

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

(21) **PI0615562-6 A2**



(22) Data de Depósito: 19/07/2006  
(43) Data da Publicação: 26/01/2010  
(RPI 2038)

(51) *Int.Cl.*:  
C12P 21/04 (2010.01)

(54) Título: **AGENTES DE TRANSPORTE PARA ATRAVESSAMENTO DA BARREIRA SANGUE-CÉREBRO E ENTRADA NAS CÉLULAS CANCERÍGENAS DO CÉREBRO E MÉTODOS PARA O SEU USO**

(30) Prioridade Unionista: 06/10/2005 US 11/244,105, 19/07/2005 US 60/700,297, 06/07/2006 US 60/818,510, 06/07/2006 US 60/818,510, 06/07/2006 US 60/818,510, 06/10/2005 US 11/244,105, 19/07/2005 US 60/700,297

(73) Titular(es): The Board Of Trustees Of The University Of Illinois

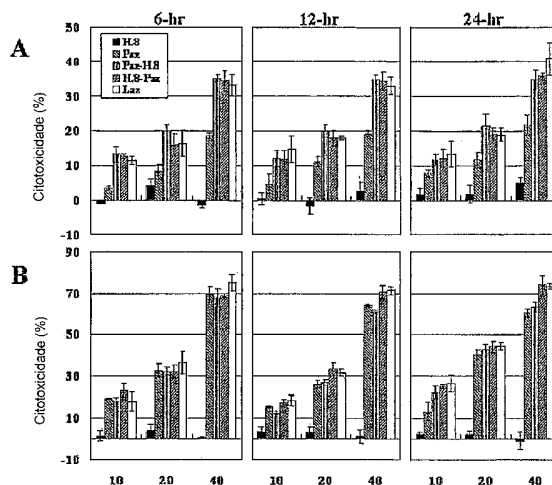
(72) Inventor(es): Ananda Chakrabarty, Arsenio Fialho, Chang Hong, Tapas das Gupta, Tohru Yamada

(74) Procurador(es): Miranda, Lynch & Kneblewski Ltda

(86) Pedido Internacional: PCT US2006028022 de 19/07/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/012004 de 25/01/2007

(57) Resumo: AGENTES DE TRANSPORTE PARA ATRAVESSAMENTO DA BARREIRA SANGUE-CÉREBRO E ENTRADA NAS CÉLULAS CANCERÍGENAS DO CÉREBRO E MÉTODOS PARA O SEU USO. Onde são revelados os métodos e materiais para a liberação de um composto de carga nas células cancerígenas do cérebro e/ou através da barreira cérebro-sangue. A liberação do composto de carga é acompanhada pelo uso de peptídeos de transporte de proteína derivados das proteínas da membrana externa da Neisseria, por exemplo, Laz. A invenção também fornece peptídeos de trânsito sintéticos contendo pentapeptídeos de AAEAP. A invenção também revela os métodos para tratamento de câncer, especificamente câncer cerebral, bem como outras condições relacionadas ao cérebro. Além disso, a invenção fornece métodos de formação de imagem e diagnóstico do câncer, em particular o câncer cerebral.



**AGENTES DE TRANSPORTE PARA ATRAVESSAMENTO  
DA BARREIRA SANGUE-CÉREBRO E ENTRADA NAS CÉLULAS  
CANCERÍGENAS DO CÉREBRO E MÉTODOS PARA O SEU USO.**

**PEDIDOS CORRELATOS**

5        Este pedido reivindica prioridade de acordo com 35 U.S.C. §§119 e  
120 para o Pedido de Patente Provisória Norte-Americana Nº 60/818.510,  
depositado em 06 de julho de 2006, com o título "Agentes de Transporte para  
Atravessamento da Barreira Sangue-Cérebro e Entrada nas Células  
Cancerígenas do Cérebro e Métodos para o seu Uso", Pedido de Patente  
10    Provisória Norte-Americana Nº 60/700.297, depositado em 19 de julho de  
2005 e Pedido de Patente Norte-Americana Nº 11/244.105, depositado em 06  
de outubro de 2005. O conteúdo completo desses pedidos está totalmente aqui  
incorporado por referência.

**DECLARAÇÃO DE INTERESSE PÚBLICO**

15        O objeto deste pedido foi patrocinado por uma subvenção de  
pesquisa dos Institutos Nacionais de Saúde (NIH [*National Institutes of  
Health*]), Bethesda, Maryland, EUA, (Número da Subvenção ES 04050-18).  
O governo poderá ter determinados direitos sobre esta invenção.

**HISTÓRICO**

20        O desenvolvimento de novos medicamentos para o cérebro tem  
avanzado em passos muito mais lentos que para o resto do corpo. Esse  
progresso lento é devido, em grande parte, à inabilidade de muitos  
medicamentos em atravessar a parede capilar cerebral, que forma a barreira  
sangue-cérebro (BBB [*blood-brain barrier*]), para penetrar no cérebro.  
25    Aproximadamente 100% dos medicamentos para moléculas grandes não  
atravessam a BBB. Apenas uma pequena classe de medicamentos de  
pequenas moléculas com lipídeos de alta solubilidade e massa molecular  
menor que 400-500 daltons realmente cruzam a BBB. Além disso, das  
pequenas moléculas que atravessam a BBB, apenas uma pequena  
30    porcentagem atravessa em quantidade farmacologicamente significativa

(Pardridge, Molecular Innovations 3:90-103 (2003)).

Apenas poucas doenças cerebrais respondem aos medicamentos de molécula pequena que podem atravessar a BBB, como a depressão, distúrbios afetivos, dores crônicas e epilepsia. Muito mais doenças do cérebro não respondem aos medicamentos de pequena massa molecular solúveis em lipídios, como o mal de Alzheimer, acidente cardiovascular / neuroproteção, lesão cerebral e da medula espinal, câncer cerebral, infecção por HIV do cérebro, vários distúrbios causadores da ataxia, esclerose lateral amiotrófica (ALS), mal de Huntington, erros genéticos congênitos na infância que afetam o cérebro, mal de Parkinson e múltipla esclerose. Mesmo as poucas doenças cerebrais para as quais estão disponíveis medicamentos de molécula pequena requerem pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos. *Id.*

Os cânceres do cérebro são particularmente difíceis de serem tratados. As formas comuns de câncer no cérebro são o glioblastoma multiforme (GBM) e o astrocitoma anaplásico (AA). A sobrevivência média para pacientes com GBM é de aproximadamente 10 a 12 meses, enquanto que a sobrevivência média para pacientes com AA é de 3 a 4 anos. Para pacientes com GBM, a cirurgia prolongará suas vidas em apenas alguns meses (Kufe *et al*, Cancer Medicine, §§ 23 e 83, (6<sup>a</sup> ed. BC Decker, 2003)). A maioria dos casos em que o tratamento de GBM foi a cirurgia e a irradiação local resulta em recidivas no intervalo de 2 a 4 cm das margens do tumor original. *Id.*

As abordagens atuais para a administração de medicamentos que não atravessam a BBB no cérebro incluem a craniotomia, processo através do qual um orifício é perfurado na cabeça e o medicamento é administrado tanto por injeção intracerebroventricular (ICV) ou intracerebral (IC). Com a administração IC, o medicamento permanece no local do depósito na ponta da agulha. Com a administração ICV, o medicamento se espalha apenas na superfície ependimal do ventrículo ipsilateral e não penetra significativamente no parênquima cerebral. Portanto, os métodos de administração IVC e IC atingem menos de 1% do volume cerebral e há poucas doenças cerebrais que

podem ser tratadas por tão limitada penetração. *Id.*

Em contraste, a rota transvascular da liberação medicamentosa pode tratar virtualmente 100% dos neurônios do cérebro. Uma vez que todos os neurônios são cobertos por seu próprio vaso sanguíneo, um medicamento administrado tranvascularmente pode atingir todos os neurônios do cérebro após atravessar a BBB. Entretanto, uma vez que não existe um sistema focado em medicamento que o permita atravessar a BBB, a rota transvascular de administração não está disponível para a grande maioria dos pretensos medicamentos.

10 A despeito do fato de que a maioria dos medicamentos e outras moléculas não conseguirem atravessar a BBB, determinados patógenos bacterianos e virais/fúngicos são conhecidos por atravessarem a BBB e provocar a infecção (Nassif *et al*, Trends Microbiol. 10:227-232 (2002)). Os referidos patógenos bacterianos podem ser tanto extracelulares, como a  
15 *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Escherichia coli K-1*, quanto intracelulares como a *Listeria monocytogenes* ou *Mycobacterium tuberculosis*. Enquanto os patógenos intracelulares invadem principalmente as meninges cerebrais, escondendo-se dentro dos leucócitos infectados, os patógenos extracelulares entram no sistema nervoso central, inicialmente pela  
20 disseminação no fluxo sanguíneo e em seguida pela interação direta com o lado luminal do endotélio cerebral, assim rompendo as apertadas junções das células endoteliais microvasculares do cérebro (Nassif *et al.*, *id.*; Drevets e Leenen, Microbes Infect. 2:1609-1618 (2000); Kim, Subcell. Biochem. 33:47-59 (2000)). Essa interação permite que o patógeno invada as meninges do  
25 cérebro, causando a meningite. Usando os modelos de monocamada e bicamada *in vitro* para atravessar a BBB, bem como para isolar os mutantes bacterianos incapazes de fazer a travessia através das referidas mono ou bicamadas, uma variedade de proteínas bacterianas foram envolvidas na invasão geral e cruzamento da BBB (Huang e Jong, Cell. Microbiol. 3:277-  
30 287 (2001)). Por exemplo, os genes *E. coli K-1* como *ibeA*, *ibeB*, *aslA*, *yijP* e

*ompA* ou *N. meningitidis* que codificam as proteínas, tais como os tipos IV pili, Opc, Opa, etc., e as proteínas virais como as da superfície de HIV, a gpl20, foram todos sugeridos por permitir a invasão efetiva e o atravessamento da BBB e causar a infecção. No caso dos patógenos bacterianos extracelulares, acredita-se que tais proteínas permitem a aderência e a subsequente ruptura da BBB para invasão das meninges (Nassif *et al.*, *id.*; Huang & Jong, *id.*). Nenhuma proteína de superfície bacteriana simples demonstrou facilitar o rompimento das apertadas junções para permitir o atravessamento da BBB.

Um gene similar a azurina existe em muitos gonococci e meningococci, como *Neisseria gonorrhoeae* e *N. meningitidis* (Gotschlich e Seiff, FEMS Microbiol. Lett. 43:253-255 (1987); Kawula, *et al.*, Mol. Microbiol. 1:179-185 (1987)). A azurina é produzida por diversas bactérias patogênicas e há uma significativa homologia seqüencial entre tais genes (Yamada *et al.*, Cell. Microbiol. 7:1418-1431 (2005)). Uma proteína epítotope chamada "H.8" é conservada entre as espécies patogênicas *Neisseria* e é detectada pela ligação do anticorpo monoclonal designado H.8. Dois genes gonocócicos distintos, *laz* e *lip*, codificam as proteínas que reagem cruzadamente com o anticorpo monoclonal H.8 (Hayashi e Wu, J. Bioenerg. Biomembr. 22:451-471 (1990)).

Muitos patógenos possuem proteínas similares a azurina, mas a *Neisseria* é a única que possui a região de H.8 ligada a ela. *Laz* e *Lip* são proteínas de superfície externa que contém uma seqüência consensual à lipoproteína peptídica de sinalização que é reconhecida pela peptidase II de sinalização da enzima bacteriana, que processa a seqüência para resultar na acilação do terminal N do resíduo da sistéia com o ácido gorduroso e glicerol (Hayashi e Wu, *id.*; Yamada *et al.*, Cell. Microbiol. 7:1418-1431 (2005)). A lipoproteína *Lip*, de aproximadamente 6,3 kDa, consiste quase totalmente em repetições do pentapeptídeo de motivo Ala-Ala-Glu-Ala-Pro (AAEAP (SEQ ID Nº 25)), enquanto que a lipoproteína *Laz*, de

aproximadamente 17 kDa, inclui uma região de 39 aminoácidos no terminal N contendo repetições AAEAP imperfeitas (SEQ ID Nº 25) (Gotschlich e Seiff, *id*; Kawula *et al*, *id*; Woods *et al*, Mol. Microbiol. 3: 43-48 (1989)). Além disso, a região do terminal N de 39 aminoácidos de

5 *Laz* é uma região com 127 aminoácidos que é altamente homóloga à azurina *P. aeruginosa* (Cannon, Clin. Microbiol. Rev. 2:S1-S4 (1989)). *Laz* é envolvida na defesa contra o desgaste por oxidação e contra a toxicidade do cobre e aumenta a sobrevivência em um ensaio do epitélio ectocervical humano *ex vivo* (Wu *et al*, Infect. Immun. 73:8444-8448 (2005)).

10 Uma terceira proteína da membrana externa da *N. gonorrhoeae*, Pan 1, também possui o motivo de repetição do pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID Nº 25) (Hoehn e Clark, Infection and Immunity, 60: 4704-4708 (1992)). O tamanho de *Lip* varia em diferentes cepas de *Neisseria*. Na cepa FA 1090, a *Lip* corresponde a 71 aminoácidos em comprimento com 13 repetições de

15 AAEAP (SEQ ID Nº 25) e seis aminoácidos não como parte das repetições. Na cepa R10, *Lip* corresponde a 76 aminoácidos em comprimento com 14 repetições AAEAP (SEQ ID Nº 25) (Cannon, *id.*). O peptídeo *Lip* purificado é um mediador inflamatório potente capaz de induzir a liberação da

20 quemoquina interleucina-8 (IL-8) e a citocina IL-6 pelas células endocervicais humanas imortalizadas e a produção de IL-8 e ativação do fator de transcrição NF-kB por 293 células renais do embrião humano transfectadas com o receptor *toll-like 2* (Fisette *et al*, J. Biol. Chem. 278:46252-46260 (2003)).

Considerando o grande número de pacientes no mundo todo com graves distúrbios da medula espinal e do cérebro, é necessário um sistema de

25 transporte que possa conduzir as moléculas hidrofílicas e moléculas grandes através da BBB. Preferivelmente, esse sistema de liberação deverá ter um alto grau de especificidade para permitir que os medicamentos atinjam o cérebro sem provocar um rombo generalizado na BBB. Além disso, um sistema de liberação bem sucedido seria geralmente benéfico e permitiria o uso repetido

30 do sistema sem efeitos colaterais indesejados. Em alguns casos, o sistema de

liberação bem sucedido liberaria o medicamento para todas as áreas do cérebro uniformemente. Em outros casos, direcionaria os medicamentos especificamente às células cancerígenas do cérebro.

### RESUMO DA INVENÇÃO

5 A invenção fornece peptídeos de trânsito derivados das proteínas da membrana externa da *Neisseria* que podem facilitar o transporte de compostos de carga ligados ou associados para as células cancerígenas do cérebro e/ou atravessar da barreira cérebro-sangue. Também são fornecidos complexos do peptídeo de trânsito e seus compostos de carga, bem como métodos de seu  
10 uso para diagnosticar e tratar o câncer cerebral, bem como diagnosticar e tratar outras condições relacionadas ao cérebro. Finalmente, a invenção fornece kits que compreendem os peptídeos de trânsito e/ou complexos, e/ou ácidos nucleicos que os codificam.

Um aspecto da invenção consiste em peptídeos de trânsito isolados,  
15 que são uma variante, derivado ou equivalente estrutural de *Laz*, *Lip* ou Pan 1 da *Neisseria*, e que facilitam a entrada da molécula ligada nas células cancerígenas do cérebro de mamífero ou o atravessamento da barreira cérebro-sangue. A região H.8 de *Laz* (SEQ ID Nº 24) pode ter pelo menos 90 % da identidade do aminoácido com relação a esses peptídeos de trânsito. Em  
20 algumas configurações, o peptídeo de trânsito possui a SEQ ID Nº 24. Em outras configurações, os peptídeos de trânsito podem ser modificados para aumentar ou otimizar a meia vida do peptídeo no fluxo sanguíneo.

Um outro aspecto da invenção corresponde aos peptídeos de trânsito, que compreendem uma região de pelo menos 4 repetições perfeitas  
25 ou imperfeitas de Ala-Ala-Glu-Ala-Pro (SEQ ID Nº 25), e cuja região possui pelo menos aproximadamente 50% das repetições de pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID Nº 25) por comprimento total. Em algumas configurações, a região das repetições perfeitas ou imperfeitas é pelo menos aproximadamente 90% idêntica ao peptídeo que compreende um mesmo  
30 número de repetições de Ala-Ala-Glu-Ala-Pro (SEQ ID Nº 25). Em algumas

configurações, esses peptídeos de trânsito são sintéticos. Em outras configurações, esses peptídeos de trânsito podem ser modificados para aumentar ou otimizar a meia vida do peptídeo no fluxo sanguíneo.

Um outro aspecto da invenção se refere a complexos que compreendem pelo menos um composto de carga ligado a peptídeos de trânsito que compreendem uma região com pelo menos 4 repetições perfeitas ou imperfeitas de Ala- Ala-Glu- Ala-Pro (SEQ ID Nº 25), onde essa região não compreende menos que aproximadamente 50% do peptídeo.

Um outro aspecto da invenção são os complexos que compreendem pelo menos um composto de carga ligado a uma variante, derivado ou equivalente estrutural de *Laz*, *Lip* ou Pan 1 da *Neisseria*, e que facilita a entrada da molécula ligada nas células cancerígenas do cérebro de mamífero ou através da barreira cérebro-sangue. Em algumas configurações, o composto de carga é a cupredoxina, como azurina, plastocianina, rusticianina, pseudoazurina, auracianina e proteína similar a azurina e especificamente a azurina de *Pseudomonas aeruginosa*. Em outras configurações, o complexo é modificado para aumentar ou otimizar a meia vida do peptídeo no fluxo sanguíneo. Esse complexo pode adicionalmente compreender um peptídeo de transporte derivado da cupredoxina.

O composto de carga desse complexo pode ser uma proteína, lipoproteína, polissacarídeo, ácido nucléicos, corante, micropartícula, nanopartícula, toxina e medicamento. Em algumas configurações, o composto de carga é uma proteína e o complexo é uma proteína de fusão. Em outras configurações, o composto de carga é uma toxina. O composto de carga pode ser um agente terapêutico para o tratamento da depressão, distúrbios afetivos, dores crônicas, epilepsia, mal de Alzheimer, acidente cardiovascular / neuroproteção, lesão cerebral e da medula espinal, câncer cerebral, infecção por HIV do cérebro, vários distúrbios causadores de ataxia, esclerose lateral amiotrófica (ALS), mal de Huntington, erros genéticos congênitos na infância que afetam o cérebro, mal de Parkinson e múltipla esclerose. O composto de



carga pode ser uma substância detectável, por exemplo, por fluorimetria, microscopia, CT de Raios-X, MRI e/ou ultrassonografia.

Em algumas configurações, o complexo é uma carreadora farmaceuticamente apropriada. A carreadora farmaceuticamente apropriada  
5 pode ser administrada intravenosamente. Em outras configurações, a carreadora farmaceuticamente aceitável é apropriada para injeção intracerebroventricular ou intracerebral.

Um outro aspecto da invenção é um método que compreende o contacto de uma célula ou células com um complexo formado por pelo menos  
10 um composto de carga ligado à variante, derivado ou equivalente estrutural de *Laz*, *Lip* ou Pan 1 da *Neisseria*, e que facilita a entrada da molécula ligada nas células cancerígenas do cérebro de mamífero ou através da barreira cérebro-sangue. A célula pode ser de um tumor do sistema nervoso central, especificamente astrocitoma, glioblastoma, meningioma, oligodentroglioma,  
15 oligoastrocitoma, glioma, ependimoma, tumor da medula espinal, ganglioglioma, neurocitoma ou meduloblastoma.

Um aspecto da invenção é um método de tratamento de paciente com câncer, sendo que o complexo da invenção é administrado ao paciente em uma quantidade terapeuticamente eficaz. Em algumas configurações, o  
20 complexo é administrado por via intravenosa, tópica, subcutânea, intramuscular, ou na célula ou tumor. Em outras configurações, o complexo é administrado em conjunto com um outro tratamento de câncer.

Um outro aspecto da invenção é um método para formação de imagem do câncer em um paciente que compreende a administração de um  
25 complexo com um composto de carga detectável em um paciente, e a detecção do local do composto de carga no paciente. Em alguns casos, o composto de carga é um agente de contraste de Raios-X que é detectado por CT de Raios-X. Em outros casos, o composto de carga é um agente de contraste de imagem por ressonância magnética que é detectado por MRI. Em  
30 outros casos, o composto de carga é um agente de contraste de

ultrassonografia que é detectado por formação de imagem ultrassonográfica.

Um outro aspecto da invenção é um método para o diagnóstico do câncer que compreende o contacto da célula com um complexo da invenção contendo um composto de carga detectável e a detecção composto de carga.

5 Um outro aspecto da invenção é um kit que compreende um reagente contendo um peptídeo de trânsito isolado que é variante, derivado ou equivalente estrutural de *Laz*, *Lip* ou Pan 1 da *Neisseria*, e que facilita a entrada da molécula ligada nas células cancerígenas do cérebro de mamífero ou através da barreira cérebro-sangue. Em algumas configurações, o kit  
10 também compreende um reagente contendo uma carreadora farmacologicamente aceitável. Em outras configurações, o kit compreende um veículo para a administração do reagente.

Um outro aspecto da invenção compreende as moléculas de ácidos nucleicos. Em algumas configurações, os ácidos nucleicos codificam o  
15 peptídeo de trânsito isolado que é variante, derivado ou equivalente estrutural de *Laz*, *Lip* ou Pan 1 da *Neisseria*, e que facilita a entrada da molécula ligada nas células cancerígenas do cérebro de mamífero ou através da barreira cérebro-sangue. Em outras configurações, os ácidos nucleicos codificam os peptídeos de trânsito que compreendem uma região contendo pelo menos 4  
20 repetições perfeitas ou imperfeitas de Ala-Ala-Glu-Ala-Pro (SEQ ID N° 25), sendo que essa região não engloba menos que aproximadamente 50% do peptídeo. Em outras configurações, os ácidos nucleicos codificam os complexos que compreendem uma proteína de fusão formada por pelo menos um composto de carga de proteína ligado a um peptídeo de trânsito.

25 Um outro aspecto da invenção é um método de tratamento ou de diagnóstico de paciente com uma condição relacionada ao cérebro, que compreende a administração conjunta ao referido paciente de um peptídeo de trânsito da invenção e de pelo menos um composto de carga. Em outras configurações, um peptídeo de transporte derivado da cupredoxina é  
30 administrado em conjunto com um peptídeo de trânsito e/ou um composto de

carga.

### BREVE DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

SEQ ID Nº 1 é sequência de codificação do DNA genômico do gene *laz* da *Neisseria gonorrhoeae*, Genbank Acesso Nº Y00530.

5 SEQ ID Nº 2 é sequência de codificação do DNA genômico do gene da azurina *Pseudomonas aeruginosa*.

SEQ ID Nº 3 é sequência de codificação do DNA genômico da região H.8 do gene *laz* da *Neisseria gonorrhoeae*.

10 SEQ ID Nº 4 é o *forward primer* para que a PCR amplifique o gene de codificação de *Laz (laz)* de *Neisseria gonorrhoeae*.

