(11) Número de Publicação: **PT 2058328 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 14/47 (2011.01) ***A61K 38/17*** (2011.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2005.04.25**

(30) Prioridade(s): **2004.04.28 US 566455 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2009.05.13**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.04.13**
124/2011

(73) Titular(es):
CMS PEPTIDES PATENT HOLDING COMPANY LIMITED
TRIDENT CHAMBERS P.O.BOX 146 ROAD TOWN TORTOLA **VG**

(72) Inventor(es):
WAI MING WONG **CN**
KONG LAM **CN**

(74) Mandatário:
ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **DERIVADOS DO PÉPTIDO BIOLOGICAMENTE ACTIVO VAPEEHPTLLTEAPLNPK**

(57) Resumo:
UM PÉPTIDO SUBSTANCIALMENTE PURO CONSISTE NA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE PLNPK. O PÉPTIDO É ÚTIL COMO COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA. É TAMBÉM PROPORCIONADO UM MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO O PROPORCIONAR O PÉPTIDO E MISTURAR O PÉPTIDO COM UM TRANSPORTADOR FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL. UMA MOLÉCULA COMPREENDENDO UM DERIVADO MELHORADO DESTE PÉPTIDO COMPREENDE UMA MOLÉCULA DE AUMENTO OPERATIVAMENTE LIGADA AO PÉPTIDO, MELHORANDO A REFERIDA MOLÉCULA DE AUMENTO A EFICÁCIA TERAPÊUTICA DO PÉPTIDO.

RESUMO

"DERIVADOS DO PÉPTIDO BIOLOGICAMENTE ACTIVO VAPEEHPTLLTEAPLNPK"

Um péptido substancialmente puro consiste na sequência de aminoácidos de PLNPK. O péptido é útil como composição farmacêutica. É também proporcionado um método para a produção de uma composição farmacêutica compreendendo o proporcionar o péptido e misturar o péptido com um transportador farmaceuticamente aceitável. Uma molécula compreendendo um derivado melhorado deste péptido compreende uma molécula de aumento operativamente ligada ao péptido, melhorando a referida molécula de aumento a eficácia terapêutica do péptido.

DESCRIÇÃO

"DERIVADOS DO PÉPTIDO BIOLOGICAMENTE ACTIVO VAPEEHPTLLTEAPLNPK"

Antecedentes do Invento

Campo do Invento

O presente invento refere-se a péptidos curtos e à utilização destes. Em particular, o presente invento refere-se a péptidos curtos com actividades biológicas.

Descrição da Técnica Relacionada

São conhecidos na técnica péptidos para tratamento de doenças e como composições farmacêuticas. Por exemplo, a Patente U.S. No. 6191113 divulga um péptido que tem actividade inibidora para o crescimento de células do músculo liso e é portanto útil para prevenir e tratar condições patológicas associadas a crescimento de células do músculo liso tais como arteriosclerose, restenose após angioplastia, estenose luminal após enxerto de vasos sanguíneos e sarcoma do músculo liso. U.S. 6184208 divulga outro péptido que se verifica modular processos fisiológicos, tais como actividade de ganho de peso da zona de crescimento epitelial e crescimento de cabelo. Além disso,

a publicação PCT No. WO 03/006492 e o Pedido de Patente U.S. No. 2003/219447 sugeriram que certos péptidos e suas composições farmacêuticas são biologicamente activos e capazes de modular respostas imunitárias.

É, portanto, um objectivo do presente invento proporcionar um péptido ou péptidos curtos que possuam actividade biológica.

Sumário do Invento

Um aspecto do invento refere-se a um péptido substancialmente puro consistindo na sequência de aminoácidos de SEQ ID No. 24.

Outro aspecto do invento refere-se a composições farmacêuticas compreendendo um péptido que consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID No. 24 e um transportador farmaceuticamente aceitável.

Ainda outro aspecto do invento são métodos de produção de uma composição farmacêutica compreendendo o proporcionar um péptido consistindo na sequência de aminoácidos de SEQ ID No. 24 e a mistura do péptido com um transportador farmaceuticamente aceitável.

Ainda outro aspecto do invento é um péptido substancialmente puro consistindo na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO. 24 para utilização na redução dos

efeitos de uma doença humana. Nalgumas concretizações, o referido humano sofre de nefrite e/ou um distúrbio imunológico.

