



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

(21) PI0707948-6 A2



(22) Data de Depósito: 16/02/2007

(43) Data da Publicação: 17/05/2011
(RPI 2106)

(51) Int.Cl.:

C07K 14/47

C12N 15/09

(54) Título: INIBIÇÃO BASEADO EM PEPTÍDEO DA INTERAÇÃO caPCNA EM CÂNCER

(30) Prioridade Unionista: 17/02/2006 US 60/743.313

(73) Titular(es): Indiana University Research And Technology

(72) Inventor(es): Linda H. Malkas, Robert J. Hickey

(74) Procurador(es): Alexandre Ferreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007062335 de 16/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/098415de 30/08/2007

(57) Resumo: INIBIÇÃO BASEADA EM PEPTÍDEO DA INTERAÇÃO caPCNA EM CÂNCER. Peptídeos derivados da isoforma específica de câncer de antígeno nuclear de proliferação celular (caPCNA, também conhecido como csPCNA) ou a partir de proteínas interagindo com nmPCNA interferem com a interação proteína-proteína intracelular, dessa forma causando uma redução no potencial proliferativo do câncer. Esses peptídeos servem como composições terapêuticas para reduzir a proliferação de células cancerígenas e também aumento dos métodos quimioterapêuticos existentes.

"INIBIÇÃO BASEADA EM PEPTÍDEO DA INTERAÇÃO caPCNA EM CÂNCER"

INVENTORES: Robert J. Hickey e Linda H. Malkas

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica prioridade ao EUA, Ser. No. 60/743.313, depositado em 17

5 de Fevereiro de 2006.

CAMPO TÉCNICO

Esta revelação relaciona-se a composições terapêuticas baseadas em peptídeo e métodos para seletivamente objetivar componentes celulares e processos envolvidos na proliferação de câncer.

10 ANTECEDENTE

Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) desempenha um papel importante no processo de replicação de DNA, reparo, recombinação cromossomal, controle do ponto de checagem no ciclo celular e outras atividades proliferativas celulares. Em conjunção com uma proteína adaptadora, fator de replicação C (FRC), PCNA forma um grampo móvel que é o ponto de ancoragem para DNA polimerases delta e epsilon. Isoformas diferentes de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) que mostra ambos, pontos acídicos e básicos (pI) têm sido demonstrados. Análises de PCNA por eletroforese em gel poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE) de ambas, células de mama malignas e não malignas (referido como PCNA não maligno ou nmPCNA) e tecidos revelaram a presença de uma forma acídica de PCNA somente em células malignas (referida como PCNA específico de câncer ou csPCNA ou caPCNA). Esta diferença no ponto isoelétrico entre essas duas formas de PCNA, parece resultar de uma alteração na habilidade das células malignas, para pós-traducionalmente modificar o polipeptídeo PCNA e não é devido a uma mudança genética dentro do gene PCNA.

25 Trabalho estrutural examinando a estrutura do polipeptídeo PCNA para definir as diferenças estruturais entre caPCNA e isoforma de célula não maligna de PCNA revelaram uma região da proteína caPCNA que é unicamente exposta somente na célula de câncer. Um anticorpo foi desenvolvido para uma região da isoforma específica de câncer de PCNA que é altamente seletiva para a isoforma PCNA expressa exclusivamente em células de
30 câncer.

35 Antígeno nuclear proliferante de célula (PCNA) é uma proteína nuclear de 29 kDa e sua expressão nas células durante as fases S e G2 do ciclo celular, faz a proteína um bom marcador de proliferação celular. Tem sido também mostrado partilhar em muitas vias moleculares responsáveis para a vida e morte da célula. Seu aparecimento periódico na fase nuclear S sugeriu um envolvimento na replicação de DNA. PCNA foi mais tarde identificado como um fator acessório da DNA polimerase em células mamíferas e um fator essencial para replicação de SV40 DNA *in vitro*. Em adição ao funcionante como uma proteína de

grampo móvel de DNA e um fator acessório da DNA polimerase nas células mamíferas, PCNA interage com um número de outras proteínas envolvidas na transcrição, pontos de checagem do ciclo celular, remodelação de cromatina, recombinação, apoptose, e outras formas de reparar DNA. Além de ser diverso em ação, parceiros de ligação de muitos PC-
5 NAs são ligadas por suas contribuições para a precisa herança das funções celulares por cada nova geração de células. PCNA pode atuar como uma molécula principal que coordena o processamento do cromossomo.

PCNA é também conhecido interagir com outros fatores tipo FEN-1, DNA ligase, e DNA metil transferase. Adicionalmente, PCNA foi também mostrado serem um componente
10 essencial nos múltiplos caminhos de reparo do DNA. Interações com proteínas do tipo de reconhecimento incompatível, Msh2, e a excisão de nucleotídeo da endonuclease de reparo, XPG, têm implicado PCNA em processos distintos da síntese de DNA. Interações com múltiplos parceiros geralmente contam com os mecanismos que permitem o PCNA seletivamente interagir em uma forma ordenada e energeticamente favorável.

15 O uso de peptídeos sintéticos curtos para a geração de anticorpos policlonais e monoclonais têm sido utilizados com considerável sucesso. Peptídeos são conhecidos servir como quimioatraentes, neurológicos potentes e toxinas respiratórias, e hormônios. Os peptídeos têm também sido utilizados como alvos de afinidade e padrões para estudos bioquímicos, e têm provido uma base para entender características e a natureza específica de interações proteína-proteína discreta. Em adição, peptídeos hormônios exercem potentes efeitos fisiológicos, e em alguns casos o hormônio ativo é ou um peptídeo que está contido dentro de uma proteína maior ou é processado e liberado de uma proteína precursora antes de exercer seu efeito fisiológico.

20 Peptídeos têm sido utilizados romper interações proteína-proteína, por agir como competidores altamente específicos dessas interações. Estudos bioquímicos empregando reagentes peptídeos avançados, o uso de peptídeos como fármacos terapêuticos capazes de romper as funções celulares que requerem interações proteína-proteína. Então, processos celulares específicos tal como apoptose e progressão do ciclo celular, que são dependentes de discretas interações proteína-proteína, podem ser inibidos se essas interações 25 proteína-proteína são seletivamente interrompidas. A replicação de DNA genômico sendo dependente das interações proteína-proteína é também suscetível a inibição induzida por peptídeo dessas interações de proteína.

30 Síntese de DNA in vivo é um processo altamente regulado que depende de uma miríade de reações bioquímicas mediadas por uma série complexa de interações proteína-proteína. Divisão de célula é dependente do processo sintético de DNA, e crescimento de célula cancerígena é substancialmente sensível a qualquer agente que interrompe a regulação e/ou atividade da maquinaria de DNA sintético responsável por copiar o DNA genômico

da célula cancerígena. Em adição, foi demonstrado que uma característica de câncer de mama está na indução da instabilidade genômica, como células transformadas desenvolvem um fenótipo metastático altamente agressivo. Instabilidade genômica aumenta através de uma série de mudanças na maquinaria do DNA celular sintético que altera a fidelidade com 5 a qual o DNA é sintetizado.

Estudos utilizando os 26 aminoácidos carbóxi-terminal da proteína p21cip, (que é conhecido interagir com a proteína PCNA), demonstraram a habilidade deste peptídeo em interromper o processo proliferativo celular. Este fragmento peptídico de p21 potencialmente rompe um ou mais processos celulares utilizando PCNA e presumivelmente interferem com 10 interações proteína-proteína críticas que participam no processo de DNA sintético bem como a regulação de outros pontos de checagem do ciclo controles e a indução de apoptose.

Estudos utilizando este fragmento peptídico de p21 têm demonstrado a habilidade do peptídeo p21 na ativação de uma via apoptótica não associada à caspase. Similarmente, estudos envolvendo um fragmento peptídico de 39 aminoácidos da proteína p21 parcialmente 15 inibiu a replicação de DNA in vivo, e sugere que este fragmento de peptídeo de p21 pode estabilizar a interação da proteína PCNA-p21 levando a diminuição da atividade sintética de DNA dentro da célula.

Um peptídeo sintético correspondendo a resíduos 65-79 da seqüência de classe II HLA pode inibir a progressão do ciclo celular em uma forma que é similar àquela induzida por rapamicina. Este estudo indica que peptídeos outros que aqueles derivados das proteínas regulatórias do ciclo celular têm a habilidade de modular a progressão através do ciclo 20 celular.

Em adição, métodos químicos computacionais estão sendo utilizados para modelar 25 regiões específicas da molécula de PCNA que podem interagir com outras proteínas celulares envolvidas no controle do ponto de checagem do ciclo celular e síntese de DNA. Regiões do complexo ciclina-CDK podem servir como padrão para identificar sítios para interromper pontos de checagem do ciclo celular controles chaves que são essenciais para a proliferação celular.

Uso de peptídeos sintéticos para inibir a proliferação celular e o processo de seletivamente objetivar a proteína PCNA específica para câncer para mediar a inibição da proliferação celular é necessária para tratar câncer. Fármacos peptidomiméticos que interagem com um sítio抗igenico ou sítio alvo em caPCNA para interromper interações proteína-caPCNA específicas que são únicas para a célula de câncer são desejadas. Peptídeos derivados de epítopos específicos de caPCNA, aqui revelados, significantemente aumentaram 30 os efeitos citotóxicos dos regimes quimioterapêuticos tradicionais específicos e consequentemente matam células cancerosas em uma maneira altamente seletiva.

RESUMO

Peptídeos derivados de regiões específicas ou domínios de proteínas PCNA não-malignos (nmPCNA) ou proteínas de interagindo com (caPCNA ou csPCNA) específicas interferem com a interação de proteínas celulares com a proteína PCNA in vivo. Seqüências aminoácidas específicas representando fragmento peptídicos de a proteína caPCNA interromper a atividade regulatória do PCNA e subsequentemente inibem o crescimento da célula de câncer através da interrupção do funcionamento dos processos celulares que requerem PCNA, incluindo replicação de DNA, reparo, recombinação cromossomal, e ponto de checagem do ciclo celular controle.

