



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0501037-3 B1



(22) Data do Depósito: 18/03/2005

(45) Data de Concessão: 07/05/2019

(54) Título: USO DE CROTAMINA E COMPOSIÇÃO

(51) Int.Cl.: C07K 14/46; G01N 33/68; A61K 35/58; A61K 38/17; A61P 35/00; (...).

(73) Titular(es): FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO.

(72) Inventor(es): TETSUO YAMANE; IRINA KERKIS; ALEXANDRE KERKIS; GANDHI RÁDIS BAPTISTA; MIRIAN AKEMI FURUIE HAYASHI; KATSUHIRO KONNO; ALVARO ROSSAN B. P. DA SILVA; LYGIA DA VEIGA PEREIRA; EDUARDO BRANDT DE OLIVEIRA.

(57) Resumo: "USO DE CROTAMINA, KIT E COMPOSIÇÃO". A presente invenção refere-se a usos de crotamina e de composições que a contêm, baseado na sua característica de interação com material genético. Constatou-se que em quantidades sub-micromolares o polipeptídeo deixa de ser tóxico, associando as características de penetração celular, condução de moléculas para a superfície, citoplasma ou núcleo celular e, de forma particular, de penetração celular seletiva. A invenção se refere ainda a composições que compreendem uma concentração farmacologicamente eficaz de crotamina, e uso destas no tratamento de doenças e disfunções, baseado nas suas características de interação com material genético, por exemplo, DNA e RNA, e de seletividade celular.

USO DE CROTAMINA E COMPOSIÇÃO

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] A presente invenção refere-se, em um aspecto, a usos de crotamina e de composições que a contêm, baseado nas suas características inéditas de interação com material genético.

[0002] Em um de seus aspectos, a invenção refere-se a uma série de usos úteis para a crotamina em quantidades sub-micromolares, em que o comportamento do polipeptídeo deixa de ser tóxico, associando as características de penetração celular, condução de moléculas para a superfície, citoplasma ou núcleo celular e, de forma particular, de penetração celular seletiva.

[0003] De acordo com a invenção, de forma mais particular, mas sem excluir qualquer outra, a crotamina e composições que a contêm são adequadas, entre outros, aos seguintes usos úteis na área diagnóstica, farmacêutica e biotecnológica:

- para condução de moléculas para dentro da célula, *in vitro* ou *in vivo*;
- para identificação ou marcação específica de células proliferativamente ativas em população mista de células, *in vitro* ou *in vivo*.

[0004] Dentro de outro aspecto, a invenção se refere a composições que compreendem uma concentração farmacologicamente eficaz de crotamina, e uso destas no tratamento de doenças e disfunções, baseado nas suas características de interação com material genético, por exemplo, DNA e RNA, e de seletividade celular.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

TOXICIDADE

[0005] Aos olhos de um técnico no assunto, e em vista do que se conhece no estado da técnica, as características tóxicas da crotamina não poderiam incentivar, e mesmo inibiriam, a pesquisa de seu uso para qualquer finalidade benéfica ao ser humano.

[0006] Crotamina é uma toxina, mais especificamente uma miotoxina, isolada do veneno da cascavel sul americana, *Crotalus durissus terrificus* [Gonçalves, J.M. (1956). Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. II - *Crotalus durissus crotaminicus*, subespécie biológica. An. Acad. Brasileira Ciências 28, 365-367]. A crotamina é um dos componentes mais abundantes no veneno de cascavel, correspondendo a aproximadamente 10% de crotamina por peso seco do veneno. A crotamina é um polipeptídeo básico de baixo peso molecular, da ordem de 4.800 Daltons e com ponto isoelétrico acima de 9,5. É constituída por 42 resíduos de aminoácidos (YKQCHKKGGHCFPKEKICLPPSSDFGKMDCRWRWK CCKKGSG), apresentando 6 cisteínas que formam três pontes de dissulfeto, e é rica em aminoácidos básicos como a lisina e a arginina.

[0007] Quando injetada intraperitonealmente, a crotamina causa uma rápida paralisia das patas traseiras de camundongo, num tempo menor que 15 minutos, sendo este o efeito típico dessa toxina. Além disto, são observadas ainda dificuldade em respirar e rigidez, sugerindo uma ação veratrina-símile [Gonçalves, J.M. (1956), já citado anteriormente]. Em nível molecular e celular, a crotamina

induz um aumento na corrente de sódio voltagem-dependente (mediado por canais de sódio), por despolarização acentuada (redução do potencial de repouso) da membrana dos miócitos das fibras musculares, junto às placas motoras - um mecanismo que é prevenido pela tetrodotoxina (TTX) [Hong, S.J., Chang, C. (1985) "Electrophysiological studies of myotoxin a isolated from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom on murine skeletal muscle". *Toxicon* 23, 927-937]. Conseqüentemente, o influxo maciço de íons sódio causa a dilatação do retículo sarcoplasmático dos miócitos, e a indução lenta de mionecrose restrita às células dos músculos esqueléticos [Ownby, C.L., Cameron, M.S., Tu, A.T. (1976) "Isolation of myotoxin component from rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom". *Am. J. Pathol.* 85, 149-166].

[0008] Esse mecanismo, pelo qual a crotamina exerce sua toxicidade, é semelhante ao da miotoxina-a, mais extensivamente estudada.

[0009] A crotamina é capaz de formar dímeros através de ligações entre cadeias de dissulfeto, adquirindo uma forma não muito diferente da esférica, que liga covalentemente subunidades extras.

[0010] Assim, não há divulgações no estado da técnica que sugiram, ou de qualquer forma indiquem benefícios advindos dos efeitos da crotamina sobre organismos vivos.

PENETRAÇÃO CELULAR

[0011] Peptídeos célula-penetrantes (CPP, do inglês "*cell-penetrating peptides*" ou "*cell-translocating peptides*") são conhecidos no estado da técnica. Algumas características desse tipo de peptídeo já foram divulgadas

como o caráter catiônico, baixo peso molecular e alto conteúdo de aminoácidos básicos, no entanto esses peptídeos podem variar na estrutura primária, no tamanho, e/ou na capacidade de penetrar nas células, o que faz com que não seja previsível reconhecer um CPP, uma vez que não se sabe a característica estrutural determinante para essa função de penetração celular. São conhecidos CPPs naturais, como a proteína HIV-1 TAT, derivada do vírus de imunodeficiência humana ("human immunodeficiency virus", HIV-1) e isolada do fator de ativação de transcrição de vírus, com capacidade de penetrar dentro de células *in vitro*, apresentando localização citoplasmática e nuclear normal; antp43-58, derivada do fator de transcrição do homeodomínio de Antennapedia de *Drosophila*, e ainda a proteína estrutural de Herpes simplex virus type I (HSV-1), denominada de VP22. Essas três proteínas célula-penetrantes possuem domínios de transdução de proteínas (protein transduction domains, PTDs), ou seja, uma sequência de resíduos de aminoácidos que quando isolada apresenta a maior eficiência de penetração dentro de células [Hawiger, J. (1999) "Noninvasive intracellular delivery of functional peptides and proteins". *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 89-94].

[0012] No entanto, apesar da obediência a alguns parâmetros que orientam a característica de um peptídeo ser célula-penetrante, o homem da técnica não saberia prever o efeito da presença de 3 pontes dissulfetos da crotamina, que é dotada de 6 cisteínas, uma das características estruturais que a diferencia dos outros peptídeos célula-penetrantes naturais conhecidos.

CONDUÇÃO DE MOLÉCULAS AO CITOPLASMA E NÚCLEO CELULAR

[0013] No estado da técnica são conhecidas algumas tecnologias sobre a condução de material genético para o citoplasma e/ou núcleo celular, no entanto apresentam alguns inconvenientes, como falta de seletividade e baixa eficiência de carregamento de moléculas, não havendo divulgação do uso de peptídeos catiônicos isolados do veneno como a crotamina para esses fins.

[0014] As referências que seguem abordam o assunto de maneira genericamente associada a este aspecto da invenção (penetração intra-celular e nuclear e/ou condução de DNA e/ou moléculas), mas todas são diferentes da presente invenção e não indicam ou de qualquer forma sugerem qualquer comportamento dessa natureza da crotamina, como determinou a Depositante.

[0015] A patente US 4.774.318 descreve o isolamento de um pequeno polipeptídeo com atividade citotóxica, purificado da fração de baixo peso molecular da serpente *Crotalus atrox*. Este composto pode ser usado como inibidor do crescimento celular, tanto puros como em combinação com outros reagentes, como anticorpos. Conjugados destes peptídeos com ligantes específicos podem ser utilizados para uma remoção seletiva de células específicas numa mistura de células.

[0016] A patente US 6.420.176 descreve uma composição para condução de DNA para células apresentadoras de antígeno. Um complexo molecular de condução específica para célula apresentadora de antígeno é formado a partir de um sistema de condução de gene não viral complexado com um

material genético heterólogo. O complexo entra então na célula-alvo através de receptores específicos e resiste aos mecanismos de degradação intracelular, de tal forma que a incorporação ou transdução deste material genético heterólogo resulta em expressão da respectiva proteína. A patente inclui ainda um método de imunização gênica sem a utilização de agulhas.