Um aspecto adicional do invento é a utilização de um péptido substancialmente puro consistindo na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO. 24 no fabrico de um medicamento para tratar uma condição seleccionada a partir do grupo que consiste em nefrite e um distúrbio imunológico.

Outro aspecto do invento é um péptido substancialmente puro consistindo na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO. 24 para utilização em modulação do sistema imunitário.

Ainda outro aspecto do invento é a utilização de um péptido substancialmente puro consistindo na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO. 24 no fabrico de um medicamento para modulação do sistema imunitário. Nalgumas concretizações, a modulação do sistema imunitário é transformação de linfócitos T *in vivo*, transformação de linfócitos T através de ConA *in vitro*, supressão da formação de anticorpos e supressão de células NK.

Um aspecto adicional do invento é a utilização de um péptido substancialmente puro que consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID No. 24 como suplemento nutricional.

Breve Descrição dos Desenhos

Cada uma das cinco figuras demonstra reacções químicas exemplificativas para ligar péptidos a moléculas de esteróides.

A Figura 1 mostra uma série de reacções químicas para ligação de um péptido a uma molécula de estrona com uma ligação covalente.

A Figura 2 mostra um segundo conjunto alternativo de reacções para criação da mesma ligação que na Figura 1.

A Figura 3 contém uma série de reacções químicas concebidas para ligar um péptido a uma molécula de estradiol com uma ligação covalente.

A Figura 4 contém uma segunda série de reacções químicas para criar a mesma ligação que na Figura 3.

A Figura 5 demonstra um método de ligação de um péptido através de uma ligação covalente a uma molécula de hidrocortisona.

Descrição Detalhada da Concretização Preferida

I. INTRODUÇÃO

Descobriu-se que o péptido CMS-010 (SEQ ID No. 1), possuindo a sequência VAPEEHPTLLTEAPLNPK, tem actividade biológica imuno-reguladora (Pedido de Patente U.S. No. 2003/219447) e tem potencial para uso humano. O presente invento refere-se a fragmentos e derivados de CMS-010 que

têm actividade biológica, em particular a um fragmento e derivado consistindo na sequência de aminoácidos de SEQ ID No. 24. Utilizações do fragmento e derivado de CMS-010 incluem a regulação de células e tecidos. Os fragmentos e derivados de CMS-010 podem ser incorporados em preparações farmacêuticas e suplementos nutricionais.

Entenda-se que pode ser possível adicionar aminoácidos adicionais aos terminais amino ou carboxilo de um péptido que consiste numa sequência de SEQ ID No. 24, em que o referido péptido não compreende a sequência de CMS-010 e derivados funcionais deste como outro método de praticar o presente invento. Em tais concretizações, um péptido que consiste numa sequência de SEQ ID No. 24, em que o referido péptido não compreende a sequência de CMS-010 e derivados funcionais deste mantêm uma ou mais das propriedades terapêuticas ou funcionais aqui descritas. Por exemplo, nalgumas concretizações, um ou dois aminoácidos podem ser adicionados a um péptido divulgado sem afectar a sua função biológica.

"Péptido substancialmente puro" refere-se a péptidos que são pelo menos 10% p/p puros, de preferência 20%, de maior preferência 40% e de muito maior preferência 60% e muito mais preferível 90% puros. Na concretização mais preferida, a pureza é maior que 99%. O péptido substancialmente puro pode ser para preparar formulações farmacêuticas e nutricionais que podem ser misturas complexas tal como aqui descrito abaixo.

"Modulação" refere-se a um efeito nas células mediado por administração ou exposição a péptidos do invento, em que a administração ou exposição dos péptidos a células causa mudanças nas actividades das células. As mudanças podem ser aumentar ou suprimir a actividade de uma célula. O aumento ou a supressão da actividade de uma célula pode ser o aumento ou a supressão da taxa de divisão e replicação celulares, o aumento ou a supressão da reacção da célula a outros elementos, e/ou o aumento ou a supressão da taxa de produção e/ou secreção de proteínas ou compostos a partir da célula.

"Proliferação celular" refere-se a um aumento no número de células presentes e pode ser devido à transformação ou imortalização de uma célula. Distúrbios de proliferação celular incluem, mas não se limitam a, cancros, crescimentos benignos, tumores e sarcomas e podem englobar qualquer número de células. "Distúrbios imunológicos" refere-se a um mau funcionamento ou função deletéria de uma célula imunitária ou outra parte do sistema imunitário. Tais distúrbios podem ser causados pela supressão de actividade de uma célula ou molécula ou pelo aumento da actividade de uma célula ou molécula.

