros. Em outras configurações, os peptídeos derivados da cupredoxina podem ser PEGilados em uma ou mais lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, treonina, ou tirosina, ou no grupo amino N-terminal ou no ácido carboxílico C-terminal. Em configurações mais específicas, os peptídeos derivados da cupredoxina podem ser PEGilados em um ou mais grupos de lisinas ou amino N-terminais. Em outras configurações, um ou mais resíduos de lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, treonina, ou tirosina são substituídos nos peptídeos derivados da cupredoxina e são PEGilados. Em outras configurações, os peptídeos derivados da cupredoxina podem ser PEGilados em um ou mais grupos amino. Em outras configurações, os peptídeos derivados da cupredoxina podem ser PEGilados de forma randômica, sem local específico. Em algumas configurações, os peptídeos derivados da cupredoxina podem ter um peso molecular de polímeros PEG-baseados de cerca de 200 daltons a cerca de 100.000 daltons, cerca de 2.000 daltons a cerca de 20.000 daltons, ou cerca de 2.000 daltons a cerca de 5.000 daltons. Em outras configurações, os peptídeos derivados da cupredoxina podem ser compreendidos em uma ou mais moléculas PEG ramificadas, especificamente uma molécula PEG ramificada cerca de 50 kDa. Em outras configurações, os peptídeos derivados da cupredoxina podem compreender uma ou mais moléculas PEG lineares, especificamente a molécula PEG linear com cerca de 5 kDa.

Cupredoxinas

As cupredoxinas são pequenas proteínas contendo cobre azul, dotadas de propriedades de transferência de elétrons (10-20 kDa) e que participam nas, por exemplo, cadeias redox bacterianas ou fotossíntese. O íon de cobre é ligado exclusivamente pela matriz protéica. Uma disposição especial planar triangular destorcida de dois ligandos de histidina e um cisteinato à volta do cobre dá origem a propriedades eletrônicas muito peculiares do local do metal e da intensa cor azul. Algumas cupredoxinas foram caracterizadas cristalograficamente em resolução média a alta. As cupredoxinas incluem as azurinas, plastocianinas, rusticianinas, pseudoazurinas, auracianinas e proteínas do tipo azurina. Como usado na presente, o termo "cupredoxina" inclui a forma de proteína sem a presença do átomo de cobre, assim como a da proteína contendo cobre.

Azurinas

As azurinas são proteínas que contêm cobre de 128 resíduos aminoácidos e que pertencem à família das cupredoxinas envolvidas na transferência de elétrons nas plantas e em determinadas bactérias. As azurinas incluem as da *P. aeruginosa* (SEQ ID NO: 1)("wt-azurin"), *A. xylosoxidans* e *A. denitrificans*. Murphy *et al.*, J. Mol. Biol. 315:859-871 (2002). Apesar de a homologia sequencial entre as azurinas variar entre 60-90%, a homologia estrutural entre essas moléculas é alta. Todas as azurinas têm uma característica β -sandwich com uma figura chave grega e um único átomo de cobre sempre localizado na mesma região da proteína. Além disso, as azurinas possuem um patch hidrofóbico essencialmente neutro envolvendo o local do cobre. *Id.*

Plastocianinas

As plastocianinas são cupredoxinas encontradas nas plantas e cianobactérias eucarióticas. Contêm uma molécula de cobre por molécula e são azuis na forma oxidada. Ocorrem no cloroplasto, em que funcionam como portadores eletrônicos. Desde a

determinação da estrutura da plastocianina poplar em 1978, foi determinada a estrutura das plastocianinas *algal* (*Scenedesmus*, *Enteromorpha*, *Chlamydomonas*) e plantas (feijão francês) seja por métodos cristalográficos ou NMR, e a estrutura poplar foi refinada até resolução de 1,33 Å. A SEQ ID NO: 2 mostra a sequência aminoácida da plastocianina da cianobactéria *Phormidium laminosum*.

Apesar da divergência sequencial entre as plastocianinas das algas e plantas vasculares (ex., 62% da identidade sequencial entre a *Chlamydomonas* e proteínas poplares), são conservadas as estruturas tridimensionais (ex., desvio de 0,76 Å rms nas posições C alfa entre as proteínas *Chlamydomonas* e *Poplar*). As características estruturais incluem um local de ligação de cobre tetraédrico distorcido em uma extremidade de um cilindro beta antiparalelo de oito fitas, um patch pronunciadamente negativo e uma superfície plana hidrofóbica. O local de cobre é otimizado por sua função de transferência eletrônica e os patches negativos e hidrofóbicos devem estar envolvidos no reconhecimento dos parceiros de reação fisiológica. Os experimentos de modificação química, de ligação cruzada e de mutagênese direcionada ao local confirmaram a importância dos patches negativos e hidrofóbicos nas interações de ligação com o citocromo f e validaram o modelo dos dois caminhos de transferência eletrônica funcionalmente significativos na plastocianina. Um suposto caminho de transferência eletrônica é relativamente curto (aproximadamente 4 Å) e envolve o ligando de cobre exposto ao solvente His-87 no patch hidrofóbico, enquanto o outro é mais comprido (aproximadamente 12-15 Å) e envolve o resíduo quase conservado Tyr-83 no patch negativo. Redinbo *et al.*, *J. Bioenerg. Biomembr.* 26(1):49-66 (1994).

Rusticianinas

As rusticianinas são polipeptídeos de cadeia simples contendo cobre azul obtido de

um tiobacilo. Foi determinada a estrutura cristalina aos raios-X da forma oxidada da rusticianina cupredoxina altamente oxidante e extremamente estável do *Thiobacillus ferrooxidans* (SEQ ID NO: 3) por difração anômala de múltiplos comprimentos de onda e refinada até a resolução de 1,9 Å. As rusticianinas são compostas de uma dobra de núcleo beta-sanduíche composta de uma β -sheet de seis e uma de sete fitas. Como nas outras cupredoxinas, o íon de cobre é coordenado por um aglomerado de quatro resíduos conservados (His 85, Cys138, His143, Met148) dispostos em um tetraedro distorcido. Walter *et al.*, J. Mol. Biol. 263:730-51 (1996).

Auracianinas

Foram isoladas três pequenas proteínas de cobre azul, denominadas auracianina A, auracianina B 1 e auracianina B-2 da bactéria fotossintética filamentosa verde termofílica *Chloroflexus aurantiacus*. As duas formas B têm propriedades quase idênticas entre si, mas são distintas da forma A. A eletroforese do gel sódio dodecil sulfato-poliacrilamida demonstra massas moleculares monoméricas aparentes como 14 (A), 18 (B-2) e 22 (B-1) kDa.