Um método de seletivamente inibir a interação in vivo de uma isoforma específica de câncer de antígeno nuclear de proliferação celular (caPCNA) com uma proteína intracelular é uma célula maligna, o método inclui os passos de:

- (a)prover um agente que seletivamente interrompe a interação do caPCNA com a proteína intracelular;
- (b) administrar o agente tal que o agente contata uma população de células cancerosas in vivo; e
- (c) inibir a interação de caPCNA com a proteína intracelular.

O agente pode ser ou um peptídeo, peptidomimético, molécula pequena ou uma combinação dos mesmos. Em uma modalidade, o agente é um peptídeo que inclui uma seqüência aminoácida LGIPEQEY. Em outra modalidade, o agente é um peptidomimético que interage com a molécula de caPCNA em um sítio alvo compreendendo uma seqüência aminoácida LGIPEQEY.

Em uma modalidade, o agente é um peptídeo que ainda inclui uma seqüência tag ("marcador"). A seqüência tag podem incluir seqüência aminoácida RYIRS. Qualquer seqüência de translocação é adequada para uso aqui.

Em uma modalidade, o agente é administrado intravenosamente. Em uma modalidade, o agente é formulado em um sistema de distribuição terapêutico selecionado de um grupo que inclui lipossomo, micropartícula, e nanopartícula.

Em uma modalidade, o agente interrompe a interação de caPCNA com uma proteína intracelular que está envolvida em um processo celular selecionado de um grupo que inclui síntese de DNA, reparo de DNA, recombinação, transcrição, ponto de checagem do ciclo celular controle, e apoptose.

Em uma modalidade, o agente é uma molécula de peptídeo cuja seqüência aminoácida é derivada de um sítio antigênico em caPCNA. Em outra modalidade, o agente é uma molécula peptidomimética cuja estrutura molecular corresponde a um sítio antigênico no caPCNA. Em outra modalidade, o agente é uma molécula peptídica cuja seqüência aminoácida é derivada de um sítio de ligação da proteína em caPCNA.

Em uma modalidade, o agente é uma molécula peptidomimética cuja estrutura mo-

lecular corresponde a uma proteína, sítio de ligação em caPCNA.

Em uma modalidade, o agente é uma molécula pequena que compete com um sítio de ligação em caPCNA, em que o sítio de ligação é capaz de interagir com a proteína intracelular.

5 Um método de seletivamente inibir a interação in vivo de uma isoforma específica de câncer do antígeno nuclear de proliferação celular (caPCNA) com uma proteína intracelular em uma célula maligna, o método inclui os passos de:

(a) prover um agente que seletivamente interrompe a interação do caPCNA com a proteína intracelular, em que o agente é um peptídeo ou um peptidomimético, cuja seqüência aminoácida ou estrutura molecular é derivada de um sítio de ligação caPCNA na proteína intracelular que interage com o caPCNA;

10 (b) administrar o agente tal que o agente contata uma população de células cancerosas in vivo; e

(c) inibir a interação de caPCNA com a proteína intracelular.

15 Um método de redução da proliferação celular in vivo das células malignas que expressam uma isoforma específica de câncer do antígeno nuclear de proliferação celular (caPCNA), o método inclui os passos de:

(a) prover um agente que interrompe seletivamente a interação do caPCNA com uma proteína intracelular;

20 (b) administrar o agente tal que o agente contata uma população de células cancerosas in vivo; e

(c) reduzir a proliferação celular de células malignas.

Um método de aumentar a terapia de câncer para cânceres que expressam uma isoforma específica de câncer de antígeno nuclear de proliferação celular (caPCNA), o método inclui os passos de:

25 (a) prover um agente que seletivamente interrompe a interação do caPCNA com uma proteína intracelular;

(b) prover um agente quimioterápico para cânceres;

(c) administrar o agente e o agente quimioterápico tal que pelo menos uma porção dos agentes contata uma população de células cancerosas in vivo; e

30 (d) aumento da terapia de câncer, em que um número aumentado de células de câncer são mortas comparadas ao número de células de câncer mortas por quimioterapia sozinha.

Um método de identificar um agente candidato que seletivamente inibe interação in vivo de uma isoforma específica de câncer do antígeno nuclear de proliferação celular (caPCNA) com uma proteína intracelular em uma célula maligna, o método inclui os passos de:

- (a) prover um agente;
- (b) prover um peptídeo derivado de caPCNA;
- (c) identificar um agente que se liga ao peptídeo derivado de caPCNA; e
- (d) determinar o agente como o agente candidato, se o agente candidato inibe a interação do caPCNA com a proteína intracelular.

5 Metodologias de desenho de fármaco racional pode também ser implementada para obter inibidores específicos de interação celular caPCNA baseada na informação estrutural ou seqüencial de um peptídeo derivado de caPCNA, por exemplo, um peptídeo que tem uma seqüência aminoácida LGIPEQEY. Em uma modalidade, o agente é um fragmento 10 peptídico derivado de uma proteína intracelular. Em uma modalidade, a proteína intracelular é conhecida por interagir com caPCNA.

Uma composição terapêutica para reduzir proliferação celular in vivo de células malignas que expressam uma isoforma específica de câncer de antígeno nuclear de proliferação celular (caPCNA), a composição inclui uma molécula peptídica que tem uma seqüência 15 aminoácida LGIPEQEY ou uma estrutura funcionalmente equivalente do mesmo ou um peptidomimético do mesmo, em que a molécula peptídica é derivada da seqüência aminoácida de caPCNA. Em uma modalidade, a molécula peptídica ainda inclui um domínio peptídico que facilita a captação peptídica através das células.

Uma composição lipossomo para reduzir proliferação celular in vivo de células malignas que expressam uma isoforma específica de câncer de antígeno nuclear de proliferação celular (caPCNA), a composição inclui uma molécula peptídica compreendendo uma seqüência aminoácida LGIPEQEY ou uma estrutura funcionalmente equivalente do mesmo ou um peptidomimético do mesmo, em que a molécula de peptídeo é derivada da seqüência aminoácida de caPCNA.

25 Uma célula recombinante que expressa um peptídeo derivado de caPCNA, em que o peptídeo seletivamente interrompe a interação proteína-proteína em células de câncer. Em uma modalidade, o peptídeo derivado de caPCNA inclui uma seqüência aminoácida LGIPEQEY.

Um peptídeo sintético que inclui uma seqüência aminoácida LGIPEQEY e uma seqüência de translocação peptídica.

30 Uma composição terapêutica para redução da proliferação celular de células malignas que expressam uma isoforma específica de câncer do antígeno nuclear de proliferação celular (caPCNA) incluindo a molécula peptídica tendo uma seqüência aminoácida LGIPEQEY. A molécula peptídica é permeável a célula, inclui uma seqüência de translocação peptídica. O peptídeo é resistente a protease.

Agentes quimioterápicos adequados que são utilizados ao junto com os inibidores de peptídeos incluindo doxorubicina, paclitaxel, docetaxel, cisplatina, datrexato, gemicitabina,

ou vinorelbina ou uma combinação dos mesmos.

Outros inibidores de peptídeos derivados de PCNA adequados incluem VEQLGIPEQEY, LGIPEQEYSCVVK, LGIPEQEYSCVVKMPG, EQLGIPEQEY, QLGIPEQEY, LGIPEQEYSCVVKMPS, LGIPEQEYSCVVKMP, LGIPEQEYSCVVKM, LGIPEQEYSCVV, LGIPEQEYSCV, LGIPEQEYSC, LGIPEQEYS e combinações de aminoácidos de terminação NH₂ e COOH adicionais que ladeiam LGIPEQBY.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

FIG. 1 mostra análise de citometria de fluxo de experimentos de transfecção da seqüência de peptídeo alvo caPCNA com células de câncer de mama.

FIG. 2 mostra uma análise 2D-PAGE de frações da coluna de afinidade XPG-GST para PCNA.

FIG. 3 mostra a proteína de fusão SPG-GST especificamente imunoprecipitados caPCNA. Aliquotas de trinta µg de extrato de célula MCF7 foram tratadas como descrito no texto. O anticorpo PC10 utilizado para visualizar PCNA na análise de Western blot foi utilizada em uma diluição de 1:1000.

FIG. 4 mostra resultado de um método de ELISA para a detecção de caPCNA.

FIG. 5 mostra os resultados de um ELISA em que o anticorpo caPCNA (caPCNA) é ligado à placa e sendo utilizado para capturar o caPCNA isolado. Os poços são lavados e então incubados com anticorpo de cabra anti-PCNA (C20) que reconhece o C-terminal de 20 aminoácidos de PCNA. O anticorpo C20 ligado é visualizado com uma fosfatase alcalina conjugada ao anticorpo IgG anti-cabra, e complexo de anticorpo ligado é visualizado com fosfato de p-nitrofenol, e quantificado por espectrofotometria. Os experimentos de competição mostrados neste estudo envolve a incubação simultânea do ca(cs)PCNA com quantidades aumentadas do fragmento peptídico antigênico de caPCNA (referido como B1 ou o peptídeo PCNA aa126-133) neste ensaio. Redução na ligação do caPCNA na célula inteira em presença de concentrações aumentadas do peptídeo B1 são mostradas, e demonstraram que o ensaio de ELISA é específico para reconhecimento do epítopo caPCNA definido por essa seqüência peptídica.

FIG. 6 mostra a especificidade da seqüência peptídica como o epítopo reconhecido pelo anticorpo caPCNA.

FIG. 7 ilustra a interação do domínio de interação XPG-PCNA. O ensaio de ELISA descrito aqui foi utilizado para avaliar se o peptídeo B1 (PCNA aa126-133) pode interagir diretamente com XPG no domínio de interação PCNA-XPG definido.

