

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

(21) **PI0620125-3 A2**

(22) Data de Depósito: 22/12/2006
(43) Data da Publicação: 01/11/2011
(RPI 2130)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 38/16

(54) Título: MÉTODO PARA REGULAÇÃO DE REDUÇÃO DA FUNÇÃO BIOLÓGICA DE UMA PROTEÍNA, MOLÉCULA DE OCORRÊNCIA NÃO NATURAL, VETOR RECOMBINANTE, E MÉTODO PARA ISOLAR UMA PROTEÍNA DE UMA AMOSTRA

(30) Prioridade Unionista: 22/12/2005 EP 0511261.1, 01/12/2006 EP 06125189.8, 22/12/2005 US 60/753.245, 01/12/2006 US 60/872.079, 22/12/2005 EP 0511261.1, 01/12/2006 EP 06125189.8, 01/12/2006 US 60/872.079

(73) Titular(es): Vib Vzw, Vrije Universiteit Brussel

(72) Inventor(es): Joost Schymkowitz

(74) Procurador(es): Walter de Almeida Martins

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006070184 de 22/12/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/071789 de 28/06/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA REGULAÇÃO DE REDUÇÃO DA FUNÇÃO BIOLÓGICA DE UMA PROTEÍNA, MOLÉCULA DE OCORRÊNCIA NÃO NATURAL, VETOR RECOMBINANTE, E MÉTODO PARA ISOLAR UMA PROTEÍNA DE UMA AMOSTRA A presente invenção pertence ao campo da proteômica funcional e mais particularmente ao campo da agregação de proteínas. A invenção divulga um método para interferência na função de uma proteína alvo e utiliza uma molécula construída não-naturalmente por um usuário, designada como interferente, que possui uma especificidade para uma proteína alvo e que induz agregação ao contatar a referida proteína alvo. A presente invenção também divulga as referidas moléculas interferentes e sua utilização em aplicações terapêuticas.

MÉTODO PARA REGULAÇÃO DE REDUÇÃO DA FUNÇÃO BIOLÓGICA DE UMA PROTEÍNA, MOLÉCULA DE OCORRÊNCIA NÃO NATURAL, VETOR RECOMBINANTE, E MÉTODO PARA ISOLAR UMA PROTEÍNA DE UMA AMOSTRA

5 Campo da invenção

A presente invenção refere-se ao campo da proteômica funcional e mais particularmente ao campo da agregação de proteínas. A invenção divulga um método para interferência na função de uma proteína alvo e utiliza uma
10 molécula criada não naturalmente por um usuário, designada como interferente, que apresenta uma especificidade para uma proteína alvo e que induz agregação mediante contato com a referida proteína alvo. A presente invenção também divulga as referidas moléculas interferentes e sua
15 utilização em aplicações terapêuticas.

Antecedentes da invenção

A biologia está em curso de ingresso em uma era excitante causada pelo aumento de informação genômica. À medida que o seqüenciamento de genomas e as técnicas
20 genômicas funcionais de elevado rendimento geram uma quantidade crescente de dados, os pesquisadores requerem novas formas de obtenção de informações biológicas relevantes. A genômica funcional em particular tem realizado rápidos progressos na atribuição de significação

biológica a dados genômicos. As informações codificadas no
genoma compreendem genes, os produtos de proteína que
realizam a mediação da maioria das funções em organismos, e
elementos de controle. As proteínas eram tidas como
5 constituindo os mais importantes causadores de efeitos a
nível celular, muito embora recentemente os RNA's não-
codificantes tenham igualmente sido identificados como
importantes participantes nos processos regulatórios.

Diversas questões biológicas chave são centrais
10 para a continuação dos projetos de genoma e são relevantes
para qualquer organismo celular, desde bactérias até seres
humanos. Um desafio consiste na compreensão da forma em que
os genes codificados em um genoma operam e interagem para
produzirem um sistema vivo complexo. Um desafio associado
15 consiste em determinar a função de todos os elementos das
seqüências no genoma. A ferramenta constituída pela
genômica funcional tem permitido diversas abordagens
sistemáticas que podem proporcionar as respostas para
algumas questões básicas para a maioria dos genes em um
20 genoma, incluindo quando um gene é expressado, onde seu
produto se encontra localizado, e com quais outros produtos
de gene o mesmo interage e qual é o fenótipo resultante se
um gene sofrer mutação. A análise fenotípica de mutantes
tem constituído uma abordagem poderosa para determinação da
25 função de um gene. A função de um gene pode ser alterada

através de eliminações de gene, mutagênese de inserção e interferência de RNA (RNAi). A RNAi é um desenvolvimento relativamente recente para redução da expressão de um gene. Ela baseia-se em relatórios de silenciamento de genes em plantas e outros organismos modelo, e é baseada na observação em *C. elegans* de que a adição de RNA de dupla fita ("double-stranded RNA" - dsRNA) a células freqüentemente interfere com a função do gene de uma forma específica em termos de seqüência. Em muitos casos, o nível de redução funcional não pode ser adequadamente controlado, é incompleto, o nível de especificidade não é inteiramente previsível e em alguns organismos a RNAi não funciona (por exemplo, no fermento *Candida albicans*).

É óbvio que a genômica funcional alterou a forma de operação da biologia mas entretanto o campo encontra-se ainda em sua infância em termos de detalhamento da complexidade subjacente aos sistemas biológicos, tal como à complexa rede de regulação genômica, interações de proteínas e reações bioquímicas que formam uma célula. Existe uma clara necessidade de desenvolvimento de tecnologias inovadoras, particularmente no campo da proteômica funcional, para aceleração de descobertas e para maximização do potencial proporcionado por métodos complementares em genômica funcional. Seria desejável possuir uma tecnologia flexível que permitisse tornar como

alvo direto a função biológica de uma proteína extracelular ou intracelular específica ao invés de tomar como alvo o mRNA que traduz a mesma ou manipular o gene que codifica a mesma.

5 Acredita-se que a conversão de proteínas normalmente solúveis em proteínas insolúveis com conformação alterada constitua um processo causal em uma variedade de doenças tal como, por exemplo, a ocorrência de amilóide beta peptídeo na doença de Alzheimer e angiopatia
10 amilóide cerebral, depósitos de alfa-sinucleína em corpos Lewi na doença de Parkinson, príons na doença de Creutzfeldt-Jacob superóxido dismutase na esclerose amiotrófica lateral e tau em enredamentos neurofibrilares na demência frontal temporal e na doença de Pick. Até o
15 presente, a agregação de proteínas tem sido principalmente estudada como um fenômeno indesejável causador de doenças e é amplamente aceitado o conceito de que a agregação com mediação beta cruzada constitui o mecanismo de agregação de mais freqüente ocorrência e maior relevância biológica². A
20 agregação beta cruzada é o termo utilizado para indicar que a agregação é nucleada através da formação de lâminas beta inter-moleculares para as quais cada molécula do agregado contribui com uma fita idêntica compreendendo tipicamente pelo menos três aminoácidos contíguos. Existem
25 presentemente dados abundantes que demonstram que as fitas

individuais interagem formando uma lâmina beta inter-molecular e que esta estrutura forma a estrutura de suporte principal do agregado^{3,4}. As regiões de auto-associação em proteínas alvo podem ser determinadas mediante utilização de programas de computador, tal como o programa TANGO⁶, que foram desenvolvidos para previsão da propensão para agregação de peptídeos e proteínas. Uma forma específica de agregação, designadamente a altamente ordenada fibra de amilóide, já está sendo explorada na técnica para potencial utilização nas ciências materiais⁵. Adicionalmente, o documento n° WO 03102187 (Scegen, Pty Ltd.) divulga um método para intensificar a atividade de uma molécula mediante fusão da referida molécula com uma seqüência de translocação de membrana, em que dessa forma a molécula quimérica resultante se auto-monta formando um agregado de maior peso molecular. O documento norte americano n° US 20050026165 (Areté Associates) divulga a utilização de peptídeos conformacionais, capazes de interagir com a conformação de lâmina beta de proteínas insolúveis tais como príons, como uma ferramenta de diagnóstico para doenças envolvendo príons.

Sumário da Invenção

A presente invenção refere-se a uma tecnologia para agregação, controlada e passível de indução, de proteínas, de proteínas alvo específicas. A invenção também

proporciona moléculas de construção inédita, que serão aqui designadas como moléculas interferentes, que compreendem pelo menos uma região de agregação em que a referida região de agregação é derivada de uma proteína alvo. Em uma

5 configuração preferencial, a molécula interferente compreende pelo menos uma região de auto-associação que é fundida com uma fração que impede a agregação da referida região de auto-associação. Mediante contato entre uma proteína alvo selecionada e uma molécula interferente

10 especificamente construída, ocorre uma co-agregação específica entre o alvo e o interferente, resultando em uma anulação funcional ("knock-out") ou uma regulação de redução da função biológica para a referida proteína alvo. Esta anulação funcional da proteína depende da presença de

15 agregados, que são induzidos pela presença da molécula interferente. Uma vantagem adicional consiste no fato de a resistência da interferência da proteína poder ser controlada experimentalmente mediante variação do número de regiões de agregação das moléculas interferentes. A

20 invenção não somente proporciona uma ferramenta eficiente para regulação de redução da função biológica de uma proteína extracelular ou intracelular específica, mas apresenta igualmente importantes aplicações terapêuticas, agrícolas e para fins de diagnóstico.

Legendas das figuras

Figura 1: Interferência protéica em *E. coli* mediante utilização de expressão recombinante de 4 diferentes constructos interferentes que têm como alvo enzimas específicas envolvidas em biosíntese de aminoácidos. A parte B de cada molécula interferente consiste em 3 seqüências sintéticas de auto-associação, separadas por elementos de ligação de 2 aminoácidos e uma região auto-associativa específica derivada da enzima. As regiões de auto-associação (sintética e específica) são acopladas à proteína NusA que serve como a fração que impede a agregação (ou seja, a parte A da molécula interferente) das regiões de auto-associação.

Figura 2: Células de *S. cerevisiae* com uma cópia de tipo natural endógeno de *URA3* foram transformadas com o plasmídeo vazio, o plasmídeo somente com a seqüência agregadora ou o plasmídeo com o constructo de fusão agregador-Ura3. As células foram cultivadas durante a noite em mídia contendo glicose, foram lavadas e foram então dispostas em placas alternativamente em mídia contendo glicose (lado esquerdo) ou contendo galactose (lado direito). Foram dispostos em placas 5 µl de diluições de 10 vezes ($OD_{600}=1$ como a concentração mais elevada).

Figura 3: Células de *C. albicans* com duas cópias de tipo natural endógeno de *TUP1* foram transformadas com o

plasmídeo vazio e com o plasmídeo com o constructo de fusão interferente-Tup1. As células foram cultivadas durante a noite em mídia contendo glicose, foram lavadas e foram então formadas placas de 20 colônias alternativamente em
5 mídia contendo glicose (lado esquerdo) ou mídia contendo casaminoácido (lado direito). O painel superior representa o caso do plasmídeo vazio, o painel inferior representa o caso do constructo de interferente ("+ aggreg.-TUP1" significa constructo interferente-TUP1). As imagens foram
10 obtidas após 4 dias de cultura.

Objetivos e descrição detalhada da invenção

Na presente invenção, os inventores desenvolveram um processo para regulação de redução da função biológica de uma proteína mediante utilização de moléculas
15 interferentes que possuem uma especificidade para uma proteína alvo. Mediante contato com uma proteína alvo, ocorre uma co-agregação entre a molécula interferente e o alvo. A agregação retira o alvo de seu ambiente solúvel e produz como resultado uma anulação funcional da proteína
20 alvo.

Desta forma, em uma configuração a invenção proporciona um método para regulação de redução da função biológica de uma proteína compreendendo o contato da referida proteína com uma molécula não ocorrente
25 naturalmente compreendendo pelo menos uma região de auto-

associação isolada da referida proteína.

Em uma outra configuração a invenção proporciona um método para regulação de redução da função biológica de uma proteína compreendendo o contato da referida proteína com
5 uma molécula de ocorrência não natural consistindo em pelo menos uma região de auto-associação isolada da referida proteína.

Em uma outra configuração ainda, a invenção proporciona um método para regulação de redução da função
10 biológica de uma proteína compreendendo o contato da referida proteína com uma molécula de ocorrência não natural compreendendo pelo menos uma região de auto-associação isolada da referida proteína em que o referido domínio de auto-associação é fundido com uma fração que
15 impede a agregação da referida região de auto-associação.

Em uma outra configuração ainda, a invenção proporciona um método para regulação de redução da função biológica de uma proteína compreendendo o contato da referida proteína com uma molécula de ocorrência não
20 natural consistindo em pelo menos uma região de auto-associação isolada da referida proteína em que o referido domínio de auto-associação é fundido com uma fração que impede a agregação da referida região de auto-associação.

Em uma outra configuração ainda, a invenção
25 proporciona um método para regulação de redução da função

biológica de uma proteína compreendendo o contato da referida proteína com uma molécula de ocorrência não natural que compreende uma parte A e uma parte B em que i) a parte A é um peptídeo, ou um domínio de proteína ou uma gota de agarose impedindo a agregação da parte B e ii) a parte B que compreende pelo menos 1 região de auto associação consistindo em pelo menos 3 aminoácidos contíguos e em que a referida região é isolada da referida proteína com a qual sua função deverá ser submetida a regulação de redução, e em que um componente de ligação se encontra opcionalmente presente entre as partes A e B.

Em uma outra configuração ainda, a invenção proporciona um método para regulação de redução da função de uma proteína compreendendo o contato da referida proteína com uma molécula de ocorrência não natural que compreende uma parte A e uma parte B em que i) a parte A é um peptídeo, ou um domínio de proteína ou uma gota de agarose impedindo a agregação da parte B de tal forma que a parte B se encontra em contato direto com o solvente em que a referida molécula e a referida proteína se encontram presentes e ii) a parte B que compreende pelo menos 1 região de auto-associação em que a referida região consiste em pelo menos 3 aminoácidos contíguos e em que a referida região é isolada da referida proteína com a qual sua função deverá ser submetida a regulação de redução, e em que um

componente de ligação se encontra opcionalmente presente entre as partes A e B.

Em uma outra configuração a parte B da molécula de ocorrência não natural compreende pelo menos 2 regiões de auto-associação em que pelo menos uma das referidas regiões é derivada da referida proteína cuja função deverá sofrer interferência.

A expressão 'molécula de ocorrência não natural' refere-se ao fato de que uma tal molécula interferente é resultado de fabricação humana. Por exemplo, quando uma molécula interferente é um polipeptídeo (isto é, tanto a parte A quanto a parte B são peptídeos) um tal polipeptídeo é construído isolando-se a parte B de uma proteína alvo (isto é, a região de auto-associação) e acoplando-se a referida parte B a uma parte A que pode ser derivada (i) de outra proteína ou (ii) da mesma proteína alvo em cujo caso a referida parte A não se encontra presente imediatamente adjacente à parte B. Ainda em outras palavras, a região de auto-associação derivada do alvo fundido com uma fração (quando o interferente é um polipeptídeo a referida fração é igualmente um polipeptídeo) que impede a agregação da região de auto-associação é diferente de uma fusão de ocorrência natural entre a parte A e a parte B em pelo menos um aminoácido natural. Tipicamente, uma tal molécula interferente não existirá na forma de um polipeptídeo

contíguo em uma proteína codificada por um gene em um genoma não-recombinante.

Deverá ficar claro que as moléculas interferentes podem ser criadas de uma forma modular, mediante introdução de repetição e alteração da ordem das partes A e B. Uma lista não limitativa das seguintes combinações é: um interferente com a estrutura A-B, um interferente com a estrutura B-A, um interferente com a estrutura A-B-A, um interferente com a estrutura B-A-B, um interferente com a estrutura A'-B-A'' e um interferente com a estrutura B'-A-B'' em que um componente de ligação (espaçador) se encontra opcionalmente presente entre as partes A, A', A'' e B, B', B''. A, A' e A'' são diferentes de frações similares (por exemplo, diferentes seqüências de peptídeos). B, B', e B'' são seqüências de auto-associação diferentes ou similares (por exemplo, B é uma seqüência de auto-associação derivada da proteína alvo e B' é uma seqüência de auto-associação sintética).

Ainda em outras palavras, a invenção proporciona um método para regulação de redução da função biológica de uma proteína compreendendo o contato da referida proteína com uma molécula compreendendo pelo menos uma região de auto-associação isolada da referida proteína em que a referida região de auto-associação é fundida com uma fração que impede a agregação da referida região de auto-associação de

tal forma que a referida região de auto-associação se encontra em contato direto com o solvente em que se encontram presentes a referida molécula e a referida proteína. A partir do que se encontra referido acima deverá
5 ficar claro que a referida 'fração' equivale ao termo parte A e a parte B é equivalente à expressão 'pelo menos uma região de auto-associação'.

A expressão 'função de regulação de redução de uma proteína' significa que a atividade biológica normal de uma
10 proteína é reduzida (inibida, submetida a regulação de redução, reduzida e perturbada são aqui expressões equivalentes) ou que a proteína é retirada de seu ambiente biológico normal (por exemplo, uma proteína que se encontra normalmente residente no retículo endoplasmático não fica
15 presente mediante regulação de redução de sua função). Assim, mediante aplicação do método de acordo com a presente invenção, a função de uma proteína é perturbada através de uma agregação da referida proteína mediante contato da referida proteína com a molécula não natural da
20 presente invenção. A referida molécula não natural é aqui designada como 'o interferente' ou a 'molécula interferente'. A agregação refere-se ao fato de que uma proteína que é normalmente solúvel ser transformada em uma proteína insolúvel ou uma proteína agregada em seu ambiente
25 biológico normal mediante contato direto ou união com o

interferente. A expressão 'regulação de redução da função de uma proteína' pode igualmente ser intercambiada com a expressão 'eliminação da função de uma proteína' ou 'interferência negativa com a função de uma proteína'. A

5 regulação de redução da função de uma proteína pode igualmente significar que uma proteína já não se encontra presente em uma forma solúvel na célula ou que uma proteína já não se encontra em uma forma solúvel em seu ambiente biológico normal (por exemplo, em localização (sub)-celular

10 ou extra-celular). Adicionalmente, a expressão pode igualmente significar que a proteína agregada é degradada através dos mecanismos naturais de eliminação da célula e já não é detectável em forma solúvel ou insolúvel. Adicionalmente, a expressão pode igualmente significar que

15 uma proteína receptora transmembrana já não pode se unir a seu ligante normal mediante agregação induzida por interferente da referida proteína transmembrana. Desta forma, a regulação de redução da função de uma proteína pode igualmente significar que uma proteína que é residente

20 normal, por exemplo, do mitocôndrio, já não se encontra ali presente através do método de interferência de proteína. Em uma configuração em particular a 'regulação de redução da função de uma proteína' ou a interferência negativa na função de uma proteína' ou 'eliminação da função de uma

25 proteína' é uma perda de função de pelo menos 20%, pelo

menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou até mesmo de 100% em comparação com a função normal (100%) da proteína.

5 A função de uma proteína ou a ausência da presença de uma proteína em seu ambiente (localização) biológico normal podem ser convenientemente determinadas por métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, dependendo da proteína alvo de interesse, a função pode ser determinada mediante
10 medição da redução de atividade enzimática. A presença reduzida de uma proteína em sua localização biológica normal pode por exemplo ser medida pela ausência de formação de um complexo, pela ausência de ocorrência de uma proteína alvo em um compartimento sub-celular, a presença
15 da proteína alvo em forma solúvel, a presença da proteína alvo em uma forma agregada (insolúvel é neste caso um termo equivalente). Alternativamente, o efeito da regulação de redução de uma proteína alvo pode ser medido em um ensaio celular (por exemplo, perda ou ganho de crescimento, perda
20 ou ganho de invasão, perda ou ganho de atividade proteolítica).

 Em uma configuração em particular uma tal atividade biológica normal (ou função normal ou localização normal) de uma proteína pode ser sujeita a interferência
25 intracelularmente ou extracelularmente. 'Intracelularmente'

refere-se à localização de uma proteína no interior de uma célula de um organismo ou hospedeiro (por exemplo, o citoplasma, o mitocôndrio, o lisossoma, o vacúolo, o núcleo, o cloroplasto, o retículo endoplasmico

5 ("Endoplasmic Reticulum" - ER), a membrana celular, a membrana mitocondrial, a membrana de cloroplasto, ...).

'Extracelularmente' refere-se não somente à localização de uma proteína no meio extracelular da célula mas refere-se igualmente a proteínas que contatam o meio extracelular

10 tais como proteínas ancoradas à membrana, uma proteína transmembrana, etc. Exemplos não limitativos de proteínas extracelulares são proteínas segregadas (por exemplo, proteases, anticorpos e citocinas presentes no sangue ou plasma) ou proteínas presentes na matriz extracelular (por

15 exemplo, metaloproteínas matriciais e proteínas transmembrana (por exemplo, um receptor de fator de crescimento)).

As células ou hospedeiros que podem constituir alvos com o método de acordo com a presente invenção

20 compreendem células procarióticas e células eucarióticas. Exemplos não limitativos são vírus, fermentos, fungos, protozoários, plantas e mamíferos incluindo seres humanos.

Deverá ficar claro que o método de regulação de redução da função biológica de uma proteína pode ser

25 utilizado para interferir na função biológica de 1, 2, 3,

4, 5 ou até mais proteínas simultaneamente. Particularmente na medida em que a parte B compreende pelo menos uma região de auto-associação, a parte B pode compreender por exemplo diferentes regiões de auto-associação, cada uma específica para uma diferente proteína. O interferente utilizado para interferir na função biológica de pelo menos uma proteína alvo não se encontra naturalmente presente na natureza e pode ser obtido mediante síntese química ou através de expressão de proteína recombinante ou mediante uma combinação destes últimos métodos.