A utilização de um péptido que consiste numa sequência de SEQ ID No. 24 em formulações farmacêuticas pode ser empregue como possível tratamento para distúrbios ou doença imunológicos. As formulações têm um péptido que

consiste numa sequência de SEQ ID No. 24, misturado com outros constituintes activos ou inactivos, incluindo outros péptidos, *e.g.*, dois a vários (*e.g.*, 3-5) péptidos podem ser adicionados à mesma formulação com ou sem outros ingredientes. Alternativamente, um péptido que consiste numa sequência de SEQ ID No. 24 pode ser utilizado para preparar a formulação juntamente com péptidos não listados aqui. Estes podem ser administrados na forma de formulação intravenosa, intramuscular, intracutânea, subcutânea ou intradérmica. O modo de administração pode também ser injecção intra-arterial que conduz directamente ao órgão do problema. Outros modos de administração são distribuição transdérmica, por inalação como pó ou *spray* e outras formas de distribuição conhecidas de um perito na técnica. A formulação pode também ser tomada oralmente e pode conter transportadores que podem ser utilizados para prevenir a digestão gástrica do péptido após a toma oral ou quaisquer outros transportadores conhecidos na técnica (um transportador para distribuição transdérmica, tal como lipossomas, por exemplo).

Tal como aqui se utiliza, o termo "péptido híbrido" é utilizado para referir péptidos que contêm péptidos adicionais inseridos no péptido biologicamente activo original possuindo a sequência especificada acima ou seus derivados funcionais mas mantêm ainda uma actividade substancialmente semelhante. Os péptidos adicionais incluem péptidos líder que contêm, por exemplo, uma sequência de aminoácidos que é reconhecida por uma ou mais células

procarióticas ou eucarióticas como sinal para secreção da proteína híbrida para o exterior da célula. A secreção pode ser uma secreção directa ou indirectamente através de vesículas secretoras.

A formulação farmacêutica pode incluir qualquer um dos transportadores farmacêuticos conhecidos. Exemplos de transportadores adequados incluem qualquer um dos transportadores farmaceuticamente aceites padrão conhecidos dos peritos na técnica. Estes incluem, mas não estão limitados a, solução salina fisiológica, água, emulsões incluindo misturas de óleo e água ou emulsões de triglicéridos, e outros tipos de agentes, enchimentos, comprimidos revestidos e cápsulas. O transportador apropriado pode ser seleccionado com base no modo de administração da composição farmacêutica.

Um péptido que consiste numa sequência de SEQ ID no. 24, pode ser administrado através de injecção intravenosa, injecção intramuscular, injecção intraperitoneal, injecção subcutânea e implantação subcutânea. O péptido pode também ser administrado sob qualquer forma de administração oral como comprimido, cápsula, suspensão, solução, etc., na forma usual sem modificação ou numa forma de libertação lenta, ou com ou sem protecção gastroentérica. O péptido pode ainda ser aplicado em qualquer forma de aplicação tópica como unguento, creme, gel, etc. com ou sem dispositivo facilitador transdérmico. O péptido pode também ser interpretado na sua sequência genética e clonado

numa sistema de expressão, por si só ou em combinação com outras sequências peptídicas, para gerar uma molécula peptídica resultante para aproveitar a actividade do péptido tal como aqui descrito.

A dose de cada péptido pode ser 1 ng - 10 g por kg de peso corporal. Uma dose preferida é 10 ng - 10 mg por kg, e de maior preferência 1 µg - 1 mg por kg para um modo de administração por injecção. No entanto, a dose eficaz pode ser tão baixa como 1 ng por kg de peso corporal, uma vez que um ou mais dos péptidos podem operar através de receptores que induzirão uma cascata de resposta fisiológica normal. Alternativamente, um ou mais dos péptidos pode ser apenas um iniciador para toda uma cascata de reacção. Para uma toma oral, a quantidade pode ser 1 ng - 10 g por dia por kg de peso corporal, de preferência 0,1 µg - 1 g por dia por kg de peso corporal e ainda de maior preferência 1 µg - 10 mg por dia.