[0017] A patente US 6.461.641 descreve um veículo de condução para tumores. O principal problema das técnicas usuais de condução de reagentes terapêuticos, especificamente células ou grandes volumes de DNA recombinante ou drogas, para tumores sólidos, tem sido a resistência destes tecidos ao influxo de células e/ou de fluidos, resultando em uma baixa eficiência na penetração destes em tecidos tumorais a serem tratados. A utilização de veículos mais viscosos, preferencialmente com densidade semelhante ao do tecido, permite uma penetração mais eficiente, com reduzido refluxo e dispersão no ponto de entrada, de forma que mais material possa ser introduzido e permaneça no tumor. Entre os materiais mais indicados incluem-se as soluções ou suspensões de material polimérico que gelificam ou solidificam, no momento ou logo após, a injeção ou implantação do material.

[0018] A patente US 6.635.623 descreve a lipoproteína como um vetor para transporte de ácidos nucleicos. Esta invenção se refere a materiais e métodos empregados para o transporte e condução de ácidos nucleicos *in vivo*. Especificamente, refere-se ao uso de lipoproteínas, incluindo as lipoproteínas de baixa densidade ("low density

lipoproteins" - LDL) e/ou as apolipoproteínas, para a ligação e transporte *in vivo* de ácidos nucleicos. Além disto, esta invenção refere-se ao uso de lipoproteínas na detecção precoce de câncer e/ou metástase e/ou arteriosclerose.

[0019] A patente US 6.638.767 descreve métodos para conduzir compostos para dentro de células utilizando haleto orgânico e/ou carreador, podendo ser associado ao uso de ultrassom. Define-se haleto como um composto orgânico halogenado, ou seja, que contém pelo menos um átomo de carbono e pelo menos átomo de halogênio que pode ser um flúor (preferencialmente), cloro, bromo ou iodo.

[0020] A patente US 6.676.935 descreve adenovírus tecido-específicos como veículo para transfecção de células hospedeiras. Através da introdução de reguladores de início de transcrição dependentes de fatores de transcrição que são ativos somente em tipos celulares específicos e restritos, a replicação viral pode ser restringida às células-alvo. O adenovírus modificado pode ser utilizado como veículo para a condução de material genético, particularmente associado com função citotóxica para utilização em neoplasias.

[0021] A patente US 6.680.301 descreve um processo de transferência de moléculas para dentro das células através da membrana endossomal e lisossomal, utilizando um tratamento fotodinâmico, sem provocar a morte da maioria das células pelo tratamento fotodinâmico. Mais especificamente, esta invenção inclui um método de transferência de DNA e/ou RNA, tais como genes, para células através de indução fotoquímica do rompimento dos endossomos e lisossomos.

[0022] A patente US 6.692.911 descreve uma

composição para condução de compostos para dentro de células, especificamente referindo-se a agentes endosomolíticos biocompatíveis. Na formulação ideal, os agentes endosomolíticos são biodegradáveis e podem se desfazer dentro das células em compostos que podem ser reaproveitados ou dispensados pela célula. Entre os agentes endosomolíticos incluem-se os polímeros catiônicos, especificamente aqueles compostos constituídos por biomoléculas tais como a histidina, poli-histidina, poli-lisina ou qualquer combinação entre eles. Outro exemplo de agente endosmolítico inclui os compostos contendo imidazol tais como o vinilimidazol e a histamina. São mencionados como preferíveis os agentes que apresentam múltiplos sítios receptadores de próton e age como uma “esponja de prótons”, rompendo o endossoma por ação osmótica. Essa patente também prevê o uso desses agentes endosomolíticos como agentes de condução de compostos com as quais estes agentes devem se complexar.

[0023] As metodologias conhecidas e empregadas de condução de DNA intracelular podem ser basicamente classificadas como sistemas virais e não virais. É necessário considerar que a eficiência no transporte do DNA depende de passos como: a absorção do complexo de transfecção em contato com a superfície da célula, internalização deste complexo pela célula, liberação dos endosomas, e translocação para o núcleo para a expressão do gene. Os carregadores virais têm a capacidade de contornar todos esses obstáculos, pois expressam proteínas que facilitam o transporte de genes nestes diversos níveis. Entretanto, os ditos carregadores

apresentam uma capacidade limitada de carregamento de DNA, além de apresentarem desvantagens como problemas no processo de empacotamento e produção, possibilidade de recombinação viral, toxicidade e imunogenicidade *in vivo*. Por outro lado, embora os carregadores não virais se mostrem ferramentas poderosas para a elucidação do funcionamento e regulação de genes, apresentam baixa eficiência no transporte do DNA para o núcleo das células-alvo. O sistema não viral é mais seguro que o sistema viral atualmente utilizado para os testes clínicos, mas a baixa eficiência na expressão do transgene continua sendo a sua grande desvantagem. A crotamina, conforme a presente invenção, como carregador não viral, apresenta uma eficiência surpreendente no carregamento de DNA para o citoplasma e/ou ao núcleo da célula *in vitro* e principalmente *in vivo*.

[0024] Assim, os usos da crotamina a que se refere a presente invenção não eram previsíveis até o momento, nunca tendo sido revelados ou sugeridos no estado da técnica, seja em relação à ausência de toxicidade, capacidade de penetrar nas células ou condução de material genético, ou outras moléculas, para a superfície, citoplasma ou núcleo celular, além de surpreendente seletividade em relação a células proliferativamente ativas.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0025] A figura 1 ilustra a internalização *in vitro* da crotamina conjugada com Cy3 em blastócitos, sendo que em (A) são ilustrados contrastes de interferência digital, em (B) é ilustrada a fluorescência determinada por microscopia confocal e em (C) a sobreposição das imagens obtidas em (A)

e (B), demonstrando uma intensa fluorescência dentro do citoplasma celular.

[0026] A figura 2 ilustra a internalização *in vitro* e localização da Cy3-crotamina (1 μ M) em diferentes tipos celulares. (A-C) ilustram a internalização *in vitro* em fibroblastos humanos após uma hora de tratamento; (D e E) ilustram a internalização *in vitro* em células-tronco após uma hora de tratamento; (F) ilustra a cultura de células ES ("embryonic stem" ou células embrionárias tronco) controle após tratamento por 3 horas com o corante fluorescente Cy3; (G-I) ilustram a internalização *in vitro* em células do líquido peritoneal; (J-L) ilustram a marcação observada em células da medula óssea murina após injeção da Cy3-crotamina em camundongos.

[0027] A figura 3 ilustra a internalização da crotamina conjugada com Cy3 em células vivas. (A-C) ilustram as células vivas do líquido peritoneal de camundongo, apresentando forte e moderada marcação no citoplasma e núcleo, respectivamente; (D-F) ilustram células vivas do líquido peritoneal de camundongo, demonstrando a localização nuclear da crotamina.

[0028] A figura 4 exibe a sequência nucléica e deduzida de aminoácidos de cDNAs codificantes para o precursor das isoformas de crotamina.

[0029] A figura 5 exibe a localização intracelular e ligação da Cy3-crotamina com cromossomos em mitose observados *in vitro* e *in vivo*.

[0030] A figura 6 exibe a análise da interação peptídeo-DNA por eletroforese em gel de agarose. A

eletroforese neste sistema permite observar alterações no padrão de migração (retardo na migração) devido à neutralização do ácido nucléico determinado pela presença do peptídeo catiônico e/ou devido à formação de complexos maiores entre a crotamina e o DNA.

[0031] A figura 7 ilustra a análise da interação peptídeo-DNA por dicroísmo circular. O painel (A) exibe os espectros de dicroísmo circular obtidos para crotamina 20 μM e o painel (B) exibe os espectros de dicroísmo circular obtidos para o plasmídeo 0,1 μM . O painel (C) exibe o espectro obtido da mistura de crotamina 20 μM com plasmídeo 0,1 μM , sendo diferente do espectro teórico obtido da soma dos espectros dos painéis (A) e (B).

[0032] A figura 8 ilustra a internalização da crotamina em células proliferativamente ativas. (A) ilustra a internalização da crotamina em células ES em processo de diferenciação; (B-D) ilustram a amplificação da região delimitada pelo quadrado em (A), (B) ilustra a internalização da Cy3-crotamina em células proliferativamente ativas, (C) ilustra a incorporação da BrDU em células proliferativamente ativas, e (D) ilustra a sobreposição das imagens (B) e (C); (E-H) ilustram 3 células ES mostrando a co-localização da crotamina com a marcação por BrDU em células proliferativamente ativas, (E) ilustra contrastes de interferência digital de células proliferativamente ativas, (F) ilustra a internalização da Cy3-crotamina em células proliferativamente ativas, (G) ilustra a incorporação da BrDU em células proliferativamente ativas, e (H) ilustra a sobreposição das imagens (F) e (G).