Foi determinada a sequência aminoácida da auracianina A e mostrou que a auracianina é um polipeptídeo com 139 resíduos. Van Dreissche *et al*, Protein Science 8:947-957 (1999). O His58, Cys123, His128 e Met132 são espaçados de forma esperada se forem ligandos de metalconservados evolucionariamente como nas conhecidas pequenas proteínas de cobre plastocianina e azurina. A previsão da estrutura secundária também indica que a auracianina tem uma estrutura geral de cilindro beta similar à da azurina da *Pseudomonas aeruginosa* e da plastocianina das folhas poplares. Entretanto, a auracianina parece ter características sequenciais de ambas as pequenas classes sequenciais de proteínas de cobre. A similaridade geral com a sequência de

consenso da azurina é aproximadamente a mesma da sequência de consenso da plastocianina, isto é, 30,5%. A região da sequência N-terminal 1-18 da auracianina é marcadamente rica em glicina e aminoácidos hidrofílicos. Ver sequência aminoácida exemplar SEQ ID NO: 10 da cadeia A da auracianina de *Chloroflexus aurantiacus* (NCBI Protein Data Bank Accession No. AAM12874). A molécula auracianina B tem uma dobra cupredoxina padrão. Foi estudada a estrutura cristalina da auracianina B da *Chloroflexus aurantiacus*. Bond *et al.*, J. Mol. Biol. 306:47-67 (2001). Com exceção de uma outra fita N-terminal, a molécula é muito similar à da cupredoxina bacteriana, a azurina. Como em outras cupredoxinas, um dos ligandos de Cu se situa na fita 4 do polipeptídeo, e as outras três se situam ao longo de um grande loop entre as fitas 7 e 8. A geometria do local Cu é discutida com referência ao espaçamento aminoácido entre os últimos três ligandos. O domínio de ligação de cobre caracterizado cristalograficamente da auracianina B é provavelmente ligado ao lado periplásmico da membrana citoplásmica por uma cauda N-terminal que demonstra significativa identidade sequencial com conhecidas cadeias de várias outras proteínas de transferência eletrônica associadas a membranas. As sequências aminoácidas das formas B estão apresentadas em McManus *et al.* (J Biol Chem. 267:6531-6540 (1992)). Ver sequência aminoácida exemplar SEQ ID NO: 11 da cadeia A da auracianina B de *Chloroflexus aurantiacus* (NCBI Protein Data Bank Accession No. 1QHQA).

Pseudoazurinas

As pseudoazurinas são uma família de polipeptídeos de cadeia simples contendo cobre azul. A sequência aminoácida da pseudoazurina obtida da *Achromobacter cycloclastes* está mostrada na SEQ ID NO: 4. A análise da estrutura de raios-X da pseudoazurina mostra que tem uma estrutura similar à das azurinas, apesar de existir uma

homologia de baixa sequência entre essas proteínas. Existem duas diferenças principais entre a estrutura geral das pseudoazurinas e das azurinas. Existe uma extensão terminal carboxílica nas pseudoazurinas, relativa às azurinas, que consiste de duas alfa-hélices. Na região intermediária do peptídeo as azurinas contêm um loop prolongado, encurtado nas pseudoazurinas, que forma um flap contendo uma α -hélice curta. As principais grandes diferenças no local do átomo de carbono são as conformações da cadeia lateral MET e o comprimento da ligação de cobre Met-S, que é significativamente mais curta na pseudoazurina que na azurina .

Os peptídeos modificados derivados da cupredoxina podem ser sintetizados por meio de técnicas padrão. As variantes são sequências aminoácidas formadas a partir de compostos nativos, seja diretamente ou por modificação ou substituição parcial. Podem ser introduzidas alterações em um peptídeo derivado da cupredoxina que levam alterações nas sequências aminoácidas do peptídeo derivado da cupredoxina que anulam as atividade(s) farmacológica(s) da cupredoxina. Um resíduo aminoácido "não essencial" é um resíduo que pode ser alterado a partir da sequência do peptídeo derivado da cupredoxina sem anular sua atividade farmacológica considerando que, um resíduo aminoácido "essencial", é necessário para tal atividade farmacológica. Os aminoácidos em que substituições "conservadoras" podem ser feitas são bem conhecidos na técnica. Estão mostradas na Tabela 1 substituições conservadoras úteis, "Substituições preferidas."

Substituições conservadoras em que um aminoácido de uma classe é substituído por outro aminoácido da mesma classe estão dentro do escopo da invenção, enquanto a substituição não anule a desejada atividade farmacológica do peptídeo derivado da cupredoxina. Essas trocas que resultam em atividade farmacológica derivada da cupredoxina alterada são contempladas como parte da invenção, enquanto esta atividade

farmacológica seja apreciável. Em algumas configurações, a atividade farmacológica do peptídeo derivado da cupredoxina é menor que cerca de 5%, menor que cerca de 10%, menor que cerca de 25% e menor que cerca de 50% da atividade específica da cupredoxina do tipo selvagem de onde derivou. Será apreciado que poderá ser tolerada alguma perda da atividade específica do peptídeo derivado da cupredoxina se estiver deslocado por outras qualidades aperfeiçoadas do peptídeo derivado da cupredoxina, como maior meia-vida plasmática ou reduzida imunogenicidade.

Tabela 1 Substituições preferidas

Resíduo original	Substituições exemplares	Substituições preferidas
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser Ile, Leu, Met, Phe, Ala	Phe
Val (V)	Norleucina	Leu

Substituições "não conservadoras" que afetam (1) a estrutura do backbone do polipeptídeo, como uma conformação β -sheet ou α -helicoidal, (2) a carga, (3) a hidrofobicidade ou (4) o volume da cadeia lateral podem modificar a atividade farmacológica de um peptídeo derivado da cupredoxina. Os resíduos são divididos em grupos baseados em propriedades

comuns das cadeias laterais como indicado na Tabela 2. As substituições não conservadoras exigem a troca de um membro de uma dessas classes por outra classe.

As substituições não conservadoras em que um aminoácido de uma classe é substituído por outro aminoácido de uma classe diferente estão dentro do escopo da invenção, enquanto a substituição não anule a atividade farmacológica do peptídeo derivado da cupredoxina. Essas trocas que resultam na atividade alterada do peptídeo derivado da cupredoxina são contempladas como parte da invenção, enquanto tal atividade farmacológica for apreciável.

Tabela 2 Classes de aminoácidos

Classe	Aminoácidos
hidrofóbica	Norleucina, Met, Ala, Val, Leu
Hidrofilica neutra	Ile
acídica	Cys, Ser, Thr
básica	Asp, Glu
cadeia rompida	Asn, Gln, His, Lys, Arg
conformação	Gly, Pro
aromático	Trp, Tyr, Phe

Podem ser feitas modificações no peptídeo derivado da cupredoxina usando os métodos conhecidos na técnica como a mutagênese mediada por oligonucleotídeos (direcionada ao local), varredura de alanina e mutagênese PCR. Mutagênese dirigida ao local (Carter, Biochem J. 237:1-7 (1986); Zoller and Smith, Methods Enzymol. 154:329-50 (1987)), mutagênese de cassette, mutagênese de seleção restrita (Wells et al., Gene 34:315-23 (1985)) ou outras técnicas conhecidas podem ser realizadas no DNA clonado para a produção de um peptídeo derivado da cupredoxina que codifica um ácido nucléico variante. Além disso, os nucleotídeos que codificam um peptídeo derivado da cupredoxina que é um equivalente estrutural de uma cupredoxina podem ser sintetizados por métodos bem conhecidos na técnica. Além disso, as moléculas protéicas que são

peptídeos modificados derivados da cupredoxina, podem ser sintetizadas por métodos bem conhecidos na técnica.

Codificação de Ácidos Nucléicos para o Domínio de Entrada de Cupredoxina e Complexo de um Domínio de Entrada de Cupredoxina Ligado a um Composto de

5 Carga

Em outro aspecto, a presente invenção provê uma molécula de ácido nucléico que codifica um peptídeo modificado derivado da cupredoxina da invenção. Esta molécula de ácido nucléico pode ser preparada por uma combinação de conhecidas técnicas do assunto. Por exemplo, sequências de ácido nucléico do peptídeo modificado derivado da cupredoxina podem ser individualmente preparadas por síntese química ou clonagem.