FIG. 8 mostra que csPCNA especificamente se liga ao extrato nuclear celular XPG.MCF7 foi preparado, dialisado em tampão de baixo sal e carregado em uma coluna XPG-GST agarose pré-equilibrada em condições de tampão de baixo sal. A coluna foi lavada com 6 volumes de coluna de pré-equilibração de tampão. O fluxo de coluna através &

frações de lavagem foram coletadas como 1 fração. A coluna foi eluída utilizando condições de tampão & sal. (A) 2D-PAGE Western blot utilizado o anticorpo PC10 das frações de coluna de agarose XPS-GST. O anticorpo PC10 foi utilizado em uma diluição de 1:1000 na análise de Western. (B) análise de 1D-PAGE Western utilizando anticorpos PC10 e csPCNAab de frações de coluna de agarose XPG-GST. Anticorpos PC10 e csPCNAab foram utilizados em uma diluição de 1:1000 na análise de Western. M denota o marcador.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Métodos e composições revelados aqui se relacionam aos peptídeos (por exemplo, p21, XPG, Cdk2) derivados de proteína interagindo com caPCNA, peptidomiméticos, análogos funcionais das mesmas e pequenas moléculas que seletivamente interrompem as funções celulares vitais nas células cancerosas. Existem pelo menos dois modos de ações desses peptídeos. Por exemplo, peptídeos derivados de caPCNA ou competem com caPCNA para ligar às proteínas interagindo com caPCNA ou alternativamente liga a um sítio na proteína interagindo com caPCNA que interrompe a interação. Peptídeos derivados de proteína interagindo com caPCNA competem por seu sítio de ligação correspondente no caPCNA e assim previne as proteínas de interação caPCNA de ligar ao caPCNA.

Peptídeos específicos derivados da seqüência de proteína caPCNA têm a habilidade de bloquear a ligação de várias proteínas celulares que participam em ou na replicação de DNA, reparo, controle do ciclo celular, apoptose, transcrição, ou recombinação cromosomal nas células de câncer. A ligação do caPCNA à essas proteínas celulares é interrompida quando o peptídeo é deixado competir com essas proteínas para seu sítio de ligação de ocorrência natural no PCNA. Por interromper a interação de ocorrência natural entre PCNA e as proteínas que ligam a ou interage com PCNA, funções celulares normais que recrutam PCNA são interrompidas. Esta interrupção da maquinaria celular vital fazem os peptídeos derivados de caPCNA citotóxicos por eles mesmos ou em combinação com outras moléculas, tal como, por exemplo, fármacos quimioterapêuticos de câncer. Esses peptídeos, ou sozinhos ou em combinação com outros agentes de terapia de câncer são quimioterapêuticos de câncer úteis ou aumentadores do efeito farmacodinâmico dos quimioterapêuticos anti-câncer específicos. Essas moléculas peptídicas derivadas de PCNA são também úteis como inibidores de processos celulares específicos permitindo novas percepções mecanísticas e métodos terapêuticos para regular funções celulares específicas em ambas, células normais e de câncer que envolvem PCNA.

Em geral, inibidores de peptídeos são baseados sob o conceito que interações proteína-proteína interrompidas levarão as interrupções nos processos celulares mediados por essas interações de proteínas. Entretanto, esses inibidores de peptídeos não levam em consideração a necessidade de identificar uma seqüência aminoácida “específica para câncer” que é somente disponível na célula cancerosa, mas não na célula não cancerosa devi-

do a seqüência aminoácida sendo “oculta” na célula não cancerosa devido a uma variedade de meios tais como modificação pós-traducional, mudança conformacional protéica, ligação a uma proteína que é super-expressa na célula cancerosa, ou a perda do parceiro de ligação em uma célula cancerosa. Dessa forma a natureza específica do câncer das seqüências 5 alvo identificadas aqui é específica nas interações proteína-proteína interrompidas nas células de câncer.

Fragmentos de peptídeos derivados a partir de proteína de Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) são identificados aqui que têm a habilidade de agir, em conjunção com agentes de danos de DNA (por exemplo, doxorubicina), para aumentar os efeitos 10 terapêuticos de tais agentes para tratar uma variedade de células cancerosas. Esses peptídeos são derivados da seqüência aminoácida dentro de PCNA, por exemplo, compreendendo aminoácidos 126-133. Esta seqüência parece ser unicamente exposta em células de câncer, mas não células não câncer. Por prevenção das proteínas de ligação de PCNA, incluindo XPG, a partir da ligação diretamente de caPCNA em células de câncer os efeitos de 15 fármacos quimioterápicos incluindo agentes de danos ao DNA são aumentados. A citotoxicidade intrínseca da seqüência peptídica foi determinada por incubação de células adequadas ou com o peptídeo como um agente único ou em combinação com fármacos citotóxicos tal como doxorubicina. Culturas de células de leucemia U937 crescendo espontaneamente em meio de cultura tossular foram utilizadas. Uma proteína mediada por lipossoma transfere 20 técnica foi utilizada em que o peptídeo caPCNA (126-133) e doxorubicina foram encapsuladas em lipossomas e adicionados às culturas celulares a 10 µM. Utilizando a linhagem celular de leucemina U937, os resultados indicaram que o peptídeo tem uma citotoxicidade intrínseca, enquanto a incubação das células U937 com este peptídeo e uma variação de concentrações de doxorubicina aumentaram a citotoxicidade da doxorubicina por aproximadamente 25 3 vezes. Esta abordagem produziu mais de 50% de morte nas células cultivadas dentro de 24 horas que foi peptídeo/fármaco específico, e não devido a citotoxicidade mediada por lipossomo.

Como um controle positivo, essas células de leucemia também incubadas por várias horas (ou 4 ou 24 horas) com um peptídeo derivado a partir da proteína p21 waf, e como um controle negativo, um peptídeo derivado da proteína miosina de levedura. Os resultados indicaram que o peptídeo p21 foi muito citotóxico (>60% de morte) mesmo em ausência de doxorubicina, enquanto o peptídeo derivado de PCNA (aminoácidos 126-133) matou aproximadamente 20% das células de leucemia. Morte celular vs. dano celular foi avaliado por citometria de fluxo utilizando corante iodeto de propídeo e anexina V.

35 Esse estudo indicaram que o peptídeo correspondendo aos aminoácidos 126-133 dentro da seqüência PCNA, tem uma atividade quimioterapêutica anti-câncer. Em adição, os dados indicaram que seqüências peptídeos adicionais dentro ou da proteína PCNA, ou

qualquer de seus parceiros de ligação, pode similarmente interferir com os processos celulares específicos que regulam a proliferação celular e influencia a sobrevivência celular. Peptídeos das regiões de contato entre PCNA e proteínas com as quais o PCNA interage são capazes de interromper processos celulares críticos. Por exemplo, peptídeos adicionais a 5 partir dos sítios de interação de 3 outras proteínas conhecidas para ligar ao PCNA (isto é, Fen 1, p21, HDAC1), pode ser designado ter um papel inibitório nos processos críticos celulares tal como replicação de DNA e controle do ponto de checagem do ciclo celular. Esses peptídeos têm um efeito específico no câncer que diferencialmente inibe a proliferação de 10 célula cancerosa, enquanto tem pouco efeito na divisão de célula normal. Esta diferença no efeito depende, pelo menos em parte, nas diferenças dentro do sítio de interação entre caPCNA e seus parceiros ligantes se tornando estruturalmente alterado – uma mudança conformacional induzida por diferenças nas modificações pós-traducionais entre células malignas e não malignas). Como uma estratégia terapêutica, alterações na forma física dos 15 peptídeos, por exemplo, mudança na ocorrência natural da forma L-aminoácida para uma forma alternada, (por exemplo, mudando para a D-aminoácida, ou alterando a ligação peptídica entre aminoácidos individuais de forma que reduza degradação não específica por proteólise), é um método útil para prolongar a meia vida do peptídeo, quando esses peptídeos modificados são utilizados terapeuticamente.

Peptídeos derivados caPCNA e peptidomiméticos representam uma nova terceira 20 geração dos agentes terapêuticos anti-câncer com isso esses peptídeos seletivamente atuam como competidores dos componentes que utilizam PCNA na célula cancerosa. Os alvos moleculares representados por seqüências de peptídeos aminoácidas são expressas predominantemente nas células cancerosas. Dessa forma, os peptídeos revelados aqui representam um avanço significante sob a corrente segunda geração terapêutica em que a 25 segunda geração terapêutica corrente objetiva uma via específica que pode ser negativamente ou positivamente regulada ou expressa na célula cancerosa. No caso dos agentes da segunda geração, essas vias celulares são também ativas nas células não cancerosas e modulação de passos específicos dentro dessas vias por esses fármacos da segunda geração ou peptídeos ou agentes não podem significantemente discriminar entre células cancerosas 30 e células não cancerosas.

As seqüências peptídicas reveladas aqui objetivam uma região da proteína caPCNA que é provavelmente para ser unicamente não aberta em células cancerosas, e esses peptídeos consequentemente reagem com um anticorpo caPCNA seletivo. Então, os peptídeos revelados aqui são designados para seletivamente alvos de células malignas por virtude de sua habilidade em competir com caPCNA para regular a atividade de proteínas específicas interagindo com as seqüências aminoácidas dentro do PCNA que estão envolvidas em pelo menos um dos seguintes processos celulares: replicação de DNA, reparo, recombi-

nação, transcrição, controle do ponto de checagem do ciclo celular, e apoptose.

Os peptídeos revelados aqui são sintetizados utilizando procedimentos de síntese de peptídeo padrão e equipamentos ou podem ser obtidos comercialmente (por exemplo, United Biochemical Research Co., Seattle, WA). Um peptídeo derivados de caPCNA que inclui aminoácidos 126-133 da molécula PCNA humana (LGIPEQEY) seguida por uma seqüência do receptor de insulina (RYIRS) para facilitar a captação do peptídeo em células seletivamente inibe células cancerosas *in vitro*. Captação deste peptídeo foi iniciada por incubação deste peptídeo com as células cancerosas em presença de dimetil sulfóxido (DMSO) em ou salina tamponada com fosfato (PBS) ou meio de cultura contendo 0,2-2% de DMSO, sem soro por cerca de 4-24 horas. Captação deste peptídeo foi também eficientemente mediada por encapsulamento do peptídeo em uma formulação lipossomal e subsequente incubação com as células cancerosas a 37°C por cerca de 4-24 horas. Este peptídeo também aumenta os efeitos citotóxicos dos agentes quimioterápicos tal como doxorubicina.