Desta forma, uma molécula interferente compreende pelo menos uma região de auto-associação (e desta forma a parte B compreende pelo menos uma região de auto-associação). Uma 'região de auto-associação' é aqui definida com uma seqüência contígua de aminoácidos que apresenta uma elevada tendência para formar um conjunto molecular íntimo com seqüências idênticas ou muito semelhantes. A expressão 'tem uma elevada tendência para formar um conjunto molecular íntimo' pode igualmente ser interpretada como 'apresenta uma elevada afinidade'. A afinidade é normalmente traduzida em valores de dissociação (valores K_d). Os valores K_d entre interferentes e proteínas alvo situam-se tipicamente entre faixas micromolares e nanomolares, porém podem ser sub-nanomolares ou supra-micromolares. Exemplos de regiões de auto-

associação são regiões laminares beta intermoleculares, elementos alfa-helicoidais, enlaces tipo grampo, seqüências transmembrana e seqüências de sinalização. Em uma configuração em particular pelo menos uma região de auto-
5 associação encontra-se presente na parte B. Em uma outra configuração em particular pelo menos duas regiões de auto-
associação encontram-se presentes na parte B. Em uma outra configuração em particular, 3, 4, 5, 6 ou mais regiões de auto-
associação encontram-se presentes na parte B. As
10 referidas regiões de auto-associação podem ser interligadas por uma região de ligação (por exemplo, um espaçador de cerca de 2 até cerca de 4 aminoácidos). Uma (ou pelo menos uma) região de auto-associação presente na parte B é derivada de uma proteína alvo. Em uma configuração em
15 particular, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais regiões de associação na parte B são derivadas de uma proteína alvo. Em uma outra configuração em particular, 2, 3, 4, 5, 6, ou mais regiões de auto-associação na parte B são derivadas de mais de 1 proteína alvo. Em uma outra configuração em particular as
20 pelo menos duas regiões de auto-associação presentes na parte B são derivadas da mesma proteína alvo. A proteína alvo é aqui definida como a proteína com cuja função se deseja interferir. Assim, para tornar a parte B específica para pelo menos uma proteína, pelo menos uma região de
25 auto-associação na parte B deverá ser 'derivada da'

proteína alvo ou pelo menos uma região de auto-associação deverá encontrar-se presente na referida proteína alvo.

'Derivada de' significa que pelo menos uma região contígua de auto-associação deverá ser idêntica ou homóloga em
5 sequência de aminoácido a uma região contígua da referida proteína alvo. Em uma configuração preferencial, a referida pelo menos uma região de auto-associação é pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo
10 menos 100% idêntica à região de auto-associação presente na região da referida proteína alvo.

É preferencial que a extensão de uma região de auto-associação consista em pelo menos 3 aminoácidos contíguos. Em uma configuração preferencial a referida
15 região consiste em desde cerca de 3 até cerca de 30 aminoácidos. Em uma outra configuração preferencial a referida região consiste em desde cerca de 3 até cerca de 25 aminoácidos. Em uma configuração particularmente preferencial a referida região consiste em desde cerca de 5
20 até cerca de 20 aminoácidos.

As regiões de auto-associação presentes na parte B da molécula interferente podem igualmente ser determinadas e isoladas de proteínas diversas da proteína alvo e as
25 referidas regiões de auto-associação são acopladas a pelo

menos uma região de auto-associação derivada da proteína alvo, opcionalmente com um espaçador (ou componente de ligação) entre as referidas regiões de auto-associação. Por exemplo as regiões de auto-associação que podem ser
5 utilizadas podem ser derivadas de regiões de auto-associação de proteínas que não ocorrem normalmente no hospedeiro no qual é realizada a regulação de redução da função biológica de uma proteína alvo (desta forma as regiões de auto-associação na parte B podem ser obtidas de
10 um organismo não relacionado). A natureza das regiões de auto-associação determina o nível de inibição (isto é, a intensidade de inibição) de uma proteína alvo mediante agregação induzida. É possível utilizar mais de uma região de auto-associação de uma proteína alvo em uma molécula
15 interferente porém podem igualmente ser utilizadas regiões de auto-associação sintéticas ou regiões de auto-associação derivadas de uma proteína alvo diferente, em combinação com uma ou mais regiões de auto-associação de uma proteína alvo.

20 Em uma configuração em particular, essas regiões de auto-associação consistem em uma sequência sintética que não é derivada de proteínas existentes e portanto não ocorre na natureza. Exemplos de tais regiões de auto-associação sintéticas são descritas em um trabalho de López
25 de la Paz M. e outros (2002) PNAS 99, 25, p. 16053, tabela

1, que se encontra aqui incorporado a título de referência.

Se pelo menos uma região de auto-associação (isto é, a parte B da molécula interferente) tiver um caráter hidrofóbico (devido a suas propriedades indutoras de agregação) a mesma é preferencialmente fundida (ou ligada ou acoplada, que são termos equivalentes) a uma fração (isto é, a parte A da molécula interferente) que impede a agregação da referida região de auto-agregação e expõe a referida região de auto-agregação ao contato direto com o solvente no qual o interferente se encontra presente. Como tal, em determinadas configurações a parte A tem uma função solubilizante para manter a parte B em solução. Em tais configurações a referida parte A é por exemplo um peptídeo, um domínio de proteína, uma proteína (preferencialmente diferente da proteína alvo, vide o exemplo 2), uma estrutura de glicosilação, um grupo químico (hidrofílico) ou uma ciclodextrina ou derivado. Em certas outras configurações a referida parte A é uma gota de agarose, uma gota de látex, uma gota de celulose, uma gota magnética, uma gota de sílica, uma gota de poliacrilamida, uma microesfera, uma gota de vidro ou qualquer suporte sólido (por exemplo, poliestireno, plástico, membrana de nitrocelulose, vidro).

Nas moléculas interferentes a parte B e a parte A

podem ser opcionalmente ligadas (ou acopladas) por meio de uma região de ligação (sendo que um espaçador é um termo equivalente). A referida região de ligação pode consistir por exemplo em um componente de ligação não natural obtido por síntese química (por exemplo, um componente de ligação flexível tal como uma cadeia de alceno hidróxi-substituído, dextran, polietileno glicol, ou o componente de ligação pode igualmente consistir em aminoácidos homólogos tais como uma poli(treonina) ou poli(serina). Preferencialmente quando o componente de ligação compreende aminoácidos, a extensão da referida região de ligação é de entre cerca de 3 e cerca de 15 aminoácidos, mais preferencialmente entre cerca de 5 e cerca de 10 aminoácidos. Pode ser freqüentemente selecionado um componente de ligação flexível porém é previsto que um elemento de ligação rígido será igualmente funcional. As seqüências de ligação flexíveis podem ser obtidas da natureza, principalmente essas regiões que ligam domínios em proteínas de ocorrência natural, tal como o componente de ligação entre os domínios SH3 e SH3 src tirosina quinase ou o componente de ligação entre os domínios BRCT de BRCA1.

O termo 'contato' refere-se ao processo de interação entre o interferente e a proteína alvo. Em uma forma o interferente é adicionado (por exemplo, o interferente encontra-se presente em uma concentração

particular em uma solução) a uma amostra compreendendo a proteína alvo. Em uma outra forma a molécula interferente é injetada em um organismo compreendendo a proteína alvo. O contato pode por exemplo ser realizado através do processo de transformação de uma célula compreendendo a proteína alvo, por exemplo uma célula isolada, por exemplo em cultura de célula, um microorganismo unicelular ou uma célula ou uma pluralidade de células dentro de um organismo multicelular. A transformação implica que a molécula interferente seja introduzida em um hospedeiro (por exemplo, uma célula) através de métodos conhecidos de transfecção ou transformação (por exemplo, através de técnicas de transferência de gene incluindo fosfato de cálcio, DEAE-dextran, electroporação, microinjeção, métodos virais, utilização de lipossomas catiônicos (vide por exemplo o trabalho de Feigner, P. L. e outros (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84, 7413), formulações lípidicas catiônicas comercialmente disponíveis, por exemplo, Tfx 50 (Promega) ou Lipofectamin 2000 (Life Technologies), bombardeamento de partículas, etc.). A molécula interferente pode ser codificada por um vetor recombinante (por exemplo, um plasmídeo, cosmídeo, vetor viral) e pode ser sintetizada no interior de um hospedeiro. Em uma configuração alternativa a molécula interferente pode ser introduzida em uma célula por fornecimento mediado por um

veículo, por exemplo, por veículos lipossomais ou nanopartículas ou por injeção. Em uma outra configuração alternativa adicional a molécula interferente pode ingressar em uma célula através de uma seqüência que
5 realiza a mediação da penetração na célula (ou translocação de célula). Neste último caso a molécula interferente é adicionalmente modificada mediante o acoplamento recombinante ou sintético de uma seqüência de penetração de célula. Assim, a molécula interferente (por exemplo, um
10 polipetídeo) pode ser adicionalmente fundida ou quimicamente acoplada a uma seqüência que facilita a transdução da fusão ou proteínas quimicamente acopladas para o interior de células procarióticas ou eucarióticas. As seqüências que facilitam a transdução de proteínas são
15 conhecidas das pessoas versadas na técnica e incluem, sem limitações, Domínios de Transdução de Proteínas. Preferencialmente, a referida seqüência é selecionada do grupo que compreende a proteína HIV TAT, uma seqüência de poliarginina, penetratina, e pep-1. Outros peptídeos
20 permeáveis a células normalmente utilizados (tanto peptídeos naturais quanto artificiais) são divulgados em um trabalho de Joliot A e Prochiantz A. (2004) *Nature Cell Biol.* 6 (3) 189-193.

Em uma configuração em particular, o interferente
25 consiste essencialmente em aminoácidos. Em algumas

configurações as seqüências das partes A e B da molécula interferente são derivadas da mesma proteína alvo. Em outras configurações o interferente é uma molécula quimérica significando que as seqüências das partes A e B são derivadas de proteínas diferentes, por exemplo a parte A é derivada de uma proteína e pelo menos uma região de agregação da parte B é derivada da proteína alvo. Um "Polipeptídeo" refere-se a um polímero em que os monômeros são aminoácidos e são unidos entre si por ligações de amida, alternativamente referido como um peptídeo. Quando os aminoácidos são alfa-aminoácidos, pode alternativamente ser utilizado o isômero ótico-L ou o isômero ótico-D. Adicionalmente, aminoácidos não naturais, por exemplo, beta-alanina, fenilglicina e homoarginina são igualmente incluídos. Aminoácidos vulgarmente encontrados que não são codificados por genes podem igualmente ser utilizados na presente invenção. A totalidade ou parte dos aminoácidos utilizados nos interferentes pode consistir alternativamente no isômero D ou no isômero L. Adicionalmente, outros peptidomiméticos são igualmente úteis na presente invenção. Referimos especificamente e incorporamos no presente texto uma análise do desenvolvimento e utilização de peptidomiméticos como antagonistas de interações proteína-proteína do trabalho de Sillerud LO e Larson RS (2005) *Curr Protein Pept Sci*.

6(2):151-69. Adicionalmente, D-aminoácidos podem igualmente ser adicionados à sequência de peptídeo para estabilização de características de inversão (particularmente no caso da glicina). Em uma outra abordagem, mimetizadores de inversão

5 alfa, beta, gama ou delta (tais como alfa, beta, gama, ou delta di-peptídeos podem ser empregados para mimetizar motivos estruturais e características de inversão em um peptídeo e simultaneamente proporcionar estabilidade relativamente a proteólise e intensificar outras

10 propriedades tais como, por exemplo, estabilidade conformacional e solubilidade.

Isolação de uma região de auto-associação de uma proteína alvo:

As seqüências de alfa-associação são freqüentemente

15 hidrofóbicas mas isto nem sempre ocorre. Por exemplo, as regiões de auto-agregação dos príons de fermento são acentuadamente polares. De fato, a agregação beta-cruzada de uma região de aminoácido derivada de um polipeptídeo ou proteína pode ser iniciada quando (1) a mesma tiver uma

20 elevada hidrofobicidade, (2) a mesma tiver uma boa propensão para β -laminaridade, (3) a mesma tiver uma baixa carga útil e (4) a mesma for exposta a um solvente. Desta forma, as regiões de auto-associação de proteína ('segmento' é um termo equivalente para 'região') são

25 freqüentemente enterradas no estado dobrado e não são

expostas ao solvente. Este último fato é confirmado pela descoberta experimental de que em muitas proteínas globulares a agregação ocorre durante a re-dobradura ou em condições em que estados desnaturados ou parcialmente
5 dobrados são significativamente populados, isto é, em elevada concentração ou como resultado de condições desestabilizantes ou mutações.

Com base nestas descobertas foram desenvolvidos algoritmos para computador capazes de prever regiões de
10 auto-associação ("segmentos ou trechos de β -agregação" é uma descrição equivalente) em proteínas. Um desses algoritmos, designado como TANGO, é baseado em um algoritmo mecânico estatístico que considera os três parâmetros físico-químico descritos acima porém considera igualmente a
15 competição entre diferentes conformações estruturais: agregados beta-invertidos, alfa-helicoidais, beta-laminados e o estado dobrado (Fernandez-Escamilla, AM e outros (2004) *Nat. Biotechnol.* 22, 1302-1306, especificamente a seção de Métodos nas páginas 1305 e 1306 são aqui especificamente
20 incorporados a título de referência e igualmente as Notas Suplementares 1 e 2 do mesmo artigo para detalhes adicionais sobre os métodos e os conjuntos de dados usados para calibração e teste do algoritmo TANGO). Assim, as regiões de auto-associação presentes em proteínas alvo
25 podem ser obtidas mediante utilização de algoritmos de

computador tal como o algoritmo TANGO. As regiões de auto-
associação são freqüentemente enterradas no interior do
núcleo das proteínas alvo¹⁰, isolando efetivamente o
peptídeo de associação intermolecular através de uma
5 barreira de energia correspondente à estabilidade das
proteínas alvo¹¹. Em seu ambiente normal (por exemplo,
citoplasma, matriz extracelular), a proteína alvo recebe
assistência de assistentes moleculares que auxiliam a
proteína a manter sua forma monomérica funcional¹². O
10 modelo utilizado pelo algoritmo TANGO⁶ é projetado para
prever beta-agregação em peptídeos e proteínas e consiste
em um espaço-fase que abrange a hélice aleatória e as
conformações nativas bem como outros estados
conformacionais, designadamente beta-inversão, alfa-hélice
15 e beta-agregado. Cada segmento de um peptídeo pode popular
cada um destes estados de acordo com uma distribuição tipo
Boltzmann. Desta forma, para prever as regiões de auto-
associação de um peptídeo, o algoritmo TANGO simplesmente
calcula a função de partição do espaço-fase. Para obtenção
20 de uma estimativa da tendência de agregação de uma
seqüência de aminoácido específica, são feitas as seguintes
suposições: (i) em um agregado beta-laminar ordenado, a
principal estrutura secundária é a fita beta. (ii) as
regiões envolvidas no processo de agregação são totalmente
25 enterradas, dessa forma sendo objeto de uma totalidade de

custos e ganhos de solvação, entropia plena e otimização de seu potencial de ligação-H (isto é, o número de ligações-H realizado no agregado é relacionado com o número de grupos doadores que são compensados por aceptadores. Um excesso de doadores ou aceptadores permanece não satisfeito). (iii) cargas complementares na janela selecionada estabelecem interações eletrostáticas favoráveis, e a carga útil geral do peptídeo no interior porém também no exterior da janela desfavorece agregação. O algoritmo TANGO pode ser acessado na rede World Wide Web no endereço <http://tango.embl.de/>. O algoritmo "zyggregator" é um outro exemplo (Pawar AP e outros (2005) *J. Mol. Biol.* 350, 379-392). Estes algoritmos identificam seqüências com tendência para agregação mediante comparação da classificação de propensão à agregação de uma determinada seqüência de aminoácidos com uma propensão média calculada com base em um conjunto de seqüências de extensão similar.

Na presente invenção estimamos que uma região de auto-associação identificada dentro de uma proteína alvo com uma classificação TANGO de 5% corresponde a um risco de agregação *in vitro* de 95%⁶. Calculamos que 85% das proteínas do proteoma humano que não são relacionadas a doenças possuem pelo menos uma região com uma classificação TANGO superior ao limiar determinado experimentalmente de 5%. Isto demonstra que muito embora mais de 85% das

proteínas humanas contenham pelo menos uma única região de auto-associação em que é impedida a agregação devido à estabilidade normal da proteína e à assistência dos mecanismos de auxílio. A presente invenção isola estas

5 regiões de auto-associação de proteínas alvo para preparação de moléculas interferentes que são utilizadas para indução específica de agregação de proteínas. A parte B das moléculas interferentes compreende pelo menos 1 região de agregação e pelo menos uma região de agregação é

10 derivada de uma proteína alvo. É possível controlar a intensidade da interferência na proteína (a intensidade da interferência na proteína corresponde por exemplo à porcentagem de perda de função biológica de uma proteína

15 referida proteína é contatada por uma molécula interferente específica) mediante incorporação de mais de uma região de agregação de uma proteína alvo na parte B da molécula interferente. Na realidade, as regiões de agregação derivadas de uma proteína alvo com uma classificação TANGO

20 baixa (tipicamente entre 5% até cerca de 20%) podem ser repetidas na parte B do interferente para 2, 3, 4 ou mais regiões de agregação. Como uma configuração alternativa, 1, 2 ou 3 ou 4 ou mais diferentes regiões de agregação com uma baixa classificação TANGO derivadas da mesma proteína podem

25 ser incorporadas na parte B do interferente. Como outra

configuração alternativa, 1, 2, 3, 4 ou mais regiões de agregação sintéticas (portanto não derivadas da proteína alvo) podem ser combinadas com 1, 2, 3, 4 ou mais regiões de agregação derivadas da proteína alvo para a parte B para
5 aumentar a regulação de redução de uma proteína alvo com uma baixa classificação TANGO.

Assim, em uma outra configuração a invenção proporciona uma molécula de ocorrência não natural capaz de agregar uma proteína alvo. Em uma configuração em
10 particular, a referida molécula não natural é de natureza proteinácea. Proteináceo significa que a molécula compreende L-aminoácidos ou D-aminoácidos ou uma mistura de L-aminoácidos e D-aminoácidos ou uma combinação de aminoácidos naturais e peptidomiméticos.

15 Em uma outra configuração ainda a invenção proporciona uma molécula de ocorrência não natural compreendendo pelo menos uma região de auto-associação isolada de um domínio de proteína capaz de ser solúvel em água em que a referida região de auto-agregação é fundida
20 com uma fração que impede a agregação da referida região de auto-agregação.

Em uma outra configuração ainda a invenção proporciona uma molécula de ocorrência não natural compreendendo pelo menos uma região de auto-associação
25 isolada de um domínio de proteína capaz de ser solúvel em

água em que a referida região de auto-agregação é fundida com uma fração que impede a agregação da referida região de auto-agregação de tal forma que a referida região de auto-agregação se encontra em contato direto com o solvente no qual se encontra presente.

Em uma outra configuração ainda a invenção proporciona uma molécula de ocorrência não natural consistindo em pelo menos uma região de auto-associação isolada de um domínio de proteína capaz de ser solúvel em água em que a referida região de auto-agregação é fundida com uma fração que impede a agregação da referida região de auto-agregação.

Em uma outra configuração ainda a invenção proporciona uma molécula de ocorrência não natural consistindo em pelo menos uma região de auto-associação isolada de um domínio de proteína capaz de ser solúvel em água em que a referida região de auto-agregação é fundida com uma fração que impede a agregação da referida região de auto-agregação de tal forma que a referida região de auto-agregação se encontra em contato direto com o solvente no qual se encontra presente.

Em uma configuração em particular essa fração consiste por exemplo em um peptídeo, uma gota de agarose, um domínio de proteína ou uma proteína. Em uma outra configuração em particular a referida molécula de

ocorrência não natural compreende pelo menos duas regiões de auto-agregação das quais pelo menos uma região de auto-agregação é derivada de uma proteína alvo.

Em outras palavras, a invenção proporciona uma
5 molécula de ocorrência não natural, que compreende uma parte A e uma parte B em que i) a parte A compreende uma região, tal como um peptídeo, um domínio de proteína, uma proteína ou uma gota de agarose que impede a agregação da parte B, e ii) a parte B que compreende pelo menos uma
10 região de auto-agregação em que a referida região consiste em pelo menos 3 aminoácidos contíguos e em que a referida região é isolada da referida proteína com a função da qual deverá ser feita interferência, e em que um componente de ligação se encontra opcionalmente presente entre as partes
15 A e B.

Ainda em outras palavras, a invenção proporciona uma molécula de ocorrência não natural que compreende uma parte A e uma parte B em que i) a parte A compreende uma região, tal como um peptídeo, um domínio de proteína ou uma
20 gota de agarose que impede a agregação da parte B, ii) a parte B que compreende pelo menos 1 região de auto-associação consistindo em pelo menos 3 aminoácidos contíguos e em que pelo menos uma região de auto-associação é isolada de uma proteína com cuja função deverá ocorrer
25 interferência e em que a referida região é isolada de um

domínio da referida proteína que é capaz de ser solúvel em água, e em que um componente de ligação se encontra opcionalmente presente entre as partes A e B, e em que a parte B se encontra em contato direto com o ambiente onde a referida molécula e a referida proteína se encontram presentes.

Ainda em outras palavras, a invenção proporciona uma molécula de ocorrência não natural que compreende uma parte A e uma parte B em que i) a parte A compreende uma região, tal como um peptídeo, um domínio de proteína ou uma gota de agarose que impede a agregação da parte B, ii) a parte B que compreende pelo menos 1 região de auto-associação consistindo em pelo menos 3 aminoácidos contíguos e em que pelo menos uma região de auto-associação é isolada de uma proteína com cuja função deverá ocorrer interferência e em que a referida região é derivada de um domínio da referida proteína que é capaz de ser solúvel em água, e em que um componente de ligação se encontra opcionalmente presente entre as partes A e B, e em que a parte B se encontra em contato direto com o ambiente no qual a referida molécula e a referida proteína se encontram presentes.

A expressão 'isolada (ou derivada de) um domínio da referida proteína que é capaz de ser solúvel em água'

significa que uma região de auto-associação é uma sequência de aminoácido contígua isolada de um domínio solúvel de uma proteína. Esta última significa igualmente que regiões de auto-associação derivadas de regiões transmembrana ou
5 regiões de auto-associação derivadas de seqüências de sinalização são especificamente excluídas no escopo reivindicado dos presentes produtos de molécula interferente nessas configurações.