Composições Farmacêuticas Contendo Peptídeos Modificados Derivados da Cupredoxina

Composições farmacêuticas contendo um peptídeo modificado derivado da cupredoxina podem ser fabricadas por qualquer forma convencional, ex., por processos de mistura convencional, dissolução, granulação, fabricação de drágeas, emulsificação, encapsulação, apresamento ou liofilização. O peptídeo modificado derivado da cupredoxina pode ser prontamente combinado com um veículo farmaceuticamente aceitável bem conhecido na técnica. Esses veículos permitem que a preparação seja formulada como comprimidos, pílulas, drágeas, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, massa semifluida, suspensão e similares. Os excipientes adequados também podem incluir, por exemplo, fillers e preparações de celulose. Outros excipientes podem incluir, por exemplo, agentes de condimentos, agentes colorantes, antiaderentes, espessantes e demais aditivos aceitáveis, adjuvantes ou ligantes.

Essas composições podem ser usadas, por exemplo, no tratamento ou no

diagnóstico do câncer, tratamento da angiogênese inadequada, infecção pelo HIV e/ou malária e no tratamento de condições relacionadas com a sinalização da efrina. As composições podem ser administradas em quantidade suficiente para evitar ou tratar a condição com a qual o paciente estiver sofrendo. Normalmente, o organismo paciente é um mamífero, como um humano ou animal.

Administração de Composições Contendo um Domínio de Entrada de Cupredoxina

As composições que contêm um peptídeo modificado derivado da cupredoxina podem ser administradas por qualquer via adequada, por exemplo, oral, bucal, inalação, sublingual, retal, vaginal, transuretral, nasal, tópica, percutânea, isto é, transdérmica ou parenteral (incluindo administração intravenosa, intramuscular, subcutânea e intracoronariana). Suas composições e formulações farmacêuticas podem ser administradas em qualquer quantidade eficaz para a obtenção do objetivo pretendido. Quando administrada para tratar um paciente sofrendo de uma condição, a composição é administrada em quantidade terapeuticamente eficaz. Uma “quantidade terapeuticamente eficaz” é uma quantidade eficaz para evitar o desenvolvimento, ou para aliviar os sintomas existentes do indivíduo sendo tratado. A determinação de uma quantidade terapeuticamente eficaz está bem presente na capacidade dos técnicos do assunto.

Em várias configurações, a composição inclui veículos e excipientes (incluindo, sem limitações, tampões, carboidratos, manitol, proteínas, polipeptídeos ou aminoácidos como a glicina, antioxidantes, bacteriostatos, agentes de quelação, agentes de suspensão, agentes espessantes e/ou preservativos), água, óleos, soluções salinas, soluções aquosas de dextrose e de glicerol, outras substâncias auxiliares farmacêuticamente aceitáveis como necessário para as condições farmacológicas aproximadas, como os agentes

tampão, agentes de ajustamento de tonicidade, agentes umectantes e similares. Será reconhecido que, como qualquer veículo adequado conhecido pelos técnicos no assunto pode ser empregado para administrar as composições da presente invenção, o tipo de veículo variará dependendo do modo de administração. Os compostos também podem ser encapsulados dentro de lipossomos usando uma tecnologia bem conhecida. Também podem ser empregadas microesferas biodegradáveis como veículos das composições da presente invenção. Microesferas biodegradáveis adequadas são mostradas, por exemplo, nas Patentes norte-americanas Nos. 4.897.268, 5.075.109, 5.928.647, 5.811.128, 5.820.883, 5.853.763, 5.814.344 e 5.942.252. "Compostos" como usado na presente, incluem os peptídeos, sequências aminoácidas, compostos de carga e complexos da presente invenção. As composições da invenção podem ser esterilizadas por técnicas de esterilização convencionais e bem conhecidas, ou podem ser filtradas. As soluções aquosas resultantes podem ser embaladas para uso no estado, ou liofilizadas, sendo a preparação liofilizada combinada com uma solução estéril antes da administração.

As composições da invenção podem ser administradas de várias maneiras, incluindo por injeção (ex., intradérmicas, subcutâneas, intramusculares, intraperitoneais e similares), por inalação, por administração tópica, supositório, usando um patch transdérmico ou pela boca.

Quando a administração é feita por injeção, a composição pode ser formulada em soluções aquosas, de preferência em tampões fisiologicamente compatíveis como solução de Hanks solução de Ringer ou tampão fisiológico salino. A solução pode conter agentes formuladores como agentes de suspensão, estabilizadores e/ou de dispersão. De maneira alternativa a composição pode ser sob a forma de pó para ser constituída com veículo adequado, por exemplo, em água estéril isenta de pirogênios antes do uso.

Quando a administração é feita por inalação, a composição pode ser aplicada sob a forma de spray aerossol por recipientes pressurizados ou por um nebulizador, utilizando um propelente adequado, por ex., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dióxido de carbono ou outro gás adequado. No caso de um aerossol pressurizado, a unidade de dosagem pode ser determinada com uma válvula para aplicar a quantidade medida. Podem ser formuladas cápsulas e cartuchos, por ex., de gelatina para uso em inalador ou insuflador contendo uma mistura de pó das proteínas a e uma base adequada de pó como lactose ou amido.

Quando a administração for tópica, a composição pode ser formulada como soluções, géis, unguentos, cremes, suspensões e similares como bem conhecidos na técnica. Em algumas configurações, a administração é feita por meio de um patch transdérmico. Quando a administração for por meio de supositório (ex., retal ou vaginal), a composição também pode ser formulada em composições contendo as bases convencionais de supositórios. Quando a administração é oral, a composição pode ser prontamente formulada em combinação com veículos farmacologicamente aceitáveis bem conhecidos na técnica. Podem ser empregados veículos sólidos, como o manitol, lactose, estearato de magnésio e similares; esses veículos permitem que a quimiotaxina seja formulada em comprimidos, pílulas, drágeas, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, massa semifluida, suspensão e similares, para ingestão oral pelo indivíduo sendo tratado. Nas formulações sólidas orais como, por exemplo, pós, cápsulas e comprimidos, os excipientes adequados incluem fillers como açúcares, preparações celulósicas, agentes de granulação e agentes ligantes.

Outros veículos convenientes, como bem conhecidos na técnica, também incluem veículos multivalentes, como polissacarídeo capsular bacteriano, um dextrano ou a um

vetor geneticamente fabricado. Além disso, as formulações de liberação sustentada que incluem a composição permitem a liberação da composição em extensos períodos de tempo, de maneira que a composição da formulação de liberação sustentada seria removida e/ou degradada do sistema do indivíduo, por exemplo, por proteases e hidrólise
5 simples antes de atingir ou ampliar o efeito terapêutico.

A formulação exata, a via de administração e a dosagem são normalmente determinadas pelo médico encarregado de acordo com as condições do paciente. A dosagem e o intervalo podem ser individualmente ajustados para proporcionar os níveis plasmáticos do complexo que sejam suficientes para manter o efeito terapêutico. Em
10 geral, a composição desejada é administrada em uma mistura com um veículo farmacêutico selecionado com relação à via pretendida de administração e à prática farmacêutica padrão.