SEQ ID Nº 5 é o *reverse primer* para que a PCR amplifique o gene de codificação de *Laz (laz)* de *Neisseria gonorrhoeae*.

SEQ ID Nº 6 é o *forward primer* para que a PCR amplifique um fragmento de 3,1 kb de pUC18-*laz*

15 SEQ ID Nº 7 é o *reverse primer* para que a PCR amplifique um fragmento de 3,1 kb de pUC18-*laz*.

SEQ ID Nº 8 é o *forward primer* para que a PCR amplifique um fragmento de 0,4 kb de pUC19-*paz*.

20 SEQ ID Nº 9 é o *reverse primer* para que a PCR amplifique um fragmento de 0,4 kb de pUC19-*paz*

SEQ ID Nº 10 é o *forward primer* para que a PCR amplifique um fragmento de 3,3 kb de pUC19-*paz*.

SEQ ID Nº 11 é o *reverse primer* para que a PCR amplifique um fragmento de 3,3 kb de pUC19-*paz*.

25 SEQ ID Nº 12 é o *forward primer* para que a PCR amplifique um fragmento de 0,13 kb de pUC18-*laz*.

SEQ ID Nº 13 é o *reverse primer* para que a PCR amplifique um fragmento de 0,13 kb de pUC18-*laz*.

30 SEQ ID Nº 14 é o *forward primer* para que a PCR amplifique o gene de codificação de GST de pGEX-5X-3.

SEQ ID Nº 15 é o *reverse primer* para que a PCR amplifique o gene de codificação de GST de pGEX-5X-3.

SEQ ID Nº 16 é o *forward primer* para que a PCR amplifique o peptídeo de sinalização e a região de codificação de H.8 de *laz* de pUC18-*laz*.

5 SEQ ID Nº 17 é o *reverse primer* para que a PCR amplifique o peptídeo de sinalização e a região de codificação de H.8 de *laz* de pUC18-*laz*.

SEQ ID Nº 18 é o *forward primer* para que a PCR amplifique a região de codificação de H.8 de pUC18-*laz*.

10 SEQ ID Nº 19 é o *reverse primer* para que a PCR amplifique a região de codificação de H.8 de pUC18-*laz*.

SEQ ID Nº 20 é o *forward primer* para que a PCR amplifique a região de fusão de GST- H.8 de pGEX-5X-3-H.8.

SEQ ID Nº 21 é o *reverse primer* para que a PCR amplifique a região de fusão de GST- H.8 de pGEX-5X-3-H.8.

15 SEQ ID Nº 22 é a seqüência de aminoácidos da proteína *Laz* F62 da cepa *Neisseria*, Genbank Acesso Nº Y00530.

SEQ ID Nº 23 é a seqüência de aminoácidos da azurina de *Pseudomonas aeruginosa*.

20 SEQ ID Nº 24 é a seqüência de aminoácidos da Região H.8 da proteína de *Laz* F62 da *Neisseria gonorrhoeae*.

SEQ ID Nº 25 é a seqüência de aminoácidos de um motivo de pentapeptídeo.

### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

25 **Figura 1** mostra uma representação esquemática de *laz* da *Neisseria gonorrhoeae* (A) e *paz* de *Pseudomonas aeruginosa* (B). O gene da azurina de *P. aeruginosa* para clonagem e hiperexpressão em *E. coli* consistiu em uma seqüência genética da azurina propriamente dita (*paz*) e do peptídeo de sinalização (*psp*) que determina a sua localização periplásmica (B). A região H.8 de *laz* foi clonada na estrutura tanto no terminal 5' do gene *paz* (C),  
30 incluindo a seqüência de sinalização *nsp* (pUC18-H.8-*paz*) da *Neisseria* ou no

terminal 3' do gene *paz* (D) (pUC19-*paz*-H.8). Os procedimentos detalhados para a preparação de constructos são dados no Exemplo 1. *naz*, seqüência similar a azurina de *Neisseria gonorrhoeae* presente no gene *laz*; *nsp*, seqüência de peptídeo de sinalização de *Neisseria*. A seqüência de peptídeo de sinalização nos dois casos é rompida para produzir proteínas maduras de *Paz* (periplásmica) e *Laz* (superfície exposta). (E) SDS-PAGE de *Laz*, *Paz* e proteínas de fusão. A migração anômala das proteínas de fusão H.8 como *Laz*, H.8-*Paz* ou *Paz*-H.8 (todos aproximadamente 17 kDa) foi previamente observada para as proteínas contendo H.8 lapidado (Cannon, Clin. Microbiol. Rev.2:S1-S4 (1989); Fiset *et al*, J. Biol. Chem. 278:46252-46260 (2003)).

**Figura 2** mostra gráficos que ilustram o grau em que as proteínas de fusão de H.8-*Paz* são citotóxicas para várias células cancerígenas. (A) Citotoxicidade dos peptídeos H.8 sintéticos, *Paz*, *Laz* e fusões de H.8 nos terminais carboxi de *Paz* (*Paz*-H.8) e terminais amino de *Paz* (H.8-*Paz*) para as células do glioblastoma LN-229. As células foram tratadas com proteínas em 3 diferentes concentrações (10, 20 e 40  $\mu$ M) por 6, 12 e 24 h. O ensaio MTT foi realizado para medir a extensão da vida das células e verificar a citotoxicidade (porcentagem de morte celular). Para calcular a porcentagem de citotoxicidade, o valor das células viáveis não tratadas foi considerado como sendo de 100% e o número de células viáveis foi determinado nas amostras tratadas por proteínas da fusão de H.8, *Paz* e *Laz*. A extensão da citotoxicidade (%) foi então determinada a partir do número de células mortas. (B) Citotoxicidade do peptídeo de H.8, *Paz*, *Paz*-H.8, H.8-*Paz* e *Laz* sobre as células do câncer de mama humano MCF-7. Todas as condições de tratamento são similares a (A) acima.

**Figura 3** mostra a entrada de várias proteínas relacionadas à azurina fluorescentemente etiquetadas nas células do glioblastoma LN-229 e do câncer de mama MCF-7. (A) Peptídeo de H.8, *Paz*, *Paz*-H.8, H.8-*Paz* e *Laz* (20  $\mu$ M cada) conjugado com Alexa fluor<sup>®</sup> 568 foram incubados com as células LN-229 sobre um revestimento a 37°C por 30 min e em seguida foram feitas as

imagens. (B) Internalização nas células MCF-7 de várias proteínas conjugadas com Alexa fluor<sup>®</sup> 568 conforme visualização por microscopia confocal e conforme descrito em (A). (C) Internalização de *Laz* visualizada por microscopia confocal. Várias concentrações (2, 4, 8 e 16  $\mu$ M) de *Laz* fluorescentemente etiquetadas foram incubadas com as células LN-229 por 30 min a 37°C. O núcleo recebeu etiqueta azul com DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol). (D) *Laz* (10  $\mu$ M) conjugado com Alexa fluor<sup>®</sup> 568 foi incubado com as células LN-229 por vários períodos (5, 10, 20 e 30 min) a 37°C. A internalização foi visualizada por microscopia confocal. (E) *Paz* (10  $\mu$ M) conjugada com Alexa fluor<sup>®</sup> 568 foi incubada com as células LN-229 sobre um revestimento a 37°C diversas vezes, sendo em seguida feitas as imagens. Muito pouca fluorescência mensurável foi detectada em (E).

**Figura 4** mostra gráficos de barra indicando a quantificação da fluorescência encontrada nas imagens por microscopia confocal da Figura 3A-D. (A) Quantificação da fluorescência em imagens da Figura 3 A. A quantificação da fluorescência em proteínas da azurina foi feita usando Adobe<sup>®</sup> Photoshop<sup>®</sup>. As barras de erros representam o desvio padrão da fluorescência em três diferentes células em uma amostra simples. (B) Quantificação da fluorescência nas imagens da Figura 3B. Quantificação realizada conforme a Figura 4 A. (C) Quantificação da fluorescência nas imagens da Figura 3C. Quantificação realizada conforme a Figura 4A. (D) Quantificação da fluorescência nas imagens da Figura 3D. Quantificação realizada conforme a Figura 4A.

**Figura 5** tratamento combinado com as proteínas da fusão H.8-GST facilita a compreensão de *paz* etiquetada com Alexa fluor<sup>®</sup> 568 nas células LN-229 do glioblastoma. Tampões não etiquetados de 20  $\mu$ M (A) H.8, (B) GST, (C) GST-H.8, (D) H.8-GST, (E) PBS e 20  $\mu$ M de *Paz* conjugado com Alexa fluor<sup>®</sup> 568 foram incubados com as células LN-229 por 30 min a 37°C. A internalização foi visualizada por microscopia confocal. (F) Citotoxicidade dos peptídeos de H.8 sintéticos, GST e derivados da fusão GST-H.8 / H.8-

GST com ou sem *Paz*. Aproximadamente  $5 \times 10^3$  células LN-229 foram incubadas na placa de cultura com 96 poços e tratadas com 20  $\mu$ M cada de peptídeo de H.8, GST, GST-H.8, H.8-GST ou o mesmo volume de tampão de PBS por 24 h com (+*Paz*) ou sem (-*Paz*) 20  $\mu$ M de *Paz*.

5           **Figura 6** mostra imagens de cérebros de camundongo injetados com *Paz*, H.8-*Paz* e *Laz* conjugado com IRdye® 800CW (LI-COR Biotechnology, Lincoln, Nebraska). (A) imagens de cérebro de camundongo vivo. 500  $\mu$ g de *Paz*, H.8-*Paz* e *Laz* conjugados com IRdye® 800CW foram injetados intraperitonealmente em camundongos vivos nus. Após 24 h, os  
10 camundongos foram sacrificados, os cérebros foram retirados e a fluorescência foi detectada e medida com o Sistema de Imagem em Infravermelho LI-COR Odyssey®. (B) Imagens da região do mesencéfalo rostral de cérebros de camundongos nus tratados conforme descrito em (A). Os cérebros dos camundongos foram cortados horizontalmente e as imagens  
15 foram tomadas.

**Figura 7** mostra SDS-PAGE, *Western blotting* e imagens por microscopia confocal da localização das proteínas de fusão H.8-GST em *E. coli*. (A). Células BL21 (DE3) de *E. coli* com genes *gst* clonados, K.8-*gst* ou *gst*-H.8 foram incubados a 37 °C com 0,1 mM de IPTG. As paletas celulares  
20 foram lavadas com PBS duas vezes e todos os lisados celulares passaram por SDS-PAGE. O corante azul de Coomassie foi usado para a detecção das proteínas. (B). O procedimento acima foi repetido, contudo desta vez todos os lisados celulares e os conteúdos do espaço periplásmico foram separadamente isolados, passados por SDS-PAGE (20  $\mu$ g de proteína) e GST ou as proteínas  
25 de fusão GST-H.8 foram detectadas por *Western blotting* com anticorpos monoclonais anti-GST para determinar as concentrações totais e periplásmicas das proteínas. (C) As células BL21(DE) da cepa *E. coli* alimentando os genes *gst* clonados, H.8-*gst* ou *gst*-H.8 (Tabela 5) foram cultivados a 37 °C com 0,4 mM de IPTG. Um ml de cada uma dessas culturas  
30 bacterianas foi centrifugado e as paletas bacterianas resultantes foram

coletadas. Após duas lavagens com PBS, um ml de 1% de FBS-PBS contendo anticorpos de anti-GST (1:2000) foi aplicado. As células em suspensão foram incubadas por 1 h e em seguida lavadas duas vezes com PBS. As células bacterianas foram incubadas com IgG *anti-rabbit* conjugado com FITC em 5 1% de FBS-PBS por 30 minutos. Para remover os anticorpos não ligados, as células foram novamente lavadas e fixadas com etanol sobre gelo. As amostras de *E. coli* tratadas com DAPI (neutralizando a coloração azul) foram observadas por microscopia confocal (objetiva de 100x), e uma célula simples foi também fotografada. (D) Células *E. coli* alimentando pUC19-*paz* (Azurina 10 de *P. aeruginosa*), pUC19-*laz* (*Neisseria*), pUC18-H.8-*paz* ou pUC18-*paz*-H.8 foram cultivadas a 37°C por uma noite em 0,1 mM de IPTG. 0,5 ml dessas culturas foram centrifugadas e as paletas bacterianas resultantes foram lavadas duas vezes com PBS esfriado. Anticorpos de anti-azurina (1:500) em 1 ml de 1% de FBS-PBS foram aplicados e incubados em gelo por 1 h. Após 15 dupla lavagem com PBS, os anticorpos anti-rabbit conjugado com FITC foram aplicados, incubados em gelo por 30 minutos, lavados duas vezes com PBS e fixados em etanol gelado. As amostras bacterianas foram observadas em microscopia confocal (objetiva de 100x).

## 20 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

### Definições

Conforme aqui usado, o termo “célula” inclui tanto o singular e o plural do termo, a menos que especialmente descrito como “célula única”.

Conforme aqui usados, os termos “polipeptídeo”, “peptídeo” e “proteína” são usados de modo intercambiável para designar um polímero de 25 resíduos de aminoácidos. Os termos se aplicam a polímeros de aminoácidos nos quais um ou mais resíduos de aminoácidos são um análogo químico artificial de um aminoácido de ocorrência natural correspondente. Os termos também se aplicam a polímeros de ocorrência natural. Os termos “polipeptídeo”, “peptídeo” e “proteína” também são passíveis de 30 modificações, incluindo, mas não se limitando a glicosilação, anexação



lipídica, sulfatação, gama carboxilação de resíduos de ácido glutâmico, hidroxilação e ADP-ribosilação. Considera-se que os polipeptídeos não são sempre completamente lineares. Por exemplo, os polipeptídeos podem ser ramificados como resultado de ubiquitinação e podem ser circulares (com ou sem ramificação), geralmente como resultado de eventos pós-transformações, incluindo evento de processamento natural e eventos provocados por manipulação humana que não ocorrem naturalmente. Os polipeptídeos circulares, ramificados ou os polipeptídeos ramificados circulares podem ser sintetizados por processos naturais de não-transformação, bem como por métodos totalmente sintéticos. Um peptídeo sintético é aquele produzido sem o auxílio de componentes celulares. Métodos sintéticos para produzir peptídeos são bem conhecidos na técnica e estão comercialmente disponíveis. Além disso, esta invenção contempla o uso de variantes da proteína da invenção contendo terminal amino com e sem metionina.

Conforme aqui usado, o termo “condição” inclui desvios anatômicos e fisiológicos da normalidade que constituem um prejuízo ao estado normal do animal vivo ou de uma de suas partes, que interrompe ou modifica o desempenho das funções corporais.

Conforme aqui usado, o termo “inibição do crescimento celular” significa diminuição ou cessação da expansão e/ou divisão celular. Esse termo também inclui a inibição do desenvolvimento celular ou aumento de morte celular.

Conforme aqui usado, o termo “sofrendo de” inclui a apresentação de sintomas de uma condição, apresentação da condição mesmo sem sintomas observáveis, em recuperação de uma condição, ou recuperado de uma condição.

Conforme aqui usado, o termo “tratamento” inclui prevenir, reduzir, interromper, ou reverter a progressão ou a gravidade de uma condição ou sintomas associados com uma condição que está sendo tratada. Desta forma, o

termo “tratamento” inclui a administração médica, terapêutica, e/ou profilática, conforme apropriado.

Uma “quantidade terapeuticamente eficaz” é uma quantidade eficaz para prevenir, reduzir, interromper ou reverter o desenvolvimento ou aliviar, total ou parcialmente, os sintomas existentes em uma condição particular, da qual o indivíduo está sendo tratado. A determinação de uma quantidade terapeuticamente eficaz está bem dentro da capacidade dos especialistas na técnica.

O termo “substancialmente puro”, conforme aqui usado, quando usado para modificar uma proteína ou outro produto celular da invenção se refere, por exemplo, a uma proteína isolada de um meio de crescimento ou conteúdos celulares, em uma forma substancialmente livre de, ou não adulterada por compostos inibidores ativos. O termo “substancialmente puro” refere-se a um fator em uma quantidade de pelo menos cerca de 75% por peso seco, da fração isolada, ou “75% substancialmente puro”. Mais especificamente, o termo “substancialmente puro” refere-se a um composto de pelo menos cerca de 85%, por peso seco, do composto ativo, ou “85% substancialmente puro”. Mais especificamente, o termo “substancialmente puro” refere-se a um composto de pelo menos cerca de 95%, por peso seco, do composto ativo, ou “95% substancialmente puro”. O termo “substancialmente puro” também pode ser usado para modificar o composto da invenção ou a proteína produzida sinteticamente, onde por exemplo, a proteína sintética é isolada dos reagentes e por produtos das reações de síntese.

O termo “grau farmacêutico”, conforme aqui usado, quando referido ao peptídeo ou composto da invenção, é um peptídeo ou composto que é isolado substancial ou essencialmente dos componentes que normalmente acompanham o material quando encontrado em seu estado natural, incluindo os reagentes da síntese e sub-produtos e substancial ou essencialmente isolados dos componentes que prejudicariam o seu uso farmacêutico. Por

exemplo, um peptídeo de “grau farmacêutico” pode ser isolado de qualquer carcinogênio. Em alguns casos, o “grau farmacêutico” pode ser modificado pelo método pretendido de administração, por exemplo “grau farmacêutico intravenoso”, a fim de especificar um peptídeo ou composto que seja substancial ou essencialmente isolado de qualquer substância que possa produzir uma composição imprópria para administração intravenosa em um paciente. Por exemplo, um peptídeo de “grau farmacêutico intravenoso” pode ser isolado de detergentes, como SDS, de agentes antibacterianos, como a azida.

As frases “isolado”, “purificado” ou “biologicamente puro” referem-se a material que é substancial ou essencialmente livre de componentes que normalmente acompanham o material do modo que é encontrado em seu estado nativo. Portanto, os peptídeos isolados de acordo com a invenção preferencialmente não contêm materiais normalmente associados com os peptídeos em seu meio ambiente *in situ*. Uma região “isolada” refere-se a uma região que não inclui a seqüência completa dos polipeptídeos de onde a região foi derivada. Um ácido nucléico, proteína, ou fragmento respectivo dos mesmos “isolado” foi substancialmente removido de seu meio ambiente *in vivo*, de tal forma que pode ser manipulado pelos especialistas na técnica, tais como, entre outros, o seqüenciamento genético, digestão por restrição, mutagênese sitio-direcionada e subclonagem em vetores de expressão para um fragmento de ácido nucléico, bem como a obtenção de proteína ou fragmento de proteína em quantidades substancialmente puras.

O termo “variante”, conforme aqui usado em relação a um peptídeo, refere-se a variantes da seqüência de aminoácidos que pode ter aminoácidos substituídos, suprimidos ou inseridos, comparativamente ao polipeptídeo do tipo selvagem. As variantes podem ser truncamentos do peptídeo do tipo selvagem. Uma “adição” é a remoção de um ou mais aminoácidos da proteína do tipo selvagem, enquanto “truncamento” é a remoção de um ou mais

aminoácidos de um ou mais terminais da proteína do tipo selvagem. Portanto, um peptídeo variante pode ser feito por manipulação dos genes que codificam o polipeptídeo. Uma variante pode ser feita por alteração da composição ou características básicas do polipeptídeo, mas pelo menos, não de suas atividades fundamentais. Por exemplo, uma “variante” do peptídeo de trânsito da *Neisseria* pode ser um peptídeo de trânsito da *Neisseria* mutado que retém a sua habilidade de atravessar a BBB e/ou penetrar nas células cancerígenas do cérebro. Em alguns casos, um peptídeo variante é sintetizado com aminoácidos artificiais, tais como resíduos de  $\epsilon$ -(3,5-dinitrobenzoil)-Lis (Ghadiri e Fernholz, J. Am. Chem. Soc., 112:9633-9635 (1990)). Em algumas configurações, a variante não tem mais de 20, 19, 18, 17 ou 16 aminoácidos substituídos, suprimidos ou inseridos comparativamente ao peptídeo do tipo selvagem. Em algumas configurações, a variante não tem mais de 15, 14, 13, 12 ou 11 aminoácidos substituídos, suprimidos ou inseridos comparativamente ao peptídeo do tipo natural. Em algumas configurações, a variante não tem mais de 10, 9, 8 ou 7 aminoácidos substituídos, suprimidos ou inseridos comparativamente ao peptídeo do tipo natural. Em algumas configurações, a variante não tem mais de 6 aminoácidos substituídos, suprimidos ou inseridos comparativamente ao peptídeo do tipo natural. Em algumas configurações, a variante não tem mais de 5 ou 4 aminoácidos substituídos, suprimidos ou inseridos comparativamente ao peptídeo do tipo natural. Em algumas configurações, a variante não tem mais de 3, 2 ou 1 aminoácidos substituídos, suprimidos ou inseridos comparativamente ao peptídeo do tipo selvagem.

O termo “aminoácido”, conforme aqui usado, significa uma parte de aminoácido que compreende qualquer resíduo de um aminoácido de ocorrência natural ou não natural ou sintético, isto é, qualquer parte compreendendo pelo menos uma carboxila e pelo menos um resíduo amino diretamente ligado por um, dois, três ou mais átomos de carbono, tipicamente um ( $\alpha$ ) átomo de carbono.

O termo “derivado”, conforme aqui usado, em relação a um peptídeo, refere-se a um peptídeo que é derivado do peptídeo objeto. Uma derivação inclui modificações químicas do peptídeo de tal forma que ele ainda retenha algumas de suas atividades fundamentais. Por exemplo, um “derivado” do peptídeo de trânsito da *Neisseria* pode ser um peptídeo de trânsito da *Neisseria* quimicamente modificado que retenha sua habilidade de atravessar a BBB e/ou penetrar nas células cancerígenas do cérebro. As modificações químicas de interesse incluem, entre outras, a amidação, acetilação, sulfatação, modificação do polietileno glicol (PEG), fosforilação ou glicosilação do peptídeo. Além disso, um peptídeo derivado pode ser a fusão de um polipeptídeo ou seu fragmento a um composto químico, tal como, entre outros, um outro peptídeo, uma molécula do medicamento ou outro agente terapêutico ou farmacêutico ou uma sonda detectável.

O termo “percentagem (%) de identidade de sequência de aminoácidos” é definido como a percentagem de resíduos de aminoácidos em um polipeptídeo que são idênticos aos resíduos de aminoácidos em uma sequência candidata quando duas sequências são alinhadas. Para determinar a percentagem de identidade de sequência, as sequências são alinhadas e, se necessário, são introduzidos intervalos para obter a percentagem de identidade de sequência máxima; as substituições conservativas não são consideradas como parte da identidade de sequência. Os procedimentos do alinhamento da sequência de aminoácidos para determinar a percentagem de identidade são bem conhecidos pelos especialistas na técnica. Frequentemente, programas de computadores publicamente disponíveis, tais como os programas BLAST, BLAST2, ALIGN2 ou Megalign (DNASTAR) são usados para alinhar as sequências de peptídeos. Em uma configuração específica, o Blastp (disponível pelo Centro Nacional para Informações de Biotecnologia, Bethesda MD) é usado com base nos parâmetros de *default* de filtro de longa complexidade, expect 10, word size 3, existence 11 e extension

Quando as seqüências de aminoácidos estão alinhadas, a porcentagem da identidade de seqüência de aminoácidos de uma dada seqüência de aminoácidos A para, com, ou em comparação com uma dada seqüência B de aminoácidos (que pode ser redigida alternativamente como uma dada seqüência de aminoácidos A que tem ou compreende uma certa porcentagem de identidade de seqüência de aminoácidos para, com ou em comparação com uma dada seqüência de aminoácidos B) pode ser calculada como:

10                   porcentagem de identidade de seqüência de aminoácidos =  $X/Y \times 100$   
onde:

X é o número de resíduos de aminoácidos pontuados como pares idênticos pelo programa de alinhamento de seqüências ou alinhamento do algoritmo de A e B, e

Y é o número total de resíduos de aminoácidos em B.