Na presente invenção a pelo menos uma região de
10 auto-associação da molécula interferente (isto é, a parte B da molécula interferente), encontra-se 'em contato direto' com o ambiente (por exemplo, solvente, citosol) em que a referida molécula interferente se encontra presente. A importância deste fato será adicionalmente clarificada. Em
15 proteínas globulares as seqüências de auto-associação (também designadas como 'regiões de nucleação de agregação') encontram-se geralmente enterradas no núcleo hidrofóbico da proteína globular e como tal são mantidas protegidas do solvente por uma densa rede de interações
20 cooperativas que estabilizam o estado nativo. Desta forma, em circunstâncias normais não ocorre 'contato direto' entre a referida região de auto-agregação e o ambiente (por exemplo o solvente). Somente quando a proteína é desdobrada, por exemplo quando é sintetizada no ribossoma ou
25 desestabilizada por mutação, alteração de temperatura, pH

ou perda de um auxiliar específico, dessa forma favorecendo o estado desdobrado, a mesma irá expor suas regiões de auto-associação ao ambiente. As regiões de auto-associação são normalmente enterradas no interior de proteínas (de
5 forma a impedir agregação) e na molécula interferente não natural as referidas regiões de auto-associação foram isoladas e expostas ao ambiente mediante ligação das referidas regiões com uma fração que impede agregação (isto é, a parte A da molécula interferente). Ainda em outras
10 palavras, a molécula interferente não natural não se dobra em uma estrutura globular e portanto a pelo menos uma região de auto-associação (isto é, a parte B) na molécula interferente não natural encontra-se em contato direto com o solvente em que a referida molécula interferente se
15 encontra presente. Desta forma, 'em contato direto' significa o oposto de 'estar enterrada e mantida protegida de'.

Em uma configuração específica as moléculas
20 interferentes que compreendem pelo menos uma região de auto-associação derivada de um domínio de proteína solúvel são polipeptídeos.

Em uma outra configuração específica a invenção proporciona um vetor recombinante compreendendo um
25 polinucleotídeo que codifica as referidas moléculas

interferentes.

Em uma outra configuração específica as moléculas interferentes de acordo com a presente invenção são utilizadas como medicamento.

5 Aplicações terapêuticas das moléculas interferentes

As proteínas são responsáveis por atividades biológicas situadas em uma faixa desde numerosas reações enzimáticas, sobre transdução de sinais para provisão de estrutura. As alterações de estrutura, abundância ou
10 atividade de proteínas constituem a causa primária de muitas doenças. Muitas drogas atuam através de interferência específica com uma ou um número limitado de proteínas. A presente invenção proporciona um método para desenvolvimento de uma nova classe de compostos capazes de
15 interferir especificamente com uma proteína alvo selecionada. Estes novos compostos são designados como interferentes.

Desta forma, em uma outra configuração ainda da presente invenção é provida a utilização como medicamento
20 de uma molécula de ocorrência não natural compreendendo pelo menos uma região de auto-associação derivada de um domínio de proteína capaz de ser solúvel em água em que a referida região de auto-associação é fundida com uma fração que impede agregação da referida região de auto-agregação.

25 Em uma outra configuração ainda a invenção

proporciona a utilização como medicamento de uma molécula de ocorrência não natural compreendendo pelo menos uma região de auto-associação derivada de um domínio de proteína capaz de ser solúvel em água em que a referida
5 região de auto-agregação é fundida com uma fração que impede agregação da referida região de auto-agregação de tal forma que a referida região de auto-agregação se encontra em contato direto com o solvente em que a referida molécula se encontra presente.

10 Em outras palavras ainda, a invenção proporciona a utilização como medicamento de uma molécula interferente de origem não natural, que compreende uma parte A e uma parte B em que i) a parte A compreende uma região, tal como um peptídeo ou um domínio de proteína que impede a agregação
15 da parte B, e ii) a parte B compreende pelo menos 1 região de auto-associação em que a referida região compreende pelo menos 3 aminoácidos contíguos derivados da proteína alvo e em que um componente de ligação se encontra opcionalmente presente entre as partes A e B.

20 Em outras palavras ainda a invenção proporciona a utilização como medicamento de uma molécula interferente de ocorrência não natural, que compreende uma parte A e uma parte B em que i) a parte A compreende uma região, tal como um peptídeo ou um domínio de proteína que impede a
25 agregação da parte B, e ii) a parte B compreende pelo menos

1 região de auto-associação em que a referida região
compreende pelo menos 3 aminoácidos contíguos derivados da
proteína alvo e em que um componente de ligação se encontra
opcionalmente presente entre as partes A e B e em que a
5 parte B se encontra em contato direto com o solvente em que
a referida molécula interferente se encontra presente.

As referidas moléculas interferentes podem ser
utilizadas para tratamento de doenças e/ou na fabricação de
um medicamento para tratamento de doenças, tal como câncer,
10 associadas com a expressão aberrante de pelo menos uma
proteína alvo, tal como uma proteína oncogênica. O termo
'expressão aberrante' refere-se por exemplo à
(sobre)expressão de uma proteína oncogênica no caso do
câncer, e inclui igualmente a expressão de uma proteína
15 negativa dominante, a localização indesejável de uma
proteína em particular ou variante de "splice" de uma
proteína em particular, a expressão indesejável de uma
variante de "splice" em particular de uma proteína
específica, a elevação de atividade de uma proteína mutante
20 ou a elevação de atividade de uma proteína específica.

Em uma configuração em particular, a expressão
"expressão aberrante" refere-se à presença indesejável de
uma proteína modificada pós-translacionalmente ou à
presença indesejável de uma proteína modificada não-pós-
25 translacionalmente. As modificações pós-translacionais

alteram as propriedades físico-químicas dos aminoácidos modificados, e como tal têm potencial para alterar a tendência de agregação de um determinado segmento de polipeptídeo que pode ser explorado para determinar especificamente como alvo a forma que possui a mais forte tendência de agregação. Desta forma, se uma modificação pós-translacional reduzir a tendência de agregação da região de auto-associação, a interferência será mais eficiente na proteína não modificada. Em contraste, no caso de modificações pós-translacionais que aumentam a tendência de agregação da região de auto-agregação, a interferência será mais eficiente com a proteína modificada. Com base somente na hidrofobicidade, é suposto que modificações tais como fosforilação e glicosilação reduzem a tendência de agregação, ao passo que o acoplamento lipídico aumenta a tendência de agregação.

A proteína alvo à qual a molécula interferente da invenção é dirigida pode ser associada com uma condição patológica. Por exemplo, a proteína pode ser uma proteína associada a um patógeno, por exemplo uma proteína viral, uma proteína associada a um tumor, ou uma proteína associada a uma doença auto-imune. Em um aspecto, a invenção apresenta um método de tratamento de um paciente em risco de ou sofrendo de uma proliferação indesejável de células, por exemplo, uma proliferação de células malignas

ou não malignas. O método inclui: provisão de uma molécula interferente, por exemplo um interferente possuindo uma estrutura conforme aqui descrita, em que a referida molécula interferente é capaz de interferir com (inibir) a
5 função e/ou a presença de uma proteína que promoveu uma proliferação celular indesejável e administração do referido interferente a um paciente, preferencialmente um paciente humano, dessa forma tratando o paciente.

Em uma configuração preferencial, a proteína
10 compreende um fator de crescimento ou um receptor de fator de crescimento, uma quinase (por exemplo, uma tirosina quinase, serina quinase ou treonina quinase de proteína), uma proteína adaptadora, uma proteína da super-família de receptores de acoplamento de proteína G, ou um fator de
15 transcrição. Em uma configuração preferencial, a molécula interferente interfere na função biológica da proteína PDGF-beta, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por uma expressão indesejável
20 de PDGF-beta, por exemplo, cânceres de testículos e dos pulmões. Em uma outra configuração preferencial o interferente inibe (elimina) a função e/ou a presença da proteína Erb-B, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar
25 portador de um distúrbio caracterizado por uma expressão

indesejável de Erb-B, por exemplo, câncer de mama. Em uma outra configuração preferencial, o interferente inibe a função (ou "interfere com a função", que é uma expressão equivalente) da (ou interfere com a presença da) proteína Src, e dessa forma pode ser utilizado para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por uma expressão indesejável de Src, por exemplo, cânceres do cólon. Em uma outra configuração preferencial, o interferente inibe a função e/ou presença da proteína CRK, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por uma expressão indesejável de CRK, por exemplo cânceres do cólon e dos pulmões. Em uma outra configuração preferencial, o interferente interfere na função e/ou na presença da proteína GRB2, e dessa forma pode ser utilizado para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por uma expressão indesejável de GRB2, por exemplo, carcinoma celular escamoso. Em uma outra configuração preferencial, a molécula interferente interfere na função e/ou na presença do gene RAS, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por uma expressão indesejável de RAS, por exemplo cânceres do pâncreas, do

cólon e dos pulmões, e leucemia crônica. Em uma outra configuração preferencial a molécula interferente interfere na função e/ou na presença da proteína MEKK, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por uma expressão indesejável de MEKK, por exemplo, carcinoma celular escamoso, melanoma ou leucemia. Em uma outra configuração preferencial, a molécula interferente interfere na função e/ou na presença da proteína JNK, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por uma expressão indesejável de JNK, por exemplo cânceres do pâncreas ou da mama. Em uma outra configuração preferencial, a molécula interferente interfere na função e/ou na presença da proteína RAF e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por expressão indesejável de RAF, por exemplo, câncer dos pulmões ou leucemia. Em uma outra configuração preferencial, a molécula interferente interfere na função e/ou na presença da proteína Erkl/2, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por expressão indesejável de Erkl/2, por exemplo, câncer dos pulmões. Em

uma outra configuração preferencial a molécula interferente interfere com a função e/ou presença da proteína PCNA (p21), e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de

5 um distúrbio caracterizado por expressão indesejável de PCNA, por exemplo, câncer dos pulmões. Em uma outra configuração preferencial, a molécula interferente interfere com a função e/ou presença da proteína MYB, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um

10 paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por expressão indesejável de MYB, por exemplo, câncer do cólon ou leucemia mielogênica crônica. Em uma configuração preferencial a molécula interferente interfere com a função e/ou com a presença da

15 proteína c-MYC, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por uma expressão indesejável de c-MYC, por exemplo, linfoma de Burkitt ou neuroblastoma. Em uma outra configuração preferencial, a

20 molécula interferente interfere com a função e/ou presença da proteína JUN, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por expressão indesejável de JUN, por exemplo, câncer do ovário, próstata

25 ou mama. Em uma outra configuração preferencial a molécula

interferente interfere com a função e/ou com a presença da proteína FOS, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por uma expressão
5 indesejável de FOS, por exemplo, cânceres da pele ou da próstata. Em uma outra configuração preferencial, a molécula interferente interfere com a função e/ou presença da proteína BCL-2, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar
10 portador de um distúrbio caracterizado por expressão indesejável de BCL-2, por exemplo, câncer dos pulmões ou da próstata, ou linfoma não-Hodgkin. Em uma outra configuração preferencial, a molécula interferente interfere com a função e/ou presença da proteína Ciclina D, e dessa forma
15 pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por expressão indesejável de Ciclina D, por exemplo, cânceres do esôfago e do cólon. Em uma configuração preferencial a molécula interferente interfere
20 com a função e/ou com a presença da proteína VEGF, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por uma expressão indesejável de VEGF, por exemplo, câncer do esôfago, do cólon, ou angiogênese
25 patológica. Em uma configuração preferencial, a molécula

interferente interfere com a função e/ou presença da proteína EGFR, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por expressão indesejável de EGFR, por exemplo, câncer da mama.. Em uma outra configuração preferencial, a molécula interferente interfere com a função e/ou presença da proteína Ciclina A, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por expressão indesejável de Ciclina A, por exemplo, cânceres dos pulmões e cervicais. Em uma outra configuração preferencial, a molécula interferente interfere com a função e/ou presença da proteína Ciclina E, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por expressão indesejável de Ciclina E, por exemplo, câncer dos pulmões e da mama. Em uma outra configuração preferencial, a molécula interferente interfere com a função e/ou presença da proteína MYB, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por expressão indesejável de MYB, por exemplo, câncer do cólon ou leucemia mielogênica crônica. Em uma outra configuração preferencial a molécula interferente interfere com a função

e/ou com a presença da proteína WNT-1, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por uma expressão indesejável de WNT-1, por exemplo, carcinoma celular basal. Em uma outra configuração preferencial, a molécula interferente interfere com a função e/ou presença da proteína beta-catenina, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por expressão indesejável de beta-catenina, por exemplo, adenocarcinoma ou carcinoma celular hepático. Em uma outra configuração preferencial, a molécula interferente interfere com a função e/ou presença da proteína c-MET, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por expressão indesejável de c-MET, por exemplo, carcinoma celular hepático. Em uma outra configuração preferencial, a molécula interferente interfere com a função e/ou presença da proteína quinase C (PKC), e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por expressão indesejável de PKC, por exemplo, câncer da mama. Em uma outra configuração preferencial, a molécula interferente interfere com a função e/ou presença da

proteína NFKappa-B, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por expressão indesejável de NFKappa-B, por exemplo, câncer da mama.

5 Em uma outra configuração preferencial, a molécula interferente interfere com a função e/ou presença da proteína STAT3, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por expressão
10 indesejável de STAT3, por exemplo, câncer da próstata. Em uma outra configuração preferencial, a molécula interferente interfere com a função e/ou presença da proteína survivina, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar
15 portador de um distúrbio caracterizado por expressão indesejável de survivina, por exemplo, câncer cervical ou do pâncreas. Em uma outra configuração preferencial, a molécula interferente interfere com a função e/ou presença da proteína Her2/Neu, e dessa forma pode ser utilizada para
20 tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por expressão indesejável de Her2/Neu, por exemplo, câncer da mama. Em uma outra configuração preferencial, a molécula interferente interfere com a função e/ou presença da
25 proteína topoisomerase I, e dessa forma pode ser utilizada

para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por expressão indesejável de topoisomerase I, por exemplo, cânceres do ovário e do cólon. Em uma outra configuração preferencial, a molécula interferente interfere com a função e/ou presença da proteína topoisomerase II alfa, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por expressão indesejável de topoisomerase II, por exemplo, câncer da mama e do cólon.

Em um outro aspecto, a invenção proporciona um método de tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de uma doença ou distúrbio que poderá ser beneficiado por inibição de angiogênese, por exemplo, câncer. O método inclui: provisão de uma molécula interferente, por exemplo uma molécula interferente possuindo uma estrutura conforme aqui descrita, em que a referida molécula interferente pode inibir (ou interferir na função de) uma proteína mediadora de angiogênese e administração da molécula interferente a um paciente, dessa forma tratando o paciente. Em uma configuração preferencial, a molécula interferente interfere com a função e/ou presença da proteína alfa v-integrina, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio

caracterizado por presença indesejável de alfa v-integrina, por exemplo, tumores cerebrais ou tumores de origem epitelial. Em uma outra configuração preferencial, a molécula interferente interfere com a função e/ou presença da proteína do receptor Flt-1, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por presença indesejável de receptores de Flt-1, por exemplo, câncer e artrite reumatóide. Em uma outra configuração preferencial, a molécula interferente interfere com a função e/ou presença da proteína tubulina, e dessa forma pode ser utilizada para tratamento de um paciente portador ou em risco de se tornar portador de um distúrbio caracterizado por presença indesejável de tubulina, por exemplo, câncer e neovascularização retinal.

Em um outro aspecto, a invenção proporciona um método de tratamento de um paciente infectado ou correndo risco de contrair um distúrbio ou doença associada a uma infecção viral. O método inclui: provisão de uma molécula interferente, por exemplo uma molécula interferente possuindo uma estrutura conforme aqui descrita, em que a referida molécula interferente é homóloga para e pode silenciar uma proteína viral ou uma proteína celular cuja proteína celular é mediadora de uma função viral, por exemplo, ingresso ou cultura; e administração da referida

molécula interferente a um paciente, preferencialmente um paciente humano, dessa forma tratando o paciente. Como tal, a invenção proporciona métodos de utilização de interferentes para fabricação de um medicamento para

5 tratamento de pacientes infectados com vírus incluindo o Vírus de Papiloma Humano, o Vírus de Imunodeficiência Humana (HIV) o Vírus da Hepatite B (HBV), o Vírus da Hepatite A (HAV), o Vírus da Hepatite C (HCV), o Vírus Sincicial Respiratório (RSV), o Vírus de Herpes Simplex

10 (HSV), o Citomegalovírus (CMV), o Vírus de Epstein Barr (EBV), um rinovírus, o Vírus do Oeste do Nilo, o vírus de encefalite portada por piolhos, o vírus do sarampo (MV) ou o póliovírus.

Em outro aspecto, a invenção apresenta métodos de

15 tratamento de um paciente infectado com um patógeno, por exemplo, um patógeno bacteriano, amébio, parasítico ou fúngico. O método inclui: a provisão de uma molécula interferente, por exemplo, uma molécula interferente possuindo uma estrutura conforme aqui descrita, em que a

20 referida molécula interferente é capaz de interferir na função de uma proteína patogênica derivada do referido patógeno e administração da referida molécula interferente a um paciente, preferencialmente um paciente humano, dessa forma tratando o paciente. A proteína alvo do patógeno pode

25 ser uma proteína envolvida na cultura, síntese de parede

celular, síntese de proteína, transcrição, metabolismo de energia (por exemplo, o ciclo de Krebs) ou a produção de toxinas. Dessa forma, a presente invenção proporciona um método de tratamento para pacientes infectados, por exemplo

5 pelos organismos *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Chlamydia pneumoniae*, or *Mycoplasma pneumoniae*.

10 Em um outro aspecto, a invenção proporciona um método de tratamento de um paciente, por exemplo, um ser humano, afetado ou em risco de se tornar portador de uma doença caracterizada por uma resposta imune indesejável, por exemplo um distúrbio ou doença de caráter inflamatório,

15 ou um distúrbio ou doença auto-imune. O método inclui: provisão de uma molécula interferente, por exemplo, uma molécula interferente possuindo uma estrutura conforme aqui descrita, em que a referida molécula interferente é capaz de inibir (realizar regulação de redução) a função e/ou

20 presença de uma proteína mediadora de uma resposta imune indesejável, e administração da referida molécula interferente a um paciente, dessa forma tratando o paciente. Em uma configuração preferencial, a doença ou distúrbio é uma isquemia ou lesão de reperfusão, por

25 exemplo uma reperfusão de isquemia ou lesão associada com

infarto agudo do miocárdio, angina instável, derivação ("bypass") cárdio-pulmonar, intervenção cirúrgica (por exemplo, angioplastia, tal como angioplastia coronária transluminal percutânea), uma resposta a um transplante de um órgão ou tecido (por exemplo, transplante de tecido cardíaco ou vascular) ou trombólise. Em uma outra configuração preferencial, a doença ou distúrbio consiste em restenose, por exemplo restenose associada a uma intervenção cirúrgica (por exemplo, angioplastia, tal como angioplastia coronária transluminal percutânea. Em uma outra configuração preferencial, a doença ou distúrbio é uma Doença Intestinal Inflamatória, por exemplo, Doença de Crohn ou Colite Ulcerativa. Em uma outra configuração preferencial, a doença ou distúrbio consiste em uma inflação associada a uma infecção ou lesão. Em uma outra configuração preferencial, a doença ou distúrbio consiste em asma, lupus, esclerose múltipla, diabetes, por exemplo diabetes do tipo II, artrite, por exemplo reumatóide ou psoriática. Em uma outra configuração preferencial, a molécula interferente interfere na função de uma integrina ou co-ligante da mesma, por exemplo, VLA4, VCAM, ICAM. Em uma outra configuração preferencial, a molécula interferente interfere na função de uma selectina ou co-ligante da mesma, por exemplo, P-selectina, E-selectina (ELAM), L-selectina, ou P-selectina glicoproteína-(PSGL1).

Em uma outra configuração preferencial a molécula interferente interfere na função de um componente do sistema complementar, por exemplo, C3, C5, C3aR, C5aR, C3 convertase, C5 convertase. Em uma outra configuração preferencial, a molécula interferente interfere na função de uma quimioquina ou receptor da mesma, por exemplo, TNF- α , IL-1 α , IL-1, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-6, IL-8, TNFRI, TNFRII, IgE, SCYA11 ou CCR3.

Em um outro aspecto, a invenção proporciona um método de tratamento de um paciente, por exemplo, um ser humano, afetado ou em risco de ser afetado por dor aguda ou dor crônica. O método inclui a provisão de uma molécula interferente, por exemplo, uma molécula interferente possuindo uma estrutura conforme aqui descrita, em que essa molécula interferente é capaz de interferir com uma proteína que media o processamento da dor e administração da referida molécula interferente a um paciente, dessa forma tratando o paciente. Em uma outra configuração preferencial a molécula interferente interfere com a função de um componente de um canal iônico. Em uma outra configuração particularmente preferencial, a molécula interferente interfere com a função de um ligante ou receptor de neurotransmissor.

Em um outro aspecto, a invenção apresenta um método de tratamento de um paciente, por exemplo, um ser humano,

portador ou correndo o risco de se tornar portador de um distúrbio ou doença neurológica. O método inclui a provisão de uma molécula interferente, por exemplo, uma molécula interferente possuindo uma estrutura conforme aqui

5 descrita, em que a referida molécula interferente é capaz de interferir com uma proteína mediadora de um distúrbio ou doença neurológica e administração da referida molécula interferente a um paciente, dessa forma tratando o paciente. Em configurações particulares as referidas

10 doenças (ou distúrbios) passíveis de tratamento incluem a Doença de Alzheimer (neste caso a molécula interferente interfere com a função de uma secretase que causa o processamento de APP, por exemplo, uma proteína envolvida no complexo gama-secretase (por exemplo, presenilina

15 proteína 1 ou 2, uma proteína Aph1, nicastrina, BACE1 ou BACE2). O interferente inibe o processamento de APP e impede a formação de amilóide beta insolúvel. A mesma estratégia pode ser utilizada para prevenção e/ou tratamento de outras doenças neuro-degenerativas tais como

20 a doença de Huntington, uma ataxia espinocerebelar (por exemplo, SCA1, SCA2, SCA3 (doença de Machado-Joseph), SCA7 ou SCA8).