[0033] A figura 9 ilustra a associação da Cy3-crotamina com centríolos. (A) ilustra células do líquido peritoneal de camundongo; (B) ilustra microtúbulos, pólos mitóticos e centríolos marcados com anti-tubulina; (C) ilustra a co-localização da Cy3-crotamina e centríolos em células ES; (D-H) ilustram a duplicação e separação de centríolos durante o ciclo do centrossoma em células do líquido peritoneal.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[0034] Estudos realizados pelos inventores revelam propriedades que propiciaram usos não conhecidos para a crotamina, quais sejam:

- ser um peptídeo célula-penetrante,
- não-tóxico em concentrações sub-micromolares,
- capacidade de transportar moléculas até a célula (até a superfície externa da célula, para dentro do citoplasma ou até seu núcleo), seja *in vitro* ou *in vivo*.

[0035] Adicionalmente, a crotamina apresenta tais qualidades de forma mais eficiente que outros CPPs conhecidos no estado da técnica.

[0036] Verifica-se ainda que em usos preferenciais, diferentemente de outros CPPs, a crotamina é seletiva, apresentando especificidade com relação a células proliferativamente ativas.

[0037] Trata a invenção, portanto, num primeiro aspecto, de usos da crotamina, de forma útil, por exemplo, nas áreas diagnóstica, farmacêutica, e/ou biotecnológica, por exemplo, como citado abaixo:

- carregadora de moléculas de interesse até a

superfície, o citoplasma ou núcleo celular, particularmente moléculas constituídas por ácidos nucleicos ou seus análogos modificados, por exemplo, DNA plasmidial, RNA, ribozimas, RNAi, DNA e RNA chamariz ("decoy"), DNAzimas; de proteínas ou peptídeos conjugados ou covalentemente ligados a crotamina;

- identificação ou marcação específica de células proliferativamente ativas, particularmente células tumorais ou células-tronco, em população mista de células, *in vitro* ou *in vivo*;

[0038] Exemplos de uso da crotamina como carregadora de genes de interesse ao núcleo da célula são:

- sistema de endereçamento de genes ("gene delivery system"), em terapia celular e transgênese; e

- vacinas de DNA, geralmente em forma plasmidial, que possuem um gene codificador de uma proteína antigênica, a ser expressa e produzida nas células de mamífero vacinado. Também chamadas de vacinas de terceira geração, as vacinas de DNA são ferramentas que permitem induzir no organismo efeitos semelhantes à infecção natural e a resposta imune desejada.

[0039] De acordo com a invenção, há usos biotecnológicos da crotamina na área experimental, particularmente como reagente de transfecção de moléculas para dentro das células. Destaca-se ainda, na área experimental, o uso de crotamina para a seleção específica de células-tronco, a partir de culturas mistas de células. Particularmente pode-se citar o uso onde as células-tronco são isoladas de forma eficiente a partir de, por exemplo,

medula óssea e cordão umbilical, com a finalidade de futuros tratamentos. Atualmente, essas culturas isoladas contêm outros tipos celulares além das células-tronco, pela falta de processos de seleção mais eficientes. Pelo fato da crotamina apresentar especificidade de seleção em relação a células proliferativamente ativas, particularmente células-tronco e células tumorais, sua utilização como marcadora das ditas células nos ditos processos de seleção torna-os mais precisos.

USO DE EQUIVALENTES FUNCIONAIS

[0040] Conforme entendimento da presente invenção, a menção a crotamina é entendida como abarcando também seus equivalentes funcionais, ou seja, moléculas estruturalmente distintas, fragmentos, análogos, derivados e associados, mas que desempenham a mesma função para atingir o resultado de características semelhantes. Isso significa que alterações executadas pelo homem da técnica, conforme conhecimentos comuns na área, e que levem de forma óbvia a efeitos equivalentes, também fazem parte da invenção.

[0041] São indicadas a seguir, a título meramente exemplificativo, modificações possíveis a partir dos conhecimentos aqui divulgados sobre crotamina, que o homem da técnica sabe efetuar, baseado no estado da técnica.

[0042] A crotamina per se, oligopeptídeo de 42 aminoácidos, pode ser expressa da seguinte forma:

aa¹aa²aa³C⁴aa⁵aa⁶aa⁷aa⁸aa⁹aa¹⁰C¹¹aa¹²aa¹³aa¹⁴aa¹⁵aa¹⁶aa¹⁷C¹⁸aa¹⁹aa²⁰a
a²¹aa²²aa²³aa²⁴aa²⁵aa²⁶aa²⁷aa²⁸aa²⁹C³⁰aa³¹aa³²aa³³aa³⁴aa³⁵C³⁶C³⁷aa³⁸aa³
9aa⁴⁰aa⁴¹aa⁴²

onde **aa** significa resíduo de aminoácido específico e **C** significa cisteína.

[0043] O homem da técnica sabe determinar as substituições de aminoácidos específicos por outros, de mesmas características ou de características alternativas equivalentes (seja por conhecimento do estado da técnica ou por experimentação normal de sua área), no sentido de obter os efeitos descritos mais atrás para a crotamina, revelados pela presente invenção. Mais especificamente, as qualidades mínimas da crotamina e seus equivalentes, de acordo com a presente invenção, são: baixa toxicidade, capacidade de penetração celular e capacidade de carregamento de moléculas para a superfície, o citoplasma ou núcleo das células. De forma preferencial e mais particular, a crotamina apresenta ainda a característica de seletividade quanto a células proliferativamente ativas, como por exemplo, células-tronco e células tumorais.

[0044] Alguns exemplos desse conhecimento comum do homem da técnica são mencionados a seguir, de forma não limitativa:

- As cisteínas podem estar ou não formando pontes de dissulfeto intramoleculares.

- a cisteína (C) pode ser substituída por semelhantes, como homocisteína, penicilamina, ou serina;

- aa¹⁻³ são respectivamente Y, K, e Q, mas podem ser substituídas por outros, independentemente básicos ou polares não-carregados;

- aa⁵⁻¹⁰ são respectivamente H, K, K, G, G e H, mas podem ser substituídos por outras, independentemente básicos ou não-polares;

- aa¹²⁻¹⁷ são respectivamente F, P, K, E, K e I, mas podem ser substituídos por outros, independentemente básicos, ácidos, ou não-polares;

- aa¹⁹⁻²⁹ são respectivamente L, P, P, S, S, D, F, G, K, M e D mas podem ser substituídos por outros, independentemente básicos, ácidos, polar não-carregados ou não-polares;

- aa³¹⁻³⁵ são respectivamente R, W, R, W e K mas podem ser substituídos por outros, independentemente básicos ou não-polares;

- aa³⁸⁻⁴² são respectivamente K, K, G, S e G, mas podem ser substituídos por outros, independentemente básicos, polares não-carregados ou não-polares.

[0045] Nas considerações acima se utilizam as nomenclaturas comuns para a referência a aminoácidos:

E - ácido glutâmico

A - alanina

R - arginina

D - asparagina

F - fenilalanina

G - glicina

Q - glutamina

H - histidina

I - isoleucina

L - leucina

K - lisina

P - prolina
S - serina
Y - tirosina
T - treonina
W - triptofano
V - valina

[0046] Ainda conforme conhecido pelo homem da técnica, os resíduos de aminoácidos (aa) podem ser L- ou D-aminoácidos, eventualmente substituídos por derivados de características equivalentes, por exemplo (mencionadas três letras típicas de referência a cada um):

ácido aminobutírico (Abu)
ácido aminoisobutírico (Aib)
ácido diaminobutanóico (Dab)
ácido diaminopropiônico (Dpr)
ácido hexanóico (ϵ -Ahx)
ácido isonipecótico (Isn)
ácido tetraidroisoquinolina-3-carboxílico (Tic)
butil-glicinacicloexilalanina (Cha)
citrulina (Cit)
estatina e derivados (Sta)
fenilglicina (Phg)
hidroxiprolina (Hyp)
homoserina (Hse)
norleucina (Nle)
norvalina (Nva)
ornitina (Orn)
penicilalanina (Pen)
sarcosina (Sar)

ietilalanina (Thi)

[0047] Assim, os compostos equivalentes da crotamina, seus fragmentos e derivados, protegidos na presente invenção, são oligopeptídeos ou peptídeos particularmente definidos pelos resíduos de aminoácidos que os compõem, sendo que cada resíduo de aminoácido pode ser substituído por outro equivalente (muda-se a forma, mas obtém-se a mesma função e resultados semelhantes), por exemplo, mantendo a natureza das cadeias laterais:

- Ácidos: o resíduo apresenta carga negativa devido à perda do íon hidrogênio (H) em pH fisiológico, sendo este resíduo atraído pela solução aquosa do meio em que está presente quando em pH fisiológico;

- Básicos: o resíduo tem carga positiva graças à associação com um íon hidrogênio (H) em pH fisiológico, sendo este resíduo atraído pela solução aquosa do meio em que está presente quando em pH fisiológico;

- Hidrofóbicos ou não-polares: os resíduos não apresentam carga em pH fisiológico, sendo estes resíduos repelidos pela solução aquosa do meio em que estão presentes;

- Polares não-carregados: os resíduos não apresentam carga em pH fisiológico, e não são eficientemente repelidos pela solução aquosa do meio em que estão presentes.