15                   Se a extensão da seqüência de aminoácidos A não for igual à extensão da seqüência de aminoácidos B, a porcentagem de identidade de seqüência de aminoácidos de A para B não equivalerá à da identidade de seqüência de aminoácidos de B para A. Comparando seqüências mais longas com as mais curtas, a seqüência mais curta será a seqüência "B". Por exemplo, comparando peptídeos truncados com os correspondentes peptídeos do tipo selvagem, o peptídeo truncado será a seqüência "B".

### **Geral**

A presente invenção se refere a métodos e materiais para a liberação de um composto de carga através da barreira cérebro-sangue (BBB) e/ou para as células cancerígenas do cérebro, e materiais e métodos para tratamento do câncer cerebral de mamíferos, bem como outras condições do cérebro e do sistema nervoso central. Conforme aqui revelado, sabe-se atualmente que as regiões do peptídeo compostas por repetições do motivo AAEAP (SEQ ID Nº 25) permitirão que os peptídeos associados ou fundidos e outros compostos de carga sejam transportados através da barreira cérebro-sangue e/ou para as

células cancerígenas do cérebro de mamíferos. Mais especificamente, a região H.8 da proteína *Laz* da *Neisseria gonorrhoeae* pode ser usada para transportar as proteínas associadas ou fundidas e outros compostos de carga através da BBB e/ou para as células cancerígenas do cérebro. Além disso, contempla-se que os peptídeos similares à região H.8 no uso das repetições de pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID Nº 25) podem ser empregados para transportar as proteínas e outros compostos de carga através da BBB e/ou para as células cancerígenas do cérebro, como parte ou toda proteína *Lip*, e parte ou toda proteína Pan 1, ambas da *Neisseria gonorrhoeae*. Os compostos de cargas liberados pela presente invenção incluem, mas não se limitam a proteínas, lipoproteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos, incluindo ácidos nucleicos anti-sentido, corantes, etiquetas fluorescentes e radioativas, micropartículas ou nanopartículas, toxinas, moléculas orgânicas e inorgânicas, pequenas moléculas e medicamentos. Em algumas configurações, os medicamentos e/ou toxinas destroem as células tumorosas. Em outras configurações, os compostos de carga tratam as várias condições o cérebro.

Sabe-se que muitas proteínas da cupredoxina, como a azurina de *Pseudomonas aeruginosa*, possuem a habilidade de penetrar e destruir especificamente muitos tipos de células cancerígenas de mamíferos (Yamada *et al*, Cell. Biol. 7:1418-1431 (2005); Hiraoka *et al*, PNAS 101:6427-6432 (2004); Hiraoka *et al*, Biochem. Biophys. Res. Comm. 338:1284-1290 (2005)). Sabe-se também que a azurina de *P. aeruginosa* não é citotóxica com relação a células cancerígenas do cérebro, como as células do glioblastoma. Veja o Exemplo 2. Surpreendentemente, sabe-se atualmente que *Laz*, uma proteína similar à azurina da *Neisseria gonorrhoeae* e de outras espécies de *Neisseria*, é capaz de penetrar e destruir especificamente as células cancerígenas do cérebro como as células do glioblastoma, bem como de outros tumores. Veja os Exemplos 2 e 7. Além disso, sabe-se atualmente que a região H.8 da proteína *Laz* pode conferir à azurina de *P. aeruginosa* quando fundida com seus terminais N ou C, a habilidade de penetrar e destruir as

células do glioblastoma. Veja os Exemplos 2 e 3.

Também surpreendentemente, sabe-se atualmente que a região H.8 não precisa estar fisicamente ligada à proteína conjuntamente administrada, como a azurina, para conferir a essa proteína a habilidade de penetrar nas células do glioblastoma. Veja o Exemplo 5. H.8 e H.8 fundidos aos terminais N de GST aumentaram a penetração da azurina fisicamente livre nas células do glioblastoma, quando comparada com a azurina sozinha, entretanto o H.8 fundido aos terminais C de GST foi ineficaz. Além disso, H.8 e H.8 fundido ao terminal N de GST quando administrados em conjunto com a azurina aumentaram a citotoxicidade da azurina das células do glioblastoma. Veja o Exemplo 5.

Surpreendentemente, o domínio de H.8 de *Laz* é atualmente conhecido por conferir às proteínas às quais é fundido, a habilidade de atravessar a barreira cérebro-sangue em camundongos vivos e alcançar o cérebro. Veja o Exemplo 6.

Finalmente, a região de H.8 é atualmente conhecida por ser responsável pela exposição da superfície das proteínas fundidas em *E. coli*. Veja o Exemplo 7. Enquanto GST e GST com H.8 fundido ao terminal C se acumulam no espaço periplásmico de *E. coli* expressando-os, a GST com H.8 fundido no terminal N é transportada à superfície das células de *E. coli*. Embora não pretendendo limitar a invenção a qualquer mecanismo de ação, a habilidade da região de H.8 em provocar o transporte da proteína fundida para a superfície das células bacterianas pode ser relacionada à habilidade da região de H.8 em permitir que as proteínas fundidas atravessem a BBB. Uma vez que o meningococci como *N. meningitidis* cruza a BBB para invadir as meninges cerebrais (Nassif, *et al.*, *id.*; Huang e Jong, *id.*), é provável que a bactéria use os componentes celulares expostos na superfície para romper a BBB. Os Pili tipo IV da *N. meningitidis* estão implicados na formação das protusões da membrana similar a microvilos cerebrais e sabe-se que a retração dos referidos pili desempenha um papel central nas interações entre *Neisseria*



e células humanas (Pujol *et al*, PNAS 96:4017-4022 (1999); Merz *et al*, Nature 407: 98-102 (2002)). Entretanto os pili tipo IV são conhecidos por retrair após a formação de contato mediada por pili com outras células e acredita-se que os componentes adicionais desconhecidos da superfície de *N. meningitidis* sejam responsáveis pelo atravessamento da BBB (Nassif *et al*, *id.*). Portanto, é possível que a região de H.8 exposta da superfície esteja diretamente envolvida na habilitação da *Neisseria* em atravessar a BBB e interagir com as células cancerígenas do cérebro humano.

A região H.8 de *Laz* é uma região com 39 aminoácidos no terminal N de *Laz*, que contém repetições imperfeitas de pentapeptídeos AAEAP (SEQ ID Nº 25). Contempla-se que essa unidade de repetição de AAEAP (SEQ ID Nº 25) pode ser usada para designar os peptídeos que transportarão as cargas através da BBB e/ou para as células cancerígenas do cérebro. Também contempla-se que a seqüência de aminoácidos de outras proteínas da membrana externa da *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitis* com repetições AAEAP (SEQ ID Nº 25) pode ser usada para designar os peptídeos que transportarão a carga através da BBB e/ou para as células cancerígenas do cérebro. Outras Proteínas de membrana externa da *Neisseria* de interesse incluem, mas não se limitam a *Lip* e *Pan 1* (Trees *et al.*, J. Clin. Microbiol. 38:2914-2916 (2000); Hoehn e Clark, Infection and Immunity 60:4704-4708 (1992)).

A presente invenção se refere a métodos e materiais para a liberação de um composto de carga através da barreira cérebro-sangue e/ou para as células cancerígenas do cérebro. A liberação do composto de carga de acordo com essa invenção é realizada pelo uso de um peptídeo de trânsito apropriado. Em uma configuração da invenção, o composto de carga é ligado a *Neisseria* ou peptídeo de trânsito de AAEAP da invenção. Em uma outra configuração, o composto de carga é administrado em conjunto com *Neisseria* ou peptídeo de trânsito de AAEAP da invenção. Em uma outra configuração, o composto de carga é ligado a um peptídeo de transporte derivado da cupredoxina e ao

peptídeo de trânsito da *Neisseria* ou AAEAP da invenção.

Em uma configuração, o composto de carga é liberado para inibir o desenvolvimento da célula em uma célula cancerígena, como a do cérebro. A referida célula cancerígena pode ser, por exemplo, o astrocitoma, glioblastoma, meningioma, oligodentroglioma, oligoastrocitoma, glioma, ependimoma, tumor da medula espinal, ganglioglioma, neurocitoma e meduloblastoma. Por exemplo, o composto de carga pode ser uma proteína de controle do ciclo celular, como p53; um inibidor da quinase ciclina dependente, como p16, p21 ou p27; uma proteína suicida como a timidina quinase ou nitroreductase; uma citocina ou outra proteína imunomodulatória como interleucina 1, interleucina 2 ou fator de estimulação da colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF); ou uma toxina, como exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, entre outras. Em algumas configurações, um fragmento biologicamente ativo de uma das classes de compostos acima é liberada. Em uma outra configuração, o composto de carga é liberado a fim de gerar uma imagem do tecido alvo. Por exemplo, o tecido alvo pode ser um câncer e o composto de carga pode ser o comumente usado para gerar a imagem para detecção por tomografia computadorizada de Raios-X (CT), Imagem de Ressonância Magnética (MRI) e ultrassonografia. Nessas configurações, o composto de carga pode ser um radioisótopo emitindo pósitron ou raios-gama, um agente de contraste de imagem por ressonância magnética, um agente de contraste de Raios-X, e/ou um agente de contraste de ultrassonografia. Em outras configurações, o composto de carga pode ser liberado para tratar uma condição relacionada ao cérebro.

## 25 **Peptídeos de trânsito da *Neisseria* e AAEAP**

A invenção fornece um peptídeo de trânsito que permite o transporte de carga ligada ou associada às células cancerígenas do cérebro de mamíferos, porém não às células não cancerígenas, e/ou através da BBB. Descobriu-se que as proteínas da membrana externa da *Neisseria*, como *Laz*, compreendem um domínio de trânsito da proteína, o domínio H.8, que facilita a entrada da

carga ligada nas células cancerígenas do cérebro de mamíferos e/ou através da BBB. A invenção fornece peptídeos de trânsito da *Neisseria* derivados das proteínas da membrana externa da *Neisseria*. A invenção também fornece domínios de trânsito naturais ou sintéticos que compreendem repetições de pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID N° 25) que podem ser usadas para transportar a carga ligada ou associada às células cancerígenas do cérebro de mamíferos e/ou através da BBB.

O termo "peptídeo de trânsito da *Neisseria*" se refere a toda proteína da membrana externa da *Neisseria* que incluem a sequência de amino necessária para a entrada da carga nas células cancerígenas do cérebro e/ou através da BBB. As proteínas de membrana externa da *Neisseria* incluem, mas não se limitam a *Laz*, *Lip* ou Pan 1 de *N. gonorrhoeae*. De particular interesse é a *Laz* de *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae*. A determinação das proteínas da membrana externa que incluem uma sequência amino necessária para a entrada de uma carga às células cancerígenas do cérebro e/ou através da BBB pode ser realizada por qualquer método que identifique os peptídeos necessários para a entrada nas células cancerígenas do cérebro ou a passagem através da BBB. Em um dos referidos métodos, todo ou um fragmento da proteína da membrana externa da *Neisseria* é ligado a uma substância de marcação e um teste é realizado para determinar se toda ou um fragmento da proteína da membrana externa da *Neisseria* penetra nas células cancerígenas do cérebro e/ou cruza a BBB. Métodos que podem ser usados para identificar as proteínas da membrana externa da *Neisseria* ou seus fragmentos são encontrados nos Exemplos 4 e 7.

Proteínas de membrana externa da *Neisseria* apropriadas que podem ser usadas na invenção incluem as da membrana externa das espécies de *Neisseria* que são reconhecidas pelos anticorpos de H.8 e/ou são compreendidas por diversas repetições perfeitas ou imperfeitas do motivo de AAEAP (SEQ ID N° 25). Em algumas configurações, os peptídeos de trânsito da *Neisseria* são reconhecidos pelo anticorpo de H.8. A metodologia e os

parâmetros para determinar se uma proteína ou peptídeo é reconhecido pelo anticorpo de H.8 são descritos por Cannon *et al*, Infection and Immunity 43:994-999 (1984).

A invenção também fornece os peptídeos de trânsito de AAEAP, que são compostos por múltiplas repetições perfeitas ou imperfeitas do motivo de AAEAP (SEQ ID N° 25) que podem transportar compostos de carga ligados ou associados às células cancerígenas do cérebro de mamíferos e/ou através da BBB. Uma repetição "imperfeita" conforme aqui usada é definida como uma repetição do pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID N° 25) onde pelo menos um dos cinco aminoácidos não faz parte do motivo de AAEAP (SEQ ID N° 25). Em outras configurações, a repetição imperfeita pode não ter mais de 1, 2, 3 ou 4 aminoácidos que não fazem parte do pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID N° 25). Em algumas configurações, o peptídeo de trânsito da *Neisseria* compreende 1 a 39 aminoácidos da proteína de Laz (SEQ ID N° 24). Em algumas configurações, o peptídeo de trânsito da *Neisseria* compreende pelo menos aproximadamente 20 aminoácidos em comprimento, pelo menos aproximadamente 40 aminoácidos em comprimento, pelo menos aproximadamente 60 aminoácidos em comprimento, ou pelo menos aproximadamente 80 aminoácidos em comprimento. Em outras configurações, o peptídeo de trânsito *Neisseria* compreende não mais que aproximadamente 40 aminoácidos em comprimento, não mais que aproximadamente 100 aminoácidos em comprimento, não mais que aproximadamente 200 aminoácidos em comprimento, ou não mais que aproximadamente 400 aminoácidos em comprimento. Em algumas configurações, o peptídeo de trânsito *Neisseria* compreende pelo menos aproximadamente 90% da identidade da sequência de aminoácidos, pelo menos aproximadamente 95% da identidade da sequência de aminoácidos ou pelo menos aproximadamente 99% da identidade da sequência de aminoácidos da proteína da membrana externa da *Neisseria*, como a SEQ ID N° 22.

O termo "peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ ID N° 25)" se refere ao peptídeo que é compreendido por uma região de repetições perfeitas e/ou imperfeitas de pentapeptídeos AAEAP (SEQ ID N° 25). O peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ ID N° 25) pode ser sintetizado por métodos padrões ou pode ser reproduzido pelos sistemas de expressão baseados em células. Em algumas configurações, o peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ ID N° 25) é compreendido por pelo menos 2 repetições de pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID N° 25), pelo menos 4 repetições de pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID N° 25), pelo menos 6 repetições de pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID N° 25), pelo menos 8 repetições de pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID N° 25), pelo menos 10 repetições de pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID N° 25), pelo menos 15 repetições de pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID N° 25) ou pelo menos 20 repetições de pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID N° 25). Em algumas configurações, o peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ ID N° 25) é compreendido por não mais que 10 repetições de pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID N° 25), não mais que 20 repetições de pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID N° 25), não mais que 30 repetições de pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID N° 25), ou não mais que 40 repetições de pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID N° 25). Em algumas configurações, o peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ ID N° 25) é compreendido por apenas repetições perfeitas de pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID N° 25), por apenas repetições imperfeitas de pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID N° 25), ou por uma mistura de repetições perfeitas e imperfeitas de pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID N° 25).

Em algumas configurações, o peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ ID N° 25) consiste em apenas repetições de pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID N° 25). Em outras configurações, o peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ ID N° 25) consiste em pelo menos aproximadamente 95% de repetições de pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID N° 25) por comprimento total, pelo menos aproximadamente 90% de repetições de pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID

Nº 25) por comprimento total, pelo menos aproximadamente 80% de repetições de pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID Nº 25) por comprimento total, pelo menos aproximadamente 50% de repetições de pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID Nº 25) por comprimento total. Em algumas configurações, a região das repetições é pelo menos aproximadamente 70% idêntica, pelo menos aproximadamente 80% idêntica, pelo menos aproximadamente 90% idêntica, ou pelo menos aproximadamente 95 % idêntica ao peptídeo que compreende um mesmo número de repetições de Ala-Ala-Glu-Ala-Pro (SEQ ID Nº 25).

Em algumas configurações, o peptídeo de trânsito da *Neisseria* e/ou o peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ ID Nº 25) pode ser usado para facilitar o transporte de carga ligada seletivamente às células cancerígenas do cérebro e/ou através da BBB. Em outras configurações, o peptídeo de trânsito da *Neisseria* e/ou peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ ID Nº 25) pode ser usado para transportar a carga conjuntamente administrada às células cancerígenas do cérebro e/ou através da BBB.

#### **Modificação do Domínio de Trânsito da *Neisseria* ou AAEAP**

Em outras configurações da presente invenção, o peptídeo de trânsito da *Neisseria* ou peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ ID Nº 25) é quimicamente modificado ou geneticamente alterado para produzir variantes e derivados que mantenham a habilidade de transportar o composto de carga às células cancerígenas do cérebro ou através da BBB.

As variantes do peptídeo de trânsito de *Neisseria* ou o peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ ID Nº 25) podem ser sintetizadas por técnicas padrão. Os derivados são seqüências de aminoácidos formados por aminoácidos nativos diretamente ou por modificação ou substituição parcial. As variantes podem ser análogos, que são seqüências de aminoácidos com estrutura similar ao composto primário, porém diferindo com respeito a determinados componentes ou cadeias laterais. Os análogos podem ser sintetizados ou ter uma origem evolucionária diferente. As variantes podem

ser de comprimento total, ou outro além do comprimento total, caso o derivado ou análogo contiver um aminoácido modificado.

A invenção fornece variantes da seqüência de aminoácidos do peptídeo de trânsito da *Neisseria*, que possuem aminoácidos substituídos, excluídos ou inseridos quando comparadas ao polipeptídeo do tipo selvagem. As variantes da invenção podem ser truncamentos do peptídeo de trânsito da *Neisseria*. Conforme aqui usado, "truncamento" de um peptídeo é o resultado da remoção de pelo menos um resíduo de aminoácido de pelo menos um terminal da seqüência de polipeptídeo. Em algumas configurações, o peptídeo de truncamento resulta pelo menos da remoção de pelo menos um resíduo de aminoácido, pelo menos 5 resíduos de aminoácido, pelo menos 10 resíduos de aminoácido, pelo menos 50 resíduos de aminoácido, pelo menos 100 resíduos de aminoácido, pelo menos 120 resíduos de aminoácido ou pelo menos 150 resíduos de aminoácido de um ou dos dois terminais da seqüência de polipeptídeo. Em algumas configurações, a composição compreende um peptídeo que consiste em uma região do peptídeo de trânsito da *Neisseria* que é menor que o comprimento total do peptídeo de trânsito da *Neisseria*. Em algumas configurações, a composição compreende um peptídeo com mais de aproximadamente 10 resíduos, mais de aproximadamente 15 resíduos ou mais que aproximadamente 20 resíduos do peptídeo de trânsito da *Neisseria* truncada. Em algumas configurações, a composição compreende um peptídeo que consiste em não mais de 100 resíduos, não mais de 70 resíduos, não mais de 50 resíduos, não mais de 40 resíduos, ou não mais de 30 resíduos do peptídeo de trânsito da *Neisseria* truncada.

Variantes do peptídeo de trânsito da *Neisseria* ou peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ ID N° 25) incluem, mas não se limitam a moléculas que compreendem regiões que são substancialmente homólogas ao peptídeo de trânsito da *Neisseria* (SEQ ID N° 24) ou ao peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ ID N° 25) em pelo menos aproximadamente 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98%, ou 99% da identidade da seqüência de aminoácidos de

tamanho idêntico ou quando comparado a uma sequência alinhada na qual o alinhamento é realizado por um algoritmo da homologia. O termo "porcentagem (%) da identidade da sequência de aminoácidos" entre o peptídeo de trânsito da *Neisseria* ou o peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ ID N<sup>o</sup> 25) e uma sequência candidata é definido como a porcentagem de resíduos de aminoácido no peptídeo de trânsito da *Neisseria* ou peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ ID N<sup>o</sup> 25) que são idênticos aos resíduos de aminoácido em uma sequência candidata quando as duas sequências são alinhadas.

As variantes também incluem peptídeos feitos com aminoácidos sintéticos que não ocorrem naturalmente. Por exemplo, aminoácidos que não ocorrem naturalmente podem ser integrados aos peptídeos variantes para aumentar ou otimizar a meia vida da composição no fluxo sanguíneo. Tais variantes incluem, mas não se limitam a peptídeos D, L (diastereômero), (Futaki *et al*, J. Biol. Chem. 276(8):5836-40 (2001); Papo *et al*, Cancer Res. 64(16):5779-86 (2004); Miller *et al*, Biochem. Pharmacol. 36(1):169- 76, (1987)).; peptídeos contendo aminoácidos incomuns (Lee *et al*, J. Pept. Res. 63(2):69-84 (2004)) e aminoácido não natural contendo olefina seguido pela grampeamento de hidrocarboneto (Schafmeister *et al*, J. Am. Chem. Soc. 122:5891-5892 (2000); Walenski *et al*, Science 305:1466-1470 (2004)) e peptídeos compreendendo resíduos  $\epsilon$ -(3,5- dinitrobenzoil)-Lis.

Em outras configurações, o peptídeo da invenção é um derivado do peptídeo de trânsito da *Neisseria* ou do peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ ID N<sup>o</sup> 25). Os derivados dos peptídeos de trânsito são modificações químicas do peptídeo que permitem manter algumas de suas atividades fundamentais. Por exemplo, um "derivado" do peptídeo de trânsito pode ser um peptídeo de trânsito quimicamente modificado que mantenha sua habilidade de atravessar a BBB e/ou penetrar nas células cancerígenas do cérebro. Derivações que resultam em uma atividade alterada do peptídeo de trânsito da *Neisseria* ou peptídeo de trânsito de AAEAP são



contempladas como parte da invenção na extensão em que as perdas na atividade não forem apreciáveis. Conforme aqui usado, "perdas apreciáveis" correspondem a mais que aproximadamente 50% da atividade quando comparada ao peptídeo não alterado. Modificações químicas de interesse incluem, mas não se limitam a amidação, acetilação, sulfatação, modificação do polietileno glicol (PEG), fosforilação e glicosilação do peptídeo. Além disso, um peptídeo derivado pode ser uma fusão de um peptídeo de trânsito, ou sua variante, derivado ou equivalente estrutural do composto químico, mas não limitado a um outro peptídeo, molécula do medicamento ou outro agente farmacêutico ou terapêutico ou uma sonda detectável.

Os derivados de interesse incluem as modificações químicas através das quais a meia vida no fluxo sanguíneo dos peptídeos e das composições da invenção pode ser aumentada ou otimizada, por exemplo, por diversos métodos bem conhecidos aos especialistas na arte, incluindo mas não se limitando aos peptídeos circularizados (Monk *et al*, BioDrugs 19(4):261-78, (2005); DeFreest *et al*, J. Pept. Res. 63(5):409-19 (2004))., modificações dos terminais N e C (Labrie *et al*, Clin. Invest. Med. 13(5):275-8, (1990)) e aminoácido não natural contendo olefina seguido pela grampeamento de hidrocarbonetos (Schafmeister *et al*, J. Am. Chem. Soc. 122:5891-5892 (2000); Walenski *et al*, Science 305:1466-1470 (2004)).