O termo “agente” como aqui utilizado inclui ácidos nucléicos, proteínas, fragmentos de proteínas, peptídeos, peptídeos sintéticos, peptidomiméticos, análogos dos mesmos, pequenas moléculas, inibidores, e qualquer molécula química, orgânica ou bioorgânica capaz de afetar interação proteína-proteína ou um processo celular.

O termo “peptídeos derivados de caPCNA” e “peptídeos derivados de PCNA” significa peptídeos, seqüências de peptídeo modificada com substituições aminoácidas ou análogos aminoácidos ou deleções aminoácidas comparadas a uma região correspondente em PCNA, e peptidomiméticos que correspondem a uma região particular em PCNA. Os peptídeos derivados de PCNA podem variar de cerca de 5-50 aminoácidos em comprimento de cerca de 5-20 aminoácidos em comprimento ou cerca de 5-10 aminoácidos em comprimento. Os peptídeos derivados de PCNA podem também incluir tags de purificação tal como histag, epítopos FLAG, tag RYIRS, e seqüências que promovem a translocação através de membranas celulares. Os peptídeos derivados de PCNA podem também ser modificados para afetar sua lipofilicidade para aumentar a distribuição do peptídeo em células cancerosas. Os peptídeos podem ser sintetizados (“peptídeos sintéticos”) ou podem também ser produzidos através de técnicas recombinantes (“peptídeo recombinante”). Esses peptídeos podem também ser construídos para aumentar sua estabilidade *in vivo* sem significantemente aumentar sua eficácia em inibir as interações caPCNA-proteína. Mutações incluindo inserções, deleções, substituições, modificações aminoácidas que substancialmente não afetam a atividade inibitória dos peptídeos revelados aqui são também inclusos. Peptídeos que consistem essencialmente da seqüência 126-133 LGIPEQEY podem incluir outras seqüências específicas ou não específicas.

Um “derivado peptídeo” significa uma molécula tendo uma seqüência aminoácida de uma região de PCNA ou de um homólogo PCNA, mas adicionalmente tendo pelo menos

uma modificação química de um ou mais de seus grupos laterais aminoácidos, átomos a-carbono, grupo aminoterminal, ou grupo ácido carboxílico terminal. Uma modificação química incluir adição de frações químicas, criando novas ligações, e removendo frações químicas. Modificações nos grupos laterais aminoácidos incluem acilação de lisina, grupos a-amino, N-alquilação de arginina, histidina, ou lisina, alquilação de grupos ácidos carboxílicos glutâmicos ou aspárticos, e deamidação de glutamina ou asparagina. Modificações do amino terminal incluem o des-amino, N-alquil inferior, N-di-alquil inferior, e modificações N-acil. Modificações do grupo carbóxi terminal inclui as modificações amida, alquil amida inferior, dialquil amida, e alquil éster inferior. Um alquil inferior é um alquil C1-C4. Além disso, um ou mais grupos laterais, ou grupos terminais, podem ser protegidos por grupos protetores conhecidos por um versado ordinariamente na técnica protéica. O carbono a de um aminoácido pode ser mono- ou di-metilado.

Os peptídeos derivados de PCNA podem também serem fusionados ou de outra forma ligados por um receptor de superfície celular que está presente em células cancerosas. Por exemplo, o receptor de transferrina humana (hTfR), um marcador para proliferação celular é utilizado como um alvo para terapêuticos e é expresso pelo menos 100 vezes mais em oral, fígado, pancreáticos, próstata, e outros cânceres (Lee et al, (2001) "Receptor mediated uptake of peptides that bind the human transferrin receptor" *Eur. J. Biochem.*, 268: 2004-2012). Peptídeos, HAIYPRH e THRPPMWSPVWP se liga especificamente a hTfR e esses peptídeos foram capazes de direcionar macromoléculas associadas ao hTfR (Lee, acima). Esses peptídeos se ligam aos sítios que não se sobrepõem com o ligante nativo, Tf, e são úteis in vivo para alvos macromoleculares para a via endocítica nas células hTfR positivas (Lee, acima). Tais peptídeos podem também ser utilizados para direcionar peptídeos derivados de PCNA para aumentar a distribuição do peptídeo e também para adicionalmente aumentar a distribuição específica.

Exemplos de peptídeos permeáveis a célula adequados ou domínios peptídicos para ligar ou fundir peptídeos derivados de caPCNA incluem, por exemplo, peptídeos polibásicos pequenos derivados de domínios de transdução de certas proteínas, tal como a terceira hélice de Antennapedia (Antp) homeodomíño, uma seqüência RYIRS tag, Penetratin (RQIKIWFQNRRMKWKK), Tat (GRKKRRQRRPPQ), Transportan (GWTLSAGYLLG-KINKALAALAKKIL), VP22 (DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVD), peptídeos anfipáticos (secundário e primário), MAP (KLALKLALKALKAAALKLA), KALA (WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA), ppTG20 (GLFRALLRLRSLWRLLLRA), Tri-mer (VRLPPP), P1 (MGLGHLLVLAAALQGAWSQPKKKRKV), MPG (GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV), Pep-1 (KETWWETWWTEWSQPKKKRKV), hCT (LGTYTQSFNFHTFPQTAIGVGAP), e outros.

Quimioterapia específica para cânceres inclui paclitaxel, docetaxel, cisplatina, meto-

trexato, ciclofosfamida, 5-flúor uridina, Leucovorina, Irinotecan, Paclitaxel, Carboplatina, doxorubicina, fluoruracil carboplatina, edatrexato, gemcitabina, ou vinorelbina ou uma combinação dos mesmos.

Os peptídeos revelados aqui são também adequados para pacientes com câncer 5 submetidos a radioterapia e qualquer outras formas de terapia de câncer. Os inibidores de peptídeos revelados aqui são adequados aumentados agentes que podem ser administrados, ou antes, de, durante, e após administração de uma terapia de câncer particular, por exemplo, quimioterapia ou radioterapia.

É para ser entendido que cânceres adequados para tratamento utilizando os peptídeos revelados aqui incluem, mas não são limitados a, malignidades tais como várias formas de glioblastoma, glioma, astrocitoma, meningioma, neuroblastoma, retinoblastoma, melanoma, carcinoma de cólon, carcinoma de pulmão, adenocarcinoma, carcinoma cervical, carcinoma ovariano, carcinoma de bexiga, linfoblastoma, leucemia, osterosarcoma, carcinoma de mama, hepatoma, nefroma, carcinoma adrenal, ou carcinoma prostático, carcinoma esofágico. Se uma célula maligna expressa a isoforma csPCNA, as composições reveladas aqui são capazes de interromper a interação da isoforma caPCNA com uma ou mais proteínas.

O termo “peptidomimético” ou “peptídeo mimético” refere-se a um composto químico tendo uma cadeia do tipo proteína pequeno (peptídeo) que inclui elementos não peptídicos tal como aminoácidos não naturais. Peptidomiméticos são designados e sintetizados com o propósito de ligação a proteínas alvos a fim de induzir ou efetuar uma mudança particular. Geralmente, umas funções peptidomiméticas pode mimetizar ou antagonizar interações chaves da estrutura peptídica original que foi designada para mimetizar ou antagonizar. Um peptidomimético normalmente não tem características peptídicas clássicas tal como 20 ligações peptídicas enzimaticamente cliváveis. Para uma revisão geral das várias técnicas disponíveis para desenho e síntese de peptídeos miméticos, ver al-Obeidi *et al* (1998), “Peptide and peptidomimetic libraries. Molecular diversity and drug design” Mol. Biotechnol.; 9(3):205-23; e Houben-Weyl: *Synthesis of Peptides and Peptidomemetics*, Thieme Medical Publishers, 4^a edição (2003).

Em outra modalidade, peptídeos capazes de interromper interação ca(cs)PCNA inclui peptídeos de seqüências aminoácidas que incluem cerca de +3 aminoácidos contíguos ou não contíguos adicionais na terminação NH₂ de LGIPEQEY e cerca de +9 aminoácidos contíguos ou não contíguos no terminal COOH de LGIPEQEY. Por exemplo, alguns desses peptídeos incluem seqüências aminoácidas de VEQLGIGEQEY (+3-terminação NH₂), LGIPEQEYSCVVK (+5-terminação COOH), LGIPEQEYSCVVKMPG (+9-terminação COOH), EQLGIPEQEY (+2-terminação NH₂), QLGIPEQEY (+1-terminação NH₂), LGIPEQEYSCVVKMPS (+8- terminação COOH), LGIPEQEYSCVVKMP (+7-terminação COOH),

LGIPEQEYSCVVKM (+6-terminação COOH), LGIPEQEYSCVV (+4-terminação COOH), LGIPEQEYSCV (+3-terminação COOH), LGIPEQEYSC (+2-terminação COOH), LGIPEQEYS (+1-terminação COOH) e combinações dos aminoácidos das terminações NH₂ e COOH adicionais que ladeiam LGIPEQEY. Mutações aminoácidas incluindo substituições que não afetam a especificidade dos peptídeos em gerar anticorpos csPCNA específicos estão dentro do objetivo desta revelação. Um ou mais desses resíduos aminoácidos nos peptídeos podem ser substituídos com um análogo aminoácido ou um aminoácido não natural. Em adição, peptídeos miméticos desenvolvidos baseados nas seqüências dos peptídeos revelados aqui, podem também ser utilizados para gerar anticorpos para a isoforma csPC-NA.

Dose dos peptídeos derivados de PCNA e outros peptídeos derivados da proteína de interação com PCNA dependem da eficácia dos peptídeos, estabilidade dos peptídeos in vivo, modo de administração, natureza do câncer sendo tratado, peso corporal, idade do paciente e outros fatores que são comumente considerados por um versado na técnica. Por exemplo, dosagem de um fármaco peptídeo derivado de PCNA pode variar de cerca de 0,1-10,0 microgramas (mcg)/kg de peso corporal ou de cerca de 0,2-1,0 mcg/kg de peso corporal ou de cerca de 0,5-5,0 mcg/kg de peso corporal ou de cerca de 10,0-50,0 mcg/kg de peso corporal. Dependendo dos efeitos tóxicos e capacidade de matar o tumor, a dosagem por também variar de cerca de 1,0-10,0 mg/kg do peso corporal e de cerca de 0,1-1,0 mg/kg de peso corporal.