[0048] A crotamina, de acordo com a presente invenção pode estar sob a forma dimérica ou monomérica, e contendo ou não pontes de dissulfeto.

[0049] Outra alternativa de realização da invenção refere-se a composições que compreendem crotamina em uma concentração farmacologicamente eficaz, preferencialmente

compreendida entre 100 μM e 0,01 μM , de maior preferência entre 1 μM e 0,1 μM . A composição compreende ainda outros ingredientes adequados, excipientes, veículos, como por exemplo genes, material genético ou moléculas de interesse, particularmente as constituídas por ácidos nucleicos ou seus análogos modificados, por exemplo DNA plasmidial, RNA, ribozimas, RNAi, DNA e RNA chamariz ("decoy"), DNazimas; ou de proteínas ou peptídeos conjugados ou covalentemente ligados a crotamina.

[0050] Um outro aspecto da invenção refere-se a um kit. Dentro de uma alternativa de concretização, o dito kit é caracterizado pelo fato de conter crotamina como reagente para a transfecção ou carregamento de moléculas para o citoplasma ou núcleo celular. Dentro de outra concretização, o dito kit é caracterizado pelo fato de conter a crotamina como reagente para a identificação e a seleção de células proliferativamente ativas a partir de uma população mista de células, particularmente as provenientes do cordão umbilical e/ou medula óssea.

[0051] Uma composição particular da presente invenção é injetável, por exemplo, administrada de forma parenteral, subcutânea, intramuscular, intravenosa, intra-arterial ou intraperitoneal.

EXEMPLOS

[0052] A presente invenção pode ser compreendida de forma mais clara e precisa através da leitura dos exemplos a seguir, que ilustram sem apresentar qualquer caráter limitativo além do contido nas reivindicações apresentadas mais adiante.

Exemplo 1

- Isolamento e Purificação da Crotamina a Partir do Veneno de *Crotalus durissus terrificus*:

A - Purificação da Crotamina por Cromatografia

[0053] O veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi extraído e seco a vácuo. Foram dissolvidos 600 mg de veneno total em 5 ml de 0,25 M formato de amônio (pH 3,5), e a crotoxina, que constitui o maior componente do veneno, foi precipitada através da adição lenta de 20 ml de água gelada e centrifugação. O tampão 1M Tris-base foi adicionado gota a gota ao sobrenadante, até atingir o pH 8,8, e a solução foi aplicada em uma coluna de CM-Sepharose FF (1,5 x 4,5 cm; fornecedor: Amersham-Pharmacia) equilibrada com o tampão 0,04 M Tris-HCl pH 8,8, contendo 0,064 M NaCl. Após lavar a coluna com 100 ml da solução de equilíbrio, a crotamina foi coletada num picofino através da elevação da concentração de NaCl para 0,64 M. A fração coletada foi dialisada utilizando membrana benzoilata ("benzoylated membrane") com corte de MW 3.000, e liofilizado. Para a crotamina purificada utilizando este método, a análise de aminoácidos após hidrólise ácida da amostra (4N MeSO₃H + 0,1% triptamina; 24h a 115°C) indica um rendimento de 72 mg com uma pureza maior que 98%.

B - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - HPLC

[0054] A crotamina foi isolada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando o equipamento da empresa Merck-Hitachi modelo L-6200A, com detector UV visível ajustado para detecção a 214 nm, acoplado a uma coluna de fase reversa: C-18 / Beckman (4,6 x 250

mm/resina de 5 μ) utilizando como solventes: solvente A, 0,1% TFA/H₂O e solvente B, 10% solvente A/acetonitrila (ACN); 5% a 60%, com fluxo de 0,5 ml/min. Os gradientes utilizados variam de acordo com a amostra. Obtêm-se os peptídeos separados manualmente do efluente de acordo com a forma dos picos monitorados através de leituras de absorbância a 214 nm.

Exemplo 2

- Determinação da Massa Molecular e Estrutura Primária da Crotamina por Espectrometria de Massa (Es-MS-MS):

[0055] Menciona-se a seguir um processo de determinação da sequência de aminoácidos da crotamina encontrado no veneno de serpente purificado, mais especificamente *Crotalus durissus terrificus*, por análise de espectrometria de massa realizada utilizando o espectrômetro de massa modelo Micromass Quattro II (ESMS-MS / Micromass), no modo de ionização positiva, com uma fonte de íon Electrospray (Micromass), e utilizando o software Mass Lynx (Micromass) para o controle de aquisição dos dados; compreendendo as seguintes etapas: dissolução das amostras em 50% H₂O/ACN com 0,1% ácido fórmico, e introdução das mesmas em fluxo constante de 5 μ L/min, feito através de uma bomba de injeção, sendo os dados adquiridos no primeiro quadrupole (ESMS), por varredura da razão massa/carga (m/z) de 400 a 1600, utilizando tempo de varredura de 5 segundos durante todo o processo de análise, sendo o sequenciamento realizado através da seleção do peptídeo com íon protonado caracterizado no primeiro quadrupolo, seguido por fragmentação realizada por colisão de dissociação induzida

(CID) com pressão de 3×10^{-3} de gás argônio, e finalmente os dados foram adquiridos por varredura no segundo quadrupolo (ESMS-MS). O software Mass Lynx (Micromass) foi utilizado para controle de aquisição dos dados.

[0056] Uma outra forma de purificação, seguido de caracterização e seqüenciamento, é realizada utilizando o sistema de HPLC acoplado ao sistema de espectrometria de massa (LC-ESMS-MS), onde foi utilizado o HPLC modelo 1100, da empresa Hewlett-Packard, com injetor automático e detector UV visível, ajustado para detecção a 214 nm, onde foi utilizada a coluna de fase reversa: C-18/The Separations Group (4,6 x 250 mm/ $\phi 5 \mu$), para isolamento dos componentes do veneno total. Os solventes utilizados foram: Solvente A: 0,1% TFA/H₂O - Solvente B: 10% solvente A/ACN, com fluxo de 0,6 ml/min. O gradiente utilizado foi:

t = 0 min a 5 min: 0% B

t = 5 min a 65 min: 0% a 60% B

t = 65 min a 70 min: 60% a 100% B

t = 70 min a 75 min: 100% B

t = 75 min a 80 min: 100% a 0% B

[0057] Do fluxo utilizado no HPLC de 600 μ l/min, 20 μ l foram automaticamente introduzidos no espectrômetro de massa e os 580 μ l restantes para o detector de UV visível.

[0058] As análises de espectrometria de massa foram realizadas no espectrômetro de massa Micromass Quattro II (ESMS-MS/Micromass) no modo de ionização positiva com uma fonte de íon Electrospray (Micromass). A aquisição dos dados de caracterização e seqüenciamento foram possíveis graças à utilização do software Mass Lynx (Micromass) desenvolvido

para essa finalidade.

Exemplo 3

- Determinação da Sequência de Aminoácidos da Crotamina por Dedução do cDNA do Precursor dessa Molécula Expresso em Tecidos de Serpentes, Especificamente Crotalus durissus terrificus, compreendendo as Seguintes Etapas:

A - Purificação do RNA Mensageiro e Construção da Biblioteca de cDNA de Glândula de Veneno de Crotalus durissus terrificus

[0059] O RNA total da glândula de veneno da *Crotalus durissus terrificus* foi isolado através do método de extração com isotiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio, utilizando o reagente Trizol (Invitrogen). O respectivo RNA mensageiro foi purificado através de dupla passagem por uma coluna de oligo-dT celulose pré-empacotada (Invitrogen). Uma alíquota do RNA mensageiro obtido foi submetida à eletroforese em gel de agarose desnaturante (contendo de 1% a 2,5% de formaldeído), e que foi corado com brometo de etídeo para a visualização e análise qualitativa da amostra de RNA.

[0060] Em seguida, o RNA foi transferido por capilaridade para membranas de náilon para que a integridade da amostra de RNA pudesse ser confirmada através de hibridizações com sondas específicas para a crotamina. A construção da biblioteca de cDNA em fagos λ ZAP foi obtida utilizando o kit de construção de bibliotecas comercializado pela Stratagene (La Jolla, CA). Após a clonagem dos insertos de cDNA dupla fita obtidos a partir de 5 μ g do RNA mensageiro total da glândula de veneno nos fagos λ ZAP, estes foram empacotados *in vitro* e, em seguida, titulados para verificar

a eficiência da clonagem. Esta biblioteca de fagos foi então amplificada e alíquotas foram estocadas a -20°C e -80°C , na presença de clorofórmio ou DMSO, respectivamente.