Contempla-se que os peptídeos de trânsito da invenção podem ser a variante, derivado e/ou equivalente estrutural do peptídeo de trânsito da *Neisseria* ou peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ ID Nº 25). Por exemplo, os peptídeos podem ser um truncamento do peptídeo de trânsito da *Neisseria* que tenha sido PEGilado, tornando-o assim uma variante e um derivado. Em uma configuração, os peptídeos da invenção são sintetizados com aminoácidos não naturais  $\alpha,\alpha$ -bi-substituídos contendo cordas de ligação da olefina, seguido pelo "grampo" de todo hidrocarboneto pela matátese da olefina catalisada de rutênio (Scharmeister *et al*, J. Am. Chem. Soc.

122:5891-5892 (2000); Walensky *et al*, Science 305:1466-1470 (2004)).  
Adicionalmente, os peptídeos que são estruturalmente equivalentes ao  
peptídeo de trânsito da *Neisseria* podem ser fundidos a outros peptídeos,  
formando um peptídeo que é, ao mesmo tempo, estruturalmente equivalente e  
5 derivado. Esses exemplos são meramente ilustrativos e não limitam a  
invenção.

Mudanças podem ser introduzidas no peptídeo de trânsito da  
*Neisseria* ou no peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ ID Nº 25) que  
incorram em alterações na seqüência de aminoácidos do peptídeo de trânsito  
10 da *Neisseria* ou do peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ ID Nº 25) mas não  
anulam a habilidade do peptídeo de trânsito da *Neisseria* ou do peptídeo de  
trânsito de AAEAP (SEQ ID Nº 25) de transportar o composto de carga às  
células cancerígenas do cérebro e/ou através da BBB. Um resíduo de  
aminoácido "não essencial" é o resíduo que pode ser alterado na seqüência do  
15 peptídeo de trânsito da *Neisseria* ou do peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ  
ID Nº 25) sem anular a sua habilidade de transportar o composto de carga na  
célula e/ou através da BBB sendo que o resíduo de aminoácido "essencial" é  
necessário devido a essa atividade.

Aminoácidos, nos quais podem ser feitas substituições  
20 "conservativas" são bem conhecidos na técnica. Substituições conservativas  
úteis são mostradas na Tabela 1, "Substituições preferidas." Substituições  
conservativas por meio dos quais um aminoácido de uma classe é substituído  
por um outro aminoácido do mesmo tipo fazem parte do escopo da invenção,  
uma vez que a substituição não anula a atividade do peptídeo de trânsito  
25 *Neisseria* /AAEAP. Tais alterações que resultam na atividade alterada do  
peptídeo de trânsito da *Neisseria* /AAEAP são contempladas como parte da  
invenção na extensão em que as perdas na atividade não forem apreciáveis.  
Conforme aqui usado, "perdas apreciáveis" correspondem a mais que  
aproximadamente 50% da atividade quando comparada ao peptídeo não  
30 alterado.

**TABELA 1**  
**SUBSTITUIÇÕES PREFERIDAS**

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

- Substituições não “conservativas” que afetam (1) a estrutura do suporte principal do polipeptídeo, como a conformação  $\beta$ -folha ou  $\alpha$ -hélice, (2) a carga, (3) hidrofobicidade ou (4) o volume da cadeia lateral do sítio alvo pode modificar a função do peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP. Os
- 5 resíduos são divididos em grupos baseados nas propriedades da cadeia lateral conforme mostrado na Tabela 2. As substituições não conservativas acarretam na troca de um membro de uma dessas classes para uma outra classe.

Substituições não conservativas onde um aminoácido de uma classe é substituído por um outro aminoácido de uma diferente classe cai dentro do escopo da invenção, na extensão em que a substituição não anula a atividade do peptídeo de trânsito da *Neisseria* ou do peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ ID N° 25). Tais alterações que resultam na atividade alterada do peptídeo de trânsito da *Neisseria* /AAEAP são contempladas como parte da invenção à medida que as perdas na atividade não forem apreciáveis.

**TABELA 2**  
**CLASSES DE AMINOÁCIDO**

Classe	Aminoácidos
Hidrofóbica	Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile
Hidrofílica neutra	Cys, Ser, Thr
Acídica	Asp, Glu
Básica	Asn, Gln, His, Lys, Arg
Conformação de cadeia rompida	Gly, Pro
Aromática	Trp, Tyr, Phe

Em outras configurações, a invenção contempla os equivalentes estruturais dos peptídeos de trânsito da *Neisseria* ou peptídeos de trânsito de AAEAP (SEQ ID N° 25) que possuem uma significativa similaridade estrutural com os resíduos dos aminoácidos 1 a 39 (SEQ ID N° 24) de *Laz* da *Neisseria gonorrhoeae*. Especificamente, a significativa homologia estrutural entre um equivalente do peptídeo de trânsito da *Neisseria* e os resíduos dos aminoácidos 1 a 39 (SEQ ID N° 24) de *Laz* da *Neisseria gonorrhoeae* pode ser determinada usando o algoritmo VAST (Gibrat *et al*, Curr Opin Struct Biol 6:377-385 (1996); Madej *et al*, Proteins 23:356-3690 (1995)). Em configurações específicas, o valor p de VAST de comparação do equivalente estrutural de um peptídeo de trânsito da *Neisseria* ou peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ ID N° 25) com os resíduos dos aminoácidos 1 a 39 (SEQ ID N° 24) de *Laz* da *Neisseria gonorrhoeae* é inferior a aproximadamente  $10^{-3}$ , inferior a aproximadamente  $10^{-5}$ , ou inferior a aproximadamente  $10^{-7}$ . Em outras configurações, uma significativa homologia estrutural entre um

equivalente estrutural do peptídeo de trânsito da *Neisseria* e os resíduos dos aminoácidos 1 a 39 (SEQ ID Nº 24) de *Laz* da *Neisseria gonorrhoeae* pode ser determinada usando o algoritmo de DALI (Holm e Sander, J. Mol. Biol. 233:123-138 (1993)). Em configurações específicas, a contagem Z de DALI para uma comparação estrutural a dois é pelo menos aproximadamente 3,5, pelo menos aproximadamente 7,0, ou pelo menos aproximadamente 10,0.

Modificações ao peptídeo de trânsito da *Neisseria* ou ao peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ ID Nº 25) podem ser feitas usando métodos conhecidos na técnica como a mutagênese mediada por oligonucleotídeo (sítio direcionada), escaneamento da alanina e mutagênese da PCR. A mutagênese sítio direcionada (Carter, Biochem J. 237:1-7 (1986); Zoller e Smith, Methods Enzymol. 154:329-50 (1987)), mutagênese de cassete, mutagênese de seleção de restrição (Wells *et al*, Gene 34:315-23 (1985)) ou outras conhecidas técnicas podem ser realizadas no DNA clonado para produzir uma variante do peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP que codificam os ácidos nucleicos. Além disso, os nucleotídeos que codificam as variantes do peptídeo de trânsito da *Neisseria* ou do peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ ID Nº 25) podem ser sintetizados por métodos bem conhecidos na técnica.

## 20            **Peptídeo de Trânsito da *Neisseria*/AAEAP (SEQ ID Nº 25) - Complexo do Composto de Carga**

Em um outro aspecto da invenção, são fornecidos complexos de carga do peptídeo de trânsito, onde o peptídeo de trânsito da *Neisseria* ou o peptídeo de trânsito da AAEAP são complexados com pelo menos um composto de carga. Os peptídeos de trânsito desses complexos podem ser o peptídeo de trânsito da *Neisseria*, o peptídeo de trânsito de AAEAP (SEQ ID Nº 25), ou suas variantes, derivados ou equivalentes estruturais. Os compostos de carga liberados pela presente invenção incluem, mas não se limitam a proteínas, lipoproteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos, incluindo ácidos nucleicos anti-sentidos, corantes, micropartículas ou

nanopartículas, toxinas e moléculas orgânicas e inorgânicas, pequenas moléculas e medicamentos. Os referidos complexos de carga de peptídeo de trânsito podem ser usados para liberar os medicamentos ao cérebro, e/ou às células cancerígenas do cérebro e às células cancerígenas em geral, para fins terapêuticos, para liberar os compostos de formação de imagens às células cancerígenas do cérebro e às células cancerígenas em geral, para fins de diagnóstico e qualquer outra finalidade que exija a liberação de um composto específico ao cérebro e/ou às células cancerígenas do cérebro. Os compostos de carga podem ser ligados aos terminais C ou N do peptídeo de trânsito.

Em algumas configurações, o peptídeo de trânsito da *Neisseria* ou o peptídeo de trânsito da AAEAP é complexado com um peptídeo de transporte derivado da cupredoxina. Os peptídeos de transporte derivados da cupredoxina são fornecidos no Pedido de Patente Norte-Americana Nº 11/244.105, depositado em 06 de outubro de 2005, que é aqui expressamente incorporado por referência. Em algumas configurações, o peptídeo de transporte derivado da cupredoxina, que compreende a região da azurina com 50 - 77 aminoácidos de *Pseudomonas aeruginosa*, é sua variante, derivado ou equivalente estrutural.

Conforme aqui usado, os termos "complexado," "complexo" ou "ligado" se referem à associação física entre os componentes que estão sendo complexados. Em alguns casos, a associação física pode não ser direta, mas pode ser mediada por um grupo de ligação ou um outro componente. Os componentes podem ser proteínas, outras moléculas orgânicas ou inorgânicas, entre outras. A associação física entre os componentes pode ser por ligações covalentes, hidrofóbicas e/ou forças de van der waals, ou quaisquer outros meios que mantenham os componentes em associação física. Em várias configurações da presente invenção, o composto de carga pode compreender a cupredoxina que é citotóxica às células cancerígenas, como a azurina: da *P. aeruginosa* (SEQ ID Nº 24) ("azurina tipo selvagem"); plastocianina da *cyanobacterium Phormidium laminosum*; rusticianina da *Thiobacillus*

*ferrooxidans*; pseudoazurina da *Achromobacter cycloclastes*, azurinas da *Pseudomonas syringa*, *Neisseria meningitidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bordetella bronchiseptica*, auracianina A e B da *Chloroflexus aurantiacus* ou *Neisseria gonorrhoeae*, entre outras azurinas e proteínas similares a azurina.

- 5 Em outras configurações, o composto de carga pode ser um citocromo c, como citocromo C<sub>551</sub> da *P. aeruginosa*. Em outras configurações, o composto de carga pode ser a variante de qualquer uma das acima citadas que mantenha a sua citotoxicidade nas células cancerígenas.

Em uma configuração, o composto de carga pode ser uma  
10 substância detectável, por exemplo, uma substância fluorescente, como a proteína fluorescente verde; uma substância luminescente; uma enzima, como  $\beta$ -galactosidase; ou uma proteína rádio-rotulada ou biotinilada, que é liberada a uma célula para conferir um fenótipo detectável. Similarmente, as micropartículas ou nanopartículas identificadas por uma substância  
15 detectável, por exemplo, uma substância fluorescente, podem ser liberadas. Um exemplo de nanopartículas apropriadas é encontrado na Patente Norte-americana N<sup>o</sup> 6.383.500, emitida em 07 de maio de 2002, que é aqui expressamente incorporada por referência. Muitas dessas substâncias detectáveis são conhecidas pelos especialistas da técnica.

20 Em algumas configurações, o composto de carga pode ser uma substância detectável apropriada para a tomografia computadorizada de raios-X, imagem de ressonância magnética, formação de imagem ultrassonográfica ou cintilografia com radionuclídeos. Nessas configurações, o composto de carga é administrado ao paciente para fins de diagnóstico. Um agente de  
25 contraste é administrado como um composto de carga para melhorar a imagem por CT de Raios-X, MRI e ultrassonografia. Em várias configurações, o composto de carga é um radioisótopo emitindo pósitron ou raios gama, um agente de contraste de imagem de ressonância magnética, um agente de contraste de Raios-X e/ou um agente de contraste de  
30 ultrassonografia.

A administração de um composto de carga de radionuclídeo, direcionado ao tecido tumoral do cérebro através do peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP (SEQ ID N° 25), com ou sem um peptídeo de transporte derivado da cupredoxina, pode ser usada para a cintilografia com radionuclídeos. Em algumas configurações, o peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP (SEQ ID N° 25) pode conter radionucleotídeos com ou sem um composto de carga. A patente norte-americana Pub. N° 2006/0039861 fornece agentes de contraste multiméricos, peptídeos direcionados para uso como agentes de contraste de radionuclídeos. Os composto de carga apropriados, comercialmente disponíveis para imagem de Raios-X incluem, mas não se limitam a Visipaque® (iodixanol), Omnipaque® (iohexol) e Imagopaque®, disponibilizados por GE Healthcare (Chalfont St. Giles, Reino Unido).

A administração do composto de carga do agente de contraste da ultrassonografia direcionada ao tecido tumoral do cérebro através do peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP (SEQ ID N° 25), com ou sem um peptídeo de transporte derivado da cupredoxina, pode ser usada para a formação de imagem ultrassonográfica. Agentes de contraste para ultrassonografia apropriados para uso como compostos de carga incluem, mas não se limitam a microbolhas de um gás biocompatível, uma carreadora líquida, uma microesfera surfactante, que também compreende uma parte de ligação opcional,  $L_n$ , entre as partes alvos e as microbolhas. As microbolhas de interesse incluem, mas não se limitam aos fornecidos na Tabela 3. Neste contexto, o termo “carreadora líquida” significa uma solução aquosa e o termo “surfactante” significa qualquer material anfílico que produz uma tensão interfacial na solução. Uma lista de surfactantes apropriados para a formação de microesferas surfactantes é revelada em EP0727225A2, aqui expressamente incorporada por referência. O termo “microesferas surfactantes” incluem a nanoesferas, os lipossomas, as vesículas e similares. Em algumas configurações, o agente de contraste da ultrassonografia é um lipossoma ou dextran. O gás biocompatível pode ser o ar ou fluorocarbono, como perfluoroalcano C3-C5, que fornece uma diferença na ecogenicidade e



portanto, um contraste na formação de imagem ultrassonográfica. O gás pode ser encapsulado ou contido em uma microesfera à qual é anexado o peptídeo de trânsito de *Neisseria* / AAEAP (SEQ ID Nº 25) opcionalmente através de um grupo de ligação. A ligação pode ser covalente, iônica ou por forças de van der Waals.

5

<b>TABELA 3</b> <b>MICROBOLHAS E SUA COMPOSIÇÃO A SEREM USADAS COMO</b> <b>AGENTES DE CONTRASTE DE ULTRASSONOGRRAFIA.</b>		
<b>Microbolha</b>	<b>Gás</b>	<b>Concha de estabilização</b>
<b>Primeira geração, não transpulmonar vascular</b>		
Microbolhas livres	Ar	Nenhuma
Echovist® (SHU 454)	Ar	Nenhuma
<b>Segunda geração, transpulmonar vascular, meia vida curta (&lt; 5 min)</b>		
Albunex®	Ar	Albumina
Levovist (SHU 508 A)	Ar	Ácido Palmítico
<b>Terceira geração, vascular transpulmonar, meia vida mais longa (&gt; 5 min)</b>		
Aerossomas (Definity, MRXI 15, DMPI 15)	Perfluoropropano	Fosfolipídeos
Echogen (QW3600)	Dodecafluoropentano	Surfactante
Optison® (FSO 69)	Octafluoropropano	Albumina
PESDA	Perfluorobutano	Albumina
Quantison	Ar	Albumina
QW7437	Perfluorocarbono	Surfactante
Imavist® (Imagent, AFO 150)	Perfluorohexano	Surfactante
Sonovue® (BRI)	Hexafluoreto sulfúrico	Fosfolipídeos
<b>Transpulmonar com fase específica do órgão (fígado, baço)</b>		
BR14	Perfluorobutano	Fosfolipídeos
Levovist (SHU 508 A)	Ar	Ácido Palmítico
Sonavist® (SHU 563 A)	Ar	Cianoacrilato
Sonazoid® (NC100100)	Perfluorocarbono	Surfatante

A administração de um composto de carga do agente de contraste de Raios-X direcionada ao tecido tumoral do cérebro através do peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP (SEQ ID- Nº 25), com ou sem um peptídeo de transporte derivado da cupredoxina, pode ser usada em tomografia computadorizada de Raios-X, e outros meios de formação de imagem por Raios-X. Atuais agentes de contraste de Raios-X comercialmente disponíveis a serem usados como compostos de carga podem ser classificados em duas categorias: 1) agentes de contraste iônicos, que possuem um grupo carboxil iônico e 2) agentes de contraste não iônicos, que não contêm quaisquer grupos iônicos. Exemplos de agentes de contraste iônicos comercialmente disponíveis incluem o Hypaque® (Diatrizoato) e Hexabrix® (Ioxaglate), enquanto os grupos não iônicos incluem Omnipaque® (Iohexol), Isovue® (Iopamidol), Optiray® (Ioversol), e Visipaque® (Iodixanol). Outros agentes de contraste de Raios-X apropriado para uso como compostos de carga incluem, mas não se limitam a um ou mais átomos que absorvem os raios-X ou átomos “pesados” de número atômico 20 ou maior, que também compreendem uma parte de ligação opcional,  $L_n$ , entre o peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP (SEQ ID Nº 25) e os átomos que absorvem os raios-X. O átomo pesado freqüentemente usado nos agentes de contraste de Raios-X é iodina. Agentes de contraste de Raios-X que compreendem quelatos metálicos (por exemplo, Patente Norte-americana Nº 5.417.959) e poliquelatos que compreendem uma pluralidade de íons metálicos (por exemplo, Patente Norte-americana Nº 5.679.810) foram revelados. Complexos de estrutura multinuclear foram revelados como agentes de contraste de Raios-X (por exemplo, Patente Norte-americana Nº 5.804.161, PCT WO91/14460 e PCT WO 92/17215). Outros agentes de contraste de Raios-X são bem conhecidos aos especialistas da técnica e podem ser usados, bem como os compostos de carga da presente invenção.

A administração de um composto de carga de agente de contraste de MRI direcionada ao tecido tumoral do cérebro através do peptídeo de

trânsito da *Neisseria* / AAEAP (SEQ ID N° 25), com ou sem um peptídeo de transporte derivado da cupredoxina, pode ser usada para a formação de imagem de MRI. Agentes de contraste de MRI apropriados para uso como compostos de carga incluem, mas não se limitam a um ou mais íons metálicos paramagnéticos, que também compreendem uma parte de ligação opcional,  $L_n$ , entre o peptídeo de trânsito de *Neisseria* / AAEAP (SEQ ID N° 25) e íons metálicos paramagnéticos. Íons metálicos de quelatos metálicos podem ser íons paramagnéticos. Íons metálicos apropriados incluem os que possuem números atômicos de 22 a 29 (inclusive), 42, 44 e 58 a 70 (inclusive) e possuem estados de oxidação de +2 ou +3. Exemplos dos referidos íons metálicos são o cromo (III), manganês (II), ferro (II), ferro (III), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), praseodímio (III), neodímio (III), samário (III), gadolínio (III), térbio (III), disprósio (III), hólmio (III), érbio (III) e itérbio (III). Agentes de contraste de MRI apropriados comercialmente disponíveis para uso como compostos de carga incluem, mas não se limitam a Omniscan<sup>®</sup> (gadodiamida) e Teslascan<sup>®</sup> da GE Healthcare (Chalfont St. Giles, Reino Unido).

Em uma outra configuração, um composto de carga é liberado para destruir ou inibir o crescimento celular, como a célula cancerígena do cérebro ou outras células cancerígenas. Por exemplo, o composto de carga pode ser uma proteína de controle do ciclo celular, como p53; um inibidor da quinase ciclina dependente, como p16, p21 ou p27; uma proteína suicida como a timidina quinase ou nitroreductase; a citocina ou outra proteína imunomodulatória como a interleucina 1, interleucina 2 ou fator de estimulação de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF); ou uma toxina, como a exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. Em outras configurações, um fragmento biologicamente ativo de uma das classes de compostos acima pode ser liberado.

Ainda em uma outra configuração, o composto de carga é um medicamento para tratamento de câncer. Tais medicamentos incluem, por

exemplo, 5-fluorouracil; Interferon  $\alpha$ ; Metotrexato; Tamoxifeno; e Vincristina. Outros compostos de carga apropriados para o tratamento do câncer incluem, mas não se limitam a agentes alquilantes como nitrogênio mostarda, alquil sulfonatos, nitrosouréas, etileniminas, e triazenas; 5 antimetabólitos como os antagonistas do folato, análogos da purina e análogos da pirimidina; antibióticos como antraciclinas, bleomicinas, mitomicina, dactinomicina e plicamicina; enzimas como L-asparaginase; inibidores da farnesil-proteína transferase; inibidores da 5 $\alpha$ -reductase; inibidores de 17 $\beta$ -hidroxiesteróide deidrogenase tipo 3; agentes hormonais como 10 glucocorticóides, estrógenos/antiestrógenos, andrógenos/antiandrógenos, progestinas, e antagonistas de hormônio luteinizantes hormônio liberador, octreotídeo acetato; agentes interruptores de microtúbulo, como ecteinascidinas ou seus análogos e derivados; agentes estabilizantes de microtúbulos como taxanos, por exemplo, paclitaxel (Taxol<sup>TM</sup>), docetaxel 15 (Taxotere<sup>TM</sup>), e seus análogos e epotilonas, como epotilonas A-F e seus análogos; produtos derivados de plantas, como vinca alcalóides, epipodofilotoxinas, taxanos; e inibidores de topoisomerase; inibidores de prenil-proteína transferase; e agentes diversos como hidroxiuréia, procarbazina, mitotano, hexametilmelamina, complexos de coordenação de 20 platina como cisplatina e carboplatina; e outros agentes usados como anticancerígenos e citotóxicos como os modificadores da resposta biológica, fatores de crescimento; imunomoduladores e anticorpos monoclonais.

Exemplos representativos dessas classes de agentes anticancerígenos e citotóxicos incluem, mas não se limitam a hidrocloreto de 25 mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucil, melfalano, ifosfamida, busulfano, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, tiotepa, dacarbazina, metotrexato, tioguanina, mercaptopurina, . fiudarabina, pentastatina, cladribina, citarabina, fluorouracil, hidrocloreto de doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, sulfato de bleomicina, mitomicina C, 30 actinomicina D, safracina, saframicina, quinocarcina, discodermolida,

vincristina, vinblastina, tartrato de vinorelbina, etoposida, fosfato de etoposida, teniposida, paclitaxel, tamoxifeno, estramustina, fosfato sódico de estramustina, flutamida, buserelina, leuprolida, pteridina, diíneses, levamisola, aflacon, interferon, interleucinas, aldesleuquina, filgrastim, sargramostim, rituximab, BCG, tretinoína, cloridrato de irinotecan, betametosona, gemcitabina cloridrato, altretamina e topoteca e quaisquer análogos ou derivados desses.