II. TERAPIA GÉNICA E MÉTODO DE TRATAMENTO

Terapia génica baseada na sequência peptídica acima é realizada através do desenho de uma sequência de ácido nucleico que codifica para este péptido. O ácido nucleico pode ser sintetizado quimicamente e operativamente ligado a um promotor, e clonado num vector de expressão. O vector de expressão é então administrado no corpo humano como forma de terapia génica para expressão na célula humana. O termo "vectores genéticos" tal como aqui se

utiliza inclui estes vectores de expressão. Vectores que podem ser utilizados para terapia génica incluem vírus adeno-associados (Mizuno, M. *et al.*, (1998) *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 76-80), vectores LNSX (Miller, A.D. *et al.*, (1993) *Methods Enzymol.* 217: 581-599) e lentivírus (Goldman, M.J. *et al.*, (1997) *Hum. Gene Ther.* 8: 2261-2268).

Outros veículos para distribuição peptídica incluem vectores de expressão codificando o péptido desejado que podem ser transferidos para um organismo que os pode replicar no organismo hospedeiro ao qual é desejado administrar o péptido sem efeitos prejudiciais significativos para a saúde do organismo hospedeiro. Por exemplo, os vectores de expressão podem ser transferidos para um organismo que não seja patogénico para o organismo hospedeiro ao qual é desejado administrar o péptido. O vector de expressão pode produzir o péptido desejado num organismo bacteriano ou fúngico que não possua efeitos prejudiciais significativos para a saúde do organismo hospedeiro ao qual o péptido é para ser administrado. Por exemplo, o vector de expressão codificando o péptido desejado pode ser um vector de expressão que produz o péptido desejado num organismo tal como bactérias de ácido láctico, *E. coli* ou leveduras. O vector de expressão pode produzir o péptido desejado num micróbio que se encontre normalmente no intestino de mamífero ou num micróbio tolerado pelo tracto digestivo de mamífero. Algumas das espécies microbianas em que o péptido desejado pode ser expresso incluem, mas não se limitam a, espécies de *Lactobacillus*, tais como *L. acidophilus*, *L.*

amylovorus, *L. casei*, *L. crispalus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* ou outras; espécies de *Bifidobacterium*, tais como *B. adolescentis*, *B. animalus*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum* ou outras; *Enterococcus faecalis* ou *Ent. facium*; *Sporolactobacillus inulinus*; *Bacillus subtilis* ou *Bacillus cereus*; *Escherichia coli*; *Propionibacterium freudenreichii*; ou *Saccharomyces cerevisiae* ou *Saccharomyces boulardii*.

As sequências de ácido nucleico que codificam o péptido do presente invento, sintetizadas quimicamente ou produzidas por outros meios, incluindo mas não se limitando a transcrição inversa de ARNm para produzir moléculas de ADNc, são incorporadas em vectores de expressão para transferência de genes para os organismos desejados através de métodos de engenharia genética familiares aos peritos na técnica. Os vectores de expressão podem ser vectores de ADN ou vectores de ARN. Por exemplo, os vectores de expressão podem ser baseados em plasmídeos ou elementos genéticos virais. Os vectores de expressão podem ser vectores que se replicam extracromossomicamente ou vectores que se integram no cromossoma.

Os vectores de expressão compreendem um promotor operativamente ligado a um ácido nucleico codificando um péptido do presente invento. O promotor pode ser um promotor regulável, tal como um promotor indutível, ou um promotor constitutivo. Nalgumas concretizações, o promotor

pode ser seleccionado para proporcionar um nível desejado de expressão do péptido. Adicionalmente, se desejado, os vectores de expressão podem compreender outras sequências para promover a produção, apresentação e/ou secreção de péptidos. Um ácido nucleico codificando um péptido do presente invento pode ser operativamente ligado a uma sequência de ácido nucleico que dirige a secreção do péptido. Por exemplo, o ácido nucleico codificando o péptido do presente invento pode ser operativamente ligado a um ácido nucleico codificando um péptido sinal.

Os vectores de expressão que são concebidos para codificar os péptidos do presente invento podem ser vectores de expressão que estão adaptados para expressão do péptido do presente invento numa espécie bacteriana que constitui a flora normal do intestino de mamíferos, tais como espécies de *Lactobacillus* e *Bacillus subtilis*. Exemplos de tais vectores de expressão podem ser encontrados nas Patentes US No. 6100388, para Casas, e No. 5728571, para Bellini, respectivamente. Será apreciado que possa ser utilizado qualquer vector de expressão que facilite a expressão de um péptido do presente invento num organismo que não seja prejudicial para a saúde do organismo hospedeiro ao qual o péptido é para ser administrado.