B - Amplificação do cDNA a Partir do Lisado Total de Fagos

[0061] Utilizando-se o lisado total de fagos ($10\ \mu\text{l}$) da biblioteca de cDNA foram realizadas reações de amplificação por PCR ("Polymerase Chain Reaction") utilizando oligonucleotídeos específicos, desenhados a partir da sequência do cDNA codificante para o precursor da crotamina da glândula de veneno. O lisado de fagos foi inicialmente incubado a 100°C por 5 minutos e resfriado a 4°C para então, adicionar os demais componentes da reação de amplificação, constituída por 30 pmol de cada primer específico, 0,58 U de Taq DNA polimerase (5000 U/ml - Invitrogen), 200 μM de dNTPs, 3,5 mM MgCl_2 e 1X do tampão para PCR, fornecido juntamente com a enzima. As reações assim preparadas foram submetidas a um ciclo de desnaturação a 94°C por 4 minutos e, em seguida, a mais 30 ciclos de 94°C por 1 min, 43°C por 45 seg e 72°C por 1 min. No final destes ciclos, as reações foram mantidas a 4°C até a análise dos produtos gerados, através de eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo. Os produtos obtidos apresentando tamanho esperado, baseado na sequência do cDNA da glândula de veneno, foi subclonado em vetor plasmidial pCRscript SK+ (Stratagene), seguindo as instruções do fabricante, e foi submetido ao sequenciamento utilizando oligonucleotídeos que anelam em regiões vizinhas ao sítio de clonagem múltipla do vetor (primers T3 e T7).

C - Seleção e Identificação de Clones Codificantes para o Precursor da Crotamina

[0062] Os clones contendo cDNA codificante para o precursor de crotamina foram isolados utilizando um método baseado em reações de PCR de alta estringência [Israel, D.I. (1993) "A PCR-based method for high stringency screening of DNA libraries". *Nucl. Ac. Res.* 21, 2627-2631]. Neste método, a biblioteca de fagos foi subdividida em 64 alíquotas de 1000 plaques em cada pocinho de uma microplaca, e em seguida foi submetida à amplificação por 6 horas. Os pocinhos contendo clones com inserto codificante para a crotamina foram identificados através de reações de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos, que permitiam a amplificação de um fragmento de aproximadamente 100 pares de base, cuja especificidade era confirmada por reações de hibridização com sondas específicas. Os fagos dos pocinhos positivos eram então diluídos e novamente aliquotados em pocinhos contendo 25 plaques cada, sendo novamente re-amplificados e submetidos a uma nova etapa de seleção através de reações de PCR, conforme já descrito. Após três ciclos de seleção, todos os plaques coletados aleatoriamente continham o cDNA codificante para o precursor da crotamina.

[0063] Alternativamente, os fragmentos obtidos por amplificação por PCR a partir do lisado total da biblioteca de cDNA da glândula de veneno ou por RT-PCR ("reverse-transcriptase polymerase chain reaction"), utilizando oligonucleotídeos específicos, foram utilizados para a síntese das sondas radioativas (marcada com α -³²P) pelo

método de "random priming" (kit Rediprime/Amersham Biosciences). As membranas de nitrocelulose (Schleicher & Schuell) preparadas utilizando placas contendo aproximadamente 50 mil plaques de fago cada, foram submetidas à hibridização com as sondas radioativas em solução 6X SSPE (1X SSPE: 0,15 M NaCl, 15 mM NaH₂PO₄ pH 7, 1 mM EDTA), 50% formamida, 0,1% SDS e 5X Denhardt's, a 42°C, por 16 horas. As membranas foram então lavadas 2 vezes em 2X SSC/0,1% SDS e 3 vezes em 0,1X SSC/0,1 %SDS, a 65°C, durante 15 minutos cada [1X SSC: 0,15 M NaCl e 15 mM citrato de sódio pH 7]. Os plaques positivos para as sondas utilizadas foram identificados por autoradiografia e somente os plaques identificados como positivos foram isolados para análise do inserto de DNA. A análise dos insertos identificados foi realizada por seqüenciamento das extremidades do inserto, logo após a excisão *in vivo* do fagomídeo pBluescript a partir do vetor λ ZAP, que foi realizado com o auxílio do "helper phage", seguindo as instruções do fornecedor.

D - Seqüenciamento dos Insertos de DNA

[0064] As reações de seqüenciamento foram realizadas segundo o método de terminação de cadeia com dideóxi-nucleotídeos utilizando o kit Big Dye (Applied Biosystem), seguido de análise no equipamento ABI 310 ou ABI 3100 (Applied Biosystem), seguindo as instruções do fabricante.

[0065] A seleção de clones por hibridização da biblioteca de cDNA de glândula de veneno de *Crotalus durissus terrificus* permitiu o isolamento do cDNA codificante para o precursor da crotamina. A partir da biblioteca de cDNA de um par de glândulas de veneno de um espécime de cascavel, foram

isolados e seqüenciados 15 clones positivos. Todos os clones de cDNA seqüenciados, contendo insertos de 340 a 360 nucleotídeos, apresentavam fase de leitura aberta de mesmo tamanho (em torno de 198 nucleotídeos). O alinhamento destas 15 seqüências utilizando o programa MACAW permitiu verificar que estes cDNAs poderiam ser agrupados em seis diferentes grupos, identificando seis distintos cDNAs que codificam para duas isoformas distintas de precursor da crotamina (figura 4). O precursor da crotamina é constituído por 63 resíduos de aminoácidos, onde 22 aminoácidos no N-terminal constituem um peptídeo sinal, 42 aminoácidos correspondem à proteína madura com uma lisina na extremidade C-terminal, que é removida após tradução.

Exemplo 4

- Processos de Síntese dos Peptídeos em Fase Sólida:

A - Emprego do Grupo Terc-Butiloxicarbonila (Boc) como Protetor Temporário do Grupo Amino e Derivados Benzílicos (Bzl) para a Proteção da Maioria das Cadeias Laterais Reativas dos Aminoácidos

[0066] O primeiro passo da síntese nesta estratégia é a remoção do grupo Boc do primeiro resíduo de aminoácido ligado à resina.

[0067] Esta remoção ocorre em presença de TFA 30% em diclorometano (DCM), contendo 2% de anisol, durante 30 min. Após este período são feitas lavagens com isopropanol 1/2% de anisol, DCM e MeOH. Para a entrada do aminoácido seguinte, desprotona-se (neutralização) o grupo amino com tratamento em TEA 10% ou DIPEA 5% em DCM por 10 min. A seguir, lava-se

a peptidil-resina com DCM, MeOH, DCM e com o solvente que será utilizado na fase de acoplamento.

[0068] O acoplamento do aminoácido passa por uma fase de ativação, que usualmente é feita com agentes acilantes: diisopropilcarbodiimida (DIC) ou tetrafluorborato de 2-(1Hbenzotriazolil-1,1,3,3-tetrametilurônio) TBTU. Usualmente emprega-se um excesso molar de 3 vezes do Boc-aminoácido (componentecarboxílico, CC) e do agente acilante em relação ao teor de amino grupos (componente amínico, CA) na resina.

[0069] A proporção de reagentes quando se utiliza DIC é de: CA:CC:DIC, 1:3:3 e quando se utiliza TBTU, a relação CA:CC:TBTU:DIEA passa a ser de 1:3:3:4. A concentração final destes reagentes se situa na faixa de 0,05 a 0,1 M.

[0070] Nos acoplamentos de Asn (asparagina) ou Gln (glutamina) utiliza-se hidroxibenzotriazol (HOBt) juntamente com o composto acilante, para prevenir a formação de nitrila destes aminoácidos. Nestes acoplamentos, a proporção final de CA:CC:TBTU:HOBt:DIEA é de 1:3:3:3:5. O monitoramento da reação de acoplamento, que dura em geral 2 horas, é feito com o método qualitativo de ninidrina e uma coloração azul na peptidil-resina é indicativo de acoplamento incompleto. Neste caso, faz-se o reacoplamento geralmente variando-se o solvente utilizado no acoplamento anterior e/ou o agente acilante. Depois de encerrada esta etapa de acoplamento, reinicia-se o ciclo seguinte com a desproteção do amino grupo até a entrada do resíduo subsequente e assim ciclicamente até o final do alongamento da sequência pretendida.

[0071] Após o encerramento da síntese, a clivagem do peptídeo da resina e a desproteção total das suas cadeias laterais dos aminoácidos são efetuadas em uma única etapa de tratamento com HF anidro a 0°C durante 60 min a 90 min em presença de *p*-cresol e dimetilsulfeto (DMS) (5%, v/v de cada um) os quais agem como supressores de reações colaterais induzidas por carbocátions liberados durante este tratamento com HF. Em seqüências peptídicas que contêm resíduos de Trp, adiciona-se etano-1,2-ditíol (EDT) para que a remoção do grupo formil que protege a cadeia lateral deste aminoácido seja feita simultaneamente à clivagem. O EDT é utilizado na mesma proporção dos demais supressores (5% v/v de cada um). Após a clivagem, lava-se a resina com acetato de etila e o peptídeo é extraído com lavagens de ácido acético (AcOH) 5% em água (v/v), seguida de liofilização para a obtenção final de pó branco, geralmente amorfo.