Desta forma, em um aspecto a invenção proporciona um método para produção ou fabricação de um medicamento ou

25 composição farmacêutica compreendendo pelo menos uma

molécula interferente a e adicionalmente misturando a referida molécula interferente com um veículo farmacêuticamente aceitável. Em uma configuração preferencial a molécula interferente é um polipeptídeo e
5 pode ser fabricada sinteticamente ou como uma proteína recombinante. A proteína recombinante pode ser fabricada mediante utilização de sistemas de expressão recombinante compreendendo células bacterianas, células de fermentos, células animais, células de insetos, células de plantas ou
10 animais ou plantas transgênicos. A proteína recombinante pode ser purificada mediante utilização de qualquer procedimento de purificação de proteína convencional próximo da homogeneidade e/ou pode ser misturada com aditivos.

15 A administração de uma composição farmacêutica compreendendo uma molécula interferente pode ser realizada por via oral, pode ser inalada, ou pode ser administrada por via transdérmica ou parenteral (incluindo intravenosa, intratumoral, intraperitoneal, intramuscular, intracavidade
20 e subcutânea). O composto ativo pode ser administrado individualmente ou preferencialmente formulado como uma composição farmacêutica. Uma dose unitária irá normalmente conter 0,01 até 500 mg, por exemplo 0,01 até 50 mg, ou 0,01 até 10 mg, ou 0,05 até 2 mg de composto ou de um sal
25 farmacêuticamente aceitável do mesmo. As doses unitárias

serão normalmente administradas uma vez ao dia ou mais de uma vez ao dia, por exemplo, 2, 3, ou 4 vezes por dia, mais habitualmente 1 a 3 vezes ao dia, de tal forma que a dose diária total fique normalmente situada na faixa de 0,0001 até 10 mg/kg; desta forma uma dose diária total adequada para um adulto de 70 kg será de 0,01 até 700 mg, por exemplo 0,01 até 100 mg, ou 0,01 até 10 mg, ou mais habitualmente 0,05 até 10 mg.

É preferencial que o composto ou sal farmacêuticamente aceitável do mesmo seja administrado na forma de uma composição de dose unitária, tal como uma composição de dose unitária para administração oral, parenteral, transdérmica ou por inalação. Essas composições são preparadas por mistura de adição e são adequadamente adaptadas para administração oral, inalada, transdérmica ou parenteral, e como tal podem ter a forma de comprimidos, cápsulas, preparações líquidas orais, pós, grânulos, losangos, pós reconstituíveis, soluções ou suspensões para injeção ou infusão ou supositórios ou aerossóis.

Os comprimidos e cápsulas para administração oral são normalmente apresentados em uma dosagem unitária, e contêm excipientes convencionais tais como agentes aglutinantes, agentes de preenchimento, diluentes, agentes de formação de comprimidos, lubrificantes, desintegrantes, corantes, aromas, e agentes de umedecimento. Os comprimidos

podem ser revestidos de acordo com métodos bem conhecidos na técnica. Os agentes de preenchimento adequados para utilização incluem celulose, manitol, lactose e outros agentes similares. Os desintegrantes adequados incluem amido, polivinilpirrolidona e derivados de amido tal como sódio amido glicolato. Os lubrificantes adequados incluem, por exemplo, estearato de magnésio. Os agentes de umedecimento farmacêuticamente aceitáveis adequados incluem lauril sulfato de sódio. Estas composições orais sólidas podem ser preparadas por métodos convencionais de mistura, preenchimento, formação de comprimidos ou similares. Podem ser utilizadas operações de mistura repetitivas para distribuição do agente ativo através das composições empregando grandes quantidades de agentes de preenchimento. Essas operações são evidentemente convencionais na técnica.

As preparação líquidas orais podem ter a forma de, por exemplo, suspensões aquosas ou oleosas, soluções, emulsões, xaropes, ou elixires, ou podem ser apresentadas na forma de um produto seco para reconstituição com água ou outro veículo adequado anteriormente ao uso. Essas preparações líquidas podem conter aditivos convencionais tais como agentes de suspensão, por exemplo, sorbitol, xarope, metil celulose, gelatina, hidróxiethylcelulose, carbóximetil celulose, gel de estearato de alumínio ou gorduras comestíveis hidrogenadas, agentes emulsionantes,

por exemplo lecitina, monooleato de sorbitan, ou acácia; veículos não-aquosos (que podem incluir óleos comestíveis), por exemplo, óleo de amêndoa, óleo de coco fracionado, ésteres oleosos tais como ésteres de glicerina, propileno glicol, ou álcool etílico; conservantes, por exemplo metil ou propil p-hidróxibenzoato ou ácido sórbico, e caso desejado, agentes convencionais de aromatização e corantes. As formulações orais podem igualmente incluir formulações convencionais de liberação prolongada, tais como comprimidos ou grânulos providos com um revestimento entérico.

Preferencialmente, as composições para inalação são apresentadas para administração ao trato respiratório na forma de um pó para aspiração ou um aerossol ou solução para um nebulizador, tal como um pó microfino para insuflação, isoladamente ou em combinação com um veículo inerte tal como lactose. Em um tal caso as partículas de composto ativo possuem adequadamente diâmetros inferiores a 50 microns, preferencialmente inferiores a 10 microns, por exemplo entre 1 e 5 microns, tal como entre 2 e 5 microns. Alternativamente podem ser utilizadas nanopartículas revestidas, com um tamanho de partícula de entre 30 e 500 nm. Uma dose inalável favorável irá situar-se na faixa de 0,05 até 2 mg, por exemplo 0,05 até 0,5 mg, 0,1 até 1 mg ou 0,5 até 2 mg.

Para administração parentérica são preparadas formas de dosagem unitária fluidas contendo um composto de acordo com a presente invenção e um veículo estéril. O composto ativo, dependendo do veículo e da concentração pode ser alternativamente suspenso ou dissolvido. As soluções parentéricas são normalmente preparadas mediante dissolução do composto em um veículo e esterilização por filtração anteriormente do preenchimento das mesmas em um frasco ou ampola adequado e vedação do mesmo.

Vantajosamente, adjuvantes tais como um anestésico local, conservantes e agentes tampão são igualmente dissolvidos no veículo. Para aumentar a estabilidade, a composição pode ser congelada após preenchimento no frasco e a água pode ser removida sob vácuo. As suspensões parentéricas são preparadas de uma forma substancialmente idêntica com exceção do fato de o composto ser suspenso no veículo ao invés de ser dissolvido e ser esterilizado por exposição a óxido de etileno anteriormente à suspensão no veículo estéril. Vantajosamente, é incluído um agente tensoativo ou agente de umedecimento na composição para facilitar uma distribuição uniforme do composto ativo. Nos casos apropriados, pequenas quantidades de bronco-dilatadores, por exemplo aminas simpatomiméticas tais como isoprenalina, isoetarina, salbutamol, fenilefrina e efedrina; derivados de xantina tais como teofilina e aminofilina e

corticosteróides tais como prednisolona e estimulantes adrenais tais como ACTH podem ser incluídos.

Conforme é prática comum, as composições serão normalmente acompanhadas por instruções escritas ou impressas para utilização no tratamento médico respectivo.

Em uma configuração preferencial a molécula interferente compreende adicionalmente um domínio de transdução de proteína. Foi demonstrado que uma série de pequenos domínios de proteína, designados como domínios de transdução de proteína ("Protein Transduction Domains" - PTD's), atravessam membranas biológicas com eficiência e independentemente de transportadores ou receptores específicos, e promovem o fornecimento de peptídeos e proteínas para as células. Por exemplo, a proteína TAT do vírus de imunodeficiência humana (HIV-1) é capaz de fornecer proteínas biologicamente ativas in vivo. Similarmente, a terceira hélice-alfa do homeodomínio Antennapedia, e a proteína VP22 do vírus de Herpes Simplex promovem o fornecimento de proteínas ou peptídeos ligados de forma covalente para o interior de células (analisado em Ford KG e outros (2001) *Gene Ther.* 8, 1-4). O fornecimento de proteínas baseado em um portador de peptídeo amfifático curto, Pep-1, é eficiente para fornecimento de uma variedade de peptídeos e proteínas para diversas linhagens celulares em uma forma plenamente ativa biologicamente, sem

necessidade de acoplamento covalente químico anterior (Morris MC e outros, (2001) *Nat. Biotechnol.* 19, 1173-1176). A capacidade das proteínas quiméricas VP22 para se espalharem da célula transduzida primária para as células circundantes pode aperfeiçoar as abordagens de terapia genética (Zender L e outros (2002) *Cancer Gene Ther.* 9, 489-496). As seqüências que facilitam a transdução de proteínas são conhecidas das pessoas versadas na técnica e incluem, sem limitações, os Domínios de Transdução de Proteínas. Preferencialmente, a referida seqüência é selecionada do grupo que compreende a proteína TAT do vírus HIV, uma seqüência de poliarginina, penetratina e pep-1. Ainda outros peptídeos permeáveis para células vulgarmente utilizados (tanto peptídeos naturais quanto artificiais) são divulgados em Joliot A. e Prochiantz A. (2004) *Nature Cell Biol.* 6 (3) 189-193.

Um segundo aspecto de uma composição farmacêutica consiste na utilização de uma seqüência de nucleotídeo que codifica as moléculas interferentes. Caso uma seqüência de ácido nucléico codificando a molécula interferente seja utilizada, o referido medicamento é preferencialmente destinado a fornecer o referido ácido nucléico para a célula, em um tratamento de terapia genética. Um grande número de métodos de fornecimento são bem conhecidos daqueles que são versados na técnica. Preferencialmente, os

ácidos nucleicos são administrados para usos terapêuticos genéticos *in vivo* ou *ex vivo*. Sistemas de fornecimento de vetor não viral incluem plasmídeos de DNA, ácido nucleico nu, e ácido nucleico complexado com um veículo de fornecimento tal como um lipossoma. Os sistemas de fornecimento de vetores virais incluem vírus de DNA e RNA, que possuem alternativamente genomas episomais ou integrados após o fornecimento à célula. Os métodos de fornecimento não viral de ácidos nucleicos incluem lipofecção, microinjeção, biolística, virossomas, imunolipossomas, policação ou conjugados lipídeo:ácido nucleico, DNA nu, vírions artificiais, e captação de DNA intensificada por agente. A lipofecção é descrita, por exemplo, na patente norte-americana nº 5.049.386, na patente norte-americana nº 4.946.787; e na patente norte-americana nº 4.897.355 e os reagentes de lipofecção são vendidos comercialmente (por exemplo, TransfectamTM e LipofectinTM). Os lípideos catiônicos e neutros que são adequados para um processo eficiente de lipofecção de reconhecimento de receptor de nucleotídeos incluem aqueles descritos por Flegner nos documentos nº WO 91/17424, e nº WO 91/16024. O fornecimento pode ser feito para células (administração *ex vivo*) ou para tecidos alvo (administração *in vivo*). A preparação de complexos lipídeo: ácido nucleico, incluindo lipossomas determinados como alvos tais

como complexos imunolipídeos, é bem conhecida daqueles que são versados na técnica (*vide, por exemplo.*, Crystal, 1995; Blaese e outros., 1995; Behr, 1994; Remy e outros., 1994; Gao e Huang, 1995; patentes norte-americanas n° US 4.186.183, n° US 4.217.344, n° US 4.235.871, n° US 4.261.975, n° US n° US 4.485.054, n° US 4.501.728, n° US 4.774.085, n° US 4.837.028, e n° US 4.946.787).

A utilização de sistemas de base viral de RNA ou DNA para fornecimento de ácidos nucléicos tem o benefício de processos altamente evoluídos para direcionar um vírus para células específicas no corpo e traficar a carga útil viral para o núcleo. Os vetores virais podem ser administrados diretamente aos pacientes (*in vivo*) ou podem ser utilizados para tratamento de células *in vitro* com as células modificadas sendo administradas a pacientes (*ex vivo*). Os sistemas convencionais de base viral para fornecimento de ácidos nucléicos incluem entre outros, vetores de vírus retrovirais, de lentivírus, adenovirais, adeno-associados e de herpes simplex para transferência de genes. Os vetores virais constituem atualmente o método mais eficiente e versátil para transferência de genes em células e tecidos alvo. A integração no genoma hospedeiro é possível com os métodos de transferência de genes de retrovírus, lentivírus e vírus adeno-associados, resultando freqüentemente em uma expressão de longo prazo do transgene

inserido. Adicionalmente, foram observadas elevadas eficiências de transdução em muitos diferentes tipos de células e tecidos alvo. Em casos em que uma expressão transiente do ácido nucléico é preferencial, podem ser utilizados sistemas de base adenoviral, incluindo vetores adenovirais de replicação deficiente. Os vetores de base adenoviral têm capacidade para uma elevada eficiência de transdução em muitos tipos de células e não requerem divisão celular. Com esses vetores, foram obtidos elevados níveis de titers e expressão. Este vetor pode ser produzido em grandes quantidades em um sistema relativamente simples. Os vetores de vírus adeno-associado ("Adeno-Associated Virus" - "AAV"), incluindo vetores de vírus adeno-associado recombinante, são igualmente utilizados para transdução de células com ácidos nucléicos alvos, por exemplo, na produção *in vitro* de ácidos nucléicos e peptídeos, e para procedimentos de terapia genética *in vivo* e *ex vivo* (vide, por exemplo, a patente norte-americana nº US 4.797.368; o documento nº WO 93/24641; Kotin, 1994; A construção de vetores AAV recombinantes é descrita em numerosas publicações, incluindo na patente norte-americana nº US 5.173.414; Hermonat & Muzyczka, 1984; Samulski e outros., 1989).

Os vetores de terapia genética podem ser fornecidos *in vivo* mediante administração a um paciente individual,

tipicamente por administração sistêmica (por exemplo, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratraqueal, subdermal, ou intracranial em forma de infusão) ou por aplicação tópica. Em uma configuração em particular a invenção também contempla a utilização de um método de terapia genética hidrodinâmica. A terapia genética hidrodinâmica é divulgada no documento nº US 6.627.616 (Mirus Corporation, Madison) e envolve o fornecimento intravascular de ácidos nucleicos não-virais que codificam um interferente, em que dessa forma a permeabilidade dos vasos é aumentada através, por exemplo, da aplicação de uma pressão aumentada no interior do referido vaso ou mediante co-administração de compostos promotores de aumento de permeabilidade vascular, tal como por exemplo, a papaverina.

Alternativamente, podem ser fornecidos vetores para células ex vivo, tais como células explantadas de um paciente individual (por exemplo, linfócitos, aspirados de medula óssea, biópsia de tecidos) ou células-tronco de doadores universais de tipo hematopoiético, com subsequente reimplantação das células em um paciente, normalmente após seleção de células que incorporaram o vetor. A transfecção de células ex vivo para diagnóstico, pesquisa, ou para terapia genética (por exemplo, através de reinfusão das células transfectadas para o organismo hospedeiro) é bem

conhecida daqueles que são versados na técnica. Em uma configuração preferencial, as células são isoladas do organismo do paciente, são submetidas a transfecção com um ácido nucléico (gene ou cDNA) e são sujeitas a re-infusão
5 de volta para o organismo do paciente (para o paciente). Diversos tipos de células adequadas para transfecção ex vivo são bem conhecidas daqueles que são versados na técnica (vide, por exemplo, Freshney et al., 1994 e as referências ali citadas quanto a uma discussão sobre a
10 forma de isolar e cultivar células de pacientes).

Em uma outra configuração ainda o método de interferência em proteína de acordo com a presente invenção pode ser utilizado para determinar a função de uma proteína em uma célula ou um organismo capaz de realizar mediação de
15 interferência em proteína. A célula pode ser uma célula procariótica ou pode ser uma célula eucariótica e pode ser uma linhagem celular, por exemplo uma célula de planta ou uma célula de animal, tal como uma célula de um mamífero, por exemplo uma célula embrionária, uma célula
20 pluripotente, uma célula de tumor, por exemplo uma célula de teratocarcinoma, ou uma célula infectada por vírus. O organismo é preferencialmente um organismo eucariótico, por exemplo, uma planta ou um animal, tal como um mamífero, particularmente um ser humano.

25 A proteína alvo à qual é dirigida a molécula

interferente de acordo com a invenção pode encontrar-se associada a uma condição patológica. Por exemplo, a proteína pode ser uma proteína com associação patogênica, por exemplo, uma proteína viral, uma proteína associada a um tumor, ou uma proteína associada a uma doença auto-imune. A proteína alvo pode consistir igualmente em um gene heterólogo expressado em uma célula recombinante ou um organismo geneticamente alterado. Mediante inibição da função de uma tal proteína, é possível obter valiosas informações e benefícios terapêuticos no campo da agricultura ou nos campos de medicina ou medicina veterinária. Em uma configuração particularmente preferencial, o método de acordo com a invenção é utilizado com uma célula eucariótica ou um organismo eucariótico não humano apresentando um fenótipo de eliminação específico de uma proteína alvo compreendendo uma expressão pelo menos parcialmente deficiente de pelo menos uma proteína alvo endógena em que a referida célula ou organismo é contatada(o) por pelo menos uma molécula interferente capaz de inibir a função de pelo menos uma proteína alvo endógena ou com um vetor que codifica pelo menos uma molécula interferente capaz de interferir na função e/ou na presença de pelo menos uma proteína endógena. Deverá ser observado que a presente invenção também permite uma eliminação específica para alvo de várias diferentes proteínas

endógenas devido à especificidade da molécula interferente.

Os fenótipos de eliminação específicos de proteínas de células ou organismos não humanos, particularmente de células humanas ou mamíferos não humanos podem ser utilizados em procedimentos analíticos, por exemplo, na análise funcional e/ou de fenótipo de processos fisiológicos complexos tais como análise de proteomas. Por exemplo, é possível preparar os fenótipos de eliminação de proteínas humanas em células cultivadas que são supostamente mecanismos de regulação de processos de "splicing" alternativos. Entre estas proteínas encontram-se particularmente os membros da família de fatores de "splicing" SR, por exemplo, ASF/SF2, SC35, SRp20, SRp40 ou SRp55. Adicionalmente, o efeito das proteínas SR sobre os perfis de mRNA de genes previamente determinados alternativamente submetidos a "splicing" tal como CD44, pode ser analisado.

Utilizando as técnicas de eliminação baseadas em proteínas aqui descritas, é possível inibir a expressão de uma proteína alvo endógena em uma célula alvo ou em um organismo alvo. A proteína endógena pode ser complementada por um ácido nucléico alvo exógeno que codifica a proteína alvo ou uma variante ou forma mutada da proteína alvo, por exemplo, um gene ou um cDNA, que pode ser opcionalmente fundido com uma seqüência de ácido nucléico adicional que

codifica um elemento detectável de peptídeo ou polipeptídeo, por exemplo, um marcador de afinidade, particularmente um marcador de afinidade de tipo múltiplo. Formas mutadas ou variantes da proteína alvo diferem da

5 proteína alvo endógena no fato de diferirem da proteína endógena por substituições de aminoácidos, inserções e/ou eliminações de aminoácidos individuais ou múltiplos. As formas mutadas ou variantes podem ter a mesma atividade biológica da proteína alvo endógena. Por outro lado, a

10 proteína alvo mutada ou variante pode igualmente ter uma atividade biológica, que difere da atividade biológica da proteína alvo endógena, por exemplo, uma atividade parcialmente eliminada, uma atividade totalmente eliminada, uma atividade intensificada, etc. A complementação pode ser

15 realizada por co-expressão do polipeptídeo codificado pelo ácido nucléico exógeno, por exemplo, uma proteína de fusão compreendendo a proteína alvo e o marcador de afinidade e a molécula interferente para eliminação da atividade da proteína endógena na célula alvo. Esta co-expressão pode

20 ser realizada mediante utilização de um vetor de expressão adequado que expressa tanto o polipeptídeo codificado pelo ácido nucléico exógeno, por exemplo, a proteína alvo modificada por marcador e a molécula interferente ou

alternativamente mediante utilização de uma combinação de

25 vetores de expressão ou alternativamente a molécula

interferente pode contatar a célula alvo a partir do lado externo da célula. Proteínas e complexos protéicos que são sintetizados de novo na célula alvo irão conter a proteína exógena, por exemplo, a proteína de fusão modificada. Para
5 evitar supressão da função da proteína exógena com a molécula interferente, a proteína exógena deverá ter diferenças de aminoácido suficientes na região de agregação que é selecionada para a construção da molécula interferente. Alternativamente, a proteína alvo endógena
10 pode ser complementada por proteínas correspondentes de outras espécies, ou a proteína alvo endógena pode ser complementada por uma forma de "splicing" da referida proteína alvo. A combinação de eliminação de função de uma proteína endógena e resgate mediante utilização de um alvo
15 exógeno mutado, por exemplo, parcialmente eliminado, é vantajosa em comparação com a utilização de uma célula de eliminação de função. Adicionalmente, este método é particularmente adequado para identificação de domínios funcionais da proteína alvo.

20 Em uma configuração preferencial adicional, é realizada uma comparação, por exemplo de perfis de expressão de genes e/ou proteomas e/ou características fenotípicas de pelo menos duas células ou organismos. Estes organismos são selecionados de: (i) uma célula de controle
25 ou organismo de controle com inibição de proteína alvo,

(ii) uma célula ou organismo com inibição de proteína alvo e (iii) uma célula ou organismo com inibição de proteína alvo além de complementação de proteína alvo por um ácido nucléico alvo exógeno que codifica a referida proteína alvo.

Os métodos de acordo com a invenção são igualmente adequados em um procedimento para identificação e/ou caracterização de agentes farmacológicos, por exemplo, para identificação de novos agentes farmacológicos a partir de uma coleção de substâncias de teste e/ou de efeitos colaterais de agentes farmacológicos conhecidos. Desta forma, a presente invenção também se refere a um sistema para caracterização e/ou identificação de agentes farmacológicos que atuam em pelo menos uma proteína alvo compreendendo: (a) uma célula eucariótica ou um organismo eucariótico não humano capaz de expressar pelo menos um gene alvo endógeno que codifica a referida proteína alvo, (b) pelo menos uma molécula interferente capaz de inibir a expressão do referido pelo menos um gene alvo endógeno e (c) uma substância de teste ou uma coleção de substâncias de teste em que devam ser identificadas e/ou caracterizadas propriedades farmacológicas da referida substância de teste ou da referida coleção. Adicionalmente o sistema conforme descrito acima compreende preferencialmente: (d) pelo menos

um ácido nucléico alvo exógeno que codifica a proteína alvo ou uma forma mutada ou variante ou forma de "splice" da proteína alvo em que a referida proteína alvo exógena difere da proteína alvo endógena no nível de aminoácido das
5 regiões de agregação de tal forma que a função da proteína alvo exógena é substancialmente menos inibida pela molécula interferente que a expressão da proteína endógena.