É claro que a dosagem adequada deverá variar dependendo, por exemplo, do composto empregado que contém o domínio de entrada da cupredoxina, do hospedeiro, do
15 modo de administração e da natureza e da severidade das condições sendo tratadas ou diagnosticadas. Entretanto, em uma configuração dos métodos da presente invenção, resultados satisfatórios de tratamento em humanos são indicados em doses diárias de cerca de 0,001 a cerca de 20 mg/kg de peso corporal, do composto que contém o peptídeo modificado derivado da cupredoxina. Em uma configuração, uma dosagem diária indicada
20 para o tratamento em humanos pode estar na faixa de cerca de 0,7 mg a cerca de 1400 mg de um composto contendo o peptídeo modificado derivado da cupredoxina convenientemente administrado, por exemplo, em doses diárias, doses semanais, doses mensais e/ou dosagem contínua. As doses diárias podem ser em dosagens discretas, de 1 a 12 vezes ao dia. De maneira alternativa, as doses podem ser administradas em dias

alternados, a cada três dias, a cada quatro dias, a cada cinco dias, a cada seis dias, a cada semana e, de maneira similar, em incrementos diários de até 31 dias. A dosagem pode ser contínua, intermitente ou em dose única, usando qualquer forma farmacêutica aplicável, incluindo comprimidos, patches, administração i.v e similares. Mais especificamente, a
5 composição é administrada em uma quantidade terapeuticamente eficaz. Em configurações específicas, a quantidade terapeuticamente eficaz é de cerca de 0,01-20 mg/kg de peso corporal. Em configurações específicas, o nível de dose é cerca de 10 mg/kg/dia, cerca de 15 mg/kg/dia, cerca de 20 mg/kg/dia, cerca de 25 mg/kg/dia, cerca de 30 mg/kg/dia, cerca de 35 mg/kg/dia, cerca de 40 mg/kg/dia, cerca de 45 mg/kg/dia ou cerca de 50 mg/kg/dia.

10 O método para a introdução de componentes contendo o peptídeo modificado derivado da cupredoxina a pacientes, em algumas configurações, uma coadministração com outros medicamentos conhecidos no tratamento da condição. Esses métodos são bem conhecidos na técnica. Em uma configuração específica, os compostos contendo o peptídeo modificado derivado da cupredoxina são parte de um cocktail ou dosagem ou
15 com outros medicamentos para o tratamento do câncer, HIV, malária, angiogênese inadequada e condições relacionadas com a sinalização de efrina. São conhecidos muitos compostos pelos técnicos no assunto e são fornecidos pelos pedidos de patente que foram expressamente incorporados por referência.

Podem ser inseridas moléculas de ácido nucléico que codifica um peptídeo derivado
20 da cupredoxina e um composto de carga nos vetores e sendo usados como vetores de terapia genética. Os vetores de terapia genética podem ser administrados a um indivíduo, por exemplo, por meio de injeção intravenosa, por administração local (Nabel et al., U.S. Patent No. 5328,470), ou por injeção estereotática (Chen et al., Proc Natl Acad Sci USA 91:3054-3057 (1994)). A preparação farmacêutica de um vetor de terapia genética pode

incluir um diluente aceitável ou pode compreender uma matriz de liberação lenta em que o veículo de administração genética está integrado. De maneira alternativa, quando o vetor completo de administração genética puder ser produzido intacto a partir de células recombinantes, por exemplo, de vetores retrovirais, a preparação farmacêutica pode incluir
5 uma ou mais células que produzem o sistema de administração genética.

Em um aspecto, a composição é administrada como DNA, de maneira que o complexo seja gerado *in situ*. Em uma configuração, o DNA está "nu," como descrito, por exemplo, em Ulmer *et al.*, Science 259:1745-1749 (1993) e revisado por Cohen, Science 259 1691-1692 (1993). A captação do DNA nu pode ser aumentada revestindo o DNA
10 sobre um veículo, por exemplo, uma conta biodegradável, que é transportada de forma eficiente para as células. Nesses métodos, o DNA pode estar presente dentro de qualquer variedade de sistemas de administração conhecidos pelos técnicos comuns no assunto, incluindo sistemas de expressão de ácidos nucleicos, sistemas de expressão bacteriana e viral. As técnicas, para a incorporação do DNA, nesses sistemas de expressão são bem
15 conhecidos pelos técnicos comuns no assunto. Ver, por exemplo, W090/11092, W093/24640, WO 93/17706 e Patente norte-americana nº 5.736.524.

Os vetores, usados para a condução do material genético de organismo para organismo, podem ser divididos em duas classes gerais: Os vetores de clonagem são plasmídeos ou fagos de replicação com regiões não essenciais para a propagação em uma
20 célula hospedeira adequada e na qual possa ser inserido DNA estranho; o DNA estranho é replicado e propagado como se fosse uma componente do vetor. É usado um vetor de expressão (como um plasmídeo, levedo ou genoma viral animal) para introduzir material genético estranho em uma célula ou tecido hospedeiro para transcrever e transladar o DNA estranho, como o DNA da composição. Em vetores de expressão, o DNA

introduzido é ligado operacionalmente a elementos como promotores que sinalizam para a célula hospedeira para transcrever o DNA inserido. Alguns promotores são excepcionalmente úteis, como promotores indutíveis que controlam a transcrição genética em resposta a fatores específicos. A ligação operacional de um polinucleotídeo da composição a um promotor indutível pode controlar a expressão de um peptídeo derivado da cupredoxina da invenção. Os exemplos de promotores indutíveis clássicos incluem aqueles que são responsivos ao interferon alfa, ao choque térmico, a íons metálicos pesados e esteróides como os glucocorticóides (Kaufman. Methods Enzymol. 185:487-511 (1990)) e a tetraciclina. Outros promotores indutíveis desejáveis incluem aqueles que não são endógenos para as células em que a construção está sendo introduzida, mas que são responsivos naquelas células quando o agente de indução é fornecido exogenamente. Em geral, vetores úteis de expressão são geralmente plasmídeos. Entretanto, são contempladas outras formas de vetores de expressão, como vetores virais (ex., retrovírus de replicação defeituosa, adenovírus e vírus adenoassociados).

A escolha do vetor é ditada pelo organismo ou pelas células usadas e pelo destino desejado do vetor. Em geral, os vetores compreendem sequências de sinais, origens de replicação, genes marcadores, elementos ampliadores, promotores, e sequências de término de transcrição.

Kits Compreendendo um Peptídeo Modificado Derivado da Cupredoxina

Em outro aspecto, a invenção provê kits contendo um ou mais dos seguintes itens em pacote ou recipiente: (1) um reagente que compreende um peptídeo modificado derivado da cupredoxina; (2) um reagente contendo um adjuvante ou excipiente farmacologicamente aceitável; (3) um veículo para administração, como uma seringa; e (4) instruções para a administração. Também são contempladas as configurações em que dois

ou mais componentes (1) - (4) são encontrados no mesmo recipiente.

Quando é fornecido um kit, os diferentes componentes da composição podem ser embalados em recipientes separados e misturados imediatamente antes do uso. Essas embalagens separadas dos componentes podem permitir a armazenagem de longo prazo sem a perda das funções dos componentes ativos.