Os vectores de expressão que são concebidos para codificar os péptidos do presente invento podem ser vectores de expressão que estão adaptados para expressão do péptido do presente invento numa espécie de levedura que

seja bem tolerada pelo intestino de mamífero, tal como *Saccharomyces cerevisiae*; ou, de preferência, *Saccharomyces boulardii*, que pode colonizar o intestino humano e é utilizada para tratar certas formas de diarreia. Podem ser utilizados vectores de expressão de levedura que expressem constitutivamente proteínas e péptidos heterólogos, são altamente estáveis e são assim bem transmitidos a células descendentes durante a mitose e meiose e podem compreender uma sequência de codificação para um péptido ou péptidos sinal que dirijam elevados níveis de secreção de proteína recombinante. Um exemplo de um tal vector de levedura é dado na Patente US No. 6391585, para Jang *et al*.

Os vectores de expressão codificando o péptido do presente invento podem ser introduzidos no organismo no qual se pretende expressar os péptidos através de técnicas conhecidas na técnica. Estas técnicas incluem métodos tradicionais de transformação de bactérias, leveduras, ou outro micróbios, através, por exemplo, da utilização de células bacterianas quimicamente competentes, electroporação ou transformação com acetato de lítio (para leveduras), bem como avanços recentes na transformação de espécies bacterianas recalcitrantes a estes procedimentos. Nalgumas concretizações, os vectores de expressão são introduzidos em bactérias de ácido láctico que se saiba serem recalcitrantes a transformação utilizando o método divulgado por Leer *et al.* (WO 95/35389).

As sequências introduzidas podem ser incorporadas

no ADN cromossómico microbiano ou podem permanecer como elementos de ADN extracromossómicos.

Este micróbio geneticamente modificado contendo o vector de expressão pode então ser inoculado no canal alimentar, na vagina, na traqueia, etc. para alcançar uma imunoterapia sustida. Os organismos expressando o péptido do presente invento podem ser ingeridos numa forma inactiva ou, de preferência, na forma viva. No intestino estes microrganismos produzem o referido péptido, libertam-no para o lúmen através de secreção ou através de lise do microrganismo ou apresentam de outro modo o péptido ao hospedeiro, pelo que o que o péptido produz o seu efeito pretendido no organismo hospedeiro. Alternativamente, o péptido é apresentado ao hospedeiro na membrana mucosa das passagens nasais, da vagina ou do intestino delgado.

Outro método de tratamento é a utilização de lipossomas como meio de distribuição do ácido nucleico específico às células do corpo humano. O ácido nucleico (tal como um vector de expressão contendo uma sequência nucleica que codifica um péptido que consiste numa sequência de SEQ ID No. 24) é distribuído num ambiente que encoraja a tomada celular e a incorporação cromossómica tal como descrito em Gao, X. e Huang, L. (1995) *Gene Ther.* 2: 710-722 e US 6207456. Alternativamente, o próprio péptido pode ser encapsulado no lipossoma e distribuído directamente, utilizando um método descrito em US 6245427.

As sequências de ácido nucleico úteis para a terapia génica e o método de tratamento acima mencionados incluem as sequências que codificam para o péptido. Qualquer uma das numerosas sequências de ácido nucleico pode ser utilizada para codificar para o péptido com base no sistema de codões degenerados.

Referências:

1. "Principles of Pre-clinical Research of New Drugs", República Popular da China. 1993, 7: 134-135, Shuyun Xu, Rulian Bian, Xiu Chen. "Methodology of pharmacological experiment". People's Health Publishing House. 1991, 1221-1234.

2. "Principle of new drug research in pre-clinic" publicado pelo Ministério da Saúde, República Popular da China. 1993, 7:140.

3. Jinsheng He, Ruizhu Li, Tingyi Zong. "The study on MTT reduction method of testing NK cell activity". *China Immunology Journal.* 1996, 1(6): 356-358.

4. Qian Wang. "Modern medical experiment method". People's Health Publishing House. 1998, 482-483.

5. "Principle of new drug research in pre-clinic" publicado pelo Ministério da Saúde, República Popular da China. 1993, 7: 141.

6. "Principle of new drug research in pre-clinic" publicado pelo Ministério da Saúde, República Popular da China. 1993, 7: 132-133.