Adicionalmente, a invenção compreende igualmente células e organismos que compreendem uma molécula
10 interferente. Um organismo pode consistir, por exemplo, em uma planta transgênica que porta a informação genética que codifica um interferente. Uma tal planta transgênica é, em uma configuração preferencial, uma planta silenciada (isto é, na qual a proteína alvo específica é submetida a
15 regulação de redução devido à presença de um interferente específico em um subconjunto de células ou órgãos ou que se encontra presente em todas as células e órgãos da referida planta). As células que compreendem um interferente podem ser produzidas mediante contato das referidas células ou
20 mediante eletroporação das referidas células com uma molécula interferente específica. Em uma configuração particular as células que compreendem um interferente são geradas mediante transfecção (ou transformação), em que o interferente é codificado por um vetor de expressão

recombinante tal como um plasmídeo ou um vetor viral.

ISOLAÇÃO: SEPARAÇÃO e DETECÇÃO

Em uma outra configuração a invenção proporciona um método para isolar uma proteína de uma amostra, compreendendo o contato da referida amostra com uma molécula de ocorrência não natural compreendendo pelo menos uma região de auto-associação presente na referida proteína e isolação do complexo resultante de proteína-molécula em co-agregação, da referida amostra.

Em uma outra configuração ainda, a invenção proporciona um método para isolar uma proteína de uma amostra compreendendo o contato da referida amostra com uma molécula de ocorrência não natural compreendendo pelo menos uma região de auto-associação isolada da referida proteína, em que a referida região de auto-associação é fundida com uma fração que impede a agregação da referida região de auto-associação, e isolação do resultante complexo de co-agregação de molécula-proteína da referida amostra.

Em uma outra configuração ainda, a invenção proporciona um método para isolação de uma proteína de uma amostra, compreendendo o contato da referida amostra com uma molécula de ocorrência não natural compreendendo pelo menos uma região de auto-associação isolada da referida proteína, em que a referida região de auto-associação é fundida com uma fração que impede a agregação da referida

região de auto-associação de tal forma que a referida região de auto-associação se encontra em contato direto com o solvente em que a referida região de auto-associação fundida com a referida fração e a referida proteína se encontram presentes, e isolamento do resultante complexo de co-agregação de molécula-proteína relativamente à referida amostra.

Em outras palavras, a invenção proporciona um método para isolamento de uma proteína de uma amostra compreendendo:

- contato da referida proteína com uma molécula de ocorrência não natural que compreende uma parte A e uma parte B em que i) a parte A compreende um peptídeo, um domínio de proteína ou uma gota de agarose, que impede a agregação da parte B, e ii) a parte B compreende pelo menos 1 região de auto-associação em que a referida região consiste em pelo menos 3 aminoácidos contíguos e em que a referida região é isolada da referida proteína e em que um componente de ligação se encontra opcionalmente presente entre as partes A e B e
- isolamento do resultante complexo de co-agregação de molécula-proteína relativamente à referida amostra.

Ainda em outras palavras, a invenção proporciona um método para isolamento de uma proteína relativamente a uma amostra compreendendo:

- 5 - contato da referida proteína com uma molécula
de ocorrência não natural que compreende uma
parte A e uma parte B em que i) a parte A
compreende um peptídeo, um domínio de proteína
ou uma gota de agarose, impedindo a agregação
da parte B, e ii) a parte B que compreende
10 pelo menos 1 região de auto-associação em que
a referida região consiste em pelo menos 3
aminoácidos contíguos e em que a referida
região é isolada da referida proteína e em que
um componente de ligação se encontra
15 opcionalmente presente entre as partes A e B,
e em que a parte B se encontra em contato
direto com o ambiente no qual se encontram
presentes a referida molécula e a proteína e
- isolamento do resultante complexo de co-
20 agregação de molécula-proteína relativamente à
referida amostra.

Ainda em outras palavras, a invenção proporciona um método para isolamento de uma proteína relativamente a uma amostra compreendendo:

- 25 - contato da referida proteína com uma molécula

- de ocorrência não natural que compreende uma parte A e uma parte B em que i) a parte A compreende um peptídeo, um domínio de proteína ou uma gota de agarose, impedindo a agregação da parte B, e ii) a parte B que compreende pelo menos 1 região de auto-associação em que a referida região consiste em pelo menos 3 aminoácidos contíguos e em que a referida região é isolada da referida proteína e em que um componente de ligação se encontra opcionalmente presente entre as partes A e B, e em que a parte B se encontra em contato direto com o ambiente no qual se encontram presentes a referida molécula e a proteína e
- isolamento do resultante complexo de co-agregação de molécula-proteína relativamente à referida amostra.

Ainda em outras palavras, a invenção proporciona um método para isolamento de uma proteína relativamente a uma amostra compreendendo:

- contato da referida proteína com uma molécula de ocorrência não natural que compreende uma parte A e uma parte B em que i) a parte A compreende um peptídeo, um domínio de proteína ou uma gota de agarose, impedindo a agregação

da parte B, e ii) a parte B consiste em pelo menos 1 região de auto-associação em que a referida região consiste em pelo menos 3 aminoácidos contíguos e em que a referida região é isolada relativamente à referida proteína e em que um componente de ligação se encontra opcionalmente presente entre as partes A e B e

- isolamento do resultante complexo de co-agregação de molécula-proteína relativamente à referida amostra.

SEPARAÇÃO

Em uma configuração adicional o método para isolamento de pelo menos uma proteína compreende adicionalmente a separação de pelo menos uma proteína relativamente a uma amostra.

Uma aplicação da separação de pelo menos uma proteína relativamente a uma amostra consiste na remoção (ou esvaziamento) de uma elevada abundância de proteínas de uma amostra. De fato, um desafio significativo na descoberta e validação de proteínas alvos consiste na forma de dissecar especificamente amostras de proteínas complexas (por exemplo, plasma, urina, fluido cérebroespinal) e medição de resíduos alvos. As proteínas abundantes apresentam freqüentemente uma concentração de 6 até 10

ordens de magnitude maior que as proteínas pouco abundantes. Desta forma, as proteínas de grande abundância precisam ser removidas para detecção e medição de resíduos de proteínas com importância em aplicação medicinal. Na medida em que a albumina, IgG, antitripsina, IgA, transferina e haptoglobina formam aproximadamente 90% do teor total de proteínas no soro humano, existe uma necessidade crítica de ferramentas de diagnóstico para esgotamento rápido destas proteínas abundantes indesejáveis e para desmascarar os biomarcadores das proteínas menos abundantes, de menor peso molecular. Vários métodos são já utilizados na técnica: 1) imunoglobulina G (IgG) como reagentes de afinidade para capturar e separar alvos de proteínas abundantes, 2) gema de imunoglobulina (IgY) são anticorpos semelhantes à IgG isolados de gemas de ovo de aves imunizadas, 3) o pré-fracionamento é utilizado para separar uma mistura de proteínas em diferentes frações para remoção de determinadas proteínas na mistura original, e 4) a proteína A e a proteína G são proteínas de parede de célula bacteriana com uma especificidade para anticorpos IgG, e desta forma as resinas com afinidade com proteínas A e G proporcionam uma remoção de IgG e 5) as micro-gotas de IgG e IgY são utilizadas para detecção de proteínas.

DETECÇÃO

Em uma outra configuração específica, o método para

isolar pelo menos uma proteína compreende adicionalmente a detecção de pelo menos uma proteína no referido complexo-proteína.

A detecção pode ser realizada mediante separação do
5 complexo molécula interferente-proteína alvo utilizando por exemplo eletroforese, cromatografia de coluna, filtração, atração eletrostática, atração magnética ou paramagnética, espectrometria de massa e similares.

As tecnologias de biodetecção mais amplamente
10 utilizadas são baseadas no uso de anticorpos. Os anticorpos reconhecem e ligam-se a outras moléculas com base em seu formato e propriedades físico-químicas. Os anticorpos são altamente adequados para detecção de pequenas quantidades de proteínas alvo na presença de misturas complexas de
15 proteínas. A presente invenção demonstra que o uso de moléculas interferentes (a parte B tem a especificidade e reconhecimento para pelo menos uma proteína específica) constitui uma alternativa para a utilização de anticorpos (como elemento de reconhecimento) para a captura específica
20 de proteínas alvo. De fato, as moléculas interferentes podem ser utilizadas em numerosas aplicações em que são tipicamente utilizados anticorpos. Para nomear somente algumas, são previstas aplicações em diagnóstico, micro-análise, medicina forense e na detecção específica de
25 patógenos.

Para as aplicações de detecção e separação de acordo com a invenção, é preferencial que a parte B da molécula interferente seja ligada a um veículo que será aqui designado como parte A. Um veículo pode ser uma
5 superfície plana tal como plástico ou nitrocelulose ou uma coluna de cromatografia mas é preferencialmente uma gota tal como gotas do tipo de microesfera. Uma discussão genérica sobre diversos tipos de gotas e microesferas, que atendem o propósito de constituição da parte A das
10 moléculas interferentes, é descrita nas páginas 9 e 10 do documento norte americano n° US 6.682.940 e é aqui especificamente incorporada a título de referência.

Em uma configuração em particular a parte A da molécula interferente é um tipo de veículo de carboidrato,
15 por exemplo, celulose ou agarose. A parte B pode ser ligada de forma covalente ao referido veículo de carboidrato com um agente de reticulação tal como glutaraldeído.

Em uma outra configuração em particular, a parte A é um suporte tal como celulose, vidro ou um polímero
20 sintético. O acoplamento covalente entre a parte A e a parte B pode ser realizado através de resíduos de aminoácidos da parte B e uma azida, carbodiimida, isocianato ou outros derivados químicos presentes na parte A.

25 Em uma outra configuração específica adicional a

parte A é uma micro-conta de vidro silanizada porosa. A parte B pode ser ligada de forma covalente à parte A através de seus grupos amina de peptídeo (por reação de Schiff seguida por redução com borohidreto de sódio) a grupos aldeído formados por oxidação de periodato de grupos glicidóxi-propilsilano quimicamente ligados aos átomos de sílica (este acoplamento é descrito no trabalho de Sportsman e Wilson (1980) Anal. Chem. 52, 2013-2018).

Em uma configuração específica a parte A portadora é envelopada por um filme proteináceo com o qual a parte A é reticulada (vide as reivindicações 1-50 e exemplos referentes ao veículo no documento norte americano nº US 4.478.946).

Em uma outra configuração específica a parte A é uma gota fluorescente tal como uma partícula de látex fluorescente. A patente norte americana nº US 4.550.017, e particularmente a página 4 da mesma, descrevem compostos fluorescentes que podem ser utilizados para produção de contas fluorescentes.

Em uma outra configuração específica as gotas, parte A, possuem dimensões variáveis e podem igualmente conter ou ser impregnadas com corantes fluorescentes. Devido à variação de dimensões e corantes das gotas é possível detectar e quantificar uma multiplicidade de proteínas em uma única reação. Os procedimentos para o

desenvolvimento dessas gotas são descritos no documento norte americano nº US 6.159.748.

Em uma outra configuração específica adicional o acoplamento entre a parte A (a gota) e a parte B ocorre
5 através de uma poli(treonina), uma poli(serina), dextran ou poli(etileno glicol). Os Exemplos 6, 7, 8 e 9 do documento norte americano nº US 6.399.317 ilustram como este acoplamento pode ser realizado.

Em uma outra configuração específica a parte A é
10 uma gota magnética. As gotas magnéticas, o acoplamento entre as gotas magnéticas e um agente de proteína e suas utilizações são descritas na página 8 do pedido de patente norte americana nº US 6.489.092.

Definições

15 Salvo definição em contrário, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados possuem o mesmo significado conforme normalmente entendido por aqueles que são normalmente versados na técnica pertinente à invenção. Muito embora quaisquer métodos e materiais similares ou
20 equivalentes àqueles aqui descritos possam ser utilizados na prática ou teste da presente invenção, são aqui descritos métodos e materiais preferenciais. Para os propósitos da presente invenção, são definidos abaixo os termos referidos a seguir.

25 Os artigos "um", "uma", são aqui utilizados para

referência a uma quantidade de um ou mais de um (isto é, a pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. A título de exemplo, "uma proteína alvo" significa uma proteína alvo ou mais de uma proteína alvo.

5 Conforme é aqui utilizada, a expressão "cerca de" refere-se a uma quantidade, nível, valor, dimensão, tamanho, ou magnitude que varia em até 30%, preferencialmente em até 20%, e mais preferencialmente em até 10% relativamente a uma quantidade, nível, valor,
10 dimensão, tamanho ou magnitude de referência.

"Reagente de reticulação bifuncional" significa um reagente contendo dois grupos reativos, em que dessa forma o reagente é capaz de ligar de forma covalente dois elementos tais como a parte A e a parte B da molécula
15 interferente. Os grupos reativos em um reagente de reticulação pertencem tipicamente às classes de grupos funcionais incluindo ésteres de succinimidila, maleimidas e haloacetamidas tais como iodoacetamidas. De princípio a fim do presente relatório descritivo, salvo quando o contexto
20 tiver um requisito diferente, as palavras "compreendem", "compreende" e "compreendendo" deverão ser entendidas como implicando a inclusão de uma etapa mencionada ou elemento ou grupo de etapas ou elementos porém não significará a exclusão de qualquer outra etapa ou elemento ou grupo de
25 etapas ou elementos.

"Vetor de expressão" ou "vetor recombinante" significa qualquer elemento genético autônomo capaz de direcionar a síntese de uma molécula interferente codificada pelo vetor. Esses vetores de expressão são conhecidos das pessoas com prática na técnica.

O termo "derivado" significa uma molécula interferente que foi derivada da sequência básica por modificação, por exemplo por conjugação ou formação de complexo com outras frações químicas (por exemplo, pegilação) ou por técnicas de modificação pós-translacional conforme seriam entendidas na técnica. O termo "derivado" inclui igualmente em seu escopo alterações que foram feitas em uma sequência mãe incluindo adições ou eliminações que proporcionam moléculas funcionalmente equivalentes.

A expressão "quantidade eficaz", no contexto de modulação de uma atividade ou de tratamento ou prevenção de um distúrbio significa a administração dessa quantidade de uma molécula interferente a um indivíduo necessitado de tal modulação, tratamento ou profilaxia, seja em dose única ou como parte de uma série, que é eficaz para modulação desse efeito ou para tratamento ou profilaxia desse distúrbio. A quantidade eficaz irá variar dependendo do estado de saúde e condição física do indivíduo a ser tratado, do grupo taxonômico do indivíduo a ser tratado, da formulação da composição, da avaliação da situação clínica, e de outros

fatores relevantes. É previsto que a quantidade venha a situar-se em uma faixa relativamente ampla passível de ser determinada através de ensaios de rotina.

O termo "isolado" significa um material substancialmente ou essencialmente livre de componentes que normalmente acompanham o mesmo e seu estado nativo. Por exemplo, um "polipeptídeo isolado", conforme aqui utilizado, refere-se a um polipeptídeo que foi purificado das seqüências contíguas ao mesmo em um estado de ocorrência natural, por exemplo, uma seqüência de auto-
10 associação que foi removida das seqüências que se encontram normalmente adjacentes a essa seqüência. Uma seqüência de auto-
15 associação (opcionalmente acoplada a uma fração inibidora de agregação) pode ser gerada por síntese química de aminoácido ou pode ser gerada por produção recombinante.

O termo "oligonucleotídeo", conforme é aqui utilizado, refere-se a um polímero composto por uma multiplicidade de unidades de nucleotídeo (desoxiribonucleotídeos ou ribonucleotídeos, ou variantes
20 estruturais ou análogos sintéticos das mesmas) ligadas por ligações fosfodiéster (ou variantes estruturais ou análogos sintéticos das mesmas). Um oligonucleotídeo tem uma extensão tipicamente relativamente curta, geralmente de cerca de 10 até 30 nucleotídeos, porém o termo pode fazer
25 referência a moléculas de qualquer extensão, muito embora o

termo "polinucleotídeo" ou "ácido nucléico" seja tipicamente utilizado para oligonucleotídeos de grande extensão. O termo "polinucleotídeo" ou "ácido nucléico" conforme aqui utilizado designa mRNA, RNA, cNRA, cDNA ou DNA. O termo refere-se tipicamente a oligonucleotídeos com extensões superiores a 30 nucleotídeos.

O termo "polinucleotídeo recombinante" conforme é aqui utilizado refere-se a um polinucleotídeo formado *in vitro* por manipulação de ácido nucléico para uma forma que não é normalmente encontrada na natureza. Por exemplo, o polinucleotídeo recombinante pode encontrar-se na forma de um vetor de expressão. De uma forma geral, esses vetores de expressão incluem ácido nucléico regulatório transcricional e translacional operacionalmente ligado à seqüência de nucleotídeo.

A expressão "ligado operacionalmente" significa que os ácidos nucléicos regulatórios transcricionais e translacionais são posicionados relativamente a um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de tal forma que o polinucleotídeo é transcrito e o polipeptídeo é submetido a translação.

Os termos "indivíduo" ou "paciente" que são aqui utilizados de forma intercambiável, referem-se a qualquer indivíduo, particularmente um indivíduo vertebrado, e ainda mais particularmente um indivíduo mamífero, para o qual é

desejada uma terapia ou profilaxia. Os animais vertebrados adequados que se situam dentro do escopo da invenção incluem, sem restrições, primatas, aves, peixes, répteis, animais de criação (por exemplo, carneiros, vacas, cavalos, burros, porcos), animais para testes de laboratório (por exemplo, coelhos, ratos, ratazanas, porquinhos da índia, hamsters), animais de companhia (por exemplo, gatos, cães) e animais selvagens cativos, por exemplo, raposas, cervos, dingos [*cão selvagem da Austrália*]. Entretanto, deverá ser entendido que os termos anteriormente mencionados não implicam a presença de sintomas.

A expressão "veículo farmacêuticamente aceitável" significa um agente de preenchimento sólido ou líquido, um diluente ou uma substância de encapsulação que pode ser utilizada de forma segura para administração tópica ou sistêmica a um paciente.

"Polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são aqui utilizados de forma intercambiável e referem-se a um polímero de resíduos de aminoácido e a variantes e análogos sintéticos do mesmo. Desta forma, estes termos são aplicáveis a polímeros de aminoácido em que um ou mais resíduos de aminoácido é/são um aminoácido sintético de ocorrência não natural, tal como um análogo químico de um aminoácido de ocorrência natural correspondente, bem como polímeros de aminoácidos de ocorrência natural.

A expressão "polipeptídeo recombinante" significa um polipeptídeo produzido mediante utilização de técnicas recombinantes, isto é, através da expressão de um polinucleotídeo sintético ou recombinante. Quando a parte
5 biologicamente ativa ou polipeptídeo quimérico do mesmo é produzida de forma recombinante, a mesma encontra-se também preferencialmente substancialmente livre do meio de cultura (isto é, o meio de cultura representa menos de cerca de 20%, mais preferencialmente menos de cerca de 10%, e mais
10 preferencialmente menos de cerca de 5% do volume da preparação de proteína.

A expressão "identidade de seqüência" conforme é aqui utilizada refere-se à medida em que as seqüências são idênticas em uma base de nucleotídeo-por-nucleotídeo ou em
15 uma base de aminoácido-por-aminoácido através de uma janela de comparação. Desta forma, uma "porcentagem de identidade de seqüência" é calculada mediante comparação de duas seqüências alinhadas de forma otimizada através da janela de comparação, determinando-se o número de posições em que
20 a base de ácido nucléico idêntica (por exemplo, A, T, C, G, I) ou o resíduo de aminoácido idêntico (por exemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys e Met) ocorre em ambas as seqüências para obtenção do número de posições equiparadas,
25 dividindo-se o número de posições equiparadas pelo número

total de posições na janela de comparação (isto é, o tamanho de janela), e multiplicando-se o resultado por 100 para obtenção da porcentagem de identidade de sequência. Para os propósitos da presente invenção, "identidade de 5 sequência" deverá ser entendido como significando a "porcentagem de equiparação" calculada pelo programa de computador DNASIS (Versão 2.5 para Windows; disponibilizado pela empresa Hitachi Software Engineering Co., Ltd., South San Francisco, Califórnia, E.U.A.) utilizando valores 10 padrão convencionais conforme utilizados no manual de referência que acompanha o software. "Similaridade" refere-se ao número percentual de aminoácidos que são idênticos ou constituem substituições conservadoras. A similaridade pode ser determinada mediante utilização de programas de 15 comparação de seqüências tal como o programa GAP (Devereaux e outros 1984, Nucleic Acids Research 12, 387-395). Desta forma, seqüências com uma extensão similar ou substancialmente diferente daquelas aqui citadas podem ser comparadas mediante inserção de intervalos no alinhamento, 20 com esses intervalos sendo determinados, por exemplo, pelo algoritmo de comparação utilizado pelo programa GAP.