Exemplos agentes anticancerígenos e outros agentes citotóxicos úteis como compostos de carga incluem os seguintes: derivados da epotilona, conforme encontrados na Patente Alemã Nº 4138042.8; WO 97/19086, WO 98/22461, WO 98/25929, WO 98/38192, WO 99/01124, WO 99/02224, WO 99/02514, WO 99/03848, WO 99/07692, WO 99/27890, WO 99/28324, WO 99/43653, WO 99/54330, WO 99/54318, WO 99/54319, WO 99/65913, WO 99/67252, WO 99/67253 e WO 00/00485; inibidores da quinase ciclina dependente conforme encontrados na WO 99/24416 (veja também a Patente Norte-americana Nº 6.040.321); e inibidores da prenil proteína transferase conforme encontrados na WO 97/30992 e WO 98/54966; e agentes como os descritos genérica e especificamente na Patente Norte-americana Nº 6.011.029, cujos compostos podem ser empregados com moduladores LHRH, especialmente no tratamento de câncer.

Outros exemplos de compostos de carga incluem aqueles que podem ser vantajosamente liberados ao cérebro. Tais compostos de carga incluem medicamentos e outros agentes terapêuticos para o tratamento das condições relacionadas ao cérebro. Tais condições incluem, mas não se limitam a depressão, distúrbios afetivos, dores crônicas, epilepsia, mal de Alzheimer, acidente cardiovascular / neuroproteção, lesão cerebral e da medula espinal, câncer cerebral, infecção cerebral por HIV, vários distúrbios causadores da ataxia, esclerose lateral amiotrófica (ALS), mal de Huntington, erros genéticos congênitos na infância que afetam o cérebro, mal de Parkinson e múltipla esclerose.

Medicamentos antidepressivos que podem ser usados como composto de carga para tratar a depressão e distúrbios afetivos incluem, mas não se limitam a antidepressivos tricíclicos como nortriptilina, venlafaxina (Effexor®) e nefazadona (Serzone®); inibidores seletivos de reabsorção de serotonina (SSRIs), como a fluoxetina (Prozac®), sertralina (Zoloft®), fluvoxamina (Luvox®), paroxetina (Paxil®), e citalopram (Celexa®), mirtazepina sedativo (Remeron®) e bupropiona mais estimulante (Wellbutrin®). Também de interesse são as medicações para enxaqueca e cefaléia que incluem, mas não se limitam a ergotamina, diidroergotamina, quetoprofeno, propranolol, timolol, atenolol, metoprolol e nadolol.

Medicamentos que podem ser usados como composto de carga para tratar a dor crônica incluem, mas não se limitam a lenitivos mais comuns como a acetaminofeno (Tylenol®); medicamentos antiinflamatórios como aspirina; medicamentos antiinflamatórios não esteroidais (NSAIDs) como ibuprofeno (Advil®, Motrin®) e naproxeno (Aleve®); medicações opióides para dor como opióides similares a morfina; medicações antidepressivas e anti-convulsiantes. Medicamentos que podem ser usados como carga para tratar a epilepsia incluem, mas não se limitam a fenobarbital, difenilidantoína, trimetadiona (Tridione®), diazepam (Valium®), carbamazepina (Tegretol®), ácido valpróico (Depakene®), Emeside® (etosuximida), Zarontin® (etosuximida), trileptal, carbamazepina, Keppra® (levetiracetam), lamictal, acetazolamida, triagabina, valproato sódico, pregabalina, clonazepam, carbamazepina, topiramato, ácido valpróico, lamotrigina, etosuximida, clobazam, vigabatrina, levetiracetam, gabapentina, zonisamida, primidona, fenitoína, e oxcarbazepina.

Medicamentos que podem ser usados como compostos de carga para tratar o mal de Alzheimer incluem, mas não se limitam a inibidores de colinesterase, como Razadyne® (anteriormente conhecido como Reminyl®) (galantamina), Exelon® (rivastigmina), Aricept® (donepezil), Cognex® (tacrina), e um antagonista de N-metil D-aspartato (NMDA), Namenda®

(memantina).

Medicamentos que podem ser usados como composto de carga para tratar o acidente cardiovascular ou a neuroproteção incluem, mas não se limitam a Gavestinel<sup>®</sup>, eritropoietina (EPO), trombopoietina, TNF-alfa, estrógenos, melatonina e canabinóides.

Medicamentos que podem ser usados como composto de carga para tratar a infecção cerebral por HIV incluem, mas não se limitam a inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa (NNRTIs) como delavardina, efavirenz e nevirapina; inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa (NRTIs) como abacavir, abacavir, lamivudina, abacavir, lamivudina, zidovudina, didanosina, emtricitabina, emtricitabina, tenofovir DF, lamivudina, lamivudina, zidovudina, estavudina, tenofovir DF, zalcitabina e zidovudina; inibidores da protease (PIs) como amprenavir, atazanavir, fosamprenavir, indinavir, lopinavir, ritonavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir e tipranavir; e inibidores da fusão como enfuvirtida.

Medicamentos que podem ser usados como composto de carga para tratar a esclerose lateral amiotrófica (ALS) incluem, mas não se limitam a creatina, Myotrophin<sup>®</sup>, Celebrex<sup>®</sup>, Neotrogin<sup>®</sup>, NAALADase, neurodex, Rilutek<sup>®</sup>, oxandrolona, coenzima Q10, topiramato (Topamax<sup>®</sup>), xaliproden, indinavir, minociclina e buspirona.

Medicamentos que podem ser usados como compostos de carga para tratar o mal de Huntington incluem, mas não se limitam a medicamentos antipsicóticos, como haloperidol, ou outros medicamentos, como clonazepam, antidepressivos como fluoxetina, sertralina e nortriptilina; tranquilizantes e lítio; minociclina, citalopram e Etil-EPA (Miraxion<sup>®</sup>).

Medicamentos que podem ser usados como compostos de carga para tratar o mal de Parkinson incluem, mas não se limitam a anticolinérgicos ou amantadina, levodopa (L-dopa), bromocriptina, pergolida, pramipexol, ropinirol, selegilina e amantadina.

Medicamentos que podem ser usados como compostos de carga para

tratar a múltipla esclerose incluem, mas não se limitam a hormônio adrenocorticotrópico (mais conhecido como ACTH), prednisona, prednisolona, metilprednisolona, betametasona, dexametasona, beta interferon (Avonex<sup>®</sup>, Betaseron<sup>®</sup> e Rebif<sup>®</sup>), alfa interferon, Novantrone<sup>®</sup> (mitoxantrona),  
5 ciclosporina (Sandimmune<sup>®</sup>), ciclofosfamida (Cytosan<sup>®</sup>), metotrexato, azatioprina (Imuran<sup>®</sup>) e cladribina (Leustatin<sup>®</sup>).

Ainda em uma outra configuração, o composto de carga é um ácido nucléico que codifica uma das classes de compostos acima.

Os exemplos acima são fornecidos apenas para ilustração e muitos  
10 outros desses compostos são conhecidos pelos especialistas na técnica.

**Ácidos Nucléicos Codificando o Domínio de Trânsito da *Neisseria* ou AAEAP ou Ligado ao Composto de Carga.**

Em um outro aspecto, a presente invenção fornece moléculas de ácido nucléicos que codificam os peptídeos de trânsito da *Neisseria* / AAEAP  
15 (SEQ ID N<sup>o</sup> 25) e suas variantes, ou proteínas de fusão que compreende o peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP (SEQ ID N<sup>o</sup> 25) ligado a composto de carga, sendo que composto de carga é uma proteína. As moléculas do ácido nucléico de acordo com a invenção podem ser preparadas por uma combinação de procedimentos conhecidos na técnica. As seqüências  
20 de codificação usadas nesses ácidos nucléicos podem ser as encontradas no DNA genômico nativo que codifica um peptídeo em particular, ou podem ser criadas a partir de códon conhecidos. Essas seqüências de codificação podem ser também criadas para considerar o uso do códon preferido e o alternativo do organismo em que o peptídeo será expresso. As seqüências dos ácidos  
25 nucléicos do peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP (SEQ ID N<sup>o</sup> 25) e complexos de carga do peptídeo de trânsito podem ser individualmente preparados por síntese química ou clonagem. As seqüências de ácidos nucléicos podem ser então ligadas entre si através da ligase a fim de obter as moléculas do ácido nucléico de interesse.

30 **Métodos de Liberação do Composto de Carga usando o Domínio**



**de Trânsito da *Neisseria* ou AAEAP.**

As composições da invenção podem ser usadas, por exemplo, na detecção ou na formação de imagem de um tipo de célula, no tratamento do câncer, particularmente do sistema nervoso central ou cérebro, ou no  
5 tratamento de uma condição relacionada ao cérebro. As composições podem ser administradas em uma quantidade terapeuticamente eficaz. Tipicamente, o organismo hospede é um mamífero, por exemplo, humano ou animal.

Em algumas configurações, o composto de carga é liberado complexado ao peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP (SEQ ID N° 25),  
10 enquanto que em outras configurações, o composto de carga é administrado em conjunto com o peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP (SEQ ID N° 25), mas sem ser complexado a ele. Mais de um composto de carga pode ser administrado em conjunto com o peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP. A administração conjunta do composto de carga pode ser ao mesmo tempo  
15 que a do peptídeo de trânsito, podendo ser na mesma preparação farmacêutica ou em uma outra que seja administrada no prazo de uma hora após a administração do peptídeo de trânsito. Além disso, a administração conjunta do peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP (SEQ ID N° 25) e do composto de carga pode incluir a administração do peptídeo de trânsito da *Neisseria* /  
20 AAEAP (SEQ ID N° 25) que ocorra mais de aproximadamente uma hora, porém menos de aproximadamente duas horas, quatro horas, seis horas, doze horas ou 24 horas da administração do composto de carga. Em algumas configurações, o peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP, o(s) composto(s) de carga e um peptídeo de transporte derivado da cupredoxina podem ser  
25 administrados em conjunto. Em outras configurações, o peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP pode ser administrado em conjunto com um peptídeo de transporte derivado da cupredoxina complexado com o(s) composto(s) de carga.

Em muitas outras configurações da presente invenção, o peptídeo de  
30 trânsito da *Neisseria* / AAEAP (SEQ ID N° 25) libera o composto de carga na

célula *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. Por exemplo, a liberação pode ser realizada *in vitro* adicionando um complexo do peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP (SEQ ID N° 25) e um composto de carga à uma cultura celular, como biópsia. Alternativamente, a liberação pode ser realizada *ex vivo* adicionando o complexo a uma amostra retirada de um paciente, por exemplo, sangue, tecido ou medula óssea e retornando a amostra tratada ao paciente. A liberação pode ser também realizada por administração do complexo diretamente em um paciente. Os métodos da presente invenção podem ser usados para fins terapêuticos, profiláticos, diagnósticos ou de pesquisa.

10 Composições contendo o peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP (SEQ ID N° 25), incluindo complexos contendo o peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP (SEQ ID N° 25) podem ser administradas por qualquer rota apropriada, por exemplo, por via oral, bucal, inalação, sublingual, retal, vaginal, transuretral, nasal, tópica, percutânea, ou seja, transdérmica ou  
15 parenteral (incluindo a administração intravenosa, intramuscular, subcutânea e intracoronária) ou por qualquer injeção intracerebroventricular ou intracerebral. As composições da invenção e suas formulações farmacêuticas podem ser administradas em qualquer quantidade efetiva para obter o propósito pretendido. Quando administrada para tratar o câncer, ou qualquer  
20 outra condição que requeira tratamento, a composição deve ser administrada em uma quantidade terapeuticamente eficaz. Um guia de dosagem e programa de administração dos vários compostos de carga podem ser reunidos de muitas referências que descrevem o uso dos referidos compostos no tratamento ou diagnóstico, por exemplo, a Referência de Mesa do Médico  
25 (PDR), ou de outra forma determinado por um especialista ordinário na técnica.

As composições da invenção podem ser esterilizadas por técnicas convencionais, bem conhecidas ou podem ser esterilizadas por filtração. As soluções aquosas resultantes podem ser embaladas para uso como está ou  
30 liofilizada, sendo a preparação liofilizada combinada com uma solução estéril

antes da administração. Ao administrar de forma intravenosa os peptídeos de trânsito da *Neisseria* / AAEAP (SEQ ID Nº 25), os compostos de carga e/ou complexos de peptídeo de trânsito-composto de carga de acordo com a presente invenção, a administração podem ser por gotejamento intravenoso ou  
5 infusão intermitente.

A exata formulação, rota de administração e dosagem são determinadas pelo assistente de saúde ou médico em atendimento considerando a condição do paciente. A quantidade da dosagem e o intervalo podem ser ajustados individualmente para obter os níveis plasmáticos das  
10 composições da invenção que sejam suficientes para manter o efeito terapêutico. Geralmente, a composição desejada é administrada em uma mistura com a carreadora farmacêutica selecionada de acordo com a rota de administração pretendida e prática farmacêutica padrão.

A dosagem apropriada pode variar de acordo, por exemplo, com o  
15 composto que contém o peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEP (SEQ ID Nº 25) empregado, composto(s) de carga, hospede, modo de administração e natureza e gravidade das condições que estão sendo tratadas ou diagnosticadas. Entretanto, em uma configuração dos métodos da presente invenção, os resultados satisfatórios do tratamento em humanos são indicados  
20 os obtidos em doses diárias de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal do composto contendo o peptídeo de trânsito de *Neisseria* / AAEAP (SEQ ID Nº 25), ou o complexo do peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP. Em uma configuração, a dose diária indicada para tratamento em humanos pode estar entre aproximadamente 0,7 mg a  
25 aproximadamente 1400 mg do composto contendo o peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP (SEQ ID Nº 25) ou o complexo do peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP convenientemente administrado, por exemplo, em doses diárias, semanais, mensais e/ou contínuas. As doses diárias podem ser discretas de 1 a 12 vezes por dia ou mais. Alternativamente, as doses podem  
30 ser administradas a cada dois dias, a cada três dias, a cada quatro dias, a cada

cinco dias, a cada seis dias, semanalmente e similarmente em incrementos diários de até 31 dias ou mais. A dosagem pode ser contínua, intermitente ou única, usando qualquer forma de dosagem aplicável, incluindo o comprimido, os adesivos, a administração i.v., etc. Mais especificamente, a composição é administrada em uma quantidade terapeuticamente eficaz. Em configurações específicas, a quantidade terapeuticamente efetiva é de aproximadamente 0,01 - 20 mg/kg de peso corporal. Em configurações específicas, o nível da dose é de aproximadamente 10 mg/kg/dia, aproximadamente 15 mg/kg/dia, aproximadamente 20 mg/kg/dia, aproximadamente 25 mg/kg/dia, aproximadamente 30 mg/kg/dia, aproximadamente 35 mg/kg/dia, aproximadamente 40 mg/kg/dia, aproximadamente 45 mg/kg/dia ou aproximadamente 50 mg/kg/dia.

O método de introduzir as composições contendo o peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP (SEQ ID N° 25) (s) ou o complexo do peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP nos pacientes é, em algumas configurações, a administração conjunta com outros medicamentos conhecidos no tratamento do câncer. Tais métodos são bem conhecidos na técnica. Em uma configuração específica, as composições contendo o peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP ((SEQ ID N° 25) ou o complexo do peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP são parte de um coquetel ou da dosagem conjunta ou com outros medicamentos para o tratamento do câncer. Tais medicamentos incluem quaisquer dos compostos de carga aqui relacionados para tratamento do câncer.

Composições farmacêuticas que compreendem as composições da invenção podem ser usadas, de acordo com presente invenção, formuladas de maneira convencional usando uma ou mais carreadoras fisiologicamente aceitáveis contendo excipientes e auxiliares que facilitem o processamento da composição, agentes ativos para a inibição ou estimulação da secreção da composição, ou sua mistura em preparações que podem ser usadas terapeuticamente.

Moléculas de ácidos nucleicos que codificam o peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP ou uma proteína de fusão combinando o peptídeo de trânsito e composto(s) de carga e/ou um peptídeo de transporte derivado da cupredoxina, podem ser inseridas nos vetores e usados como vetores de  
5 terapia genética. Os vetores de terapia genética podem ser liberados para um paciente, por exemplo, por injeção intravenosa, administração local (Patente Norte-americana Nº 5.328.470), ou por injeção estereotática. (Chen *et al*, Proc Natl Acad Sci USA, 91:3054-57 (1994)). A preparação farmacêutica de um  
10 vetor de terapia genética pode incluir um diluente aceitável ou pode compreender uma matriz de liberação lenta onde o veículo de liberação genética é assentado. Alternativamente, onde o vetor de liberação genética completo pode ser produzido intacto a partir das células recombinantes, por exemplo, retrovetores virais, a preparação farmacêutica pode incluir um ou  
mais células que produzem o sistema de liberação genética.

15 Em um aspecto, a composição é liberada como DNA de forma que o complexo é gerado *in situ*. Em uma configuração, o DNA é "despido", conforme descrito, por exemplo, por Ulmer *et al*, Science 259:1745-49 (1993) e revisado por Cohen, Science 259 1691-92 (1993). A captura do DNA despido pode ser aumentada revestindo o DNA sobre a carreadora, por  
20 exemplo, uma conta biodegradável que seja eficientemente transportada às células. Nos referidos métodos, o DNA pode estar presente dentro de qualquer variedade de sistemas de liberação conhecidos aos que possuem habilidade ordinária na técnica, incluindo os sistemas de expressão de ácidos nucleicos, bacterianos e virais. Técnicas para a incorporação do DNA nesses  
25 referidos sistemas de expressão são bem conhecidos aos que possuem habilidade ordinária na técnica. Veja por exemplo, WO90/11092, WO93/24640, WO 93/17706 e a Patente Norte-americana Nº 5.736.524.

Vetores usados para o transporte de material genético de organismo para organismo, podem ser divididos em duas classes gerais: Vetores de  
30 clonagem são plasmídios ou fagos de replicação com regiões que não são

essenciais para a propagação em uma célula hospede apropriada, na qual o DNA estranho pode ser inserido; o DNA estranho é replicado e propagado como se fosse um componente do vetor. Um vetor de expressão (como o plasmídeo, levedura ou genoma de vírus animal) é usado para introduzir o material genético estranho na célula ou tecido hospede a fim de transcrever e traduzir o DNA estranho, como DNA da composição. Em vetores de expressão, o DNA introduzido consiste de elementos operavelmente ligados como promotores que sinalizam para a célula hospede transcrever o DNA inserido. Alguns promotores são excepcionalmente úteis, como os promotores induzíveis que controlam a transcrição genética em resposta a fatores específicos. A ligação operável de um polinucleotídeo de uma composição a um promotor induzível pode controlar a expressão polipeptídeos da composição do peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP ou fragmentos. Exemplos de promotores induzíveis clássicos incluem aqueles que são responsivos a  $\alpha$ -interferon, choque térmico, íons metálicos pesados, e esteróides como glucocorticóides (Kaufman, Methods Enzymol. 185:487-511 (1990)) e tetraciclina. Outros promotores induzíveis desejáveis incluem os que não são endógenos a células nas quais o constructo está sendo introduzido, mas são responsivos às células em que o agente de indução é exogenamente fornecido. Em geral, os vetores de expressão úteis são freqüentemente os plasmídios. Entretanto, outras formas de vetores de expressão, como vetores virais (por exemplo, retrovírus de replicação defectiva, adenovírus e vírus adeno-associados) são contempladas.

A escolha do vetor é ditada pelo organismo ou células usadas e o destino desejado para o vetor. Em geral, os vetores compreendem as seqüências de sinalização, origens de replicação, genes do marcador, elementos melhoradores, promotores e seqüências de terminação da transcrição.

#### **Composições Farmacêuticas Contendo o Domínio de Trânsito da *Neisseria*.**

Composições farmacêuticas da invenção contendo o peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP (SEQ ID Nº 25) ou um complexo do peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP (SEQ ID Nº 25) ligado a um composto de carga podem ser produzidas de qualquer maneira convencional, por exemplo, por mistura convencional, pelo processo de dissolução, granulação, formação de drágea, emulsificação, encapsulamento, aprisionamento ou liofilização. O complexo do peptídeo de trânsito da *Neisseria* / AAEAP pode ser prontamente combinado com a 5 carreadora farmacêuticamente aceitável bem conhecida na técnica. As referidas carreadoras habilitam a preparação a ser formulada como comprimido, drágea, cápsula, líquido, gel, xarope, pasta, suspensão e similares. Excipientes apropriados também podem incluir, por exemplo, enchimentos e preparações de celulose. Outros excipientes podem incluir, por exemplo, agentes aromatizantes, corantes, detackificantes, espessantes e outros aditivos aceitáveis, adjuvantes ou ligantes. Em várias 15 configurações, a composição inclui carreadoras e excipientes (incluindo, mas não se limitando a tampões, carboidratos, manitol, proteínas, polipeptídeos ou aminoácidos como glicina, antioxidantes, bacteriostatos, agentes quelantes, agentes de suspensão, agentes espessantes e/ou conservativos), água, óleos, soluções salinas, dextrose aquosa e soluções de glicerol, outras substâncias auxiliares farmacêuticamente aceitáveis como as exigida para aproximar as condições fisiológicas, como agentes de tamponamento, agentes de ajuste de tonicidade, agente umectantes e similares. Reconhece-se que, embora qualquer carreadora conhecida aos 25 que possuem habilidade ordinária na técnica possa ser utilizada para a administração das composições dessa invenção, o tipo de carreadora variará dependendo do modo de administração. Os compostos podem ser encapsulados nos lipossomas usando a conhecida tecnologia. Microesferas biodegradáveis apropriadas são mostradas, por exemplo, na Patente Norte-americana Nos. 4.897.268, 5.075.109, 5.928.647, 5.811.128, 5.820.883, 30

5.853.763, 5.814.344 e 5.942.252. "Compostos" conforme aqui utilizados, incluem os peptídeos, as seqüências de aminoácidos, os compostos e complexos de carga e os ácidos nucleicos da presente invenção.

Os fluidos intravenosos para uso na preparação de composições farmacêuticas para administrar os peptídeos de trânsito da *Neisseria* / AAEAP (SEQ ID N° 25), cargas e complexos de carga-peptídeo de trânsito e ácidos nucleicos podem ser compostos de cristalóides ou colóides. Os cristalóides como os aqui utilizados são soluções aquosas de sais minerais ou outras moléculas solúveis em água. Os colóides como os aqui utilizados contêm grandes moléculas insolúveis, como a gelatina. Os fluidos intravenosos podem ser estéreis.

Os fluidos cristalóides que podem ser usados por administração intravenosa incluem, mas não se limitam à salina normal (uma solução de cloreto de sódio à concentração de 0,9%), solução ou lactato de Ringer e a solução aquosa de dextrose a 5%, às vezes chamada de D5W, conforme descrita na Tabela 4.

TABELA 4				
COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES CRISTALÓIDES COMUNS.				
Solução	Outro Nome	[Na <sup>+</sup> ]	[Cl]	[Glicose l]
D5W	Dextrose a 5%	0	0	252
2/3 e 1/3	Dextrose a 3,3% / salina a 0,3%	51	51	168
Salina seminormal	NaCl a 0,45%	77	77	0
Salina normal	NaCl a 0,9%	154	154	0
Lactato de Ringer*	Solução de Ringer	130	109	0

\* Lactato de Ringer também possui 28 mmol/L de lactato, 4 mmol/L de K<sup>+</sup> e 3 mmol/L de Ca<sup>2+</sup>.