B - Utilização do Protetor Base-Lábil 9-Fluorenilmetoxycarbonila (Fmoc) e Derivados Terc-Butílicos (TBU)

[0072] Diferentemente da estratégia anterior, utiliza-se o grupo protetor amínico Fmoc, removido do aminoácido com tratamento em solução de piperidina 20% em DMF por cerca de 20 min. Este tratamento já deixa os grupos amino na forma desprotonada para a etapa seguinte de acoplamento. Os métodos de acoplamento são os mesmos da química Boc e a clivagem final é feita em meio ácido mais fraco que o HF, pois tanto a ligação dos protetores das cadeias laterais (geralmente do tipo terc-butílico) quanto do peptídeo à resina é mais lábil que a observada na química

Boc. Usualmente se emprega um tratamento com TFA 85% a 95% (v/v) e mais uma mistura de diferentes tipos de supressores de reações colaterais por cerca de 2h. Após esta fase, o peptídeo é precipitado em éter etílico gelado junto com a resina e centrifugado a uma velocidade de 8000 rpm por 5 min. Descarta-se o sobrenadante e o resíduo é novamente suspenso em éter etílico, agitado em vortex e centrifugado. Repete-se este procedimento por cerca de 5 vezes e, após estas lavagens e precipitações, a mistura de resina e peptídeo é seca sob vácuo. Extrai-se finalmente o peptídeo da resina com AcOH 5% (v/v) em água e liofiliza-se o filtrado até a obtenção de um pó branco amorfo.

[0073] Tanto a estratégia A como a B foram anteriormente descritos por Barany, G. and Merrifield, R.B. [Gross, E., Meinhofer, J. (Eds.) (1980) In: "The Peptides: Analysis, Synthesis and Biology", vol. II, Academic Press, New York; Fields, G.B., Noble, R.L. (1990) *Int. J. Pep. Prot. Res.* 35, 161].

Exemplo 5

- Cultura Celular e Diferenciação das Células In Vitro:

[0074] As células-tronco embrionárias (ES) de camundongo, linhagem USP-1 [Soukoyan, M.A., Kerkis, A.Y., Mello, M.R.B., Kerkis, I.E., Visintin, J.A., Pereira, L.V. (2002) "Establishment of new murine embryonic stem cell lines for the generation of mouse models of human genetic diseases". *Braz.J.Med.Biol.Res.* 35, 535-542], na passagem 8-10, foram cultivadas em cima de uma camada de fibroblastos embrionários de camundongo γ -irradiados, mantidos em DMEM (Gibco, USA), suplementado com 15% de FCS (Gibco, USA), 1 mM

piruvato de sódio, 1% aminoácidos não essenciais, 0,1 mM β -mercaptoetanol e 1×10^3 U/ml Fator Inibidor de Leucemia (LIF) murina (ESGRO-LIF, Gibco). Linfoblastóides e fibroblastos primários humanos foram cultivados em DMEM e em RPMI, respectivamente, suplementados com 10% FCS sem antibióticos. As culturas foram mantidas em atmosfera úmida a 37°C, e 5% CO₂.

[0075] O método de "*hanging drop*" foi utilizado, com certas alterações, para induzir a diferenciação das células ES da linhagem USP-1 [Wobus, A.M., Wallukat, G., Hescheler, J. (1991) "Pluripotent mouse embryonic cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers". *Differentiation* 48, 173-182]. Brevemente as suspensões de células ES sem fibroblastos foram obtidas, sendo coletadas com 0,25% tripsina/EDTA (Gibco, USA). Esta suspensão foi diluída até $3,5 \times 10^4$ células/ml e gotejada utilizando a micropipeta (25 μ l uma gota) em cima da tampa de placa de Petri (10 cm). As gotas aderidas na superfície foram viradas de cabeça para baixo em cima da placa já contendo 5 ml de PBS. Após 3 dias na estufa de CO₂, na cultura de "*hanging drop*" em meio de cultura apropriado para ES, sem LIF, formam-se os agregados, chamados corpos embrióides (EBs). Posteriormente, os EBs foram transferidos para outra placa (35 mm) com uma camada de 1% de agarose, e foram mantidos na estufa de CO₂ a 37°C. No 5º dia, os EBs foram transferidos para lâminas de microscopia, em outra placa de Petri, onde foram aderidos e iniciaram a diferenciação em monocamada.

[0076] As técnicas padrões de histoquímica foram utilizadas para a detecção da atividade de fosfatase alcalina nas células não-diferenciadas [Talbot, N.C., Rexrod, C.E., Pursel, V., Powell, A.M. (1993) "Alkaline phosphatase staining of pig and sheep epiblast cells in culture". *Mol. Reprod. Dev.* 36, 139-147].

Exemplo 6

- Conjugação da Crotamina com o Corante Fluorescente Cy3:

[0077] Crotamina (1 mg) foi suspensa em 1 ml de tampão (100 mM carbonato/bicarbonato de sódio pH 9,3) e conjugada ao corante fluorescente Cy3, um derivado de cianina suprido na forma bifuncional de um éster do tipo NHS, no kit "FluoroLink Cy3 dye pack" (Amersham Biosciences). Para verificar se a Cy3-crotamina é biologicamente ativa, uma dose sub-letal, 50 µg do conjugado (correspondente a 2,5 mg of toxina/Kg) foi injetada intraperitonealmente no camundongo. A crotamina ativa conjugada com o Cy3 permite observar uma resposta típica de paralisia das patas traseiras, em menos de 15 minutos após a injeção.

Exemplo 7

- Ensaio de Embriotoxicidade:

[0078] Tendo em vista que a crotamina é uma toxina, testaram-se os efeitos citotóxicos nas células embrionárias tronco (*ES - embryonic stem cells*) de camundongo que são células indiferenciadas, derivadas do botão embrionário de blastócitos, e têm como característica principal a sua pluripotência, capacidade de se diferenciar para os diferentes tipos de tecidos [Evans, M., Kaufman, M. (1981)

Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156; Martin, G.R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 7634-7638].

[0079] Tais células foram escolhidas, tendo em vista a utilidade da aplicação da crotamina na terapia gênica (através de células-tronco) e na transgênese, como carregadora de outras moléculas para dentro das células. Testaram-se quatro concentrações diferentes, durante cinco dias. Constatou-se que em concentrações sub-micromolares, entre 10^{-6} e 10^{-7} M, a crotamina não apresenta efeito citotóxico nas células-tronco embrionárias em cultura. O teste foi como segue.

[0080] Os corpos embrióides (EBs) foram obtidos pelo método de "hanging drop", conforme descrito acima, usando meios de cultura contendo crotamina em várias concentrações (100 μ M a 0,1 μ M), trocando-se o meio a cada 2-3 dias. Para a análise de localização da toxina nos EBs em desenvolvimento, a crotamina foi substituída pela crotamina conjugada a Cy3 (Cy3-crotamina), durante as 24 horas finais de incubação. As mórulas murinas compactas (8-16 células) foram obtidas do oviduto e cultivadas por 24 horas, a 37°C, em 5% CO₂, em micropoços individuais de placas V-bottom (Costar) com 96-micropoços, em meio M16 (fornecedor: Sigma) e Cy3-crotamina (1 - 0,1 μ M). Após 24 horas de cultura, os números de blastocistos desenvolvidos normalmente foram comparados entre os grupos controle e o experimental.

Exemplo 8

- Incorporação de Crotamina:

[0081] Culturas semiconfluentes de células ES pluripotentes e em diferenciação, assim como, outras culturas celulares foram mantidas nas lamínulas colocadas em placas de 24-poços, contendo meio de cultura apropriado. As células foram incubadas por 2-3 minutos a 72 horas, na presença de Cy3-crotamina, em concentrações entre 10 μM e 0,01 μM , ou na presença somente do corante Cy3 diluído em 1 ml de PBS (controle). Nos ensaios *in vitro*, 1 ml de 1 μM de Cy3-crotamina ou do controle corante Cy3 puro (1 ml) em PBS foram injetados intraperitonealmente no camundongo (linhagem CD-1). Após 3 horas, foram isoladas as células da medula óssea, baço e líquido peritoneal. As células do líquido peritoneal foram aderidas na lamina de microscópio por 1 hora, em meio RPMI suplementado com 10% FCS na ausência de antibióticos, a 37°C, na atmosfera úmida e 5% CO₂. Em todos os ensaios, as células foram lavadas duas vezes com as soluções refrigeradas de 0,1 M PBS pH 7,4, fixadas com 3,7% formaldeído em PBS por 15 minutos, e lavadas duas vezes com PBS. As lâminas de microscópio foram montadas na solução PBS/glicerol (1:1). Alternativamente, células não fixadas foram lavadas duas vezes em PBS e observadas no microscópio confocal.