Os reagentes incluídos no kit podem ser fornecidos em recipientes de qualquer tipo, de maneira que a vida dos diferentes componentes seja preservada e não sejam adsorvidos ou alterados pelos materiais do recipiente. Por exemplo, ampolas de vidro vedadas podem conter polipeptídeos ou polinucleotídeos liofilizados, ou tampões que forem embalados em atmosfera de gás neutro e não reativo, como o nitrogênio. As ampolas podem ser fabricadas com qualquer material adequado, como vidro, polímeros orgânicos, como o policarbonato, poliestireno etc., cerâmica, metal ou qualquer outro material comumente empregado para conter reagentes similares. Outros exemplos de recipientes adequados incluem garrafas simples que podem ser fabricadas a partir de substâncias similares, como ampolas e envelopes que podem compreender interiores revestidos por folhas, como de alumínio ou de uma liga. Outros recipientes incluem tubos de testes, frascos, garrafinhas, garrafas, seringas ou similares. Os recipientes podem ter uma porta estéril de acesso, como uma garrafa tendo um bujão que possa ser perfurado por uma agulha hipodérmica. Outros recipientes podem ter dois compartimentos separados por uma membrana facilmente removível que, com sua remoção, permita que os componentes sejam misturados. As membranas removíveis podem ser de vidro, plástico, borracha etc. Os kits também podem ser fornecidos com materiais de instrução. As instruções podem ser impressas em papel ou em qualquer outro substrato, e/ou podem ser fornecidas como um meio de leitura eletrônica, como um disquete, CD-ROM, DVD-

ROM, disco Zip, videotape, audiotape, dispositivo pendrive etc. As instruções detalhadas podem não estar fisicamente associadas ao kit; ao invés disso, o usuário pode ser direcionado para um site da internet especificado pelo fabricante ou distribuidor do kit ou fornecido como correio eletrônico.

5 Uma maior compreensão da presente invenção pode ser obtida por referência por meio dos seguintes exemplos específicos. Os Exemplos são descritos unicamente com objetivos de ilustração e não se destinam a limitar o escopo da invenção. São contempladas alterações na forma e substituição de equivalentes, como as circunstâncias podem sugerir ou tornarem apropriado. Apesar de terem sido empregados termos
10 específicos na presente, esses termos são destinados a um sentido descritivo e não com objetivos de limitações. Podem ser feitas modificações e variações da invenção como mencionadas anteriormente sem abandonar seu espírito e escopo e, portanto, são impostas somente as limitações indicadas pelas configurações anexas.

EXEMPLOS

15 **Exemplo 1 – Modelo de tumor xenotransplantado *in vivo* e experimentos de tráfego**

Foram feitos estudos por imagens em camundongos atímicos com xenoenxertos Mel-2 para determinar a distribuição de p18 (SEQ ID NO: 14) no corpo do camundongo com o passar do tempo. Camundongos nus fêmeas receberam injeções subcutâneas de 1 x
20 10⁶ células UISO-Mel-2 no flanco. Quando os tumores cresceram até o tamanho de 0,5 mm (em uma das três medidas no diâmetro), os estudos foram iniciados com p18 marcado. Para marcar o p18, este foi incubado com Corante Infra-vermelho Irdye® 800CW NHS Ester (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska) por 2 horas a 4°C com

agitação contínua. O peptídeo marcado foi separado do corante não ligado por diálise em Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassettes por um mínimo de 48 horas contra PBS.

Foram injetados intravenosamente 125µg/camundongo de p18 marcado com IRDye® (SEQ ID NO:14) em 100 µl de PBS (solução salina tamponada com fosfato) estéril, e os camundongos foram triados diariamente para a detecção do corante marcador nos tumores e órgãos usando o Sistema de Imagem Infra-vermelho Odyssey®. Foram feitas varreduras de alta resolução em uma profundidade entre 1 e 1,5 mm para a detecção de tumores subcutâneos. As imagens registradas no canal 800 nm (cor verde) representam sinais específicos e as do canal 700 nm (cor vermelha) representam o fundo.

No primeiro experimento, os camundongos com tumores Mel-2 de 0,5 mm foram acompanhados por até 16 dias para determinar a localização do IRDye®. Figura 1. No segundo experimento, os camundongos com tumores Mel-2 de 0,5 mm receberam injeções i.v. de 125 µg/camundongo de p18 marcado com IRDye® e sacrificados 120 horas depois. Foram tomadas varreduras totais dos camundongos, sendo retirados os órgãos e tumores e triados para determinar a localização do IRDye®. Foram feitas varreduras de alta resolução dos órgãos e das seções transversais após a excisão em profundidades entre 0,1 e 0,5 mm. Figura 2. No terceiro experimento, os camundongos receberam injeções de células Mel-2 e os tumores foram deixados desenvolvendo por três semanas. Os camundongos receberam então injeções de 125 µg/camundongo de p18 marcado com IRDye®, e 48 horas depois, sacrificados e triados para determinar a localização do IRDye®.

Esses experimentos indicam que o p18 marcado com IRDye® localiza o tumor e os rins em até 5 horas após a injeção no camundongo. Ver Figura 1. Os rins acumulam o

complexo IRDye-p 18, sugerindo que o p18 é removido da corrente sanguínea do camundongo primariamente por excreção renal. Ver Figura 2 e Figura 3.

Exemplo 2 – Tratamento de Pacientes Sofrendo de Câncer com Peptídeos Modificados Derivados da Cupredoxina

5 Será feito um estudo clínico de Fase I/II de uma fusão de p28 PEGilado (SEQ ID NO: 13) (Medicamento de Estudo) em pacientes sofrendo de câncer. Especificamente, o p28 da *Pseudomonas aeruginosa* será modificado por PEGilação.

Quarenta e nove pacientes adultos com cânceres de mama verificados histologicamente, do cólon e melanoma que demonstraram progressão clínica ou
10 radiográfica ou recorrência após tratamento adequado com os medicamentos e regimes quimioterapêuticos atualmente disponíveis e aprovados pelo FDA serão matriculados em um estudo prospectivo aberto para a administração do Medicamento de Estudo. Para ser elegível para a inscrição no estudo, todos os pacientes demonstraram crescente volume do tumor mensurável após o término do curso aprovado dos regimes de quimioterapia. A
15 evidência de depósitos persistentes metastáticos e/ou aumento continuado da dimensão ou do volume deve ser estabelecida histologicamente. Essa prova histológica pode ser obtida por meio de uma biopsia com aspiração de agulha fina (FNA).

O programa de tratamento será instituído após a obtenção do consentimento informado de todos os pacientes de acordo com a Junta de Revisão Institucional da
20 Universidade de Illinois, Chicago e o FDA. Os pacientes não terão doenças intercorrentes como outra malignidade, história de malignidade anterior, discrasias sanguíneas, diabetes dependente de insulina ou outras doenças cardiovasculares sérias que possam interferir com a avaliação adequada dos efeitos da terapia proposta. Será feito um trabalho completo sanguíneo basal (Contagem sanguínea total [CBC] e Química Sérica)

incluindo estudos sobre a função hepática (LFT) antes do início da terapia. Todos os pacientes elegíveis não devem receber nenhuma quimioterapia para o câncer de maneira concorrente durante o período do estudo.

O medicamento de estudo será administrado por meio de injeção intravenosa diária de uma preparação farmacologicamente aceitável do Medicamento de Estudo por 12 semanas e todos os indivíduos serão observados com relação a qualquer toxicidade limitadora de dose. Existirão 7 níveis de dose, começando com 10 mg/kg/dia e aumentando de 5 mg/kg/dia até a dose máxima de 50 mg/kg/dia.