A meia vida no fluxo sanguíneo das composições da invenção pode ser aumentada ou otimizada por diversos métodos bem conhecidos aos especialistas na arte, incluindo mas não se limitando aos peptídeos



circularizados (Monk *et al*, BioDrugs 19(4):261-78, (2005); DeFreest *et al.*, J. Pept. Res. 63(5):409-19 (2004)), D,L-peptides (diastereomer), (Futaki *et al*, J. Biol. Chem. Feb 23;276(8):5836-40 (2001); Papo *et al*, Cancer Res. 64(16):5779-86 (2004); Miller *et al*, Biochem. Pharmacol. 36(1):169-76, (1987)); peptídeos contendo aminoácidos incomuns (Lee *et al*, J. Pept. Res. 63(2):69-84 (2004)), e modificações nos terminais N e C (Labrie *et al*, Clin. Invest. Med. 13(5):275-8, (1990)). De particular interesse são a isomerização d (substituição) e modificação da estabilidade do peptídeo através da substituição do aminoácido L ou D.

10 Quando a administração for por injeção, a composição pode ser formulada em soluções aquosas em tampões fisiologicamente compatíveis, como as soluções de Hanks, solução de Ringer ou salina fisiológica tamponada. A solução pode conter agentes formuladores como os de suspensão, estabilização e/ou dispersão. Alternativamente, a cupredoxina ou  
15 suas variantes, derivadas ou equivalentes estruturais pode ser em forma de pó para a constituição com um veículo apropriado, por exemplo, água livre de pirógeno estéril, antes do uso.

Quando a administração for por inalação, a composição pode ser liberada em forma de spray de aerosol de volumes pressurizados ou um  
20 nebulizador com o uso de propelente apropriado, por exemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dióxido de carbono ou outro gás apropriado. No caso de um aerosol pressurizado, a unidade de dosagem pode ser determinada fornecendo uma válvula para liberar a quantidade medida. As cápsulas e cartuchos de, por exemplo, gelatina,  
25 para uso em um inalador ou insuflador, podem ser formuladas contendo a mistura em pó de proteínas e uma base em pó apropriada como a lactose ou amido.

Quando a administração for tópica, a composição pode ser formulada como soluções, géis, linimentos, cremes, gelatinas, suspensões  
30 e similares, como são bem conhecidos na técnica. Em algumas

configurações, a administração é feita por meio de adesivo transdérmico. Quando a administração for por supositório (por exemplo, via retal ou vaginal), a composição também pode ser formulada em composições contendo bases convencionais de supositório.

5 Quando a administração for por via oral, a composição pode ser prontamente formulada pela combinação com carreadoras farmacologicamente aceitáveis bem conhecidas na técnica. Uma carreadora sólida, como manitol, lactose, estearato de magnésio e similares pode ser empregada; as referidas carreadoras permitem que a chemotaxina seja  
10 formulada como comprimido, pílula, drágea, cápsula, líquido, gel, xarope, pasta, suspensão e similares, por ingestão oral pelo paciente a ser tratado. Para formulações orais sólidas como por exemplo, pós, cápsulas e comprimidos, excipientes apropriados incluem enchimentos como açúcares, preparação de celulose, agentes granulantes e ligantes.

15 Outras carreadoras convenientes, como bem conhecida na técnica, também incluem carreadoras polivalentes, polissacarídeos capsulares bacterianas, um dextran ou um vetor geneticamente construído. Além disso, as formulações de liberação prolongada que incluem a composição permitem a liberação a composição por longo tempo, tal que  
20 sem as formulações de liberação prolongada, a composição seria eliminada do sistema do paciente e/ou degradada, por exemplo, por proteases e hidrólises simples, antes de produzir ou melhorar um efeito terapêutico.

**Kits que Compreendem o Domínio de Trânsito da**  
25 ***Neisseria*/AAEAP (SEQ ID Nº 25).**

Em um outro aspecto, a invenção fornece kits contendo um ou mais dos seguintes produtos em uma embalagem ou recipiente: (1) um reagente que compreende um complexo do peptídeo de trânsito da *Neisseria* ou AAEAP (SEQ ID Nº 25) ligado ao composto de carga; (2)  
30 um reagente contendo um adjuvante ou excipiente farmacologicamente

aceitável; (3) um veículo de administração, como uma seringa; (4) instruções para administração. Configurações em que dois ou mais componentes (1) - (4) são encontrados em um mesmo recipiente também são contemplados. Em outras configurações, os componentes do kit  
5 podem incluir um reagente que compreende o peptídeo de trânsito da *Neisseria* ou AAEAP (SEQ ID N° 25), e um reagente separado que compreende um composto de carga. Em outras configurações, o kit compreende um reagente contendo o peptídeo de trânsito da *Neisseria* ou AAEAP (SEQ ID N° 25), porém não um reagente contendo um composto  
10 de carga. Em outras configurações, os reagentes são formulados para a administração intravenosa, e/ou o veículo de administração é apropriada para administração intravenosa. Em algumas configurações, o kit pode compreender um peptídeo de trânsito derivado da cupredoxinas, especificamente a azurina de *Pseudomonas aeruginosa*. Em outras  
15 configurações, os kits podem conter reagentes para ligar o composto de carga ao peptídeo de trânsito da *Neisseria* ou AAEAP, ou ao peptídeo de transporte derivado da cupredoxina.

Quando um kit é fornecido, os diferentes componentes da composição podem ser embalados em recipientes separados e  
20 imediatamente misturados antes do uso. A referida embalagem de componentes separados pode permitir armazenamento em longo prazo sem perder as funções do princípio ativo.

Os reagentes inclusos nos kits podem ser fornecidos em recipientes de qualquer tipo desde que a vida dos diferentes componentes  
25 seja preservada e não seja absorvida ou alterada pelos materiais do recipiente. Por exemplo, ampolas de vidro vedadas podem conter cupredoxina e suas variantes, derivados ou equivalentes estruturais liofilizadas ou tampões que tenham sido embalados por meio de gás não reativo, neutro, como nitrogênio. As ampolas podem consistir de qualquer  
30 material apropriado, como vidro, polímeros orgânicos, como

policarbonato, poliestireno, etc., cerâmica, metal ou qualquer outro material tipicamente empregado para manter os reagentes similares. Outros exemplos de recipientes apropriados incluem frascos simples que podem ser fabricados de substâncias similares às da ampola e invólucros, cujos interiores podem ser metalicamente revestidos com, por exemplo, alumínio ou uma liga. Outros recipientes incluem tubos de teste, frascos, flaconetes, garrafas, seringas ou similares. Os recipientes podem ter uma entrada de acesso estéril, como um frasco com tampa que pode ser perfurada por agulha de injeção hipodérmica. Outros recipientes podem ter dois compartimentos separados por uma membrana facilmente removível, que mediante sua remoção permite que os componentes sejam misturados. As membranas removíveis podem ser de vidro, plástico, borracha etc.

Os kits também podem ser fornecidos com materiais de instrução. As instruções podem ser impressas em papel ou em outra base, e/ou pode ser fornecido em meio eletrônico, como disco flexível, CD-ROM, DVD-ROM, Zip, videotape, audiotape, dispositivo de memória flash, etc. Instruções detalhadas podem não estar fisicamente associadas ao kit, em vez disso, o usuário pode ser encaminhado a uma página da internet especificado pelo fabricante ou distribuidor do kit ou fornecido por correio eletrônico.

Uma compreensão mais completa da presente invenção pode ser obtida por referência aos Exemplos específicos apresentados a seguir. Os exemplos são descritos apenas para fins de ilustração e não pretendem limitar o escopo da invenção. Mudanças na forma e substituição por equivalentes são contempladas de acordo com as oportunidades surgidas ou recursos disponíveis. Embora termos específicos tenham sido aqui empregados, sua intenção é o sentido descritivo e não limitativo. Modificações e variações da invenção conforme estabelecidas anteriormente podem ser feitas sem sair do seu espírito e escopo e,

portanto, apenas as limitações indicadas pelas reivindicações anexas deverão ser impostas.

## EXEMPLOS

### Exemplo 1

#### 5      **Clonagem e Expressão de *Laz* e Genes da Fusão de H.8-Azurina.**

O gene *laz* da *Neisseria gonorrhoeae* foi clonado (Fig. 1A) com base em sua conhecida seqüência (SEQ ID Nº 1). O gene da azurina de *P. aeruginosa* (SEQ ID Nº 2), chamado *paz* (Fig. 1B), e a seqüência do epítotope de H.8 de *laz* da *N. gonorrhoeae* (SEQ ID Nº 3), foi usada para  
10      clonar na estrutura o gene de epítotope de H.8 no terminal 5' de *paz* para produzir H.8-*paz* (Fig. 1C) ou no terminal 3' de *paz* para produzir *paz*-R.8 (Fig. 1D), conforme descrito a seguir.

**Linhagens Celulares e Reagentes.** As células cancerígenas humanas, cepas bacterianas e plasmídios encontram-se relacionados na Tabela 5. As células  
15      do câncer de mama humana MCF-7 e dos tumores cerebrais LN-229 são da coleção de cultura de estoque do Departamento de Oncologia Cirúrgica da Universidade de Illinois, Chicago (UIC). As células foram cultivadas em MEM com sal de Eagle contendo 2 mM de L-glutamina, 0,1 mM de aminoácidos essenciais de MEM e suplementados com 10% de soro bovino fetal inativado a  
20      quente, 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. Todas as células foram desenvolvidas a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> (Yamada *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:14098-14103 (2002); Punj *et al*, Oncogene 23:2367-2378 (2004)).

<b>TABELA 5</b> <b>CÉLULAS CANCERÍGENAS, CEPAS BACTERIANAS E CONTRUCTOS GENÉTICOS</b>		
<b>Células/cepas/ plasmídios</b>	<b>Características relevantes*</b>	<b>Referência</b>
LN-229	Bliostoma do cérebro humano	Ishii <i>et al.</i> , Brain Pathol. 9:469-479 (1999)
MCF-7	Adenocarcinoma de mama humana	Soule <i>et al.</i> , J. Natl. Cancer. Inst. 51:1409-1416 (1973); Punj <i>et al.</i> , Oncogene 23:2367-2378 (2004)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Prototrofia, FP-(menos fator de sexo)	Holloway <i>et al.</i> , Microbiol. Rev. 43:73-102 (1979)
<i>E. coli</i> . JM109	Clonagem e cepa de expressão de azurina	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , Gene 33:103-119 (1985)
<i>E. coli</i> . BL21 (DE3)	Cepa de expressão GST	Novagen
<i>N. gonorrhoeae</i> F62	Prototrofia usada para isolamento de DNA	American Type Culture Collection
pUC18	Vetor de clonagem geral, Ap <sup>r</sup>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , <i>id.</i>
pUC19	Vetor de clonagem geral, Ap <sup>r</sup>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , <i>id.</i>
pUC18-laz	Fragmento 1 kb PCR do DNA genômico de <i>N. gonorrhoeae</i> F62 clonado em pUC18	Neste documento
pUC19-paz	Fragmento 0,55 kb de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 clonado em <i>HindIII</i> e <i>PstI</i> digerido pUC19, Ap <sup>r</sup>	Yamada <i>et al.</i> , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:14098-14103 (2002); Yamada <i>et al.</i> , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:4770-4775 (2004)
pUC18-H.8-paz	Fusão de plasmídio que codifica H.8 de <i>N. gonorrhoeae</i> e azurina de <i>P. aeruginosa</i> PAO1, Ap <sup>r</sup>	Neste documento
pUC19-paz-H.8	Fusão de plasmídio que codifica a azurina de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 e H.8 de <i>N. gonorrhoeae</i> , Ap <sup>r</sup>	Neste documento
pGEX-5X-3	Vetores de fusão de gene GST, Ap <sup>r</sup>	Amersham
pET29a	Vetor de expressão <i>E. coli</i> , Km <sup>r</sup>	Novagen
pET29a-gst	Derivado de pET29a contendo o gene <i>gst</i> , Km <sup>r</sup>	Neste documento
pET29a-H.8-gst	Derivado de pET29a contendo o gene H.8- <i>gst</i> , Km <sup>r</sup>	Neste documento
pGEX-5X-3-H.8	Derivado de pGEX-5X-3 contendo a região de codificação H.8, Ap <sup>r</sup>	Neste documento
pET29a-gst-H.8	Derivado de pET29a contendo o gene <i>gst</i> -H.8, Km <sup>r</sup>	Neste documento

\*Ap, ampicilina; Km, kanamicina; GST, Glutathione S-transferase.

### Clonagem e Expressão dos genes *paz* e *laz*.

A clonagem e a hiperexpressão do gene da azurina foram descritas (Yamada *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:14098-14103 (2002); Punj *et al.*, Oncogene 23:2367-2378 (2004)). O gene de codificação de *laz* (*laz*) de *Neisseria gonorrhoeae* foi amplificado por PCR com DNA genômico da cepa de *N. gonorrhoeae* F62 como modelo de DNA. Os *primers forward* e *reverse* usados foram: 5'-CCGGAATTCCGGCAGGGATGTTGTAAATATCCG-3' (SEQ ID Nº 4) e 5'-GGGGTACCGCCGTGGCAGGCATACAGCATTTCATTCGG-3' (SEQ ID Nº 5), onde os sítios de restrição adicionalmente introduzidos dos sítios de *EcoRI* e *KpnI* estão respectivamente sublinhados. O fragmento de DNA amplificado de 1,0 kb, digerido com *EcoRI* e *KpnI*, foi inserido nos sítios correspondentes do vetor pUC 18 (Yanisch-Perron *et al.*, Gene 33:103-119 (1985)) de forma que o gene *laz* foi colocado em seguida ao promotor de *laz* para resultar em uma expressão de plasmídio pUC18-*laz* (Tabela 5, Figura 1).

Os plasmídios expressando a fusão de H.8 de *laz* de *N. gonorrhoeae* e azurina de *P. aeruginosa* (*Paz*) foram construídos por PCR com pUC 19-*paz* e pUC 18-*laz* como modelos. Para a fusão de H.8-*Paz*, um fragmento de 3,1 kb foi amplificado com pUC 18-*laz* como modelo e os *primers*, 5'-(fosforilado)GGCAGCAGGGGCTTCGGCAGCATCTGC-3' (SEQ ID Nº 6) e 5'-CTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCG-3' (SEQ ID Nº 7), onde o sítio de *Sall* está sublinhado. Um fragmento de 0,4 kb amplificado por PCR foi obtido de pUC19-*paz* como modelo e os *primers*, 5'-(fosforilado)GCCGAGTGCTCGGTGGACATCCAGG-3' (SEQ ID Nº 8) e 5'-TACTCGAGTCACTTCAGGGTCAGGGTG-3' (SEQ ID Nº 9) onde o sítio *XhoI* está sublinhado. Um fragmento de PCR de pUC 18-*laz* digerido por *Sall* e fragmentos de PCR de pUC19-*paz* digerido por *XhoI* foram clonados para resultar em uma expressão de plasmídio de pUC18-H.8-*paz* (Tabela 5, Figura 1).

Para a fusão de *Paz*-H.8, um fragmento de 3,3 kb foi

amplificado com pUC19-*paz* como modelo e *primers*,  
 5'-CTTCAGGGTCAGGGTGCCCTTCATC-3' (SEQ ID Nº 10)  
 e 5'-CTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCG-3' (SEQ ID Nº 11), onde o  
 sítio de *BamHI* está sublinhado. Um fragmento de 0,13 kb  
 5 amplificado por PCR foi obtido de pUC18-*laz* como modelo e os  
*p r i m e r s*,  
 5'-(fosforilado) TGCTCTCAAGAACCTGCCGCGCCTGC-3' (SEQ ID Nº  
 12) e 5'-TAGGATCC~~TT~~AGGCAGCAGGGGCTTCGGCAGCATCTGC-3' (SEQ  
 ID Nº 13), onde o sítio *BamHI* está sublinhado e adicionalmente introduzido  
 10 TTA, correspondendo ao códon de interrupção do gene bacteriano, está em  
 itálico. Dois fragmentos de PCR digerido por *BamHI* foram clonados para  
*r e s u l t a r e m*  
 uma expressão de plasmídeo de pUC19-*paz* -H.8 (Tabela 5).

*E. coli* JM109 foi usado como cepa hóspede para a expressão da  
 15 azurina e seus genes derivados. As cepas de *E. coli* recombinantes foram  
 cultivadas em meio 2 X YT contendo 100 µg/ml de ampicilina, 0,1 mM de  
 IPTG e 0,5 mM de CuSO<sub>4</sub> por 16 h à temperatura de 37 °C para produzir  
 proteínas de azurina.

#### **Construção de Plasmídeo para as Proteínas de Fusão de GST.**

20 Os genes de codificação da glutathione S-transferase (GST) foram  
 amplificados por PCR com pGEX-5X-3 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.,  
 Piscataway, NJ) como DNA de modelo. Os *primers forward* e *reverse* usados  
 f o r a m  
 5'-CGAGCTCATGTCCCCTATACTAGGTTATTGG-3' (SEQ ID Nº 14) e  
 25 5'-CCCAAGCTTCAGGGGATCCCACGACCTTCGATCAGATCC-3' (SEQ ID Nº  
 15), onde os sítios de restrição adicionalmente introduzidos de *SacI* e *HindIII*  
 estão sublinhados e TCA adicionalmente introduzido, correspondendo ao  
 códon de interrupção do gene bacteriano, está em itálico respectivamente. O  
 fragmento de DNA amplificado de 1,0 kb, digerido com *SacI* e *HindIII*, foi  
 30 inserido nos sítios correspondentes do vetor pET29a para produzir um



plasmídeo de expressão pET29a-*gst* (Tabela 5).

Para a fusão de H.8-GST, o peptídeo de sinalização e a região de codificação de H.8 de *laz* foram amplificados por PCR com pUC18-*laz* como DNA de modelo. Os *primers forward* e *reverse* usados foram 5'-GGAATTCATATGAAAGCTTATCTGGC-3' (SEQ ID Nº 16) e 5'-CCGGAATTCGGCAGCAGGGGCTTCGGC-3' (SEQ ID Nº 17), onde os sítios de restrição adicionalmente introduzidos de *NdeI* e *EcoRI* estão sublinhados respectivamente. O fragmento de DNA amplificado de 0,14 kb, digerido com *NdeI* e *EcoRI*, foi inserido nos sítios correspondentes do vetor pET29a-*gst* para produzir um plasmídeo de expressão pET29a-H.8-*gst* (Tabela 5).

Para a fusão de GST-H.8, a região de codificação de H.8 foi amplificada por PCR com pUC18-*laz* como DNA de modelo. Os *primers forward* e *reverse* usados foram 5'-CGGGATCCCCTGCTCTCAAGAACCTGCCGCGCC-3' (SEQ ID Nº 18) e 5'-CGGAATTCTTAGGCAGCAGGGGCTTCGGCAGCATCTGCAGG-3' (SEQ ID Nº 19), onde os sítios de restrição adicionalmente introduzidos de *BamHI* e *EcoRI* estão sublinhados e o códon de interrupção do gene bacteriano introduzido TTA está em itálico. O fragmento de DNA amplificado de 0,14 kb, digerido com *BamHI* e *EcoRI*, foi inserido nos sítios correspondentes do vetor pGEX-5X-3 para produzir pGEX-5X-3-H.8. A região de fusão de GST-H.8 foi então amplificada por PCR com pGEX-5X-3-H.8 como DNA de modelo. Os *primers forward* e *reverse* usados foram 5'-CGAGCTCATGTCCCCTATACTAGGTTATTGG-3' (SEQ ID Nº 20) e 5'-CCGCTCGAGTCAGGCAGCAGGGGCTTCGGCAG-3' (SEQ ID Nº 21), onde os sítios de restrição adicionalmente introduzidos de *SacI* e *XhoI* estão sublinhados e o códon de interrupção do gene bacteriano introduzido TCA está em itálico. O fragmento de DNA amplificado de 1,1 kb, digerido com *SacI* e *XhoI*, foi inserido nos sítios correspondentes do vetor pET29a para produzir um plasmídeo de expressão pET29a-*gst*-H.8 (Tabela 5).

*E. coli* BL21 (DE3) foi usado como cepa hospede para a expressão de *gst* e suas fusões derivadas.

Quando as cepas de *E. coli* que alimentam esses plasmídios crescem na presença do lisado das células de IPTG e das proteínas purificadas conforme descrito para a azurina (Yamada *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:14098-14103 (2002); Punj *et al.*, Oncogene 23:2367- 2378 (2004); Yamada, et l, Cell. Microbiol. 7:1418-1431 (2005)), os diversos derivados da azurina migram ao SDS-PAGE como componentes simples (Fig. 1E), embora H.8 contendo proteínas (aproximadamente 17 kDa) apresente migrações anômalas, conforme anteriormente observado (Cannon *et al.*, id; Fisette *et al.*, id.).

## Exemplo 2

**H.8 Melhora a Citotoxicidade da Azurina de *P. aeruginosa* das Células do Glioblastoma, mas não das Células cancerígenas da mama.**

A entrada preferencial de *Paz* nas células cancerígenas (Yamada *et al.*, Cell. Microbiol. 7:1418-1431 (2005)) e sua citotoxicidade, *in vitro* e *in vivo* no melanoma humano (Yamada *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:14098-14103 (2002)) e no câncer de mama (Punj *et al.*, Oncogene 23:2367-2378 (2004)), foi relatada. Entretanto, não se conhece o efeito de *Paz* ou *Laz* nos tumores cerebrais como glioblastomas. Aqui o efeito de *Paz*, *Laz*, H.8-*Paz* (epítotope de H.8 no terminal N de *Paz*) e *Paz*-H.8 (epítotope de H.8 no terminal C de *Paz*) nas células do glioblastoma (linhagem celular LN-229) e do câncer de mama (linhagem celular MCF-7) foi estudado.

**Preparações das Proteínas.** A azurina (*Paz*) de *P. aeruginosa*, *Laz* de *N. gonorrhoeae*, *Paz*-H.8 e H.8-*Paz* foram purificados conforme anteriormente descritos (Yamada *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:14098-14103 (2002); Punj *et al.*, Oncogene 23:2367-2378 (2004); Yamada *et al.*, Cell. Microbiol. 7:1418-1431 (2005)) Toda fusão de GST recombinante foi purificada conforme anteriormente descrita. (Yamada *et al.*, Cell. Microbiol.

7:1418-1431 (2005)). Comprova-se o peptídeo de H.8 de 39 aminoácidos quimicamente sintetizado.

**Ensaio de Citotoxicidade.** O ensaio de brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il-2, 5-difenil) tetrazólio (MTT) foi realizado para determinar a citotoxicidade nas células cancerígenas. As células ( $5 \times 10^3$  per poço) foram colocadas em placas de cultura de 96 poços em 100:1 de meio a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após incubação por uma noite, o supernadante foi removido e um meio fresco contendo proteínas em várias concentrações conforme especificado foi adicionado às células depositadas. Essas células foram incubadas em vários períodos conforme especificado anteriormente e o número de células vivas foi determinado pelo ensaio de MTT adicionando 10 µl de 5 mg/ml de solução de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) à cultura e incubando por 2 h a 37°C. A reação de MTT foi encerrada adicionando 100 µl de 40 mM HCl em isopropanol. O formazano de MTT foi medido espectrofotometricamente de acordo com o método descrito por Mosmann (J. Immunol. Methods 65:55-63 (1983)).