O termo "transformação" significa a alteração do genótipo de um organismo, por exemplo uma bactéria, um fermento ou uma planta, mediante introdução de um ácido 25 nucléico estranho ou endógeno. Os vetores para

transformação incluem plasmídeos, retrovírus e outros vírus animais, YACs (cromossoma artificial de fermento), BACs (cromossoma artificial bacteriano) e similares. O termo "vetor" significa uma molécula de polinucleotídeo, preferencialmente uma molécula de DNA derivada, por exemplo, de um plasmídeo, bacteriófago, fermento ou vírus, na qual um polinucleotídeo pode ser inserido ou clonado. Um vetor contém preferencialmente um ou mais sítios de restrição singulares e pode ser capaz de replicação autônoma em uma célula definida de um hospedeiro incluindo uma célula ou tecido alvo ou uma célula progenitora ou tecido da mesma, ou pode ser integrado no genoma do hospedeiro definido tornando a sequência clonada passível de reprodução. Desta forma, o vetor pode ser um vetor de replicação autônoma, isto é um vetor que existe na forma de uma entidade extra-cromossômica, cuja replicação independe da replicação cromossômica, por exemplo, um plasmídeo linear ou circular fechado, um elemento extra-cromossômico, um minicromossoma, ou um cromossoma artificial. O vetor pode conter qualquer meio para assegurar a auto-replicação. Alternativamente o vetor pode ser um vetor que quando é introduzido na célula hospedeira, é integrado no genoma e replicado juntamente com o(s) cromossoma(s) no(s) qual/quais foi integrado. Um sistema de vetor pode compreender um único vetor ou plasmídeo, dois ou mais

vetores ou plasmídeos, que em conjunto contêm o DNA total a ser introduzido no genoma da célula hospedeira, ou um transposon. A escolha do vetor dependerá tipicamente da compatibilidade do vetor com a célula hospedeira no qual o
5 vetor será introduzido. Em uma configuração preferencial, o vetor é preferencialmente um vetor viral ou de derivação viral, que é operacionalmente funcional em células de animais e preferencialmente de mamíferos. O vetor pode igualmente incluir um marcador de seleção tal como um gene
10 de resistência antibiótica que pode ser utilizado para seleção de agentes de transformação adequados. Exemplos de tais genes de resistência são conhecidos daqueles que são versados na técnica e incluem o gene nptII que confere resistência aos antibióticos kanamicina e G418 (Geneticin®)
15 e o gene hph que confere resistência ao antibiótico higromicina B.

Salvo definição em contrário, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizado têm o mesmo significado conforme normalmente entendido por uma pessoa
20 normalmente versada na técnica à qual a presente invenção pertence. Muito embora métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser utilizados para prática ou teste da presente invenção, os métodos e materiais úteis encontram-se descritos mais abaixo. Os
25 materiais, métodos, e exemplos são meramente ilustrativos e

não pretendem constituir limitações. Outras características e vantagens da invenção serão aparentes da descrição detalhada e das reivindicações.

Exemplos

5 1. Construção de uma molécula interferente de peptídeo sintético

Os presentes requerentes construíram uma molécula interferente em que a parte B consiste em três regiões de auto-associação sintéticas com componentes de ligação
10 curtos para dois aminoácidos (STLIVL-QN-STVIFE-QN-STVIFE) interligando as regiões de auto-associação. As referidas três regiões de auto-associação são hexapeptídeos que apresentam uma forte tendência de agregação, vide a Fig. 1 para a construção da molécula interferente. Observação: no
15 texto da presente invenção todas as seqüências de aminoácidos são ilustradas começando pela parte terminal amino e são lidas na direção da parte terminal carbóxi - desta forma, "STLIVL" é lido como "NH₂-STLIVL-COOH"). A parte B da molécula interferente sintética foi fundida N-
20 terminalmente a uma fração (parte A) que impede agregação e traz as regiões de auto-associação para contato direto com o ambiente (neste caso o citosol de *E. coli*). (A Fig. 1 ilustra a estrutura da construção do interferente sintético). A referida fração é a proteína NusA, que é
25 freqüentemente utilizada como indicador de solubilização em

produção de proteínas recombinantes¹³. A molécula interferente sintética resultante (estrutura A-B) pode ser fabricada e purificada de uma forma recombinante em *E. coli*.

5 Os presentes requerentes demonstraram que a sobre-expressão da molécula interferente sintética (sem nenhuma sequência de auto-associação específica para uma proteína específica de *E. coli*) não impede o crescimento bacteriano. Desta forma, as células BL21 de *E. coli* foram transformadas
10 com o constructo interferente sintético presente no plasmídeo pETM60 (gentilmente cedido por G. Stier, EMBL). Neste último plasmídeo os interferentes encontram-se sob o controle do promotor quimérico T7 (ver a seção de materiais e métodos). Os recombinantes foram cultivados até uma
15 densidade de 0,6 OD, o interferente foi expressado após a adição de 0,5 μ M de IPTG durante 3 horas a uma temperatura de 37° C e a suspensão bacteriana foi disposta em placas de ágar. As placas foram inspecionadas após 12 horas de incubação a 37° C e apresentaram um abundante crescimento
20 bacteriano.

Em uma etapa seguinte uma sequência de ligação flexível ("KPGAAGK" - ilustrada como "componente de ligação" na Figura 1) foi acoplada ao terminal COOH do constructo interferente sintético para permitir a fusão das
25 sequências de auto-associação derivadas de uma proteína

alvo.

2. Interferência de proteína em procariotos

No presente exemplo foram selecionadas proteínas de *E. coli* para serem submetidas a regulação de redução, das
 5 quais uma interferência de proteína funcional confere um traço selecionável. As proteínas alvo do proteoma de *E. coli* foram selecionadas com uma localização citosólica e a presença de uma região de agregação com uma classificação TANGO adequadamente elevada. Devido ao fato de uma
 10 auxotrofia condicional para um único aminoácido poder ser convenientemente testada utilizando um meio de cultura com composição controlada, os presentes requerentes selecionaram quatro enzimas candidatas envolvidas na síntese de isoleucina (anotação de item UniProt¹⁵:
 15 ILVI_ECOLI), metionina (anotações de itens UniProt¹⁵: METE_ECOLI e METK_ECOLI) e leucina (anotação de item UniProt¹⁵: LEU1_ECOLI). As seqüências de auto-associação baseadas na classificação de previsão TANGO das quatro proteínas alvo foram para ILVI_ECOLI: "GVVLVTSG",
 20 classificação TANGO: 44, para METE_ECOLI: "LLLTTYF", classificação TANGO: 32 , METK_ECOLI: "'LTLLV", classificação TANGO: 20 e LEU1_ECOLI: "LAFIG", classificação TANGO: 15. As informações genéticas para a molécula interferente sintética do Exemplo 1 foram fundidas
 25 com a seqüência de DNA que codifica as respectivas regiões

de auto-associação das quatro enzimas biosintéticas resultando em quatro moléculas interferentes específicas. Para demonstrar a interferência de proteína *in vivo* (que consiste essencialmente em uma co-agregação entre o

5 interferente específico (para uma enzima biosintética) e a enzima biosintética propriamente dita, os procedimentos foram conforme descritos a seguir. Os organismos *E. coli* foram transformados com o plasmídeo compreendendo os respectivos constructos interferentes e cultivados em um

10 meio de cultura rico até o início da fase de crescimento exponencial, quando a expressão da proteína interferente foi induzida com IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosida). A expressão em proteína foi deixada prosseguir a 37° C, foram colhidas células, que foram

15 lavadas com uma solução salina para remoção de excesso de IPTG e meio de cultura rico e foram dispostas em placas de ágar contendo uma quantidade mínima de meio de cultura M9 completado com os vinte aminoácidos de ocorrência natural (designado como meio de cultura M9 completo) e em uma

20 quantidade mínima de meio de cultura M9 com todos os aminoácidos exceto aquele relativamente ao qual está sendo testada a auxotrofia (designado como M9 selecionado). Foi demonstrado que para três de cada quatro enzimas designadas como alvos, foi possível obter uma eliminação funcional

25 completa, isto é, foram encontradas condições em que as

bactérias formaram colônias no meio M9 completo mas não nas placas de ágar de M9 selecionado. A expressão dos constructos interferentes e sua presença exclusiva na fase insolúvel do lisato celular foi confirmada pelo
5 procedimento Western Blot. Para as quatro enzimas testadas neste caso, foi observada uma relação clara entre sua sensibilidade à abordagem de co-agregação e sua propensão prevista para agregação de acordo com o algoritmo TANGO, confirmando adicionalmente a qualidade das previsões TANGO
10 bem como sua relevância em um contexto funcional celular. A proteína ILVI, que apresenta a classificação TANGO mais elevada, foi quase completamente eliminada pela expressão "leaky" do promotor T7 na ausência de qualquer IPTG, e uma hora de sobreexpressão induzida causa uma eliminação
15 funcional total. As enzimas METE e METK apresentam uma classificação TANGO intermédia e não foram afetadas por uma única hora de sobreexpressão do interferente. Entretanto, após três horas de indução IPTG a função foi completamente perdida e não foi detectada qualquer formação de colônia. A
20 classificação de agregação mais fraca foi observada para a enzima LEU1 e a sobreexpressão neste caso produziu somente uma modesta regulação de redução de sua atividade. Significativamente, a eliminação funcional das enzimas constituídas como alvos é reversível. Quando células
25 carregadas com um nível elevado de material interferente

sobreexpressado foram dispostas em placas de ágar LB, as mesmas apresentaram um crescimento de colônia normal. Quando estas colônias foram copiadas para M9 selecionado, foi novamente observado um crescimento normal. Isto indica
5 que durante o crescimento de colônia os agregados foram perdidos, restituindo a rede celular para uma condição normal.

3. Interferência de proteína de alvos compreendendo regiões de auto-associação com uma baixa classificação de auto-
10 associação

As regiões de auto-associação são freqüentemente flanqueadas ou contêm resíduos com carga tais como R, K, D e E mas também P e G (designados vulgarmente como resíduos de aminoácidos "gatekeeper") (vide Rousseau, Serrano &
15 Schymkowitz (2006) How Evolutionary Pressure Against Protein Aggregation Shaped Chaperone Specificity, [*Como a Pressão Evolucionária Contra Agregação de Proteínas Conformou a Especificidade de Auxiliares*] J Mol Biol, doi:10.1016/j.jmb.2005.11.035). Estes resíduos "gate
20 keeper" reduzem a propensão para auto-associação das seqüências às quais se encontram associados. Para otimizar a sensibilidade da parte B de uma molécula interferente à co-agregação com uma determinada proteína alvo, a região de auto-associação da proteína alvo que é incluída na parte B
25 do interferente pode ser submetida a mutação de tal forma

que os resíduos mencionados acima sejam substituídos por resíduos promotores de agregação tais como L,V,I,F,W,Y porém podem igualmente ser incluídos outros resíduos passíveis de aumentar a propensão à auto-associação da região de auto-associação. A região de auto-associação submetida a mutação (derivada da proteína alvo) que é incluída na parte B da molécula interferente apresenta uma homologia de sequência de pelo menos 60%, preferencialmente pelo menos 70%, mais preferencialmente pelo menos 80%, e mais preferencialmente pelo menos 90%, com a região de auto-agregação da proteína alvo. Adicionalmente, alguns aminoácidos são neutros em termos de agregação, e a substituição dos referidos aminoácidos por aminoácidos que favorecem agregação irá igualmente aumentar a tendência de auto-associação de uma região (por exemplo S, P, C mas também Q, N, H, M podem ser substituídos por resíduos com tendência a agregação tais como L, V, I, F, W, Y. Estas moléculas integradoras otimizadas aumentam a interferência de proteína de alvos com uma baixa previsão de classificação de agregação. No Exemplo 2 foi demonstrado que a interferência de proteína da enzima LEU1 de *E. coli* é menos eficiente. Neste exemplo os requerentes otimizaram a molécula interferente com uma especificidade para a enzima LEU1. A sequência de auto-associação identificada em LEU1 é "LAFIG". Esta última sequência é flanqueada pelos resíduos

"gatekeeper" "...DYDLEALAFIGKQQEE..." e portanto para intensificar mutacionalmente a sequência alvo foi empregada uma estratégia baseada em pcr degenerado como segue: foram construídos "primers" complementares que apresentam uma
5 sobreposição de 20-25 bp em cada lado do códon que será mutado para permitir um recozimento eficiente dos "primers" da matriz. Um códon degenerado é introduzido mediante incorporação de uma razão equimolar das quatro bases durante a síntese de "primer" (designado como códon NNS).
10 Mediante utilização do protocolo Quickchange PCR com este "primer" degenerado, é obtida uma lista contendo as 20 mutações de ponto da posição de flanqueamento. Esta lista é amplificada em células Top10 (Invitrogen) e o DNA de plasmídeo é purificado mediante utilização do kit miniPrep
15 (Qiagen). Para testar se ocorreu aumento de eficiência de eliminação, os interferentes mutantes (a construção é realizada em conformidade com o exemplo 2) contra o alvo LEU1 são transformados em células BL21 (Invitrogen) e dispostas em placas de ágar LB. Em uma placa de 96
20 receptáculos contendo 0,2 mL de LB + antibiótico por receptáculo, cada receptáculo é inoculado mediante seleção de colônias individuais. A placa é incubada a 37° C até ser alcançado um valor OD de 0,6, quando é induzida a expressão dos interferentes mutantes mediante adição de 0,5. µM de
25 IPTG durante 3 horas a uma temperatura de 37° C. O conteúdo

completo de cada receptáculo, com exceção de 1 μ L é disposto em placa em uma mídia mínima seletiva que contém todos os aminoácidos com exceção de leucina. Para clones que apresentam diferentes gradações de prejuízo de crescimento nas placas seletivas, é adicionado um reagente TempliPhi (GE Health Science) para amplificação de DNA e a placa é transferida para a instalação de seqüenciamento. As informações de seqüência proporcionam o espectro total de moléculas interferentes mutadas de LEU1 com otimização.

10 4. Uso de moléculas interferentes para esgotamento de imunoglobulina G de soro

Neste experimento de esgotamento uma gota de agarose foi selecionada como uma fração (parte A) com a qual as regiões de auto-associação derivadas de uma proteína alvo são fundidas através de ligação química reativa amino. Esses materiais de agarose encontram-se disponíveis comercialmente tal como Sepharose™ NHS-ativada 4 Fast Flow da empresa GE Healthcare. A imunoglobulina G humana possui duas regiões com classificações TANGO fortes (I) IIVAVVIATAVAAIIVAAVVALIY e II) LTVLLLLASA) que podem ser utilizadas como regiões de auto-associação. Na medida em que o dispêndio de peptídeo forma uma escala com extensão em aminoácidos, os peptídeos são projetados para conterem 10 frações de aminoácidos da primeira região alvo. As seqüências alvo (regiões de auto-associação) são precedidas

pela sequência de ligação ADPRGAAEGA e sintetizadas com extremidades não protegidas para manutenção do grupo amina N-terminal reativo. As sequências designadas são a) ADPRGAAEGAIIVAVVIATA, b) ADPRGAAEGAVVIATAVA AI, c) ADPRGAAEGAIVAAVVALIY (a), b) e c) compreendem decapeptídeos derivados da região TANGO forte I) e d) ADPRGAAEGALTVLLLLASA compreende a região TANGO II). Para esgotamento, 10 ml de soro é incubado com 1 mg de peptídeo imobilizado a 25, 30, 37 e 45° C durante 1 hora. São colhidas gotas de agarose por centrifugação e o soro é removido, as gotas de agarose são lavadas em tampão PBS para remoção de impurezas remanescentes. As gotas são subsequentemente transferidas para tampão SDS e são incubadas a 95° C durante 10 minutos e são extensivamente submetidas a um vórtice. A presença de IgG é investigada mediante utilização de SDS-PAGE. A identidade de alvo é confirmada mediante utilização de espectrometria de massa.

5. Utilização de moléculas interferentes para detecção

As moléculas interferentes foram designadas para detecção específica de 3 proteínas recombinantes disponíveis comercialmente (citrato sintase de coração de porco (Roche), beta-galactosidase de *E. coli* (Sigma) e glicose-6-fosfato deshidrogenase de *Leuconostoc mesenteroides* (Sigma). Em uma primeira etapa foram determinadas regiões de auto-associação com o algoritmo

TANGO das seguintes proteínas alvo:

- a) citrato sintase (CISY_PIG): "ALFWLLVT"
(classificação TANGO 60),
- b) beta-galactosidase (BGAL_ECOLI): "AVIIWSLGN"
5 (classificação TANGO 30) e "ALAVVLQ" (classificação TANGO
42), e
- c) glicose-6-fosfato deshidrogenase (G6PD_LEUME):
"AFVDAISAVYTA" (classificação TANGO 41).

Em uma etapa subsequente foi realizado acoplamento
10 amino-terminal de biotina com as 4 diferentes regiões de
auto-associação resultando em 4 diferentes moléculas
interferentes: i) biotina-ALFWLLVT com uma especificidade
para citrato sintase, ii) biotina-AVIIWSLGN e biotina-
ALAVVLQ com uma especificidade para beta-galactosidase e
15 iii) biotina-AFVDAISAVYTA com uma especificidade para
glicose-6-fosfato deshidrogenase. Os peptídeos biotinilados
foram adquiridos da empresa Jerine Peptide Technologies.
Deverá ser observado que a construção de interferente -
região de auto-associação corresponde à estrutura A-B em
20 que a biotina (parte A) impede a agregação da região de
auto-associação (parte B) em coloca a região de auto-
associação em contato direto com o solvente (PBST), em que
a referida região de auto-associação-biotina se encontra
presente.

25 Foram preparados "dotblots" individuais mediante

"spotting" de 0,3 mg de cada proteína alvo sobre membrana de nitrocelulose, seguida de secagem ao ar e incubação durante a noite em 1% BSA-PBST (PBS com 0, 1% Tween-20) para bloqueio de sítios de ligação não específicos. A
5 membrana foi imersa em uma solução de 10 mM de peptídeo de detecção biotinilado e foi incubada durante 3 horas à temperatura ambiente com agitação. Após uma lavagem repetitiva com tampão, a ligação do peptídeo à proteína foi confirmada por visualização da fração de biotina mediante
10 utilização de estreptavidina-HRP (Peroxidase de Rábano Silvestre, Pierce) e detecção de quimioluminescência utilizando um sistema de câmera CCD.

6. Utilização de moléculas interferentes contra VEGF de ratos para tratamento de angiogênese retinal patológica

15 A neovascularização retinal é uma causa principal da cegueira a nível mundial e a angiogênese retinal patológica constitui uma via de percurso comum final que causa a perda de visão em doenças tais como retinopatia de prematuridade (ROP), retinopatia diabética e degeneração
20 macular relacionada com o envelhecimento. É sabido que o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um dos principais causadores do desenvolvimento de angiogênese patológica. Os presentes requerentes estudaram o efeito das moléculas interferentes contra o VEGF em dois modelos
25 murinos com retinopatia induzida. Em um primeiro modelo,

ratos recém nascidos (com uma vasculatura retinal imatura) foram expostos a hiperoxia, com resultante obliteração dos vasos sanguíneos em desenvolvimento que fornecem oxigênio para a retina. Quando os ratos retornaram para normoxia, a retina, distal com relação aos vasos em oclusão, tornou-se isquêmica, induzindo produção de VEGF e finalmente resultando em uma neovascularização retinal proliferativa passível de reprodução e quantificação (o modelo é detalhado no trabalho de Pierce EA e outros (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92(3)905-9, vide os procedimentos experimentais na página 905 - modelo murino). Em suma, filhotes de rato com 7 dias de existência (P7) juntamente com suas mães de aleitamento, foram submetidos a hiperoxia (75% de oxigênio) em câmaras de oxigênio especialmente projetadas durante 5 dias, sem abertura das gaiolas. Em P12, os animais foram retornados para o ar ambiente até P17, quando então as retinas foram avaliadas quanto à resposta neovascular máximas. Em P12 metade dos animais foram tratados com uma molécula interferente contra VEGF e metade foram deixados sem tratamento. Metade dos ratos tratados perceberam interferente VEGF através de injeção intra-vitreosa enquanto a outra metade do grupo tratado recebeu interferente VEGF por meio de injeção periocular (a injeção periocular ou intravitreosa é realizada conforme a descrição feita no trabalho de Shen J e outros (2006) Gene

Therapy, publicação antecipada on-line em 29 de setembro).
Foram utilizadas três diferentes moléculas interferentes
contra a isoforma murina VEGF165 em uma faixa de
concentração de 1-100 µg/ml.

5 a) REAG-FLLSWVHWTALALLYLHH-GGEERAG; esta molécula
interferente possui a estrutura A-B-A' de uma molécula
interferente. A região de auto-associação derivada de
VEGF165 murino (sublinhada) é flanqueada por regiões A de
solubilização (REAG e GGEERAG), ou em outras palavras, as
10 regiões A e A' inibem a agregação da região de auto-
associação (parte B da molécula interferente).

 b) STVIIE-GGAG-NHVTLS-GGAGQ-FLLSWVHWTALALLYLHH-
GERAG; esta molécula interferente possui a estrutura B-A de
uma molécula interferente. A parte A de solubilização
15 (GERAG) é ilustrada em *itálico*. A parte B tem a seguinte
estrutura: STVIIE (= região de auto associação sintética) -
GGAG (=um componente de ligação) - NHVTLS(=região de auto-
associação sintética) - GGAGQ (=um componente de ligação) -
FLLSWVHWTALALLYLHHG (=a região de auto-associação derivada
20 de VEGF165 murino).

 c) STVIIE-GGAG-FLLSWVHWTALALLYLHH-GERAG; esta
molécula interferente possui a estrutura B-A de uma
molécula interferente. A parte A de solubilização (GERAG) é
ilustrada em *itálico*. A parte B tem a seguinte estrutura:
25 STVIIE (=região de auto-associação sintética) - GGAG (=um

componente de ligação entre as regiões de auto-associação)
- FLLSWVHWTLLALLYLHH (=a região de auto-associação derivada
de VEGF165 murino).

Ratos P17 anestesiados foram submetidos a perfusão
5 através do ventrículo esquerdo com um ml de solução salina
de tampão de fosfato contendo 50 mg de 2×10^6 de peso
molecular de fluoresceína-dextran. Os olhos foram removidos
e fixados em 4% de paraformaldeído durante 3 (olho direito)
ou 24 (olho esquerdo) horas. Dos olhos direitos foram
10 removidas as lentes e as retinas periféricas foram cortadas
para permitir uma montagem plana com glicerol-gelatina. As
retinas montadas em plano foram analisadas por microscopia
de fluorescência. Os olhos esquerdos foram embebidos em
parafina e seções seriais de 6 μ m foram cortadas
15 sagitalmente através da córnea, paralelamente ao nervo
óptico, e foram manchadas com hematoxilina-eosina. A
resposta neovascular proliferativa foi quantificada por
contagem do número de novos vasos (= (tufos) e do número de
células endoteliais estendendo-se da membrana limitadora
20 interna da retina para o corpo vítreo nos cortes
transversais sagitais manchados. A técnica angiográfica com
utilização de perfusão com fluoresceína-dextran foi
utilizada em conjunção com este método de contagem para
análise rápida de retinas ou como um sistema alternativo de
25 atribuição de valores para avaliação quantitativa. Em um

segundo modelo a neovascularização retinal foi imitada experimentalmente mediante trombose venosa induzida por laser na retina. O modelo foi descrito por Saito Y e outros (1997) Curr Eye Res. 16(1): 26-33. Chi-Chun Lai e outros (2005) Acta Ophthalmologica Scandinavica 83:590-594, descrevem na seção de materiais e métodos nas páginas 591-592 que o modelo pode ser quantificado. A aplicação das moléculas interferentes de VEGF é realizada conforme foi aqui anteriormente descrito.