Administração das composições reveladas aqui pode ser através de qualquer via conhecida para ser efetiva pelo médico versado na técnica. Administrações periféricas, parenterais são adequadas. Administração parenteral é comumente entendida na literatura médica como a injeção de uma forma de dosagem no corpo por uma seringa estéril. Vias parenterais periféricas incluem vias de administração intravenosa, intramuscular, subcutânea e intraperitoneal. Vias de administração intravenosa, intramuscular e subcutânea das composições reveladas aqui são adequadas. Para administração parenteral, os peptídeos revelados aqui podem ser combinados com salina tamponada com fosfato (PBS) ou qualquer tampão de classificação farmacêutica livre de pirogênio adequada que encontra padrão FDA para administração a paciente humano. Como aqui utilizado, "veículo farmaceuticamente aceitável" inclui qualquer e todos os solvente, ou outro veículo líquido, ferramentas de dispersão ou suspensão, agentes de superfície ativos, agentes isotônicos, agentes espessantes ou emulsificantes, conservantes e semelhantes, como adaptado para a forma de dosagem particular desejada. Remington's Pharmaceutical Sciences, 20^a Edição, A.R. Gennaro (Williams e Wilkins, Baltimore, MD, 2000) revela vários veículos utilizados na formulação de composições farmacêuticas e técnicas conhecidas para a preparação das mesmas. Soluções ou suspensões das composições descritas aqui podem também incluir um diluente

estéril, tal como água para injeção, solução salina, óleos fixados, polietileno glicóis, glicerina, propilenoglicol ou outros solventes sintéticos; agentes quelantes, tal como EDTA; tampões, tais como acetatos, citratos ou fosfatos; e agentes para o ajuste de tonicidade, tais como cloreto de sódio ou dextrose. Uma preparação parenteral das composições pode ser confiada em ampolas, disponível em seringas ou frascos de dose múltipla feitas de vidro ou plástico, de acordo com a prática padrão no campo. As composições reveladas aqui podem ser estocadas como um pó estéril liofilizado em frascos contendo para reconstituição e o produto não reconstituído pode ser estocado a -20°C.

Peptídeos e outras composições reveladas aqui podem ser administrados através de quaisquer meios adequados. Por exemplo, as composições peptídicas podem ser diluídas em salina ou qualquer tampão adequado e administrado diretamente intravenosamente. Por exemplo, as composições peptídicas podem ser encapsuladas em lipossomos e administradas intravenosamente por qualquer método adequado. Por exemplo, as composições peptídicas podem ser distribuídas por um sistema de distribuição de fármaco de liberação estendida conhecido por um versado na técnica. Outros modos de direcionar tumores são também adequados. Por exemplo, publicação do pedido de patente dos EUA US20050008572 (Prokop *et al*) revela métodos e composições relacionados a direcionamento e terapia de tumor nanoparticular, a revelação do qual é aqui incorporada por referência. Publicação do pedido de patente dos EUA US2003021031 (Huang *et al*) revela complexos de distribuição de fármaco compreendendo líquido estável para sua produção, a revelação da qual é aqui incorporada por referência.

EXEMPLO 1

Efeitos citotóxicos de um peptídeo derivado de caPCNA em células de câncer de mama

Exponencialmente crescendo as células de câncer de mama foram crescidas em meio de cultura para 50% de confluências (FIG. 1). O meio foi então trocado e lipossomos que foram preparados a partir do reagente de transfecção (PJR) foram incubados com as células em meio fresco por um adicional de 24 horas antes de fazer a análise de citometria de fluxo nas células tratadas.

Lipossomos continham ou a região carboxil da proteína p21waf1, e/ou o peptídeo do sítio抗原 caPCNA (LGIPEQEY). Após 24 horas, as células foram coradas com iodeto de propídio e anticorpo anexina V fluorescentemente marcado. Células crescendo saudavelmente foram não permeáveis ao anticorpo como mostrado na esquerda inferior do painel da FIG. 1, enquanto células saudáveis permeabilizadas susceptíveis para o reagente de transfecção, mas ainda crescendo, foram corados com iodeto de propídeo. Células corando com o anticorpo anexina V indicaram algum nível de dano associado com a indução de células apoptóticas (quadrante direito inferior, FIG. 1), e/ou células que morreram a partir de ou

apoptose ou necrose (quadrante direito superior, FIG.1).

Esses resultados demonstram que células controles tratadas com salina produziram um perfil de fluxo associado com o 1º painel esquerdo superior (FIG. 1). Células tratadas com somente o reagente de transfecção afetaram levemente a condição das células e levaram a um leve aumento no número de células apoptóticas e necróticas. Células tratadas com o fragmento de peptídeo citotóxico p21 exibiram induziu morte celular (painel direito superior, FIG. 1), e células tratadas com o peptídeo caPCNA mostraram uma forte resposta citotóxica e a maioria das células em crescimento foram danificadas e foram no processo de se submeter ou a apoptose ou morte celular. Combinando o peptídeo caPCNA com 100 µM de doxorubicina resultou em quase 90% de morte celular dentro do período de tempo medido. Em adição, aproximadamente 5-7% das células remanescente pareceram estar sofrendo apoptose e foram condenadas a morte. Células tratadas com baixas doses de doxorubicina levam a um nível significante de morte celular, e combinando o peptídeo caPCNA com esta dose de doxorubicina leva a um efeito sinergístico que resultou em morte de quase todas as células que foram analisadas. Em concentrações subletais deste fármaco, exposição das células a um grupo de baixas concentrações do peptídeo significantemente aumenta a letalidade da doxorubicina.

EXEMPLO 2

Proteína de fusão XPG-GST preferencialmente se liga a caPCNA comparado a nmPCNA

Tentativas anteriores de isolar seletivamente e purificar caPCNA foram malsucedidas. Este problema foi superado por uso de um sistema de proteína de fusão SPG-GST imobilizada como uma matriz de afinidade para purificação caPCNA (FIG. 2). Comumente técnicas utilizadas para purificar PCNA que emprega passos de cromatografia na fosfocelulose, fenil Sefarose, e matrizes de Q-Sefarose resultado na presença de duas isoformas junto na fração de proteína. Para separar as duas isoformas PCNA, fragmento de proteína de fusão SPG-GST imobilizado foi incorporado em uma coluna de afinidade contido no esquema purificação (FIG. 3). Por causa das afinidades de ligação diferencial da porção XPG da proteína de fusão para duas isoformas de PCNA, esta metodologia resultou em uma purificação efetiva de um caPCNA a partir de nmPCNA. Análise subsequente de 2D-PAGE através do fluxo e eluente partir da coluna de afinidade (XPG-GST) demonstrou que a isoforma PCNA presente nas células não malignas, (nmPCNA), é encontrada através do fluxo da coluna de afinidade, enquanto a isoforma ácida (caPCNA) foi recuperado em uma fração eluída a partir da coluna (FIG. 2).

Extratos de células MCF7 (linhagem celular de adenocarcinoma de mama humana) foram processados para purificação do sintesoma. Sintesoma derivado de MCF7 foi então sujeito aos passos de cromatografia em matrizes de fosfocelulose, fenil Sefarose, e Q-

Sefarose como descrito em (Malkas, L. e Hickey, R. (1996) The expression, purification and characterization of DNA polymerases involved in papovavirus replication. Em: Methods in Enzymol Vol. 275: Viral Polymerases and Related Proteins, Acad. Press (1330167). A fração eluída em Q-Sefarose contendo ambas as isoformas nmPCNA e caPCNA foi então carregada em uma coluna de afinidade XPG-GST. A coluna foi eluída e ambos, a coluna de fluxo e eluato foram sujeito a análise de 2D-PAGE Western blot utilizando anticorpo PC10. O anticorpo PC10 foi utilizado em uma diluição de 1:1000 na análise de Western blot.

caPCNA foi especificamente imunoprecipitado de um extrato celular de MCF7 utilizando proteína de fusão XPG-GST (FIG. 3). Amostras de trinta micrograma de extrato celular de MCF7 foram incubadas com proteína de fusão XPG-GST por duas horas, seguido por incubação com esferas de Glutationa agarose por uma hora para capturar o XPG-GST. A mistura foi então centrifugada para coletar as esferas, e o sobrenadante e o concentrado de esferas de agarose contendo o complexo PCNA XPG-GST foram sujeitos a análise de 2D-PAGE Western blot. Os Western blots foram então provados utilizando anticorpo PC10 comercialmente disponível. Como pode ser visto na FIG. 3, XPG-GST foi facilmente capaz de reconhecer e caPCNA precipitado seletivamente a partir do extrato celular de câncer de mama MCF7, deixando a isoforma nmPCNA na fração de sobrenadante.

Exemplos 1 descreve o efeito de um peptídeo dericado de caPCNA na citotoxicidade de células cancerosas. O sítio de peptídeo derivado caPCNA em capCNA serve como um bloqueio molecular em que qualquer de uma variedade de proteínas chaves adequadas, por exemplo XGP (proteína Xeroderma Pigmentosum G). Essas proteínas interagindo servem como chaves que ativa processos celulares específicos tal como reparo de DNA, regulação do ponto de checagem do ciclo celular, e semelhantes, quando eles interagem com PCNA. O benefício terapêutico alcançado pela interrupção da ligação dessas proteínas para PCNA relaciona-se a diferença na estrutura deste sítio de ligação entre o câncer específico e isoformas celulares normais de PCNA, como demonstrado pela ligação preferencial do fragmento protéico da fusão XPG-GST ap imobilizado ao caPCNA, mas é oculto na isoforma nmPCNA. Este sítio de ligação é não disponível ou não acessível quando o peptídeo competindo está presente, ou o sítio de ligação tem uma afinidade para a ligação de proteína que difere entre os tipos de células malignas e não malignas.