Os peptídeos de H.8 sintéticos apresentaram citotoxicidade muito pequena tanto com relação às células do glioblastoma LN-229 (Fig. 2A) quanto ao câncer de mama MCF-7 (Fig. 2B). O efeito da azurina (*Paz*) foi dose dependente, sendo reduzida nas células do glioblastoma (Fig. 2A), porém não nas do câncer de mama (Fig. 2B), com citotoxicidade crescente à medida que a concentração da azurina foi aumentada de 10 µM a 40 µM. A citotoxicidade aumentou apenas insignificamente além de 6 h de incubação. Mais notável foi a diferença na citotoxicidade de *Paz*, *Paz*-H.8, H.8-*Paz* e *Laz* nas células do glioblastoma e câncer de mama. Enquanto *Paz*, *Paz*-H.8, H.8-*Paz* e *Laz* apresentam citotoxicidades essencialmente idênticas em todas as doses nas células MCF-7 para diferentes períodos de incubação (Fig. 2B), *Paz* apresentou citotoxicidade muito menor que *Paz*-H.8, H.8-*Paz* ou *Laz* para as células do glioblastoma, particularmente, em períodos menores de incubação (6 h). Portanto, parte de H.8, embora em si falte citotoxicidade,

pareceu melhorar a citotoxicidade de *Paz*, mas apenas com relação às células do glioblastoma e não do câncer de mama.

### Exemplo 3

#### Epítoto de H.8 Presente em *Paz* ou *Laz* Facilita a Captação da Azurina nas Células do Glioblastoma

A citotoxicidade melhorada de *Paz*-H.8, H.8-*Paz* e *Laz* com relação às células do glioblastoma quando comparada a *Paz*, aumentou a dúvida se a parte de H.8 de alguma forma facilita a captação da azurina nas células do glioblastoma. As proteínas fluorescentes vermelhas marcadas por Alexa fluor<sup>®</sup> 568 (Invitrogen-Molecular Probes Corp., Carlsbad CA) foram usadas para determinar a internalização dessas proteínas nas células do glioblastoma e do câncer de mama. Essa técnica foi anteriormente usada para demonstrar a internalização da azurina nas células MCF-7 (Punj *et al*, Oncogene 23:2367-2378 (2004); Yamada *et al*, Cell. Microbiol. 7:1418-1431 (2005)).

**Microscopia confocal.** Para a preparação de amostras microscópicas, as células foram cultivadas sobre lamínulas por uma noite a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Meio fresco pré-aquecido a 37°C foi misturado com azurina marcada com vermelho fluorescente (Alexa fluor<sup>®</sup> 568) ou derivados da fusão de GST e incubado com as células por períodos indicados. As células foram lavadas com PBS e fixadas com metanol a -20 °C por 5 min. Após lavagem com PBS três vezes e adição do meio de montagem contendo 1,5 mg/ml 4, 6-diamidino-2- fenilindol (DAPI) para colorir os núcleos (VECTASHIELD<sup>®</sup>, Vector Laboratories, Burlingame CA), foram tomadas imagens usando um microscópio confocal de escaneamento a laser Carl Zeiss LSM510 (Yamada *et al*, Cell. Microbiol. 7:1418-1431 (2005)).

A azurina (*Paz*) foi internalizada com eficiência reduzida com relação a *Paz*-H.8, H.8-*Paz* e *Laz*, demonstrando uma barreira para a entrada de *Paz* nas células LN-229 do glioblastoma (Figs. 3A e 4A). Em contraste, *Paz* foi eficientemente internalizada nas células MCF-7 do câncer de mama conforme anteriormente relatado, com eficiência igual ou um pouco superior

a *Paz*-H.8, H.8- *Paz* ou *Laz* (Figs. 3B e 4B). (Punj *et al*, *Oncogene* 23:2367-2378 (2004); Yamada *et al*, *Cell. Microbiol.* 7:1418-1431 (2005)). A dose dependência da entrada de *Laz* nas células LN-229 demonstrou uma excelente concentração de aproximadamente 16  $\mu$ M durante um período de incubação de 30 minutos a 37 °C (Figs. 3 C e 4C) além do qual não há crescimento adicional (dados não mostrados). À concentração de 10  $\mu$ M, embora o volume de *Laz* tenha sido internalizado nas células LN-229 em aproximadamente 10 a 20 min (Figs. 3D e 4D), a internalização de *Paz* foi mínima nessas condições (Fig. 3E), sugerindo que ela foi inerentemente ineficiente nas células LN-229. A significativa internalização de *Paz*-H.8 e H.8-*Paz*, similar a *Laz*, mas em contraste a *Paz* nas células LN-229 (Figs. 3A e 4A) parece sugerir que a relativa localização da parte de H.8, no terminal N ou C de *Paz*, não afetou a sua habilidade de promover a internalização de parte de *Paz* nas células do glioblastoma.

#### Exemplo 4

##### **Parte de H.8 promove a entrada de *Paz* nas células do glioblastoma, porém não nas células do câncer de mama**

A fim de determinar se o epítipo de H.8 precisa fazer parte de *Paz*, como em *Laz*, ou se consegue sozinho prover a entrada de *Paz* nas células do glioblastoma, várias proteínas de fusão H.8 foram adicionadas a apenas H.8. Uma vez que os pequenos peptídeos como parte de H.8 de 39 aminoácidos sintéticos possuem baixa estabilidade na solução, produziu-se fusões da glutathione S-transferase (GST) com parte de H.8, similar a *Paz*-H.8 ou H.8-*Paz*, de forma que H.8 foi incorporado ao terminal N de GST (H.8-GST) ou ao terminal C de GST (GST-H.8). A formação dos peptídeos de fusão de GST é descrita no Exemplo 1.

*Paz* conjugada a 568 Alexa fluor<sup>®</sup>, fluorescência vermelha foi incubada com os peptídeos de H.8 sintéticos sem marcação, GST, proteínas da fusão de GST-H.8 e H.8-GST separadamente, juntamente com a salina fosfatada tamponada (PBS) como controle e determinou-se a internalização

da mistura de 20  $\mu$ M de *Paz* na células LN-229 após incubação a 37 °C por 30 min. O peptídeo H.8 sintético, quando introduzido separadamente com *Paz*, melhorou a internalização de *Paz* (Fig. 5A) quando comparada a PBS (Fig. 5E), GST (Fig. 5B) ou GST-H.8 (Fig. 5C). A quantificação da fluorescência mostrou que o peptídeo H.8 estimulou a entrada de *Paz* em 2,1 vezes. A presença de H.8-GST, entretanto, melhorou significativamente (mais que 3 vezes) a internalização de *Paz* (Fig. 5D). GST-H.8, por outro lado, mostrou apenas uma moderada estimulação (Fig. 5C). A *Paz*, por si mesma, penetrou apenas lentamente (Fig. 5E) nas células do glioblastoma, demonstrando que a entrada nas células tumorosas do cérebro é mediada por H.8. Apenas H.8 não penetra nas células do glioblastoma (Fig. 3A), mas a sua habilidade de estimular a internalização de *Paz* (Fig. 5A) reflete a sua habilidade de facilitar a entrada das proteínas nas células tumorosas do cérebro.

### Exemplo 5

#### Internalização melhorada de *Paz* na Presença de H.8-GST nas Células do Glioblastoma Aumenta a Citotoxicidade nessas Células.

Foram incubados o peptídeo de H.8 sintético, as proteínas de GST, GST-H.8 e H.8-GST (20  $\mu$ M cada) na ausência ou presença de 20  $\mu$ M de *Paz* com as células LN-229 por 24 h e em seguida mensurou-se a extensão da citotoxicidade, medindo-se as células do glioblastoma viáveis através do ensaio de MTT após 24 h. Na ausência de *Paz*, nenhum peptídeo de H.8, GST ou proteínas de fusão de GST demonstrou qualquer citotoxicidade significativa (Fig. 5F, -*Paz*). Na presença de 20  $\mu$ M de *Paz*, que em si demonstrou uma baixa citotoxicidade na presença do peptídeo de H.8 ou PBS (Fig. 5F, + *Paz*), foi observada uma considerável melhoria da citotoxicidade na presença de H.8-GST (Fig. 5F, + *Paz*), embora GST ou GST-H.8 em si não apresente melhoria da citotoxicidade (Fig. 5F, + *Paz*). Tomados em conjunto, esses dados sugerem que a parte de H.8, quando presente parcialmente ou na presença de uma proteína como *Paz*, facilita o transporte de *Paz* para as

referidas células, resultando na citotoxicidade melhorada.

### **Exemplo 6**

#### **Atravessamento da BBB Mediado por H.8 Permitindo a Entrada no Cérebro**

5 A habilidade do epítotope de H.8 em permitir a internalização melhorada da proteína sozinha ou fundida nas células LN-229 do glioblastoma (Figs. 3A, 4A e 5D) aumentou a dúvida se H.8 como parte do terminal N de H.8-*Paz* ou *Laz* promoveu o atravessamento da BBB e permitiu o transporte dessas proteínas a partir da circulação periférica às vênulas cerebrais.

10 **Ensaio Odyssey®.** Todas as proteínas foram identificadas usando IRDye® 800CW (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska) nas condições recomendadas pelos fabricantes. 500 µg de *Paz*, H.8-*Paz* e *Laz* conjugado com IRDye® 800CW foram injetados intraperitonealmente em camundongos despidos. Após 24 h, os camundongos foram sacrificados, os cérebros foram retirados e as imagens cerebrais foram detectadas com o Sistema de Imagem em Infravermelho LI-COR Odyssey® (resolução de 84 µm, offset de 1 mm). Os cérebros dos camundongos foram cortados horizontalmente e Imagens da região do mesencéfalo rostral foram tomadas para detectar a presença das proteínas identificadas.

20 **Quantificação da fluorescência nas proteínas da azurina.** A quantificação da fluorescência foi medida usando Adobe® Photoshop® conforme segue: uma célula foi selecionada pela ferramenta Lasso do Photoshop, e o valor médio foi tomado a partir do histograma vermelho do menu de imagem. Pelo menos três diferentes células foram medidas para uma amostra e o desvio padrão foi calculado.

25 500 µg de *Paz*, H.8-*Paz* e *Laz* identificadas com corante infravermelho IRdye® 800CW foram injetados intraperitonealmente em camundongos vivos despidos. Após 24 h, os camundongos foram sacrificados, os cérebros foram retirados e as imagens foram tomadas usando

o Sistema de Imagem em Infravermelho LI-COR Odyssey®. Embora tenha-se observado que *Paz* entrou nas vênulas cerebrais em pequenas quantidades, muito mais *Laz* e em particular H.8-*Paz* (mais de 4 vezes) foram detectadas dentro do cérebro nessas condições, demonstrando claramente o papel do epítotope de H.8 em possibilitar a entrada das proteínas de fusão no cérebro.

### Exemplo 7

#### Epítotope de H.8, quando Presente no Terminal N, Permite a Exposição da Superfície Bacteriana das Proteínas Periplásmicas.

Para investigar se a localização do terminal N do epítotope de H.8 em *Laz* contribui para a sua exposição de superfície, os derivados da fusão de H.8 foram construídos nos terminais N e C de GST (Fig. 5) e *Paz* (Fig. 2 e Figs. 3A/B e 4A/B), conforme descrito no Exemplo 1.

**Localização das proteínas exposta na superfície exposta em *E. coli*.** A cepa de *E. coli* BL21 (DE3) que alimenta pET29a-*gst*, pET29a-H.8-*gst* ou pET29a-*gst*-H.8 e cepa de *E. coli* JM109 que alimenta pUC19-*paz*, pUC19-*paz*-H.8, pUC18-H.8-*paz* ou pUC18-*laz* foram cultivadas a 37 °C com 0,4 mM de isopropil β-D-tiogalactosídeo (IPTG). Um ml de cada uma dessas culturas bacterianas foram centrifugadas e as paletas resultantes foram coletadas. Após lavagem com PBS duas vezes, um ml de 1% FBS-PBS contendo anticorpos anti-GST (1:2000) para derivados de GST ou anticorpos da anti-azurina (1:500) para derivados da azurina foi adicionado. As suspensões celulares foram incubadas em gelo por 1 h e em seguida lavadas duas vezes com PBS. IgG *anti-rabbit* conjugado com FITC para derivados de GST ou anticorpos *anti-rabbit* conjugado com FITC para derivados da azurina foram aplicados e incubados em gelo por 30 minutos. Para remover os anticorpos livres, as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com etanol em gelo. As amostras de *E. coli* tratadas com DAPI foram observadas em seguida usando o microscópio confocal.

As proteínas de fusão de H.8 foram purificadas (Fig. 1E e Fig. 7A).



As localizações das células de GST, bem como das duas fusões de H.8 nos terminais N e C (H.8- GST e GST-H.8) são mostradas na Fig. 7B. Todas as três proteínas foram hiperexpressadas em *E. coli* e presentes em todas os lisados celulares de *E. coli*, quando detectadas através de *Western blotting* usando anticorpos anti-GST (Fig. 7B). Quando as frações periplásmicas foram isoladas de *E. coli* e a presença das três proteínas verificadas, as proteínas de GST e GST- H.8 foram detectadas em quantidades insignificantes. (Fig. 7B, pistas 1 e 3 sob fração periplásmica), porém pequenas quantidades de H.8-GST (Fig. 7B, pista 2 sob fração periplásmica) puderam ser detectadas nas referidas frações periplásmicas. Para examinar se as demais proteínas da fusão H.8-GST tinham sido transportadas à superfície das células de *E. coli*, as células que hiperexpressam as três proteínas foram desenvolvidas e alimentadas, lavadas, tratadas com anticorpos anti-GST para ligar em qualquer GST exposta na superfície, novamente lavada e tratada com anticorpos secundários conjugados a FITC. Se a GST for exposta na superfície, os anticorpos anti-GST ligariam a ela, que então poderia ser detectada pelos anticorpos secundários conjugados a FITC-conjugado. De fato, apenas as células de *E. coli* que alimentam H.8-GST apresentaram a fluorescência verde gerada por FITC (Fig. 7C, H.8-GST), sugerindo que a presença do epítipo de H.8 no terminal N de GST promoveu o seu transporte para a superfície da célula. A presença de parte de H.8 no terminal C de GST (GST-H.8), bem como a própria GST, permaneceu amplamente periplásmica e intracelular sem qualquer exposição de superfície (Fig. 7C, GST e GST-H.8).

Usando a mesma técnica acima descrita, determinou-se que *Paz* e *Paz*-H.8 permaneceram intracelular (Fig. 7D, *Paz* e *Paz*-H.8), enquanto que *H.8-Paz* e *Laz* apresentaram exposição de superfície, confirmando que a presença de H.8 no terminal N, talvez precisando de uma cisteína livre para a lipidação, é importante para o transporte das proteínas de fusão através da membrana externa para alcançar a superfície.

## Exemplo 8

### Tratamento de Pacientes com Câncer

Um estudo clínico de fase I/II da fusão de H.8-*Paz* (Medicamento de Estudo) será realizado em pacientes com câncer. Especificamente, o domínio de H.8 do gene de codificação de *Laz* (*laz*) da *Neisseria gonorrhoeae* e composto de carga são a azurina de *Pseudomonas aeruginosa* (*paz*), produzindo a proteína de fusão "H.8-*paz*". Esta proteína de fusão será construída conforme ilustrada no Exemplo 1.

Quarenta e nove pacientes adultos com câncer de cérebro histologicamente comprovado, que demonstraram progressão radiográfica e clínica ou recorrência após tratamento adequado por regimes e medicamentos quimioterápicos aprovados pela FDA atualmente disponíveis estão inscritos no estudo aberto, prospectivo, administrando o Medicamento de Estudo. Para serem elegíveis para inscrição neste estudo, todos os pacientes demonstraram volume crescente do tumor mensurável, após conclusão do curso aprovado de regimes quimioterápicos. A evidência de depósitos metastáticos persistentes e/ou aumento continuado na dimensão e volume devem ser histologicamente estabelecidos. Esta prova histológica pode ser obtida por uma biópsia de aspiração por uma agulha fina (FNA).

O programa de tratamento será instituído após a obtenção de consentimento informado de todos os pacientes de acordo com o Órgão de Análise Institucional da Universidade de Illinois, Chicago e FDA. Os pacientes não terão nenhuma enfermidade intercorrente como outras malignidades, histórico anterior de malignidade, discrasias sanguíneas, diabetes insulina dependente ou outras doenças cardiovasculares graves que possam interferir na avaliação apropriada dos efeitos da terapia proposta. As atividades sanguíneas da linha basal (hemograma completo [CBC] e bioquímica sérica), inclusive os estudos da função hepática (LFT) são realizados antes de iniciar a terapia. Todos os pacientes elegíveis não devem receber qualquer quimioterapia anticancerígena paralela durante o período do estudo.

Os medicamentos do estudo são administradas por injeção intravenosa diária de preparação farmacêuticamente aceitável do Medicamento de Estudo por 12 semanas e os pacientes serão observados quanto a qualquer toxicidade referente ao limite de dosagem. Haverá 7 níveis de dosagem começando com 10 mg/kg/dia e aumentando em 5 mg/kg/dia até um máximo de 50 mg/kg/dia. A eficácia de cada nível de dosagem será registrado em 7 pacientes com câncer avançado mensurável.

A resposta será estimada medindo-se o tumor em duas dimensões (a e b). 1) O total desaparecimento de tumores metastáticos em alvo é considerado como uma resposta completa (CR); 2) Uma redução de 75% é considerada excelente, resposta parcial (PR); e 3). Uma boa resposta (PR) é a redução pós-tratamento em dimensão de 50%. 4) Uma redução de 5% nas dimensões é considerada como uma doença estável (SD) e 5)  $< 25\%$  é considerada como sem resposta (NR). Pacientes que demonstram uma progressão da doença terá seu tratamento descontinuado, mas serão acompanhados por 12 semanas adicionais.

O desaparecimento total e qualquer redução na dimensão dos tumores metastáticos em alvo indicam que o tratamento por azurina é eficaz no tratamento do câncer. Outras indicações de que o tratamento com a H.8-azurina é eficaz são a redução da taxa no surgimento de novos tumores cerebrais e a diminuição na angiogênese associada a tumores.

Várias modificações e variações dos exemplos e sistemas descritos da invenção serão evidentes aos especialistas na técnica, sem se afastar do escopo e espírito da invenção. Embora a invenção tenha sido descrita em conexão com configurações específicas, deve-se compreender que ela, conforme reivindicada, não deve ser indevidamente limitada a essas configurações específicas. De fato, várias modificações aos modos descritos para efetivação da invenção que são óbvias aos especialistas nos campos relacionados são presumidas que estejam dentro do escopo das seguintes reivindicações.

**REIVINDICAÇÕES:**

- 1) Peptídeo de trânsito isolado que é variante, derivado ou equivalente estrutural de *Laz*, *Lip* ou Pan 1 da *Neisseria*, e que facilita a entrada da molécula ligada nas células cancerígenas do cérebro de mamífero ou através da barreira cérebro-sangue.
- 2) Peptídeo de trânsito da reivindicação 1, com relação ao qual a região H.8 de *Laz* (SEQ ID Nº 24) possui pelo menos 90 % da identidade do aminoácido.
- 3) Peptídeo de trânsito da reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o peptídeo possui SEQ ID Nº 24.
- 4) Peptídeo de trânsito da reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que peptídeo de trânsito é modificado para aumentar ou otimizar a sua meia vida no fluxo sanguíneo.
- 5) Peptídeo de trânsito que compreende uma região consistindo em pelo menos 4 repetições perfeitas ou imperfeitas de Ala-Ala-Glu-Ala-Pro (SEQ ID Nº 25), e que possui pelo menos aproximadamente 50% das repetições do pentapeptídeo de AAEAP (SEQ ID Nº 25) por comprimento total.
- 6) Peptídeo de trânsito da reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a região das repetições é pelo menos aproximadamente 90% idêntico ao peptídeo que compreende o mesmo número de repetições de Ala-Ala-Glu-Ala-Pro (SEQ ID Nº 25).
- 7) Peptídeo de trânsito da reivindicação 5, que é sintético.
- 8) Peptídeo de trânsito da reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o peptídeo de trânsito é modificado para aumentar ou otimizar a sua meia vida no fluxo sanguíneo.
- 9) Complexo que compreende pelo menos um composto de carga e um peptídeo de trânsito, caracterizado pelo fato de que o peptídeo de trânsito é o da reivindicação 5 e é ligado ao composto de carga.
- 10) Um complexo que compreende pelo menos um composto de carga e um peptídeo de trânsito, caracterizado pelo fato de que o peptídeo de trânsito é o da reivindicação 1 e peptídeo de trânsito é ligado ao composto de carga.

- 11) Complexo da reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o composto de carga é uma cupredoxina selecionada do grupo que consiste em azurina, plastocianina, rusticianina, pseudoazurina, auracianina e uma proteína similar à azurina.
- 5 12) Complexo da reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o composto de carga é a azurina de *Pseudomonas aeruginosa*.
- 13) Complexo da reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o complexo é modificado para aumentar ou otimizar a meia vida do peptídeo no fluxo sanguíneo.
- 10 14) Complexo da reivindicação 10, que adicionalmente compreende um peptídeo de transporte derivado da cupredoxina.
- 15) Complexo da reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o composto de carga é selecionado do grupo que consiste em uma proteína, lipoproteína, polissacarídeo, ácido nucléico, corante, micropartícula, nanopartícula, toxina e medicamento.
- 15 16) Complexo da reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o composto de carga é uma proteína e o peptídeo de trânsito é ligado ao composto de carga para formar uma proteína de fusão.
- 17) Complexo da reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o composto de carga é uma toxina.
- 20 18) Complexo da reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o composto de carga é um agente terapêutico para o tratamento da condição selecionada do grupo que consiste em depressão, distúrbios afetivos, dores crônicas, epilepsia, mal de Alzheimer, acidente cardiovascular / neuroproteção, lesão cerebral e da medula espinal, câncer cerebral, infecção cerebral por HIV, vários distúrbios causadores da ataxia, esclerose lateral amiotrófica (ALS), mal de Huntington, erros genéticos congênitos na infância que afetam o cérebro, mal de Parkinson e múltipla esclerose.
- 25 19) Complexo da reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o composto de carga é uma substância detectável.
- 30

- 20) Complexo da reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a substância é detectável pelo método selecionado do grupo que consiste em fluorimetria, microscopia, CT de Raios-X, MRI e ultrassonografia.
- 21) Composição farmacêutica que compreende o complexo da reivindicação 10 em uma carreadora farmaceuticamente apropriada.
- 22) Composição farmacêutica da reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que a carreadora farmaceuticamente aceitável é apropriada para a administração intravenosa.
- 23) Composição farmacêutica da reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que a carreadora farmaceuticamente aceitável é apropriada para a injeção intracerebroventricular ou intracerebral.
- 24) Método que compreende o contacto de uma célula ou células com o complexo da reivindicação 10.
- 25) Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a célula é de um tumor do sistema nervoso central.
- 26) Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a célula é uma célula cancerígena selecionada do grupo que consiste em astrocitoma, glioblastoma, meningioma, oligodentroglioma, oligoastrocitoma, glioma, ependimoma, tumor da medula espinal, ganglioglioma, neurocitoma e meduloblastoma.
- 27) Método de tratamento do paciente com câncer, que compreende a administração ao referido paciente do complexo da reivindicação 10 em uma quantidade terapeuticamente eficaz.
- 28) Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o complexo é administrado de uma maneira selecionada do grupo que consiste em administração por via intravenosa, tópica, subcutânea, intramuscular e no tumor.
- 29) Método de acordo com a reivindicação 27, que compreende adicionalmente a administração conjunta com outro tratamento de câncer.
- 30) Método para formação de imagem do câncer de um paciente, que

compreende a administração do complexo da reivindicação 19 ao referido paciente e a detecção da localização do composto de carga no referido paciente.

31) Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o composto de carga é um agente de contraste de Raios-X e a localização do composto de carga é detectada por CT de Raios-X.

32) Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o composto de carga é um agente de contraste de imagem por ressonância magnética e a localização do composto de carga é detectada por MRI.

33) Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o composto de carga é um agente de contraste de ultrassonografia e a localização do composto de carga é detectada pela formação de imagem ultrassonográfica.

34) Método para o diagnóstico do câncer, que compreende o contato da célula com o complexo da reivindicação 19 e a detecção da localização celular da molécula de carga.

35) Kit que compreende um reagente contendo o peptídeo de trânsito da reivindicação 1.

36) Kit da reivindicação 35, que compreende adicionalmente um reagente contendo uma carreadora farmacologicamente aceitável.

37) Kit da reivindicação 35, que compreende adicionalmente um veículo para a administração do reagente.

38. Moléculas do ácido nucléico que codificam o peptídeo de trânsito da reivindicação 1.

39) Moléculas do ácido nucléico que codificam o peptídeo de trânsito da reivindicação 5.

40) Moléculas do ácido nucléico que codificam o complexo da reivindicação 10.

41) Método de tratamento ou diagnóstico de paciente com uma condição relacionada ao cérebro, que compreende a administração conjunta ao referido

paciente do peptídeo de trânsito da reivindicação 1 e pelo menos um composto de carga.

5 42) Método de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que o peptídeo de transporte derivado da cupredoxina é adicionalmente administrado em conjunto.

43) Método de tratamento ou de diagnóstico de paciente com uma condição relacionada ao cérebro, que compreende administração conjunta ao referido paciente do peptídeo de trânsito da reivindicação 5 e pelo menos um composto de carga.

10 44) Método de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que um peptídeo de transporte derivado da cupredoxina é adicionalmente administrado em conjunto.



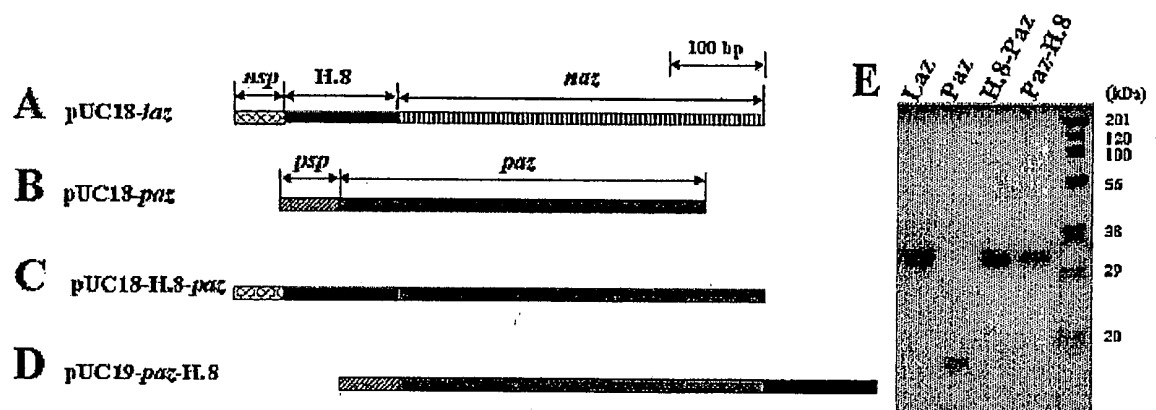


FIG. 1

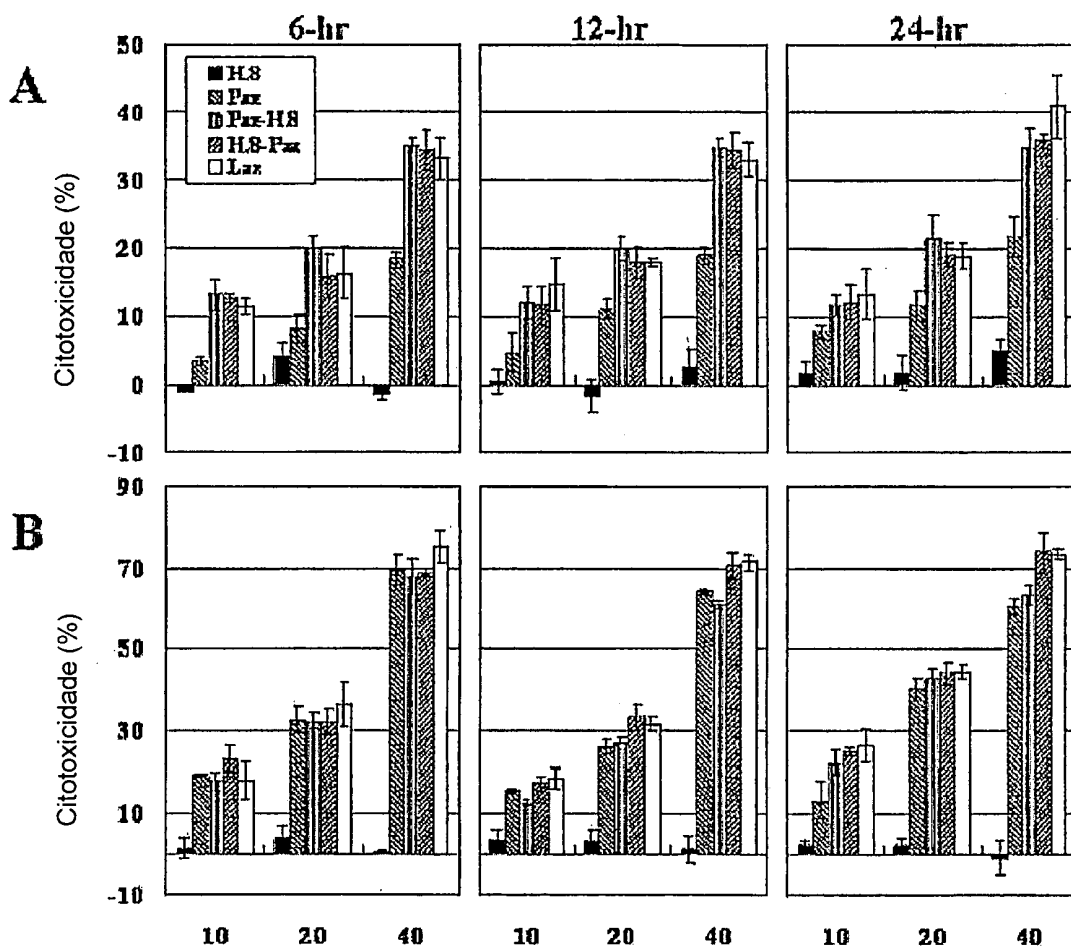


FIG. 2

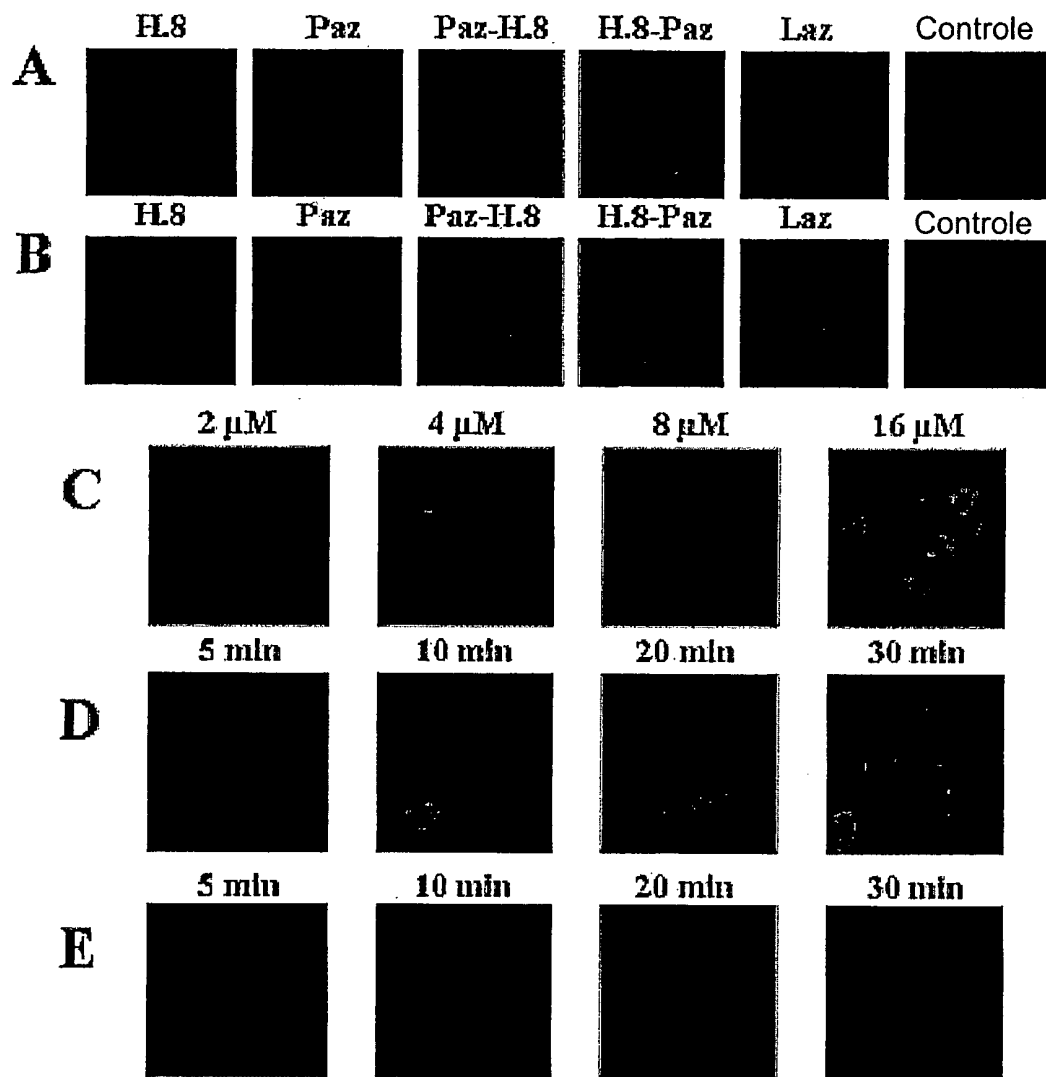


FIG. 3

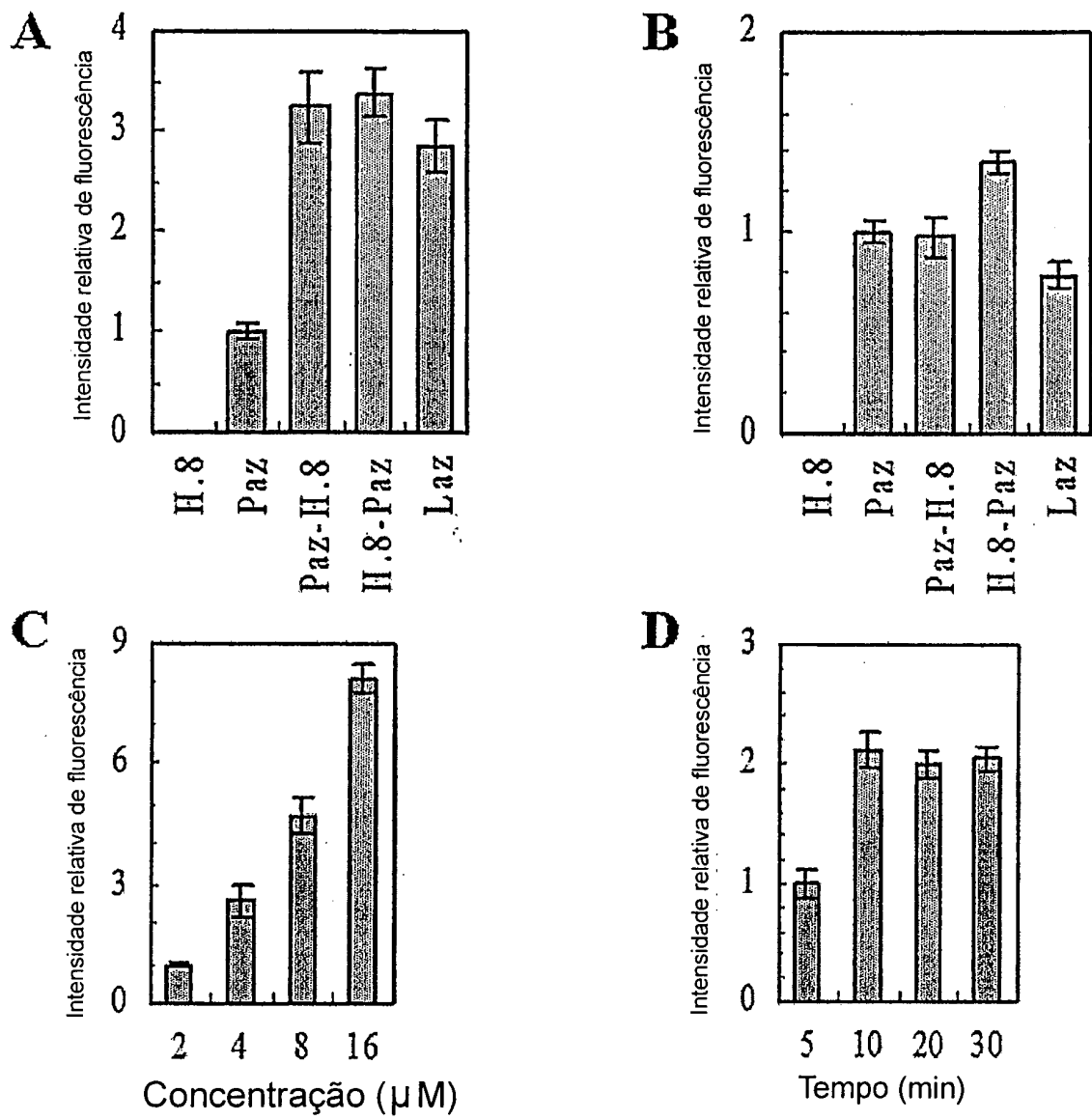


FIG. 4

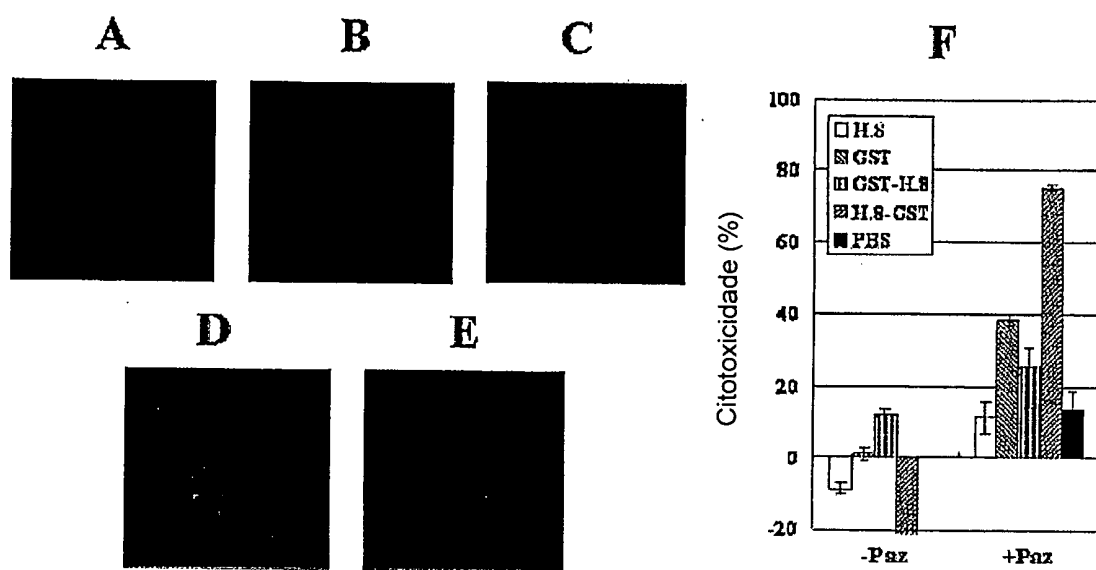


FIG. 5

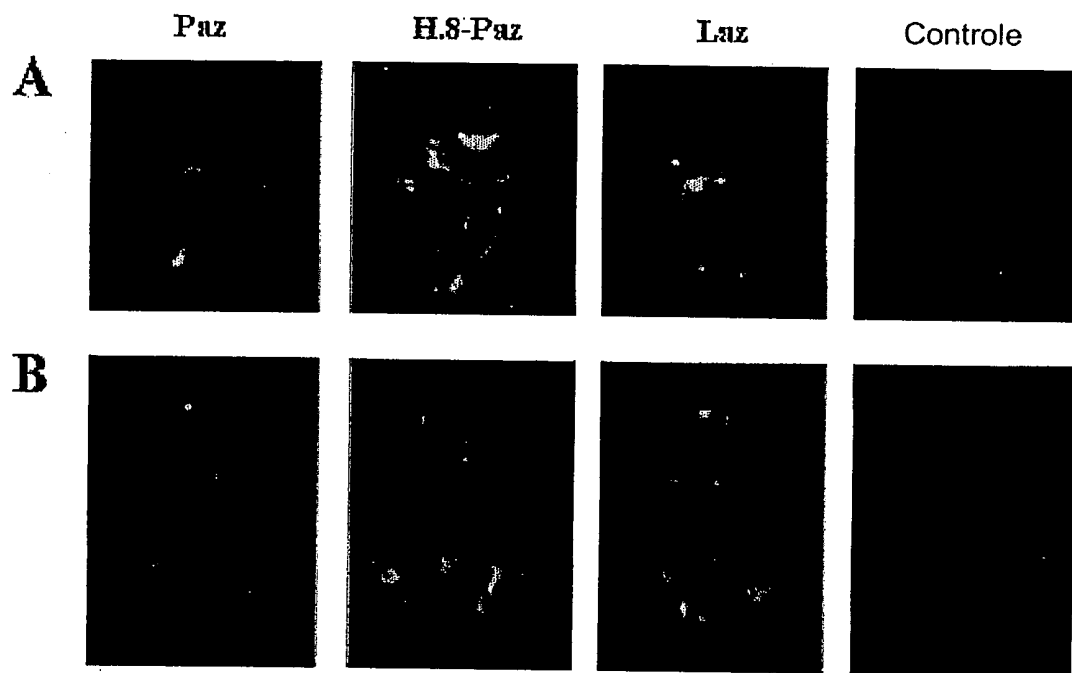


FIG. 6

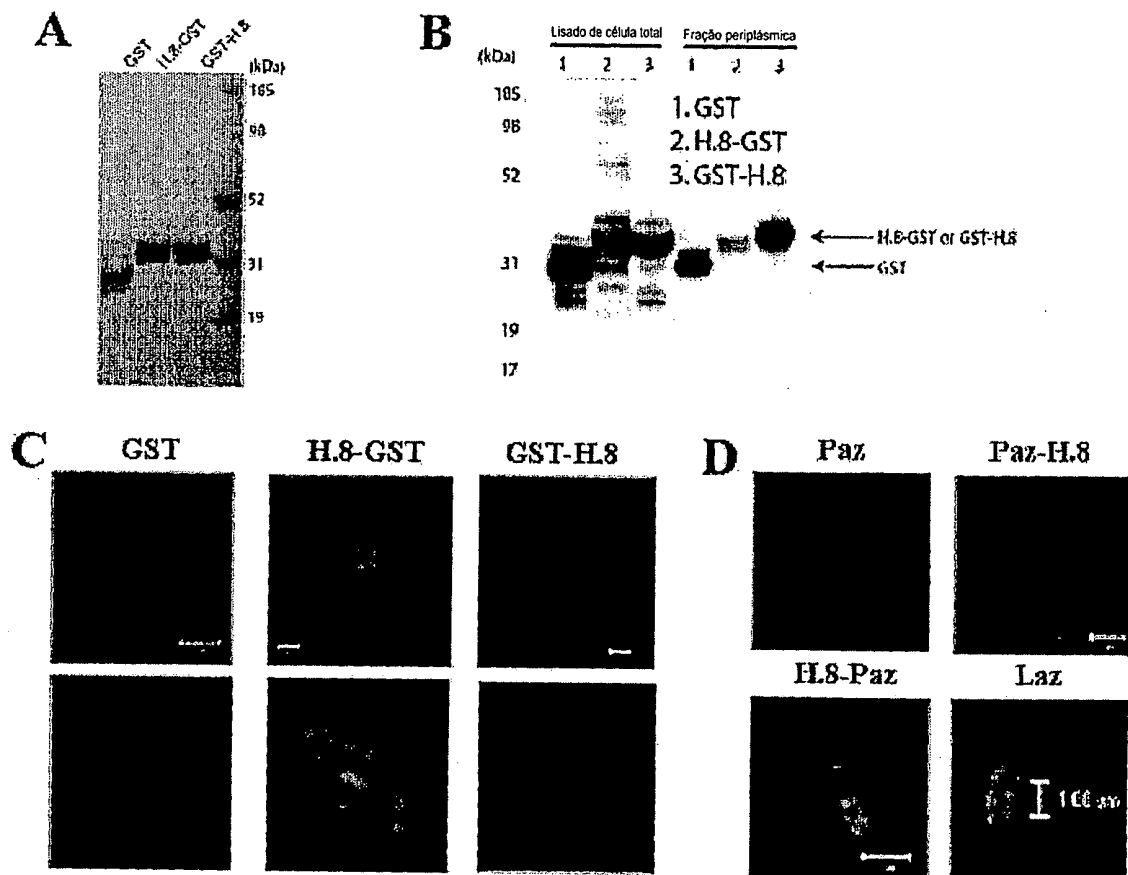


FIG. 7

**RESUMO****AGENTES DE TRANSPORTE PARA ATRAVESSAMENTO DA  
BARREIRA SANGUE-CÉREBRO E ENTRADA NAS CÉLULAS  
CANCERÍGENAS DO CÉREBRO E MÉTODOS PARA O SEU USO,**

5 onde são revelados os métodos e materiais para a liberação de um composto de carga nas células cancerígenas do cérebro e/ou através da barreira cérebro-sangue. A liberação do composto de carga é acompanhada pelo uso de peptídeos de transporte de proteína derivados das proteínas da membrana externa da *Neisseria*, por exemplo, *Laz*. A invenção também fornece  
10 peptídeos de trânsito sintéticos contendo pentapeptídeos de AAEAP. A invenção também revela os métodos para tratamento de câncer, especificamente câncer cerebral, bem como outras condições relacionadas ao cérebro. Além disso, a invenção fornece métodos de formação de imagem e diagnóstico do câncer, em particular o câncer cerebral.