10 7. Interferência em proteína em uma linhagem celular humana

A modulação de apoptose (indução ou supressão) é fácil de monitorar em um sistema celular. É conhecido que a staupsporina induz apoptose de uma forma dependente de p53. Desta forma, a regulação de redução de p53 ou a regulação de redução de proteínas que aumentam a função de p53 (por exemplo, ASPP1) suprime a apoptose induzida por staupsporina em linhagens celulares animais (por exemplo, humanas). Os vetores de expressão recombinante, que codificam moléculas interferentes, são construídos com base na construção da molécula interferente sintética descrita no exemplo 1, com exceção do fato de que a parte A, a proteína NusA, é mudada para a proteína fluorescente verde (GFP) e o promotor é um promotor mamífero constitutivo tal como a actina ou o promotor CMV. A sequência de auto-associação para p53 é ILTIITLLE (que possui uma classificação TANGO de 72) e esta

seqüência é adicionalmente compreendida para o interior da parte B do interferente sintético causando uma molécula interferente com uma especificidade para p53. A seqüência de auto-associação para ASPP1 é MILTVFLSN (que possui uma
5 classificação TANGO de 63) e esta seqüência é adicionalmente compreendida para o interior da parte B da molécula interferente sintética causando uma molécula interferente com uma especificidade para ASPP1. São cultivadas células HeLa, e as mesmas são submetidas a
10 transfecção com os vetores recombinantes. A GFP (parte A) permite a visualização das moléculas interferentes sobreexpressadas. A adição de 1 μ M de staurosporina a células de controle transfectadas e não transfectadas induz uma resposta apoptótica diferencial.

15 8. Interferência de proteína do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em peixes "zebrafish"

Foram desenvolvidas moléculas interferentes direcionadas para VEGF de peixes "zebrafish". A inativação específica (através de agregação) do VEGF segregado pode
20 ser acompanhada por um distúrbio do desenvolvimento vascular em embriões de peixes "zebrafish".

Em uma primeira etapa as regiões de auto-associação presentes na proteína VEGF de peixes "zebrafish" foram determinadas mediante utilização do algoritmo TANGO. A
25 região de agregação com a classificação TANGO mais elevada

foi NH₂-FLAALLHLSA-COOH. Com base nesta sequência de auto-
 associação foram desenvolvidas quatro moléculas
 interferentes sintéticas:

Interferente A: NH₂-RLFLAALLRFLAALLHLSAR-COOH

5 Interferente B: NH₂-RFLAALLHLSARLFLAALLR-COOH

Interferente C: NH₂-RYLAILAGIRLFLAALLR-COOH

Interferente D: NH₂-RYLAILAGIRFLAALLHLSAR-COOH

Interferente E (NH₂-EALVVYLIQLAGR-COOH) serviu como
 sequência de controle e é derivado de uma sequência
 10 situada externamente a esta região de elevada
 classificação TANGO.

Deverá ser observado que os interferentes A, B e D
 compreendem a região TANGO inteira ao passo que o
 interferente C compreende somente uma parte da região
 15 TANGO. As seqüências derivadas das regiões TANGO encontram-
 se sublinhadas.

Estas moléculas interferentes foram adicionadas ao
 meio de embriões de peixes "zebrafish" *Tg(fli1:EGFP)^{y1}*
 transgênicos em diferentes concentrações. Os peixes
 20 "zebrafish" *Tg(fli1:EGFP)^{y1}* transgênicos expressaram
 Proteína Fluorescente Verde (GFP) em suas células
 endoteliais, e os referidos peixes são descritos no
 trabalho de Lawson ND e Weinstein BM (2002) *Dev. Biol.* 248,
 307-318), e são fornecidos pela instituição Zebrafish
 25 International Resource Center (Universidade de Oregon) e

são mantidos conforme se encontra descrito no manual de peixes "zebrafish", que é um guia para utilização laboratorial de peixes "zebrafish" (*Danio rerio*), Univ. Oregon Press, Eugene, 1994).

5 Embriões decorionados com 20 horas pós-fertilização (hpf) foram testados em placas de 24 receptáculos (10 embriões por receptáculo) e foram expostos a diversas concentrações das moléculas interferentes selecionadas (começando por 50 μ M) durante 24 horas. Embriões vivos
10 foram analisados a 28 e 48 hpf (horas pós fertilização) utilizando formação de imagem confocal realizada com utilização de um microscópio de varredura laser Zeiss LSM510.

Muito embora fosse monitorado o desenvolvimento de
15 diferentes estruturas vasculares, os presentes requerentes dedicaram uma atenção específica a (i) estrutura da aorta dorsal (DA), veia cardinal posterior (PCV), (ii) ao surgimento dos vasos intersomáticos (ISV) e à formação do plexo vascular (PV) na região posterior do tronco. Um
20 sumário dos experimentos dependentes de dosagem encontra-se ilustrado na Tabela 1. É aparente que os interferentes A e C induzem claros defeitos vasculares nas larvas de peixes "zebrafish" em desenvolvimento. É surpreendente o fato de as moléculas interferentes serem absorvidas pelas larvas de
25 peixes "zebrafish" através da pele e não ser necessária

qualquer injeção dos interferentes. Os interferentes B e D precisam ser administrados em uma concentração ainda mais baixa para tornar possível a monitoração de defeitos vasculares específicos.

5 9. Interferência de proteína no fermento *Saccharomyces cerevisiae*

Os presentes requerentes utilizaram a eliminação da enzima de fermento Ura3 para demonstrar que a interferência de proteína funciona em eucariotos devido ao fato de a
10 inativação dirigida a alvo (mediante agregação) da proteína Ura3 proporciona uma leitura fácil. A enzima Ura3 de *S. cerevisiae* é uma enzima essencial envolvida na via de percurso de biosíntese de uracil. Desta forma, mutantes de *S. cerevisiae* que não possuem o gene URA3 não são capazes
15 de crescer em um meio de cultura sem uracil porém o crescimento pode ser restaurado mediante adição de uracil ao meio. Em uma primeira etapa as regiões de auto-associação presentes na proteína Ura3 foram determinadas mediante utilização do algoritmo TANGO. A região de auto-
20 associação (ou região de agregação) com a melhor classificação TANGO é a região NH₂-VIGFIAQ-COOH (classificação TANGO: 74). Esta sequência de peptídeo foi utilizada para geração de um constructo de expressão de interferente. Para clonagem da sequência de auto-associação
25 que codifica este peptídeo em fase com o constructo

interferente sintético (vide o exemplo 1), os presentes
 requerentes utilizaram os dois oligonucleotídeos seguintes:
 agregadorURA3 Para: 5' CCTCTAGAATGAAAGAAATTTGGCTGTAG 3' e
 agregadorURA3Rev: 5' CCGTCGACTTA AGC TTG AGC AAT AAA GCC
 5 GAT AAC GCCAGCAGCGCCCGGTTTAGCAGC 3'.

Os sítios de restrição *Xba*I e *Sal*I encontram-se
 sublinhados. O códon de início da proteína NusA encontra-se
 marcado em negrito. O códon de interrupção encontra-se
 ilustrado em itálico e a sequência que codifica os sete
 10 aminoácidos Ura3 encontra-se marcada em negrito.

Como matriz para PCR os presentes requerentes
 utilizaram o plasmídeo pETM60 (gentilmente cedido por G.
 Stier, EMBL) que contém a proteína NusA acoplada ao
 constructo de ligação/interferente sintético (ver o exemplo
 15 1). Este vetor contém um promotor T7, confere resistência à
 kanamicina e proporciona um sinalizador de expressão N-
 terminal de seis histidinas. O produto PCR resultante foi
 sub-clonado no vetor pBEVY/GT (Miller CA 3rd, Martinat MA
 and Hyman LE (1988) *Nucleic Acids Res.* 26: 3577-3583)
 20 utilizando os sítios de restrição *Xba*I e *Sal*I. Neste vetor,
 o cassete de expressão - "sequência de auto-associação
 "NusA-interferente sintético-componente de ligação-Ura3" -
 encontrava-se sob o controle do promotor GAL1/10 de *S.*
cerevisiae. O marcador de seleção deste vetor é o gene
 25 *TRP1*.

Constructos com sequência conferida com e sem o DNA codificando os sete aminoácidos Ura3 (derivados da região de auto-associação) foram introduzidos em PVD2 da cepa *S. cerevisiae* por transformação e seleção de transformantes com base em complementação *trp1*. A cepa PVD2 é derivada da cepa W303-1A (Thomas BJ e Rothstein R. (1989) *Cell* 56, 619-630) porém a cepa PVD2 é transformada com alelas de tipo natural tanto de *HIS3* quanto de *URA3*. A cepa PVD2 é ainda auxotrófica para leucina (*LEU2*), triptofane (*TRP1*) e adenina (*ADE2*). Os transformantes foram selecionados em meio SDglu-Trp medium (meio mínimo de fermento com 2% de glicose porém sem triptofane). As colônias foram re-manchadas ("re-streaked") em placas frescas de SDglu-Trp para colônias únicas. Duas colônias independentes foram cultivadas durante a noite em meio líquido de SDglu-Trp. O parâmetro OD₆₀₀ da cultura foi então ajustado para 1 e 5 microlitros de uma diluição serial em 10 etapas e depositados em pontos ("spotted") em placas de SDglu-Ura-Trp (meio SD com 2% de glicose porém sem uracil e sem triptofane) ou SDgal-Ura-Trp (meio SD com 2% de galactose porém sem uracil e sem triptofane). O resultado deste experimento encontra-se ilustrado na fig. 2. Este experimento foi repetido três vezes com resultados similares. A expressão do vetor vazio pBEVY/GT ou o vetor expressando somente o constructo de NusA-interferente

sintético (sem uma sequência de auto-associação de ura3) não apresenta nenhuma inibição de crescimento em meio sem uracil. A expressão do constructo de região de associação NusA-interferente sintético-Ura3, entretanto, inibe intensamente o crescimento em um meio sem uracil (quando o uracil é adicionado ao meio de cultura não ocorre nenhum defeito de crescimento), demonstrando que a proteína Ura3 endógena é especificamente inativada por interferência de proteína.

10 10. Interferência de proteína no fermento *Candida albicans*

O organismo *Candida albicans* causa 40% das infecções por fungos em seres humanos. Este comensal possui um determinado número de fatores de virulência. Além da capacidade de aderência a todos os tipos de plásticos (um problema grave em unidades de tratamento intensivo) ou da produção de lipases e proteinases, sua capacidade de adotar diversas morfologias tem sido extensivamente estudada devido ao fato de constituir um dos principais fatores de virulência. Muitos fatores de transcrição podem induzir a transição de células semelhantes a fermento para hifas ou pseudo-hifas. Outros fatores de transcrição são necessários para manutenção das células na forma semelhante a fermento. Um exemplo de um tal repressor de formação de hifas é a Tup1. Como exemplo de interferência de proteína em *Candida albicans* os presentes requerentes utilizaram a proteína

Tup1 como alvo. A regulação de redução da função biológica da Tup1 deveria induzir formação de hifas. Em uma primeira etapa as regiões de auto-associação presentes na proteína Tup1 foram determinadas com o algoritmo TANGO. A região de auto-associação (ou a região de agregação) com a melhor classificação TANGO (classificação TANGO: 30) é NH₂-VISVAVSL-COOH. Este peptídeo foi utilizado para geração de um constructo de expressão de interferente. Para clonagem da sequência de auto-associação que codifica este peptídeo em fase com o constructo interferente sintético do exemplo 1 os presentes requerentes, utilizaram os dois oligonucleotídeos a seguir:

agregadorTUP1Para:
 5'ATTGTACAAATATCCGTATGTGCCTGACTACGCAATGGCTCAGTGGCAGAAC 3' e
 agregadorTUP1Rev: 5' GCGCTAGCTTA AGC TAG GGA TAC AGC GAC
 TGA GAT GAC GCCAGCAGCGCCCGGTTTA 3'.

Os sítios *BsrGI* e *NheI* encontram-se sublinhados. O códon de interrupção encontra-se ilustrado em itálico e a sequência reversa que codifica o peptídeo alvo encontra-se ilustrada em negrito.

Os presentes requerentes utilizaram o plasmídeo pETM60 contendo o constructo de NusA-interferente sintético (do exemplo 1) como matriz para PCR. O produto PCR resultante foi sub-clonado no plasmídeo pPCK1-GFP (Barelle CJ, Manson CL, MacCallum DM, Odds F, Gow NAR, Brown AJP.

Yeast 21:333-340, 2004) utilizando os sítios de restrição *BsrGI* e *NheI*. Neste vetor, o constructo interferente foi clonado em fase com o gene GFP presente no vetor e o cassete de expressão de interferente resultante "GFP-
5 interferente sintético-componente de ligação-"região de auto-associação Tup1") ficou sob o controle do promotor *PCK1*. Neste último constructo a proteína fluorescente verde (GFP) foi substituída por NusA e GFP atuou como parte A da molécula interferente. O promotor *PCK1* é fortemente
10 induzido em casaminoácidos contendo meio de cultura e é reprimido em meio de cultura contendo glicose (Leuker CE, Sonneborn A, Delbruck S, Ernst JF. Gene 192:235-240, 1997). Os plasmídeos de sequência confirmada foram então transformados na cepa CAI4 de *C. albicans* (Fonzi WA, Irwin
15 MY. Genetics 134:717-728, 1993). Os transformantes foram selecionados em SDglu-ura (meio com o mínimo de fermento compreendendo 2% de glicose porém sem uracil) Os transformantes foram cultivados durante a noite em meio de cultura mínimo contendo glicose, as células foram diluídas
20 para obtenção de 20 células/100 microlitros e este volume foi disposto em placas de ágar de SDglu-ura ou SDcasaminoácido-ura. A morfologia de colônia foi classificada após 4 e 6 dias de cultura (vide a Fig. 3). Conforme pode ser observado na fig. 3, a regulação de
25 redução de Tup1 ocorre em meio de cultura com

casaminoácidos e a formação de hifas é claramente visível na margem das colônias. A formação de hifas não é observada nos transformantes de controle ((plasmídeo pPCK1-GFP sem cassete de expressão de interferente)) nem no meio de
5 cultura compreendendo glicose. O exemplo demonstra que a Tup1 endógena é especificamente inativada por interferência de proteína.

11. Aplicação de interferência de proteína em plantas

Os presentes requerentes demonstraram interferência
10 de proteína em células BY2 de tabaco mediante utilização de células BY2 já transformadas com vários genes de fusão-GFP (os referidos genes são ilustrados na Tabela 2). Uma lista dos referidos genes de *Arabidopsis thaliana* juntamente com suas correspondentes regiões de auto-associação
15 identificadas e classificações TANGO encontra-se ilustrada na Tabela 2.

As moléculas interferentes específicas contra cada um dos alvos da Tabela 2 são construídas com base na molécula interferente sintética descrita no exemplo 1, com
20 exceção do fato de a proteína NusA ser alterada pela Proteína Fluorescente Vermelha (RFP) e o fato de a parte B compreender adicionalmente as regiões de auto-associação específicas dos alvos ilustrados na Tabela 2.

Os constructos que codificam as referidas moléculas
25 interferentes específicas são introduzidos em vetores

apropriados para sobreexpressão utilizando a tecnologia Gateway™ (Invitrogen Life Technologies). Para esta finalidade, foi desenvolvido um conjunto de vetores binários com compatibilidade Gateway para transformação de plantas. Para sobreexpressão o vetor pK7WGD2 é utilizado, e no mesmo o gene é colocado sob o controle do promotor p35S. Para transformações de células de plantas é aplicado o sistema de vetor ternário. O plasmídeo pBBR1MCS-5.virGN54D é utilizado como vetor ternário. O plasmídeo binário é introduzido na cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* já portando o plasmídeo ternário por eletro-transformação. Uma cultura fresca de BY-2 é estabelecida anteriormente à transformação com o constructo específico. BY-2 com cinco dias de existência é inoculado em uma taxa de 1:10 e cultivado por três dias (28° C, 130 rpm, ambiente escuro). A cultura líquida de *Agrobacterium tumefaciens* transformada com pK7WGD2-GUS (vetor de controle), pK7WGD2-interferente 1 (por exemplo, específico para aurora 1, pK7WGD2-interferente 2 (por exemplo, específico para aurora 2) etc. etc. é estabelecida dois dias antes da transformação de BY-2. Uma quantidade de bactérias do meio sólido é inoculada em 5 ml de meio LB líquido com os antibióticos (rifampicina, gentamicina, estreptomicina e espectinomomicina). A cultura é cultivada durante dois dias (28° C, 130 rpm). A transformação de BY-2 é realizada em

uma placa de petri vazia ($\varnothing$ 4,6 cm) com o método de co-cultivo. BY-2 com três dias de existência (3 ml) é depositado por pipeta em uma placa e são adicionados alternativamente 50 ou 200 μ l de suspensão bacteriana. As
5 placas são misturadas com suavidade e permanecem na bancada laminar em ambiente escuro durante três dias. Após co-cultivo as células são dispostas em placas no meio BY2 sólido com as seleções (50 μ g/ml de kanamicina, e 500 μ g/ml de vancomicina e 500 μ g/ml de carbenicilina para eliminação
10 do excesso de bactérias). As placas são vedadas com fita Millipore e incubadas a uma temperatura de 28° C em ambiente escuro durante aproximadamente duas semanas quando então os calos se tornam visíveis. A eficiência de interferência de proteína (neste caso a agregação entre o
15 constructo-GFP e o constructo-RFP) é visualizada mediante verificação da expressão de GFP, RFP e da co-localização de GFP e RFP sob microscópio de fluorescência.

Material e métodos relacionados com os exemplos 1 e 2

Constructos, células e meios de cultura

20 As moléculas interferentes foram clonadas para o vetor pETM60 (gentilmente cedido por G. Stier, EMBL). Este vetor encontra-se sob controle de RNA polimerase T7 (a polimerase RNA T7 encontra-se sob o controle de elementos regulatórios do óperon Iac de *E. coli*), confere resistência

à kanamicina e proporciona um sinalizador de expressão N-terminal de seis histidinas seguidas por NusA. Uma série de óligos sobrepostos codificando a sequência de interferente parte B foi utilizada para criação de um 'gene sintético' por PCR. Este gene foi ligado em pETM60 através de sítios de restrição NcoI e BamHI. Os genes interferentes foram criados por PCR de interferente parte B, mediante utilização de um óligo anti-codificação longo para inclusão da sequência para o componente de ligação flexível e a região de auto-associação de proteína (a isca) no terminal-C. Estes foram ligados em pETM60 através de sítios de restrição NcoI e BamHI. Todos os óligos foram adquiridos da empresa Sigma-Genosys, todas as enzimas de restrição foram adquiridas da empresa Fermentas, e as ligações foram realizadas mediante utilização do kit Quick Ligation Kit da empresa Roche.

Células BL21 quimicamente competentes (DE3) foram produzidas internamente em laboratório e transformadas observando-se protocolos convencionais. Foram preparadas placas de ágar-LB convencionais, e todas as placas de ágar continham 50 µg/mL de kanamicina. Foram preparadas placas de M9 completo mediante suplementação do meio de cultura M9 convencional com todos os 20 aminoácidos (50 µg/mL) e os nucleotídeos adenina, guanina, uracil e xantina (20 µg/mL). Placas de M9 selecionado eram idênticas a M9 completo em

todos menos um aminoácido. Para controle quanto a possível degradação de aminoácidos em armazenagem, as placas foram preparadas um dia antes da utilização. O LB foi preparado de acordo com protocolos convencionais e a kanamicina foi
5 incluída em 50 µg/mL. Todos os aminoácidos foram adquiridos da empresa Sigma, e a kanamicina e IPTG foram adquiridos da empresa Duchefa.

Protocolos

Células BL21 (DE3) foram transformadas com os
10 constructos de expressão, dispostas em placas de ágar-LB mais kanamicina e foram incubadas a 37° C durante a noite. Uma única colônia foi utilizada para inocular 10 mL de LB mais kanamicina e o produto inoculado foi cultivado durante a noite a 37° C, com agitação. No dia seguinte esta cultura
15 foi utilizada para inocular 10 mL de LB mais kanamicina a uma razão de 1:100 e o produto foi deixado em cultivo até ser obtido um valor OD600 de 0,6. As culturas foram então divididas em duas, foi adicionado IPTG (50 µM) a uma cultura para induzir expressão de interferente, e ambas as
20 culturas foram adicionalmente incubadas a 37° C pelo tempo de expressão desejado. As células foram então colhidas por centrifugação e foram lavadas duas vezes (por re-suspensão e centrifugação) com solução (0,85% peso/volume de NaCl). As células foram então novamente colocadas em suspensão em
25 solução salina para obtenção de um valor final OD600 de

0,05, e 200 μL desta suspensão de células foram dispostos em placas de ágar. As placas de ágar foram incubadas a 37° C durante a noite e no dia seguinte foi observado o crescimento da colônia. Quando necessário as colônias foram
5 colhidas com um palito esterilizado e depositadas em novas placas de ágar.

TABELAS

	embriões de 48 hpf com fenótipo vascular indicado						
Interferente	Conc.	% de embriões afetados	Aorta Dorsal Fina	PCV Anormal	Retardo de surgimento de ISV	VP Anormal	Número de embriões analisados
E	50 μM	-	-	-	-	-	10
A	2.5 μM	80%	20%	40%	20%	20%	10
B	1 μM	morte da maioria dos embriões					10
C	2 μM	80%	20%	20%	20%	20%	10
D	2.5 μM	morte da maioria dos embriões					10

Tabela 1: Sumário dos efeitos de resposta a dosagem de
10 diferentes moléculas interferentes VEGF (utilizadas no exemplo 8) na vasculatura de peixes "zebrafish".