Uso das “chaves” ligando ao “bloqueio” caPCNA, isto é, regiões ou domínios ou epítopos dentro das proteínas intracelulares de interação podem também ser utilizadas como potenciais terapêuticos e alvos terapêuticos potenciais. Evidência para a ligação seletiva de uma dessas proteínas para este sítio em PCNA é demonstrada na forma de um fragmento de proteína XPG fusionado ao produto de gene da glutationa-S-tranferase (isto é, GST) como provido nas FIGS. 2-4. O racional desta metodologia é baseado son a obsevação que um peptidominético (baseado sob o sítio antigênico de caPCNA) é capaz de aumentar a

morte celular cancerosa por doxorubicina. Isto provavelmente ocorre ou porque o peptídeo correspondendo a esta sírio antigênico diretamente compete com caPCNA para as proteínas ligando a caPCNA, ou liga a uma ou mais das proteínas específicas interagindo com PCNA, através deste sítio de ligação (aa 126-133 de caPCNA), antes de sua associação com caPCNA. Em outro cenário, a associação previne o peptídeo de um ou mais dessas proteínas com seu sítio ligante complementar em caPCNA. Esta competição ou ligante diferencial por sua vez interrompe os processos celulares específicos mediados por esta interação proteína-proteína, por exemplo, a via de reparo de excisão nucleotídica. FIG. 2 demonstra que a isoforma específica de câncer de PCNA (caPCNA) seletivamente se liga a uma coluna de afinidade preparado por acoplamento do fragmento aminoácido 29 da proteína XPG a Glutationa-S-transferase, e expressando a proteína de fusão em bactéria. A coluna de afinidade se liga a caPCNA sob condições de ligação apropriadas. Extração do caPCNA ligado é alcançada por redução da concentração de NaCl no tampão de 300 mM a zero mM. Este dado demonstra que a interação XPG-PCNA podem ser utilizada para seletivamente ligar a isoforma caPCNA. FIG. 3 provê ainda evidência para a ligação específica de caPCNA ao fragmento XPG expresso como parte do produto de fusão XPG-GST. Os dados demonstram que a proteína XPG-GST são utilizados para seletivamente se ligar e precipitar somente a isoforma caPCNA, enquanto permite a isoforma PCNA para permanecer em solução. Análises subsequentes, por 2G-PAGE, das proteínas seletivamente ligadas pela proteína de fusão XPG-GST imobilizada, seguida por Western blotting com anticorpo seletivo a PCNA, demonstrado que a isoforma específica de câncer de PCNA (acídico) foi especificamente ligada a proteína de fusão XPG-GST imobilizada; enquanto deixando a isoforma nmPCNA não ligada e um solução. FIG. 4 indica que a proteína de fusão XPG-GST pode ser utilizado como reagente primário levando a captura e quantificação de caPCNA presente em extratos tissulares. Resultados de ELISA mostram que XPG-GST capture caPCNA a partir de extratos celulares, e potencialmente de amostras de soro de paciente, se presente, e permite o eficiente monitoramento de caPCNA expresso por indivíduos com câncer ou indivíduos passando por tratamento para câncer.

Essas proteínas específicas derivadas de ca-PCNA e derivadas da interação de caPCNA e fragmentos de peptídeos são úteis ferramentas para diagnóstico bem como agentes terapêuticos valiosos. Em adição, esses fragmentos peptídicos também interrompem o crescimento celular e proliferação da célula cancerosa por interromper as interações proteína-proteína com o sítio antigênico em caPCNA, por exemplo, aminoácido 126-133.

EXEMPLO 3

Desenvolvimento de uma proteína de fusão XPS-GST baseada no ensaio de ELISA para a detecção da caPCNA

Um ensaio de ELISA utilizando a proteína de fusão XPG-GST foi desenvolvida para

detectar a abundância de caPCNA no complexo de misturas protéicas (FIG. 4). Proteína de fusão XPS-GST foi ligada aos poços da placa de ELISA, e aumentado quantidades de extratos de proteína a partir ou de células MCF7 maligna ou células mamárias MCF10A não malignas foram adicionadas em grupos individuais de poços. Sítios de ligação residual em cada poço foram bloqueados por incubação com 3% de BSA, seguido por extensiva lavagem com salina tamponada. O anticorpo C20 anti-PCNA comercialmente disponível foi utilizado como o anticorpo primário, e seguindo lavagem com salina tamponada com fosfato, cada poço foi incubado com IgG anti-cabra conjugado a peroxidase de rábano silvestre. Anticorpo secundário não especificamente ligado foi removido por lavagem de cada poço com salina tampão nata com fosfato contendo 0,05% de detergente Tween 20 e cada poço foi incubado com um tampão contendo ABTS [2,2'-Azino-bis [ácido 3-etilbenziazolina-6-sulfônico] por 30 minutos antes de ler a absorbância da solução a 405 nm. Extratos de células MCH10A contendo somente nmPCNA produziu um nível baixo de conversão de ABTS para um produto colorido que saturou em menos que 1 µg/mL de extrato. Em contraste, a reação de ELISA contendo extrato celular MCF7, contendo ambos, caPCNA e nmPCNA (Bechtel, acima) produziu 3 vezes mais produto colorido na mesma concentração de extrato, e não alcançando saturação mesmo com 3 vezes mais extrato celular na reação. A diferença na absorbância entre as reações contendo MCF10A e extratos celulares MCF7 representam a quantidade de caPCNA presente no extrato celular MCF7.

20 EXEMPLO 4

Especificidade da interação do peptídeo 126-133 PCNA

FIG. 5 mostra os resultados de um ELISA em que caPCNA está ligada a placa e sendo utilizada para capturar a caPCNA isolada. Os poços são lavados e então incubados com anticorpo de cabra anti-PCNA (C20) que reconhece os 20 aminoácidos C-terminais de 25 PCNA. Anticorpo C20 ligado é visualizado com uma fosfatase alcalina conjugada com anticorpo IgG anti-cabra, e complexo anticorpo ligado é visualizado com fosfato de p-nitrofenol, e quantificado por espectrofotometria. Os experimentos de competição mostrados neste estudo envolvem a incubação simultânea de ca(cs)PCNA com quantidades aumentadas do fragmento de peptídeo antigênico de caPCNA (referido como B1 ou o peptídeo aa126-133 30 PCNA) neste ensaio. Redução na ligação da molécula inteira de caPCNA em presença de concentrações aumentadas de peptídeo B1 são mostradas, e demonstram que o ensaio de ELISA é específico para reconhecimento do epítopo caPCNA definido pela seqüência peptídica.

O ensaio descrito na FIG. 5 foi utilizado para testar a especificidade do anticorpo combinando o sítio para o epítopo definido por PCNA aa126-133 (FIG. 6). O ensaio de ELISA foi feito como descrito no objetivo 1, entretanto, ou o peptídeo B1 ou uma seqüência peptídica (H-Ser-Ala-Cys-Glu-Gln-Ile-Leu-Lys-Asp-Thr-OH) tomada de dentro da proteína

miosina de levedura foi utilizada para competir pelo anticorpo em presença de caPCNA purificada. Como mostrado na FIG. 5, o peptídeo B1 eficientemente compete pelo sítio combinante do anticorpo, enquanto o peptídeo de miosina de levedura não relacionado (MAL4) não compete com caPCNA para ligar ao caPCNAab, e não diminui a quantidade de PCNA ligada ao caPCNAab imobilizado ligado a placa. Esses dados demonstraram a especificidade do anticorpo combinando o sítio para o epítopo em caPCNA que é definido pelo peptídeo B1.

O ELISA descrito aqui foi utilizado para monitorar a habilidade de dois peptídeos para interromper a ligação de caPCNA ao anticorpo caPCNA ligado. Um peptídeo (H-Gly-Arg-Lys-Arg-Arg-Gln-Thr-Ser-Met-Thr-Asp-Arg-Tyr-His-Ser-Lys-Arg-Arg-Leu-Ile-Phe-Ser-OH) correspondendo aos sítios de interação de proteínas p21cip/waf1 com PCNA foi avaliado neste ensaio, e é mostrado não ter efeito na ligação de caPCNA para ligar o anticorpo caPCNA neste ensaio de ELISA (FIG. 7). O outro peptídeo (H-Gln-Thr-Gln-Leu-Arg-Ile-Asp-Ser-Phe-Phe-Arg-OH) correspondendo ao sítio de interação XPG-PCNA da proteína XPG efetivamente competiu com a caPCNA purificada para ligar o anticorpo cPCNA, e显著mente reduziu a geração do substrato colorido no ensaio na proporção direta para a quantidade de peptídeo XPG utilizado neste ensaio de competição. O peptídeo XPG não interage sozinho com o anticorpo caPCNA, como ele é não relacionado para o peptídeo antigenico. Dessa forma, o peptídeo XPG interage com seu sítio de ligação de PCNA reconhecido a fim de bloquear a ligação da proteína de PCNA para o anticorpo caPCNA. Isto acontece se o epítopo reconhecido pelo anticorpo foi mascarado por especificamente ligação do peptídeo XPG. Estes dados indicam que ambos, peptídeo caPCNA (aa126-133) e peptídeos que interagem com sítios específicos dentro do PCNA, tal como o peptídeo XPG e outros parceiros de ligação de PCNA conhecidos, podem interromper o reconhecimento de PCNA por seus parceiros de ligação regular e potencialmente interrompem as funções celulares dependentes dessas interações proteína-proteína.

EXEMPLO 5

Diferenças funcionais entre as isoformas PCNA parte II: XPG liga especificamente ao csPCNA.

Uma coluna de agarose XPG-GST foi preparada e subsequentemente resolvida, & núcleo celular de câncer de mama extraído utilizando a coluna. O fluxo da coluna, lavagem da coluna, e condições de eluição foram utilizadas baseadas nas condições de ligação XPG-PCNA. Análises2D-PAGE do fluxo+lavagem e frações de proteína eluente a partir da coluna de afinidade (XPG-GST) mostraram que a isoforma básica de PCNA presente nas células não malignas (nmPCNA) foi encontrado no fluxo da coluna de agarose XPG-GST + fração lavada, enquanto a isoforma PCNA acídica, csPCNA, foi recuperada na fração de proteína eluída a partir da coluna (FIG. 8A). Uma análise de 1D-PAGE Western das frações da colu-

na XPG-GST foi feita utilizando ambos anticorpos PC10 e csPCNAab (FIG. 8B). Isto mostrou que csPCNAab somente reconheceu a isoforma PCNA contida na fração eluente da coluna de agarose XPG-GST sugerindo que XPG preferencialmente se liga a csPCNA sob condições utilizadas para resolver a coluna, e que as isoformas PCNA têm afinidades diferentes para parceiros de ligação de PCNA conhecidos.