A eficácia de cada nível de dose será registrada em 7 pacientes com câncer avançado mensurável (mama, cólon e melanoma).

A resposta será estimada medindo o tumor mensurável em 2 dimensões (a e b). 1) O desaparecimento total dos tumores metastáticos alvo será considerado como uma resposta completa (CR); 2) Uma redução de 75% será considerada uma resposta parcial excelente (PR); e 3) Uma boa resposta (PR) será a redução pós-tratamento em tamanho de 50%. 4) A redução do tamanho em 25% será considerada como uma doença estável (SD) e 5) <25% será considerada como nenhuma resposta (NR). Os pacientes que demonstrarem progressão da doença terão os tratamentos interrompidos, mas serão acompanhados por mais 12 semanas.

O desaparecimento total e qualquer redução do tamanho dos tumores metastáticos alvo indicará que o tratamento com azurina é eficaz para o tratamento do câncer. Outras indicações de que o tratamento p28 PEGilado é eficaz são uma menor taxa do aparecimento de novos tumores metastáticos e uma redução da angiogênese associada aos tumores.

Várias modificações e variações dos exemplos e dos sistemas descritos da invenção ficarão aparentes para os técnicos no assunto, sem abandonar o escopo e o espírito da invenção. Apesar de a invenção ter sido descrita em relação a configurações específicas, deve ser compreendido que a invenção, como reivindicada, não deve ser indevidamente limitada a essas configurações específicas. Na verdade, várias modificações dos modos descritos para a realização da invenção, que são óbvias para os técnicos no assunto estão contidas no escopo das seguintes configurações.

REIVINDICAÇÕES

1. Peptídeo isolado modificado derivado da cupredoxina, caracterizado por ser uma variante ou derivado de um peptídeo derivado da cupredoxina que pode ter pelo menos uma propriedade farmacocinética aperfeiçoada quando comparado com o peptídeo derivado da cupredoxina não modificado.

2. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos a referida propriedade farmacocinética aperfeiçoada é selecionada do grupo (1) menos susceptível à biotransformação no paciente, (2) excretado do corpo do paciente em menor proporção, (3) crescente estabilidade de sua estrutura terciária e (4) maior meia-vida plasmática.

3. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ter pelo menos uma atividade farmacológica de uma cupredoxina do tipo selvagem.

4. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ter pelo menos uma atividade farmacológica selecionada do grupo que consiste (1) na entrada em uma célula de câncer de mamífero, (2) não entrada em células não cancerosas de mamíferos, (3) na entrada em células pré-malignantes de mamíferos, (4) na eliminação de células de câncer de mamíferos, (5) na eliminação de células pré-malignantes de mamíferos, (6) na inibição do crescimento de células de câncer em mamíferos, (7) na inibição da infecção HIV-1, (8) na inibição da parasitemia dos eritrócitos infectados com a malária, (9) na interferência com o sistema de sinalização da efrina e (10) na inibição da angiogênese.

5. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a cupredoxina se origina de um organismo selecionado do grupo que consiste de *Pseudomonas aeruginosa*, *Phormidium laminosum*, *Ulva pertussis*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Achromobacter cycloclastes*, *Pseudomonas syringa*, *Neisseria meningidis*,

Vibrio parahaemolyticus, Bordetella bronchiseptica, Bordetella pertussis, Chloroflexus aurantiacus e Neisseria gonorrhoeae.

6. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a cupredoxina é selecionada do grupo que consiste de azurina, plastocianina, rusticianina, pseudoazurina, auracianina, stelacianina, proteína básica do pepino e proteína tipo azurina.
7. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a cupredoxina é selecionada do grupo que consiste de SEQ ID NOS: 1-12.
8. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser um truncamento da cupredoxina.
9. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por compreender uma sequência aminoácida selecionada do grupo que consiste de SEQ ID NOS: 13-47.
10. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por possuir pelo menos uma sequência selecionada do grupo que consiste de SEQ ID NOS: 1-12 é pelo menos 90 % idêntica.
11. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por ser menos susceptível à hidrólise.
12. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que um ou mais resíduos de asparagina ou serina, na sequência do peptídeo derivado da cupredoxina, são substituídos por outro resíduo aminoácido.
13. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o resíduo de asparagina ou serina, é substituído por resíduos de ácido glutâmico ou treonina.
14. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por ser menos susceptível à deamidação.

15. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que um ou mais resíduos de glicina, do peptídeo derivado da cupredoxina, são substituídos por outro resíduo aminoácido.

16. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que um ou mais resíduos de glicina são substituídos por resíduo de treonina ou alanina.

17. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que são substituídos um ou mais resíduos de glicina no peptídeo derivado da cupredoxina, que são equivalentes aos resíduos 58 ou 63 da *Pseudomonas aeruginosa* azurina (SEQ ID NO: 1).

18. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado por compreender a SEQ ID NO: 30.

19. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por ser menos susceptível à oxidação.

20. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que são substituídos um ou mais resíduos de metionina ou cisteína, do peptídeo derivado da cupredoxina, por outro resíduo aminoácido.

21. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que um ou mais resíduos de glicina, são substituídos por um resíduo de leucina ou valina.

22. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que são substituídos um ou mais resíduos de metionina, do peptídeo derivado da cupredoxina que são equivalentes aos resíduos 56 ou 64 de *Pseudomonas aeruginosa* azurina (SEQ, ID NO: 1).

23. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por compreender a SEQ ID NO:31 ou SEQ ID NO: 32.

24. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de ser menos susceptível à formação de dicetopiperazina e de ácido piroglutâmico.

25. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que um resíduo de glicina, nas posições 1, 2 ou 3 do N-terminal do peptídeo derivado da cupredoxina, é substituído por outro resíduo aminoácido.

26. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que um resíduo de prolina na posição 3, do N-terminal do peptídeo derivado da cupredoxina, é substituído por outro resíduo aminoácido.

27. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que um resíduo de asparagina, no N-terminal do peptídeo derivado da cupredoxina, é substituído por outro resíduo aminoácido.

28. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 2 caracterizado pelo fato de ser menos susceptível à racemização.

29. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que um ou mais resíduos aminoácidos do peptídeo derivado da cupredoxina, são substituídos pelo D-isômero do resíduo aminoácido.

30. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que todos os resíduos aminoácidos do peptídeo derivado da cupredoxina, são substituídos pelos D-isômeros dos resíduos aminoácidos.

31. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender a SEQ ID NO: 45.

32. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de ser menos susceptível à degradação.

33. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação I, caracterizado pelo fato de que o

N-terminal do peptídeo derivado da cupredoxina é acetilado.

34. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o C-terminal do peptídeo derivado da cupredoxina é amidado.

35. O peptídeo, derivado da cupredoxina isolado, de acordo com reivindicação 34, caracterizado por ser a SEQ ID NO: 33.

36. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o peptídeo derivado da cupredoxina, é modificado para aumentar a estabilidade de sua estrutura terciária.

37. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o peptídeo é modificado para aumentar a estabilidade de pelo menos uma α -hélice.

38. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos um resíduo aminoácido do peptídeo derivado da cupredoxina, selecionado do grupo que consiste de glicina, prolina, serina, ácido aspártico, alanina, treonina, valina, glutamina, asparagina, cisteína, histidina, lisina, e arginina, é substituído por um resíduo aminoácido selecionado do grupo que consiste de leucina, isoleucina, fenilalanina, ácido glutâmico, tirosina, triptofano e metionina.

39. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que o resíduo substituído do peptídeo derivado da cupredoxina, está dentro dos resíduos equivalentes aos resíduos 53-56, 58-64 e 68-70 de *P. aeruginosa* azurina.

40. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a glutamina, no resíduo equivalente ao resíduo 57 da *P. aeruginosa* azurina, é substituído por um resíduo triptofano.

41. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a treonina, em um resíduo equivalente ao resíduo 52 da *P. aeruginosa* azurina, é substituído

por um resíduo triptofano.

42. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a treonina, em um resíduo equivalente ao resíduo 61 da *P. aeruginosa* azurina, é substituído por um resíduo triptofano.

5 43. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a glicina, em um resíduo equivalente ao resíduo 63 da *P. aeruginosa* azurina, é substituído por um resíduo triptofano.

44. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência aminoácida selecionada do grupo que consiste da SEQ ID

10 NOS: 34-44.

45. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que dois ou mais resíduos de lisina do peptídeo derivado da cupredoxina, são substituídos por resíduos de ϵ -(3,5-dinitrobenzoil)-lisina em um espaçamento $i(i+4)$.

15 46. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que os resíduos substituídos do peptídeo derivado da cupredoxina, estão dentro dos resíduos equivalentes aos resíduos 53-56, 58-64 e 68-70 da *P. aeruginosa* azurina.

47. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que os pares de resíduos histidina-cisteína ou histidina-histidina, são substituídos no peptídeo derivado da cupredoxina em espaçamento $i(i+4)$, o peptídeo compreendendo ainda pelo

20 menos um íon selecionado do grupo que consiste de Cu, Zn, Cd e Ru.

48. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que o resíduo substituído do peptídeo derivado da cupredoxina, está dentro dos resíduos equivalentes aos resíduos 53-56, 58-64 e 68-70 da *P. aeruginosa* azurina.

49. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que um

ou mais pares dos resíduos aminoácidos nativos no peptídeo derivado da cupredoxina, são substituídos por α,α -aminoácidos não naturais dissustituídos por cadeias que transportam olefinas que correspondem aos aminoácidos nativos.

50. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que o resíduo substituído do peptídeo derivado da cupredoxina, está dentro dos resíduos equivalentes aos resíduos 53-56, 58-64 e 68-70 da *P. aeruginosa* azurina.

51. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender uma ou mais moléculas PEG ligadas de forma covalente ao peptídeo derivado da cupredoxina.

52. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que uma ou mais moléculas PEG são ligadas de forma covalente a um ou mais resíduo de cisteína do peptídeo derivado da cupredoxina.

53. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 52, caracterizado pelo fato de que uma ou mais moléculas PEG são ligadas de forma covalente, a um ou mais resíduos de cisteína equivalentes a um resíduo, selecionado do grupo que consiste de resíduos aminoácidos 3, 6 e 112 da *Pseudomonas aeruginosa* azurina (SEQ ID NO: 1).

54. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que o resíduo de cisteína, é substituído no peptídeo derivado da cupredoxina e ligado de forma covalente à molécula PEG.

55. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que uma ou mais moléculas PEG são ligadas de forma covalente, ao peptídeo derivado da cupredoxina em um ou mais locais selecionados do grupo que consiste de lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, treonina, tirosina, grupo amino N-terminal e ácido carboxílico C-terminal.

56. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo fato de que um ou mais resíduos de lisina ou ácidos carboxílicos C-terminais, são ligados de forma covalente a uma molécula PEG.

57. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo fato de que um ou mais resíduos, selecionados do grupo que consiste de resíduos de lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, treonina e tirosina são substituídos no peptídeo derivado da cupredoxina, e são ligados de forma covalente a uma molécula PEG.

58. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que um ou mais grupos aminoácidos do peptídeo derivado da cupredoxina, são ligados de forma covalente a uma molécula PEG.

59. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que uma ou mais moléculas PEG são ligadas de forma covalentemente randômica ao peptídeo derivado da cupredoxina.

60. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que o peso molecular médio das moléculas PEG por peptídeo derivado da cupredoxina, é de cerca de 200 a cerca de 100.000 daltons.

61. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que o peptídeo derivado da cupredoxina, é ligado de forma covalente a uma ou mais moléculas PEG ramificadas.

62. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que a molécula PEG ramificada tem cerca de 50 kDa.

63. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que o peptídeo derivado da cupredoxina, está ligado de forma covalente a uma ou mais

moléculas PEG lineares.

64. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 63, caracterizado pelo fato de que a molécula PEG linear tem cerca de 5 kDa.

65. Composição farmacêutica, caracterizada por compreender o peptídeo isolado definido na reivindicação 1 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

66. Método, caracterizado por compreender a administração a um mamífero, de uma quantidade terapeuticamente efetiva do peptídeo isolado definido na reivindicação 1.

67. Método, de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo fato de que o referido mamífero é humano.

68. Peptídeo isolado, que compreende a sequência aminoácida

$X_1SX_2AADX_3X_4X_5VVX_6DX_7X_8ASGLDKDYLKPDX_9$ (SEQ ID NO:48);

caracterizado pelo fato de que:

X_1 é selecionado do grupo que consiste de L e acetilado-L;

X_2 é selecionado do grupo que consiste de T e W ;

X_3 é selecionado do grupo que consiste de M, L e V;

X_4 é selecionado do grupo que consiste de Q e W,

X_5 é selecionado do grupo que consiste de G e A;

X_6 é selecionado do grupo que consiste de T e W;

X_7 é selecionado do grupo que consiste de G, T e W;

X_8 é selecionado do grupo que consiste de M, L e V;

X_9 é selecionado do grupo que consiste de D e amidado-D.

69. Peptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 68, caracterizado pelo fato de que consiste da sequência aminoácida

$X_1SX_2AADX_3X_4X_5VVX_6DX_7X_8ASGLDKDYLKPDX_9$ (SEQ ID NO:48);

onde X_1 é selecionado do grupo que consiste de L e acetilado-L;

onde X_2 é selecionado do grupo que consiste de T e W;

onde X_3 é selecionado do grupo que consiste de M, L e V;

onde X_4 é selecionado do grupo que consiste de Q e W;

5 onde X_5 é selecionado do grupo que consiste de G e A;

onde X_6 é selecionado do grupo que consiste de T e W;

onde X_7 é selecionado do grupo que consiste de G, T e W;

onde X_8 é selecionado do grupo que consiste de M, L e V;

onde X_9 é selecionado do grupo que consiste de D e amidado-D.

10 **70.** Peptídeo isolado, que compreende a sequência aminoácida

X_1 DPKLYDKDLGSAX $_2$ X $_3$ DX $_4$ VVX $_5$ X $_6$ X $_7$ DAAX $_8$ SX $_9$ (SEQ ID NO:49), caracterizado pelo fato de que:

X_1 é selecionado do grupo que consiste de D e acetilado-D;

X_2 é selecionado do grupo que consiste de M, L e V;

15 X_3 é selecionado do grupo que consiste de G, T e W;

X_4 é selecionado do grupo que consiste de T e W;

X_5 é selecionado do grupo que consiste de G e A;

X_6 é selecionado do grupo que consiste de Q e W;

X_7 é selecionado do grupo que consiste de M, L e V;

20 X_8 é selecionado do grupo que consiste de T e W;

X_9 é selecionado do grupo que consiste de L e amidado-L.