	Gene	Classificação	TANGO	região de auto-associação
	AtFH5		95,7956	VFWLILFSGLLVITL
	AtFH5		75,3155	IIIAVVVTAVSTFLLAALFFLC
5	AtFH6		80,8913	FFFFYIFFSVSVSS
	AtFH6		64,3993	AIVISVGIVTLGMLSALAFFLY
	AtMAP65-3		55,9959	QFIVVM
	AURORA1		51,1964	YLILEYAA
	AURORA1		19,4128	YGYFY
10	AURORA2		35,8169	VYLILEYAVRG
	AURORA2		20,1483	YGYFY
	AURORA3		78,0306	IFLIL
	AURORA3		16,6145	FGWF
	TPLATE		73,2511	SIIAILTLW
15	TPLATE		20,4469	GEWVQVLYYPF
	TPLATE		16,3765	IWTIA

Tabela 2: proteínas derivadas de *Arabidopsis thaliana*,
regiões de auto-associação identificadas e classificações

20 TANGO correspondentes

Referências

1. Dobson, C. M. Protein-misfolding diseases: Getting out of shape. *Nature* **418**, 729-730 (2002).
2. Dobson, C. M. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 3-16 (2004).
3. Nelson, R. et al. Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* **435**, 773-8 (2005).
4. Makin, O. S., Atkins, E., Sikorski, P., Johansson, J. & Serpell, L. C. Molecular basis for amyloid fibril formation and stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 315-20 (2005).
5. Hamada, D., Yanagihara, I. & Tsumoto, K. Engineering amyloidogenicity towards the development of nanofibrillar materials. *Trends Biotechnol* **22**, 93-7 (2004).
6. Fernandez-Escamilla, A. M., Rousseau, F., Schymkowitz, J. & Serrano, L. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nat Biotechnol* **22**, 1302-6 (2004).
7. Chiti, F., Stefani, M., Taddei, N., Ramponi, G. & Dobson, C. M. Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. *Nature* **424**, 805-8 (2003).
8. Pawar, A. P. et al. Prediction of "aggregation-prone"

- and "aggregation-susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases. *J Mol Biol* **350**, 379-92 (2005).
9. Lopez de la Paz, M. & Serrano, L. Sequence
5 determinants of amyloid fibril formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 87-92 (2004).
 10. Linding, R., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Diella, F.
& Serrano, L. A comparative study of the relationship
between protein structure and beta-aggregation in
10 globular and intrinsically disordered proteins. *J Mol Biol* **342**, 345-53 (2004).
 11. Clark, L. A. Protein aggregation determinants from a
simplified model: cooperative folders resist
aggregation. *Protein Sci* **14**, 653-62 (2005).
 - 15 12. Barral, J. M., Broadley, S. A., Schaffar, G. & Hartl,
F. U. Roles of molecular chaperones in protein
misfolding diseases. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 17-29
(2004).
 13. De Marco, V., Stier, G., Blandin, S. & de Marco, A.
20 The solubility and stability of recombinant proteins
are increased by their fusion to NusA. *Biochem Biophys Res Commun* **322**, 766-71 (2004).
 14. Houry, W. A., Frishman, D., Eckerskorn, C.,
Lottspeich, F. & Hartl, F. U. Identification of in
25 vivo substrates of the chaperonin GroEL. *Nature* **402**,

147-54 (1999).

15. Bairoch, A. et al. The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* **33**, D154-9 (2005).
16. Kopp, J. & Schwede, T. The SWISS-MODEL Repository of
5 annotated three-dimensional protein structure homology
models. *Nucleic Acids Res* **32**, D230-4 (2004).
17. Guex, N. & Peitsch, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-
PdbViewer: An environment for comparative protein
modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723 (1997).

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> VIB VZW
 VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL
 5
 <120> Dispositivos e métodos para mediação de
 interferência protéica
 <130> JSC/PRON/226
 10
 <150> PCT/EP2006/070184
 <151> 2006-12-22
 <160> 57
 15
 <170> PatentIn versão 3.5
 <210> 1
 <211> 6
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Hexapeptídeos sintéticos
 25
 <400> 1
 Ser Thr Leu Ile Val Leu
 1 5
 30
 <210> 2
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência de ligação flexível

5

<400> 2

Lys Pro Gly Ala Ala Lys Gly

1 5

10

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

15 <213> Escherichia coli

<400> 3

Asp Tyr Asp Leu Glu Ala Leu Ala Phe Ile Gly Lys Gln Gln Glu

20 Glu

1 5 10 15

<210> 4

25 <211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

30

Ile Ile Val Ala Val Val Ile Ala Thr Ala Val Ala Ala Ile Val
Ala

1 5 10 15

Ala Val Val Ala Leu Ile Tyr

20

5

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 5

Leu Thr Val Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ala

1

5

10

15

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Sequência de ligação

25 <400> 6

Ala Asp Pro Arg Gly Ala Ala Glu Gly Ala

1

5

10

30

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência designada

5 <400> 7

Ala Asp Pro Arg Gly Ala Ala Glu Gly Ala Ile Ile Val Ala Val
Val

1 5 10 15
10

Ile Ala Thr Ala
20

15

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Sequência designada

<400> 8

25

Ala Asp Pro Arg Gly Ala Ala Glu Gly Ala Val Val Ile Ala Thr
Ala

1 5 10 15

30

Val Ala Ala Ile
20

<210> 9
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Sequência designada

<400> 9

10

Ala Asp Pro Arg Gly Ala Ala Glu Gly Ala Ile Val Ala Ala Val
 Val

1 5 10 15

15

Ala Leu Ile Tyr
 20

20 <210> 10
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Sequência designada

<400> 10

30 Ala Asp Pro Arg Gly Ala Ala Glu Gly Ala Leu Thr Val Leu Leu
 Leu

1 5 10 15

Leu Ala Ser Ala

20

5 <210> 11
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Região de solubilização
 <400> 11

15 Arg Glu Ala Gly
 1

<210> 12
 20 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 25 <223> Região de solubilização
 <400> 12

Gly Gly Glu Glu Arg Ala Gly
 30 1 5

<210> 13
 <211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Região de auto-associação sintética

<400> 13

Ser Thr Val Ile Ile Glu

10 1 5

<210> 14

<211> 4

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Componente de ligação

20

<400> 14

Gly Gly Ala Gly

1

25

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Região de auto-associação sintética

<400> 15

Asn His Val Thr Leu Ser

1 5

5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Componente de ligação

15 <400> 16

Gly Gly Ala Gly Gln

1 5

20

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Parte de solubilização

<400> 17

30

Gly Glu Arg Ala Gly

1 5

<210> 18
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Molécula interferente

<400> 18

10

Arg Glu Ala Gly Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Thr Leu Ala
 Leu

1 5 10 15

15

Leu Leu Tyr Leu His His Gly Gly Glu Glu Arg Ala Gly

20 25

20 <210> 19
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Molécula interferente

<400> 19

30 Ser Thr Val Ile Ile Glu Gly Gly Ala Gly Asn His Val Thr Leu
 Ser

1 5 10 15

Gly Gly Ala Gly Gln Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Thr Leu
Ala

20

25

30

5

Leu Leu Leu Tyr Leu His His Gly Glu Arg Ala Gly

35

40

10 <210> 20

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Molécula interferente

<400> 20

20 Ser Thr Val Ile Ile Glu Gly Gly Ala Gly Phe Leu Leu Ser Trp
Val

1

5

10

15

25 His Trp Thr Leu Ala Leu Leu Leu Tyr Leu His His Gly Glu Arg
Ala

20

25

30

30 Gly

<210> 21

<211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> região de auto-associação derivada de VEGF165 murino

<400> 21

10 Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Thr Leu Ala Leu Leu Leu Tyr
 Leu
 1 5 10 15

15 His His

<210> 22
 20 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 25 <223> Sequência de auto-associação

<400> 22

Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu
 30 1 5

<210> 23
 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Sequência de auto-associação

<400> 23

Met Ile Leu Thr Val Phe Leu Ser Asn

10 1 5

<210> 24

<211> 15

15 <212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 24

20 Val Phe Trp Leu Ile Leu Phe Ser Gly Leu Leu Val Ile Thr Leu
1 5 10 15

<210> 25

25 <211> 22

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 25

30

Ile Ile Ile Ala Val Val Val Thr Ala Val Ser Thr Phe Leu Leu
Ala

1 5 10 15

Ala Leu Phe Phe Leu Cys

20

5

<210> 26

<211> 14

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

10

<400> 26

Phe Phe Phe Phe Tyr Ile Phe Phe Ser Val Ser Val Ser Ser

1

5

10

15

<210> 27

<211> 22

<212> PRT

20 <213> Arabidopsis thaliana .

<400> 27

Ala Ile Val Ile Ser Val Gly Ile Val Thr Leu Gly Met Leu Ser

25 Ala

1

5

10

15

Leu Ala Phe Phe Leu Tyr

30

20

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 28

5

Gln Phe Ile Val Val Met

1 5

10 <210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

15 <400> 29

Tyr Leu Ile Leu Glu Tyr Ala Ala

1 5

20

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

25

<400> 30

Tyr Gly Tyr Phe Tyr

1 5

30

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 31

5 Val Tyr Leu Ile Leu Glu Tyr Ala Val Arg Gly
1 5 10

<210> 32

10 <211> 5

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 32

15

Ile Phe Leu Ile Leu
1 5

20 <210> 33

<211> 4

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

25 <400> 33

Phe Gly Trp Phe
1

30

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 34

Ser Ile Ile Ala Ile Leu Thr Leu Trp

5 1 5

<210> 35

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 35

15 Gly Phe Trp Val Gln Val Leu Tyr Tyr Pro Phe

1 5 10

<210> 36

20 <211> 5

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 36

25

Ile Trp Thr Ile Ala

1 5

30 <210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Proteína alvo para agregação

<400> 37

5

Gly Val Val Leu Val Thr Ser Gly

1

5

10 <210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Proteína alvo para agregação

<400> 38

20 Leu Leu Leu Thr Thr Tyr Phe

1

5

<210> 39

25 <211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> Proteína alvo para agregação

<400> 39

Leu Thr Leu Leu Val

1 5

<210> 40

5 <211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Proteína alvo para agregação

<400> 40

Leu Ala Phe Ile Gly

15 1 5

<210> 41

<211> 22

20 <212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Regiões de auto-associação sintéticas com
25 componentes de ligação curtos de dois
aminoácidos

<400> 41

30 Ser Thr Leu Ile Val Leu Gln Asn Ser Thr Val Ile Phe Glu Gln
Asn

1 5 10 15

Ser Thr Val Ile Phe Glu

20

5 <210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Sus scrofa

10 <400> 42

Ala Leu Phe Trp Leu Leu Val Thr

1 5

15

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Escherichia coli

20

<400> 43

Ala Val Ile Ile Trp Ser Leu Gly Asn

1 5

25

<210> 44

<211> 12

<212> PRT

30 <213> Leuconostoc mesenteroides

<400> 44

Ala Phe Val Asp Ala Ile Ser Ala Val Tyr Thr Ala

	1	5	10
	<210> 45		
5	<211> 7		
	<212> PRT		
	<213> Sequência Artificial		
	<220>		
10	<223> Molécula interferente de biotina com uma especificidade para beta galactosidase		
	<400> 45		
15	Ala Leu Ala Val Val Leu Gln		
	1	5	
20	<210> 46		
	<211> 10		
	<212> PRT		
	<213> Danio rerio		
25	<400> 46		
	Phe Leu Ala Ala Leu Leu His Leu Ser Ala		
	1	5	10
30	<210> 47		
	<211> 20		
	<212> PRT		
	<213> Sequência Artificial		

<220>

<223> Molécula interferente sintética A

5 <400> 47

Arg Leu Phe Leu Ala Ala Leu Leu Arg Phe Leu Ala Ala Leu Leu
His

1 5 10 15
10

Leu Ser Ala Arg
20

15

<210> 48

<211> 20

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

20

<220>

<223> Molécula interferente sintética B

<400> 48

25

Arg Phe Leu Ala Ala Leu Leu His Leu Ser Ala Arg Leu Phe Leu
Ala

1 5 10 15

30

Ala Leu Leu Arg
20

<210> 49
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

5

<220>
 <223> Molécula interferente sintética C

<400> 49

10

Arg Tyr Leu Ala Ile Leu Ala Gly Ile Arg Leu Phe Leu Ala Ala
 Leu

1 5 10 15

15

Leu Arg

20 <210> 50
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

25 <220>
 <223> Molécula interferente sintética D

<400> 50

30 Arg Tyr Leu Ala Ile Leu Ala Gly Ile Arg Phe Leu Ala Ala Leu
 Leu

1 5 10 15

His Leu Ser Ala Arg

20

5 <210> 51

<211> 13

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

10 <220>

<223> Molécula interferente sintética E

<400> 51

15 Glu Ala Leu Val Val Tyr Leu Ile Gln Leu Ala Gly Arg

1

5

10

<210> 52

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 52

25

Val Ile Gly Phe Ile Ala Gln

1

5

30 <210> 53

<211> 30

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Agregador dianteiro URA3

<400> 53

5 cctctagaat gaaagaaatt ttggctgtag
30

<210> 54

10 <211> 59

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

15 <223> Agregador reverso URA3

<400> 54

ccgtcgactt aagcttgagc aataaagccg ataacgccag cagcgcccgg
tttagcagc 59
20

<210> 55

<211> 8

<212> PRT

25 <213> Candida albicans

<400> 55

Val Ile Ser Val Ala Val Ser Leu

30 1 5

<210> 56

<211> 52

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

5 <223> Agregador dianteiro Tup1

<400> 56

attgtacaaa tatccgtatg tgcctgacta cgcaatggct cagtggcaga ac
52

10

<210> 57

<211> 52

<212> DNA

15 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Agregador reverso Tup1

20 <400> 57

attgtacaaa tatccgtatg tgcctgacta cgcaatggct cagtggcaga ac
52

- REIVINDICAÇÕES -

1 - MÉTODO PARA REGULAÇÃO DE REDUÇÃO DA FUNÇÃO BIOLÓGICA DE UMA PROTEÍNA, caracterizado por compreender o contato da referida proteína com uma molécula de ocorrência
5 não natural compreendendo pelo menos uma região de auto-
associação presente na referida proteína.

2 - Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a referida região de auto-associação ser fundida com uma fração que inibe a agregação da referida
10 região de auto-associação.

3 - Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por a referida fração consistir em um peptídeo, um domínio de proteína ou uma gota de agarose..

4 - Método, de acordo com qualquer uma das
15 reivindicações 1 a 3, caracterizado por a referida região de auto-associação consistir em pelo menos 3 aminoácidos contíguos.

5 - Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado por um componente de
20 ligação se encontrar presente entre a referida região de auto-associação e a referida fração.

6 - Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por o referido componente de ligação ser um polipeptídeo ou ser de natureza não-polipeptídica.

25 7 - Método, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 6, caracterizado por a referida molécula ser um polipeptídeo e ser codificada por uma sequência de nucleotídeo presente em um vetor recombinante, e que após transformação para uma célula ou organismo, produz o
5 referido polipeptídeo na referida célula ou organismo.

8 - MOLÉCULA DE OCORRÊNCIA NÃO NATURAL, caracterizada por compreender pelo menos uma região de auto-associação isolada de um domínio de proteína capaz de ser solúvel em água, em que a referida região de auto-
10 associação é fundida com uma fração que inibe a agregação da referida região de auto-agregação.

9 - Molécula, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada por a referida fração ser um peptídeo, um domínio de proteína ou uma gota de agarose.

15 10 - VETOR RECOMBINANTE, caracterizado por compreender um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo de acordo com as reivindicações 8 e 9.

11 - Molécula, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10, caracterizada por ser destinada a
20 uma utilização como medicamento.

12 - MÉTODO PARA ISOLAR UMA PROTEÍNA DE UMA AMOSTRA, caracterizado por compreender o contato da referida amostra com uma molécula compreendendo pelo menos uma região de auto-associação isolada da referida proteína
25 e isolamento do resultante complexo proteína-molécula de co-

agregação da referida amostra.

13 - Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por a referida região de auto-associação ser fundida com uma fração que inibe a agregação da referida
5 região de auto-associação.

14 - Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por a referida fração ser um peptídeo, um domínio de proteína ou uma gota de agarose.

15 - Método, de acordo com qualquer uma das
10 reivindicações 12 a 14, caracterizado por compreender adicionalmente a detecção de uma proteína na referida amostra.

Figura 1

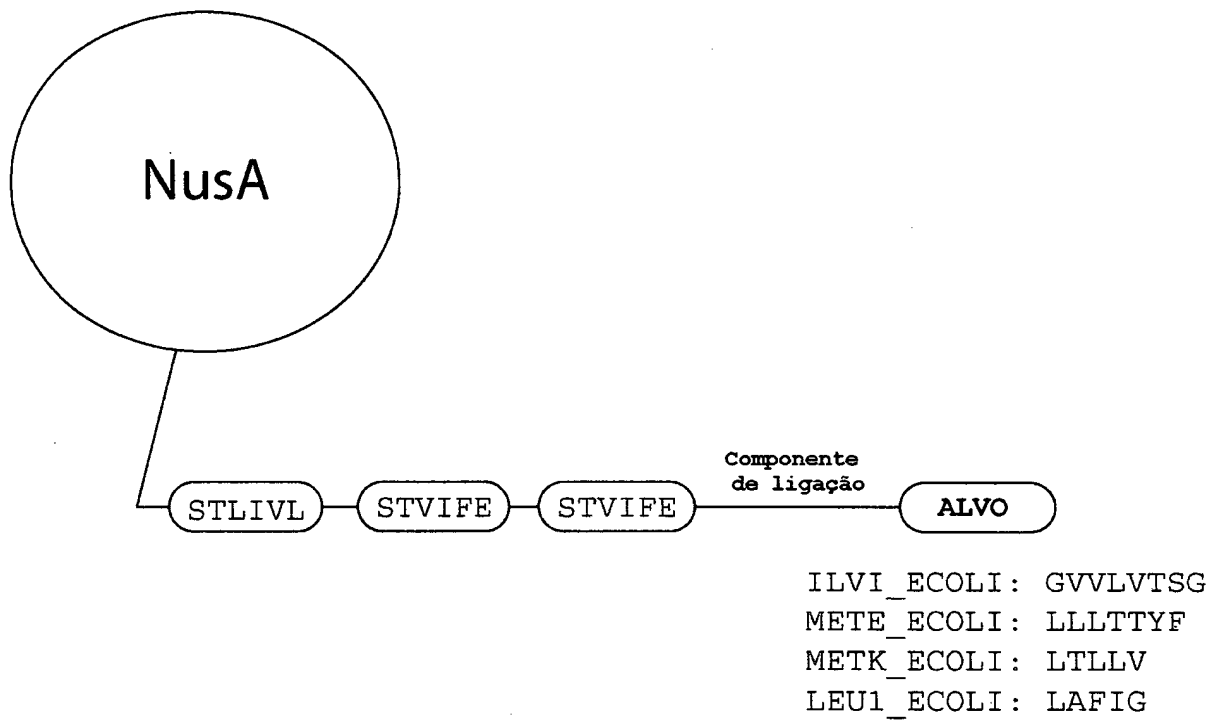


Figura 2

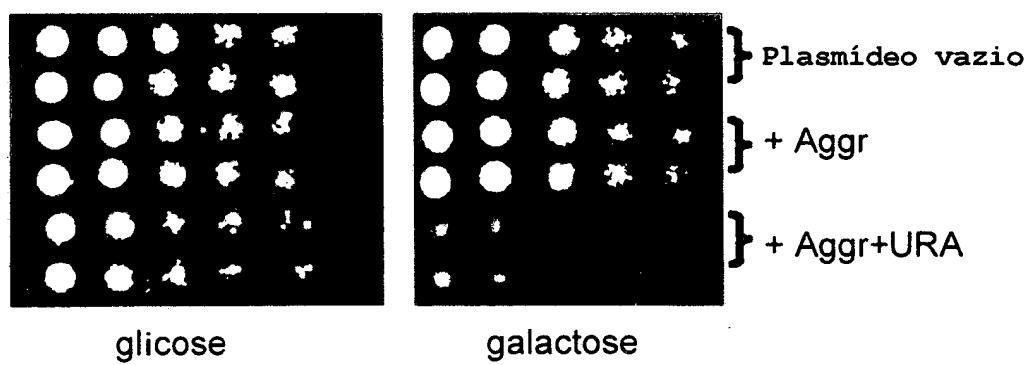
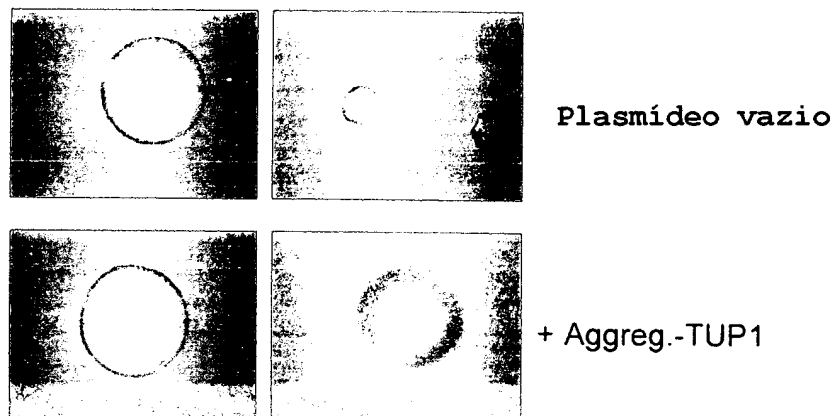


Figura 3



- RESUMO -

MÉTODO PARA REGULAÇÃO DE REDUÇÃO DA FUNÇÃO BIOLÓGICA DE UMA
PROTEÍNA, MOLÉCULA DE OCORRÊNCIA NÃO NATURAL, VETOR
RECOMBINANTE, E MÉTODO PARA ISOLAR UMA PROTEÍNA DE UMA
5 AMOSTRA

A presente invenção pertence ao campo da proteômica
funcional e mais particularmente ao campo da agregação de
proteínas. A invenção divulga um método para interferência
na função de uma proteína alvo e utiliza uma molécula
10 construída não-naturalmente por um usuário, designada como
interferente, que possui uma especificidade para uma
proteína alvo e que induz agregação ao contatar a referida
proteína alvo. A presente invenção também divulga as
referidas moléculas interferentes e sua utilização em
15 aplicações terapêuticas.