5

Tabela 1: Domínios peptídicos contendo a região de PCNA aa126-133

seqüência PCNA 111-125
LVFEAPNQE K VSDYEMKLMD LDVEQLGIPEQEYSCVVKMP SGEFARICRD LSHIGDAVVI SCAKDGVKFS ASGELGN GNI KLSQTSNVDK EEEAVTIEMN
seqüência PCNA 118-135
LVFEAPNQE K VSDYEMKLMD LDVEQLGIPEQEYSCVVKMP SGEFARICRD LSHIGDAVVI SCAKDGVKFS ASGELGN GNI KLSQTSNVDK EEEAVTIEMN
seqüência PCNA 121-133
LVFEAPNQE K VSDYEMKLMD LDVEQLGIPEQEYSCVVKMP SGEFARICRD LSHIGDAVVI SCAKDGVKFS ASGELGN GNI KLSQTSNVDK EEEAVTIEMN
seqüência PCNA 126-133
LVFEAPNQE K VSDYEMKLMD LDVEQLGIPEQEYSCVVKMP SGEFARICRD LSHIGDAVVI SCAKDGVKFS ASGELGN GNI KLSQTSNVDK EEEAVTIEMN
seqüência PCNA 126-143
LVFEAPNQE K VSDYEMKLMD LDVEQLGIPEQEYSCVVKMP SGEFARICRD LSHIGDAVVI SCAKDGVKFS ASGELGN GNI KLSQTSNVDK EEEAVTIEMN
seqüência PCNA 126-153
LVFEAPNQE K VSDYEMKLMD LDVEQLGIPEQEYSCVVKMP SGEFARICRD LSHIGDAVVI SCAKDGVKFS ASGELGN GNI KLSQTSNVDK EEEAVTIEMN
seqüência PCNA 126-163
LVFEAPNQE K VSDYEMKLMD LDVEQLGIPEQEYSCVVKMP SGEFARICRD LSHIGDAVVI SCAKDGVKFS ASGELGN GNI KLSQTSNVDK EEEAVTIEMN

As regiões contendo o domínio 126-133 são mostradas como sublinhadas.

Listagem de Seqüências

<110> Indiana University Research And Technology Corporation

<120> Inibição baseada em peptídeo de interação com PCNA em câncer

<130> 29920-201293

<140> PCT/US2007/062335

<141> 2007-02-16

<150> 60/743,313

<151> 2006-02-17

<160> 38

<170> **Versão em Patente 3.4**

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> **sintético**

<400> 1

Leu Gly Ile Pro Glu Gln Glu Tyr
1 5

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> **sintético**

<400> 2

Val Glu Gln Leu Gly Ile Pro Glu Gln Glu Tyr
1 5 10

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> **sintético**

<400> 3

Leu Gly Ile Pro Glu Gln Glu Tyr Ser Cys Val Val Lys
1 5 10

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> **sintético**

<400> 4

Leu Gly Ile Pro Glu Gln Glu Tyr Ser Cys Val Val Lys Met Pro Ser
1 5 10 15

Gly

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

) <220>

<223> **sintético**

<400> 5

Glu Gln Leu Gly Ile Pro Glu Gln Glu Tyr
1 5 10

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> **sintético**

<400> 6

Gln Leu Gly Ile Pro Glu Gln Glu Tyr
1 5

) <210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> **sintético**

<400> 7

Leu Gly Ile Pro Glu Gln Glu Tyr Ser Cys Val Val Lys Met Pro Ser
1 5 10 15

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 8

Leu Gly Ile Pro Glu Gln Glu Tyr Ser Cys Val Val Lys Met Pro
1 5 10 15

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 9

Leu Gly Ile Pro Glu Gln Glu Tyr Ser Cys Val Val Lys Met
1 5 10

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 10

Leu Gly Ile Pro Glu Gln Glu Tyr Ser Cys Val Val
1 5 10

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 11

Leu Gly Ile Pro Glu Gln Glu Tyr Ser Cys Val
1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 12

Leu Gly Ile Pro Glu Gln Glu Tyr Ser Cys
1 5 10

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> **sintético**

<400> 13

Leu Gly Ile Pro Glu Gln Glu Tyr Ser
1 5

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> **sintético**

<400> 14

His Ala Ile Tyr Pro Arg His
1 5

<210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> **sintético**

<400> 15

Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro
1 5 10

<210> 16
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> **sintético**

<400> 16

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 17
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 17

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
1 5 10

<210> 18

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 18

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu
1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
20 25

<210> 19

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 19

Asp Ala Ala Thr Ala Thr Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Arg Pro Thr
1 5 10 15

Glu Arg Pro Arg Ala Pro Ala Arg Ser Ala Ser Arg Pro Arg Arg Pro
20 25 30

Val Asp

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 20

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ala

<210> 21
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> sintético

<400> 21

Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys His
1 5 10 15

Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Ala Cys Glu Ala
20 25 30

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

<220>
<223> sintético

<400> 22

Gly Leu Phe Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Arg Ser Leu Trp Arg Leu
1 5 10 15

Leu Leu Arg Ala
20

<210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> sintético

<400> 23

Val Arg Leu Pro Pro Pro
1 5

<210> 24
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> sintético

<400> 24

Met Gly Leu Gly Leu His Leu Leu Val Leu Ala Ala Ala Ala Leu Gln Gly
 1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 20 25

<210> 25
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> **sintético**

<400> 25

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
 1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 20 25

<210> 26
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> **sintético**

<400> 26

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val
 20

<210> 27
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> **sintético**

<400> 27

Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Phe Asn Lys Phe His Thr Phe Pro Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro
 20

<210> 28

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

<220>
<223> **sintético**

<400> 28

Ser Ala Cys Glu Gln Ile Leu Lys Asp Thr
1 5 10

<210> 29
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> **sintético**

<400> 29

Gly Arg Lys Arg Arg Gln Thr Ser Met Thr Asp Arg Tyr His Ser Lys
1 5 10 15

Arg Arg Leu Ile Phe Ser
20

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> **sintético**

<400> 30

Gln Thr Gln Leu Arg Ile Asp Ser Phe Phe Arg
1 5 10

<210> 31
<211> 100
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> **sintético**

<400> 31

Leu Val Phe Glu Ala Pro Asn Gln Glu Lys Val Ser Asp Tyr Glu Met
1 5 10 15

Lys Leu Met Asp Leu Asp Val Glu Gln Leu Gly Ile Pro Glu Gln Glu
20 25 30

Tyr Ser Cys Val Val Lys Met Pro Ser Gly Glu Phe Ala Arg Ile Cys
 35 40 45

Arg Asp Leu Ser His Ile Gly Asp Ala Val Val Ile Ser Cys Ala Lys
 50 55 60

Asp Gly Val Lys Phe Ser Ala Ser Gly Glu Leu Gly Asn Gly Asn Ile
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Gln Thr Ser Asn Val Asp Lys Glu Glu Ala Val Thr
 85 90 95

Ile Glu Met Asn
 100

<210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> **sintético**

<400> 32.

Val Ser Asp Tyr Glu Met Lys Leu Met Asp Leu Asp Val Glu Gln
 1 5 10 15

<210> 33
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> **sintético**

<400> 33

Leu Met Asp Leu Asp Val Glu Gln Leu Gly Ile Pro Glu Gln Glu Tyr
 1 5 10 15

Ser Cys

<210> 34
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> **sintético**

<400> 34

Asp Val Glu Gln Leu Gly Ile Pro Glu Gln Glu Tyr

1

5

10

<210> 35
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> **sintético**

<400> 35

Leu Gly Ile Pro Glu Gln Glu Tyr Ser Cys Val Val Lys Met Pro Ser
 1 5 10 15

Gly Glu

<210> 36
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> **sintético**

<400> 36

Leu Gly Ile Pro Glu Gln Glu Tyr Ser Cys Val Val Lys Met Pro Ser
 1 5 10 15

Gly Glu Phe Ala Arg Ile Cys Arg Asp Leu Ser His
 20 25

<210> 37
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> **sintético**

<400> 37

Leu Gly Ile Pro Glu Gln Glu Tyr Ser Cys Val Val Lys Met Pro Ser
 1 5 10 15

Gly Glu Phe Ala Arg Ile Cys Arg Asp Leu Ser His Ile Gly Asp Ala
 20 25 30

Val Val Ile Ser Cys Ala
 35

<210> 38
 <211> 5

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> **sintético**

<400> 38

Arg Tyr Ile Arg Ser
1 5

REIVINDICAÇÕES

1. Composição terapêutica para redução da proliferação celular de células malignas que expressam uma isoforma específica de câncer de antígeno nuclear de proliferação celular (caPCNA) **CARACTERIZADA** pelo fato de compreender uma molécula de peptídeo com preendendo uma seqüência aminoácida LGIPEQEY, em que o peptídeo especificamente inibe a interação da PCNA com uma ou mais proteínas.
 - 5 2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a molécula de peptídeo é uma molécula sintética.
 - 10 3. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a molécula de peptídeo é permeável a célula.
 - 15 4. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o peptídeo compreende uma seqüência de translocação.
 - 20 5. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o peptídeo é resistente a protease.
 6. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de compreender um agente quimioterápico.
 7. Composição, de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o agente quimioterápico é selecionado a partir do grupo consistindo de doxorubicina, paclitaxel, docetaxel, cisplatina, datrexato, gemcitabina, ou vinorelbina ou uma combinação dos mesmos.
 8. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de compreender um lipossomo.
 9. Uso da composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de seletivamente inibir a interação de uma isoforma específica de câncer do antígeno nuclear de proliferação celular (caPCNA) com uma proteína intracelular em uma célula maligna, o uso compreendendo:
 - (a) prover a composição, de acordo com a reivindicação 1, que seletivamente interrompe a interação da caPCNA com a proteína intracelular;
 - (b) administração da composição tal que o agente contata uma população de células cancerosas; e
 - (c) inibe a interação da caPCNA com a proteína intracelular.
 10. Uso, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a composição é administrada intravenosamente.
 11. Uso, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a interação do caPCNA com a proteína intracelular está envolvida em um processo celular selecionado do grupo consistindo de síntese de DNA, reparo de DNA, recombinação, transcrição, controle do ponto de checagem do ciclo celular, e apoptose.