[0082] Para a análise da ligação específica da Cy3-crotamina com a cromatina e centríolos, o mesmo procedimento experimental descrito acima foi usado, sendo que a única diferença consistiu no pré-tratamento das células ES e fibroblastos embrionários murinos com 1 μM de crotamine livre, seguido de tratamento com a crotamina conjugada, Cy3-

crotamina, por mais 15 minutos. Experimento semelhante foi conduzido *in vivo*, injetando em camundongos, tanto a crotamina conjugada como a livre. Como controle foi usado 1 μM de Cy3-crotamina, incubado por 15 minutos. Para a análise por microscopia confocal, as células foram preparadas como descrito acima. Os experimentos com animais foram realizados em condições de acordo com as recomendações internacionais de ética no uso de animais.

Exemplo 9

- Análise Cromossômica:

[0083] Um μM de crotamina conjugada a Cy3 foi adicionada na cultura de células ES-USP1, linfoblastóides e fibroblastos primários humanos por 1, 3, 6 e 24 horas. As células foram coletadas e tratadas de acordo com o protocolo de citogenética rotineiro, sem a adição de colchicina. Imagens digitais foram obtidas com o CCD refrigerado (PCO, VC44) e processados usando o ISIS software (MetaSystem).

[0084] Verificou-se que a crotamina se liga aos cromossomos em metáfase, coradas com DAPI ou 5-BrDU. Aparentemente, a crotamina se liga ao cromossomo na fase S/G2, e na fase G2/M, durante a condensação do cromossomo, quando a marcação fluorescente se torna evidente em todos os cromossomos. Ao final da telófase, a crotamina permanece restrita ao citoplasma. Após 16 a 24 horas da sua remoção do meio de cultura a crotamina não é mais detectada nas células, o que a diferencia do VP22 de herpes simples, que também se liga à cromatina após a internalização e é segregado para as células filhas [Martin, A., O'Hare, P., McLauchlan, J., Elliott, G. (2002) Herpes simplex's vírus tegument protein

VP22 contains overlapping domains for cytoplasmic localization, microtubule interaction, and chromatin binding. *J. Virol.* 76, 4961-4970].

Exemplo 10

- Marcação de Células Proliferativamente Ativas e de Centríolos:

[0085] Corpos embrióides, obtidos de acordo com o protocolo descrito acima, após três dias, foram aderidas em lamínulas. No dia seguinte, as células proliferativamente ativas foram marcadas simultaneamente com 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrDU) e com Cy3-crotamina. A diluição do BrDU e a sua detecção através da utilização do anticorpo monoclonal anti-BrDU (clone BU-1) foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante (Amersham-Pharmacia Biotech). O anticorpo secundário utilizado era conjugado com o composto fluorescente FITC. O BrDU e a Cy3-crotamina foram adicionados simultaneamente ao meio de cultura, e após 3 horas, as células foram lavadas duas vezes com 0,1 M PBS pH 7,4 refrigerada. As células foram então fixadas com 3,7% de formaldeído em PBS por 15 minutos, e lavadas duas vezes com PBS. As lâminas de microscópio foram montadas em solução PBS/glicerol (1:1), e analisadas em microscópio confocal. Para análise da co-localização da crotamina com os centríolos nas células ES, utilizou-se o anticorpo monoclonal anti-tubulina, específica para os microtúbulos citoplasmáticos e mitóticas.

[0086] Verificou-se que aparentemente a Cy3-crotamina funciona como marcador do ciclo do centrosomo. Forte marcação do centrosomo em células do líquido

peritoneal de camundongo em diferentes fases do ciclo celular pode ser observada na figura 9. Para análise da associação da crotamina com os centríolos nas células ES, foram utilizados anticorpo anti-tubulina α para destacar os microtúbulos do fuso mitótico, pólos mitóticos e centríolos (figura 9B). A Cy3-crotamina se co-localiza com os pólos mitóticos, sugerindo a sua associação com o centrosomo (figura 9C). Além disto, a crotamina se liga aos cromossomos ancorados ao fuso mitótico reconhecidos pelo anticorpo anti-tubulina α (figura 9C). O processo de duplicação e separação do centrosomo foram observados nas células do líquido peritoneal tratadas com Cy3-crotamina (figuras 9D-R). Inicialmente, material pericentriolar associado com um par de centríolos em G1 fortemente marcado pela Cy3-crotamina (figuras 9 - D, I, N). Fluorescência observada no núcleo de células na fase S/G2, quando os centríolos começam a se separar, e onde se observa a segregação cromossomal (figuras 9 - E, J, O). Dois centríolos migrando para pólos opostos durante a prófase (figura 9 - F, K, P), confirmando uma clara associação da crotamina com o cromossomo, e intensa fluorescência observada no cromossomo e em centríolos localizados em pólos opostos, durante a metáfase (figura 9 - G, L, Q) e anáfase (figura 9 - H, M, R).

Exemplo 11

- Obtenção de Agregados dna - peptídeo:

[0087] Os agregados de DNA-peptídeo foram preparados seguindo o protocolo elaborado para os peptídeos célula-penetrantes sintéticos [McKenzie, D.L., Kwok, K.Y., Rice, K.G. (2000) A potent new class of reductively activated

peptide gene delivery agents. *J. Biol. Chem.* 275, 9970-9977]: 50 µg do DNA foi adicionado em 500 µl de tampão *Hepes-buffered mannitol* (HBM), (0,27 M mannitol, 5 mM Hepes, pH 7,5) com 5-75 nmol de peptídeo em 500 µl de HBM. Posteriormente, a mistura foi submetida à agitação em vortex (5 min), para produzir os diferentes agregados em razão da carga ($\text{NH}_4^+:\text{PO}_4^-$), calculado entre 0,1 e 2,4.

[0088] A interação entre a crotamina e o DNA foi analisado por ensaio de interferência na migração do DNA em gel de agarose. Um micrograma de DNA e uma concentração crescente de crotamina foi adicionada num volume total de 25 µl, contendo 150 mM de NaCl. Vinte minutos após o preparo da mistura, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (1%) utilizando tampão Tris-borato-EDTA, seguido de visualização usando o corante de ácidos nucleicos brometo de etídio.

[0089] Verificou-se que a crotamina interage com o DNA, e que a formação deste complexo determina uma alteração na mobilidade eletroforética destes compostos em gel de agarose (figura 6) utilizando várias proporções molares entre a crotamina e o DNA dupla-fita, na forma linear e/ou circular. A eletroforese neste sistema permite observar alterações no padrão de migração (retardo na migração) devido à neutralização do ácido nucleico determinado pela presença do peptídeo catiônico e/ou devido à formação de complexos maiores entre a crotamina e o DNA.

Exemplo 12

- Transfecção *in vitro* e *in vivo*:

[0090] As células 3T3 de camundongo ou COS7 foram

plaqueadas ($1,5 \times 10^5$) em poços de placas (dimensão 6 x 35 mm), já com as lamínulas, 1 ou 2 dias antes de transfecção até atingir a confluência de 60% a 80% da placa, em meio DMEM com 10% de soro bovino fetal (FBS) e 200 mM de L-glutamina, sem antibióticos. A transfecção foi realizada em meio DMEM (2% ml/35 mm poço) com 2% FBS e 80 ou 100 μM de cloroquina. Os agregados (2 μg do DNA em 0,2 ml de HBM) foram colocados sobre a cultura em cada um dos poços. Após 5 horas de incubação na estufa a 37°C, em atmosfera úmida e 5% CO₂, o meio foi substituído por outro contendo 10% de FBS. Nos poços de cultura controle, o DNA foi adicionado na mesma concentração, e foram processados da mesma maneira que as amostras experimentais. Após 24 e 48 horas, as células foram lavadas com PBSA, e fixadas com 3,7% de formaldeído. O meio de transfecção foi substituído pelo meio DMEM, contendo 10% de FBS, e a expressão transgênica então foi avaliada de 24 a 48 horas após a transfecção. A eficácia da transfecção determinada pelos agregados DNA-peptídeos foi comparada com o obtido utilizando a lipofectamina, seguindo o protocolo de rotina.

[0091] A transfecção também foi realizada na presença de dimetilamilorida (concentração final 62,5-250 μM) e citocalasina b (concentração final 5-40 μM) como descrito acima, exceto pelo fato de que a droga foi adicionada nas células mantidas em meio sem soro, antes da adição de agregados (10 e 30 minutos antes da transfecção, respectivamente). Para transfecções com metil- β -ciclodextrina (M β CD) ou metil- β -ciclodextrina com colesterol (M β CD-col; concentração final de 5-10 mM), as células foram

incubadas por 1 hora com a droga em meio sem soro antes da transfecção.

[0092] Para a transfecção *in vivo*, o agregado de DNA e peptídeo foi preparado substituindo o tampão HBM pelo PBSA pH 7,5. O mesmo foi então injetado intraperitonealmente em camundongo, e os tecidos foram analisados na presença do transgene após 24 e 48 horas.