71. Peptídeo isolado da reivindicação 70, que consiste da sequência aminoácida

X_1 DPKLYDKDLGSAX $_2$ X $_3$ DX $_4$ VVX $_5$ X $_6$ X $_7$ DAAX $_8$ SX $_9$ (SEQ ID NO: 49),

caracterizado pelo fato de que;

X_1 é selecionado do grupo que consiste de D e acetilado-D;

X_2 é selecionado do grupo que consiste de M, L e V;

X_3 é selecionado do grupo que consiste de G, T e W;

X_4 é selecionado do grupo que consiste de T e W;

5 X_5 é selecionado do grupo que consiste de G e A;

X_6 é selecionado do grupo que consiste de Q e W;

X_7 é selecionado do grupo que consiste de M, L e V;

X_8 é selecionado do grupo que consiste de T e W;

X_9 é selecionado do grupo que consiste de L e amidado-L.

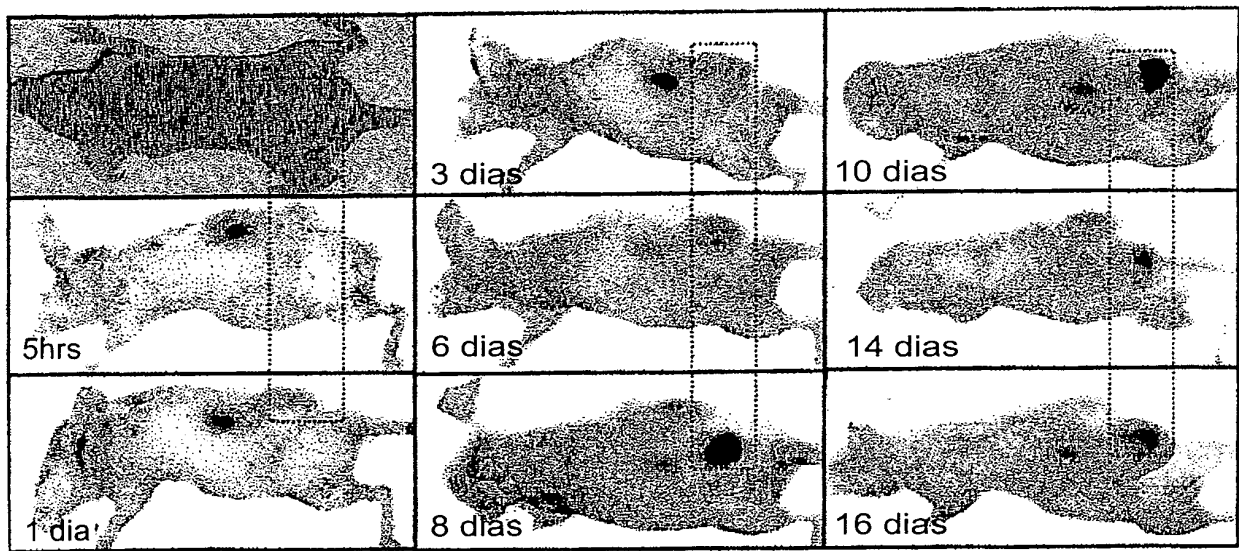


Figura 1

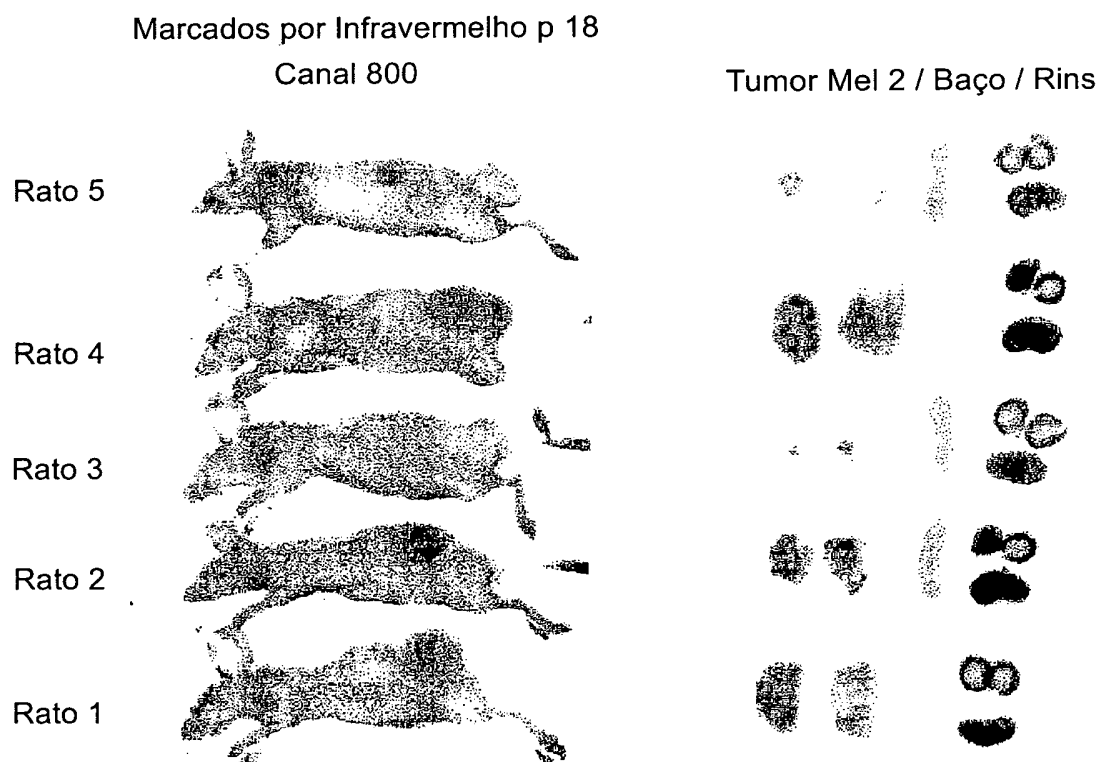


Figura 2



Subcutâneo

800

700/800

Figura 2

RESUMO**MODIFICAÇÕES DOS PEPTÍDEOS DERIVADOS DA CUPREDOXINA E SEUS
MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO**

A presente invenção proporciona peptídeos modificados derivados da cupredoxina com atividade farmacológica que aperfeiçoou as propriedades farmacocinéticas e seus métodos de uso no tratamento de mamíferos que sofrem de vários problemas relacionados com as atividades farmacológicas. As modificações dos peptídeos derivados da cupredoxina incluem variantes da sequência de aminoácidos e derivações estruturais que aumentam a meia-vida plasmática do peptídeo, aumentam a atividade específica da atividade farmacológica, reduzem a imunogenicidade e reduzem a biotransformação dos peptídeos. Os peptídeos modificados derivados da cupredoxina podem ser usados em métodos para o tratamento de mamíferos com câncer, problemas relacionados com a angiogênese inadequada, infecções virais e bacterianas, e especificamente HIV e malária, problemas relacionados com a sinalização da efrina e para transferir compostos de carga, incluindo compostos diagnósticos, nas células de câncer.