12. Uso de uma composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de reduzir a proliferação de células malignas que expressam uma isoforma específica de câncer do antígeno nuclear de proliferação celular (caPCNA), o uso compreendendo:
- 5 (a) prover a composição, de acordo com a reivindicação 1, que seletivamente interrompe a interação da caPCNA com a proteína intracelular;
- (b) administração da composição tal que o agente contata uma população de células cancerosas; e
- (c) redução da proliferação de células malignas.
13. Uso da composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato aumentar a terapia de câncer para cânceres que expressam uma isoforma específica de câncer do antígeno nuclear de proliferação celular (caPCNA), o método compreendendo:
- 10 (a) prover a composição, de acordo com a reivindicação 1, em que a composição compreende um agente quimioterápico para cânceres;
- (b) administração da composição compreendendo o agente quimioterápico tal que pelo menos uma porção dos agentes contata uma população de células cancerosas; e
- 15 (c) aumento da terapia do câncer por aumentar a morte de células cancerosas ou por reduzir o potencial proliferativo das células de câncer, comparadas ao número de células cancerosas mortas por quimioterapia sozinha.

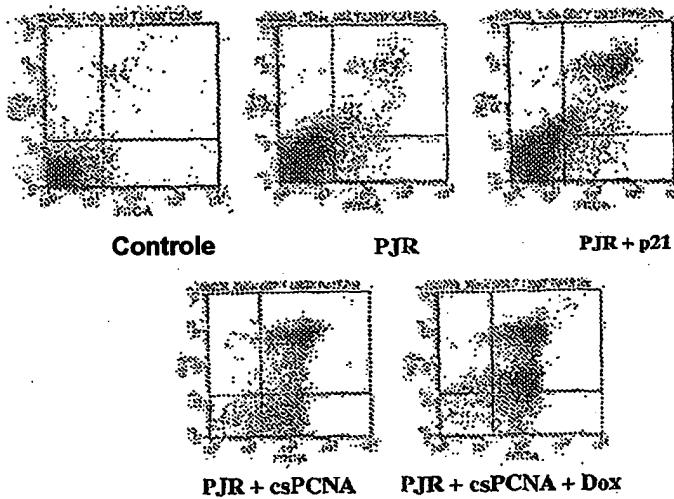


FIG. 1

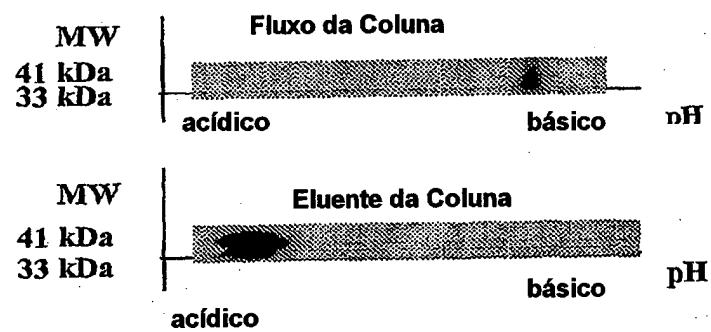
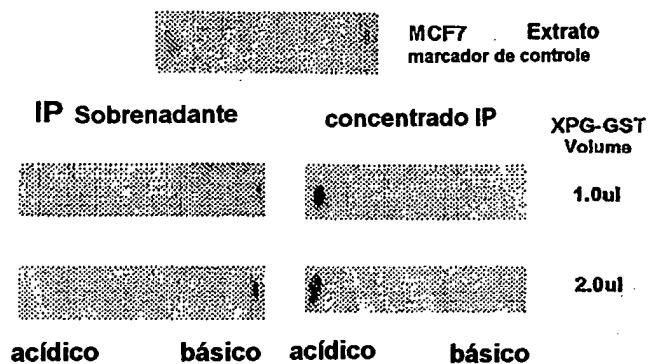
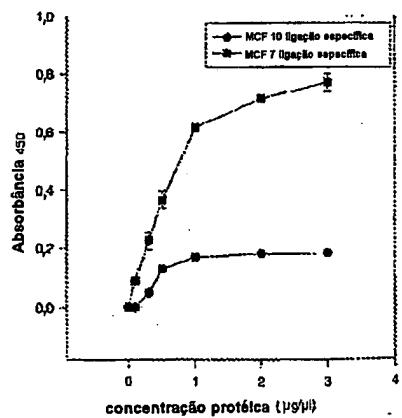
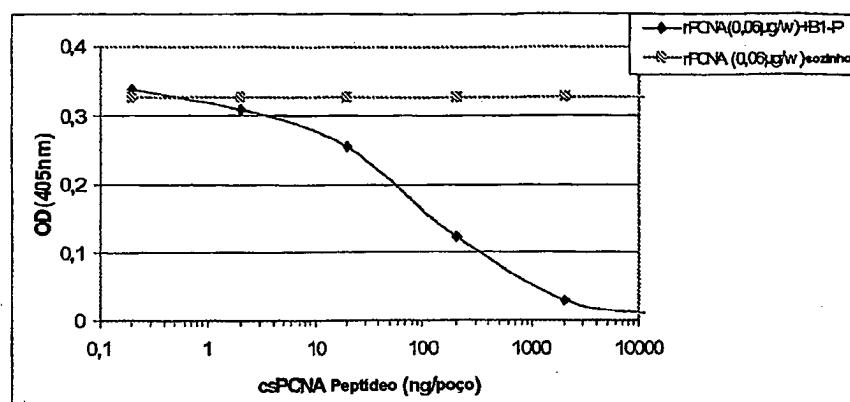
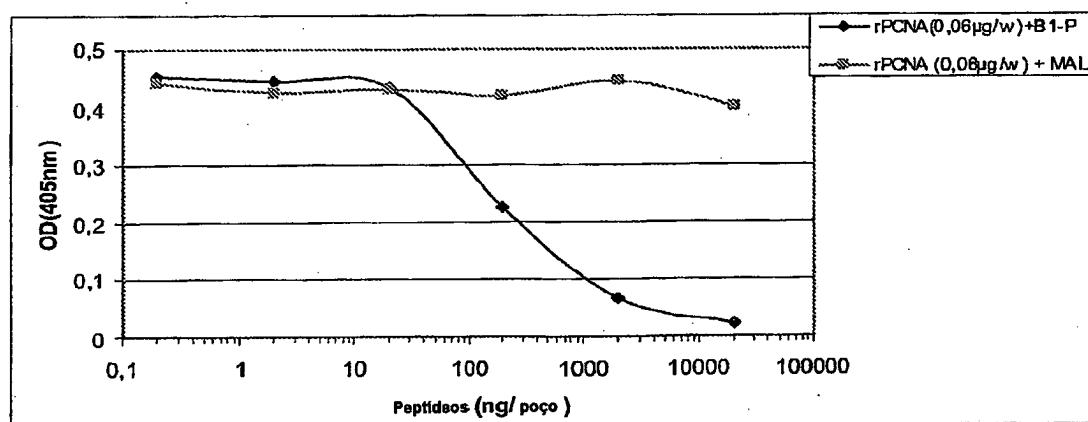


FIG. 2

**FIG. 3****FIG. 4**

**FIG. 5****FIG. 6**

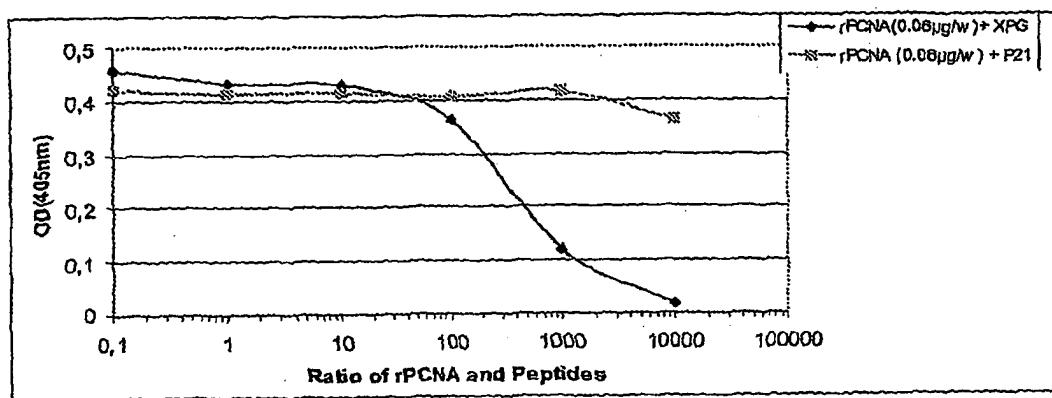


FIG. 7

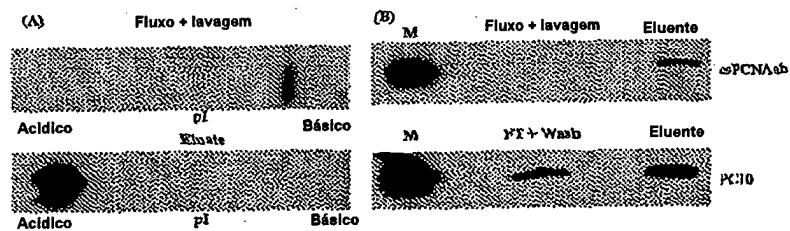


FIG. 8

PI0707948-0

RESUMO

“INIBIÇÃO BASEADA EM PEPTÍDEO DA INTERAÇÃO caPCNA EM CÂNCER”

Peptídeos derivados da isoforma específica de câncer de antígeno nuclear de proliferação celular (caPCNA, também conhecido como csPCNA) ou a partir de proteínas interagindo com nmPCNA interferem com a interação proteína-proteína intracelular, dessa forma causando uma redução no potencial proliferativo do câncer. Esses peptídeos servem como composições terapêuticas para reduzir a proliferação de células cancerígenas e também aumento dos métodos quimioterapêuticos existentes.