[0093] Verificou-se que, *in vitro*, os fibroblastos humanos foram intensivamente marcados após uma hora de incubação com a crotamina (figura 2A), demonstrando forte marcação nas células arredondadas, supostamente em processo de divisão celular (figura 2 B e C) e fraca nas quiescentes. As células-tronco embrionárias pluripotentes murinas apresentaram forte marcação nas ilhas de células, compostas por células arredondadas e justapostas crescidas sobre uma camada de fibroblastos de camundongo irradiados (figura 2 D e E), em contraposição à uma fraca marcação basal ("background") observada para a cultura de células ES controle após tratamento por 3 horas com o corante fluorescente Cy3 (figura 2F). Por outro lado, *in vivo*, 3 horas após injeção intraperitoneal de Cy3-crotamina em camundongos da linhagem CD-1, permitiram observar forte marcação no citoplasma e núcleo de células do líquido peritoneal (figura 2 - G, H, I) e células da medula óssea murina (figura 2 - J, K, L). Em controles, onde apenas o corante fluorescente Cy3 foi injetado, somente uma fraca marcação basal ("background") pode ser observada.

Exemplo 13

- Determinação da Interação entre a Crotamina e o DNA:

A - Análise da Interação peptídeo-DNA por Eletroforese em Gel de Agarose ("Gel Shift Assay")

[0094] A formação do complexo entre o peptídeo e o DNA foi analisada através da mobilidade eletroforética do complexo em gel de agarose (1%, w/v) utilizando várias proporções molares entre o peptídeo e o DNA dupla-fita. Os testes foram realizados através da mistura do DNA plasmidial (2 or 4 µg) com 10 µg da crotamina pura, na presença ou ausência de 150 mM NaCl, que foram aplicados em gel de agarose imerso em tampão Tris borato-EDTA. O DNA foi então visualizado após coloração com brometo de etídeo e utilizando transluminador de luz UV. A documentação do gel após a eletroforese foi realizada utilizando um digitalizador de imagens (modelo FLA3000). A eletroforese neste sistema permite observar alterações no padrão de migração (retardo na migração) devido à neutralização do ácido nucléico determinado pela presença do peptídeo catiônico e/ou devido à formação de complexos maiores entre a crotamina e o DNA (figura 6).

B - Análise da Interação Peptídeo-DNA por Dicroísmo Circular

[0095] Os espectros de dicroísmo circular foram realizados em um espectropolarímetro JASCO 810 com um sistema peltier de controle de temperatura. O aparelho é rotineiramente calibrado com ácido d-10 canforsulfônico recristalizado. Os parâmetros utilizados no equipamento foram: faixa de comprimento de onda 190-260 nm; sensibilidade 100 mdeg; resolução 0,5 nm; resposta 8s; velocidade de leitura 50 nm/min, 8 acumulações; temperatura 37°C. As

amostras foram analisadas em uma cela de caminho óptico de 1 mm em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,4 na ausência ou na presença de 150 mM de NaCl. A concentração de crotamina utilizada foi de 20 μ M e a concentração do plasmídeo foi de 0,1 μ M. Os espectros de CD da crotamina e da amostra de DNA circular (plasmídeo) foram coletados separadamente e misturados em uma relação molar de 200:1 (crotamina:DNA) conforme descrito acima.

[0096] Verificou-se que os espectros obtidos para os compostos misturados tanto na proporção acima descrita como na proporção estequiométrica (1:1) apresentaram diferenças quando comparado ao espectro teórico obtido pela soma dos espectros coletados da crotamina e da amostra de DNA coletados individualmente, indicando claramente a interação da crotamina com o plasmídeo associado a uma alteração conformacional. Essa interação pode ser verificada nos experimentos realizados tanto na ausência como na presença de NaCl 150mM, mas puderam ser melhor visualizados na relação molar de 200:1 (crotamina:DNA) devido à grande diferença no peso molecular destas duas moléculas (figura 7).

Exemplo 14

- Fragmentos Peptídicos Derivados da Crotamina:

[0097] Foram sintetizadas dois peptídeos baseados na sequência da crotamina, ou seja, duas sequências que correspondem a segmentos da crotamina, quais sejam Crot2-18 (KQCHKKGGHCFPKEKIC) - chamado aqui de peptídeo 1 - e Crot27-39 (KMDCRWRWKCKK) - chamado aqui de peptídeo 2. Foram analisadas a capacidade e a eficiência para transfectar as células *in vitro* e *in vivo*. Utilizou-se o mesmo protocolo

elaborado para a crotamina natural, com 42 resíduos de aminoácidos, do exemplo 9, para avaliar se estes peptídeos também apresentam as propriedades descritas para a crotamina, ou seja, capacidade de carregar moléculas para o interior da célula. Os peptídeos foram misturados com o plasmídeo contendo o gene codificante para o GFP ("green fluorescent protein", proteína verde fluorescente). Após a formação do complexo com o DNA, os peptídeos foram colocados nas placas de Petri contendo células da linhagem 3T3, e deixados na estufa de CO₂ por 24 e 48 horas. Em seguida, as células foram fixadas e o resultado da transfecção foi analisado por microscopia confocal. Como controles, as mesmas células foram transfectadas utilizando Lipofectamina, assim como a molécula de crotamina de 42 resíduos de aminoácidos.

[0098] Após o tratamento verificou-se uma marcação verde correspondente à expressão do GFP mais forte quando o peptídeo 1 foi utilizado, em comparação com o peptídeo 2. Em ambos os casos, o melhor resultado foi obtido após 48 horas de tratamento. Aparentemente nas células 3T3 não se observou marcação seletiva de células proliferativamente ativas em comparação com a crotamina original. Tal resultado permite a sua utilização em terapia gênica, principalmente nos casos em que envolvem tecidos com baixo número de células proliferativamente ativas.

[0099] A partir dos conhecimentos aqui divulgados, no texto, nos exemplos ou nas figuras, o homem da técnica saberá prontamente colocar em prática inúmeros aspectos da presente invenção, não necessariamente aqui descritos, mas

cujo conteúdo está englobado pelas reivindicações apresentadas a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de crotamina que consiste em uma das SEQ ID NO: 2, 3 ou 4, **caracterizado pelo** fato de ser na condução *in vitro* de moléculas para a superfície, para o citoplasma ou para o núcleo de células de amostras de tecido e/ou de cultura de células, no qual ditas moléculas são selecionadas entre: - material genético e; -uma ou mais proteínas, ou peptídeos conjugados ou covalentemente ligados a crotamina.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato do dito material genético ser escolhido dentro do grupo que compreende: ácidos nucleicos, particularmente DNA e RNA; análogos de ácidos nucleicos modificados, particularmente DNA plasmidial, RNA, ribozimas, RNAi, DNA chamariz ("decoy"), RNA chamariz ("decoy"), ou DNazimas.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato da condução ser seletiva para células proliferativamente ativas dentre uma população mista de células e a crotamina ser a SEQ ID NO:2.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado pelo** fato das ditas células proliferativamente ativas serem células tumorais ou células-tronco.

5. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato da dita condução ser em suporte a procedimento de diagnóstico.

6. Uso de crotamina que consiste em uma das SEQ ID NO: 2, 3 ou 4 **caracterizado pelo** fato de ser para a preparação de uma composição para terapia gênica e/ou vacina de DNA.

7. Uso, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado**

pelo fato da dita composição ser injetável.

8. Uso de crotamina **caracterizado** pelo fato de que consiste na SEQ ID no 2, na identificação ou marcação *in vitro* de células proliferativamente ativas dentre uma população mista de células em uma amostra de tecido e /ou em uma cultura de células.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pelo** fato das células proliferativamente ativas serem células tumorais ou células-tronco.

10. Uso, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pelo** fato da dita marcação ser em suporte a procedimento de diagnóstico.

11. Uso, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo** fato de ser em aplicação farmacêutica.

12. Uso, de acordo com uma das reivindicações 1 ou 8, **caracterizado pelo** fato de ser em aplicação diagnóstica.

13. Uso, de acordo com uma das reivindicações 1 ou 8, **caracterizado pelo** fato de ser em aplicação biotecnológica.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado pelo** fato de ser como reagente de transfecção de moléculas para dentro das células.

15. Uso, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado pelo** fato de ser para a seleção específica de células-tronco.

16. Composição **caracterizada pelo** fato de compreender crotamina que consiste em uma das SEQ ID 2, 3 ou 4 em uma concentração farmacêuticamente eficaz compreendida entre 100 μM e 0,01 μM , um ácido nucleico heterólogo e veículo farmacêuticamente aceitável.

17. Composição **caracterizada pelo** fato de compreender crotamina que consiste em uma das SEQ ID 2, 3 ou 4 em uma concentração farmacologicamente eficaz compreendida entre 100µM e 0,01µM, na qual a dita crotamina está conjugada ou covalentemente ligada a uma ou mais proteínas ou peptídeos.