7. "Principle of new drug research in pre-clinic" publicado pelo Ministério da Saúde, República Popular

da China. 1993, 7: 128-129.

8. Yuanpei Zhang, Huaide Su. "Pharmalogical experiment" (segunda edição). People's Health Publishing House. 1998, 137-138.

9. Jiatai Li, "Clinical pharmacology" (segunda edição). People's Health Publishing House. 1998, 1338-1339.

III. CONJUGAÇÕES PEPTÍDICAS E FORMULAÇÕES COM O PÉPTIDO QUE CONSISTEM EM SEQ ID NO. 24

O péptido biologicamente activo do presente invento pode ser conjugado com outras moléculas biologicamente eficazes ou úteis para proporcionar um efeito ou utilização adicional ou para aumentar a sua eficácia terapêutica. Muitas potenciais moléculas de conjugação, seus efeitos biológicos e os métodos para conjugação das moléculas com péptidos são conhecidos na técnica. Para outros parceiros de conjugação candidatos, as reacções químicas para conjugação dos presentes péptidos a estes podem ser deduzidas por um perito na técnica sem demasiada experimentação. Moléculas eficazes são descritas abaixo. São descritos exemplos específicos de como o péptido de acordo com o presente invento pode ser conjugado com moléculas eficazes e as propriedades biológicas do produto de conjugação resultante.

O fragmento peptídico que consiste numa sequência de SEQ ID No. 24 pode ter efeitos terapêuticos distintos em

determinados tipos de células ou tecidos. Um objectivo importante da conjugação de moléculas a fármacos peptídicos é o direccionamento do péptido para uma determinada localização ou compartimento no corpo de um indivíduo a tratar.

Deste modo, o fármaco peptídico e seus efeitos podem ser concentrados no local do tipo de célula ou tecido no qual tem o efeito terapêutico pretendido. Isto pode aumentar o efeito que uma quantidade molar semelhante do péptido livre, não conjugado teria. Por outro lado, a dosagem de um fármaco peptídico conjugado que é direccionado para o seu local activo terapêutico pode ser significativamente menor do que a dose necessária para obter o mesmo efeito terapêutico a partir da forma livre, não conjugada do fármaco.

Outro efeito benéfico do direccionamento de um fármaco peptídico para o local onde a sua actividade é mais desejada é a redução de efeitos secundários indesejados. Um fármaco peptídico que é administrado para efectuar uma alteração num determinado tipo de célula ou tecido pode também actuar noutros locais num indivíduo, por vezes com resultados prejudiciais. Direccionando o péptido para o local de actividade desejado através de conjugação com uma molécula de direccionamento, a concentração do péptido noutros locais no indivíduo e os subsequentes efeitos secundários podem ser reduzidos.

O péptido que consiste numa sequência de SEQ ID No. 24, pode ser conjugado com uma variedade de moléculas para direccionamento para diferentes localizações ao longo do corpo de um indivíduo. Qualquer uma das tecnologias de conjugação descritas abaixo para direccionar um péptido para uma localização desejada, bem como outras tecnologias de conjugação familiares aos peritos na técnica, podem ser empregues com o péptido do presente invento. Por exemplo, foi demonstrada a distribuição selectiva de um fármaco anti-hepatite B a células hepáticas (Fiume *et al.*, *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 29(3): 275, 1997). Neste estudo, os investigadores conjugaram adenina-arabinósido-monofosfato (ara-AMP), um análogo de um nucleósido fosforilado activo contra o vírus da hepatite B, com albumina lactosaminada humana, uma macromolécula terminando em galactosilo. Os hepatócitos expressam uma proteína receptora que interage com os resíduos galactosilo terminais com elevada afinidade. Através da ligação a este receptor, o fármaco conjugado será selectivamente tomado pelos hepatócitos. Após absorção, o fármaco conjugado é distribuído a lisossomas, onde a ligação entre os dois componentes do fármaco conjugado é clivada libertando ara-AMP na sua forma activa. No estudo citado acima, o fármaco conjugado foi tão eficaz como ara-AMP livre no tratamento de pacientes com infecções de hepatite B crónica, mas não causou os efeitos secundários clínicos, tais como neurotoxicidade, que a administração de ara-AMP livre causa. Uma tal abordagem pode ser utilizada com o péptido do presente invento.

Num estudo relacionado com o de cima, pela mesma equipa de investigação (Di Stefano *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, 61(4): 459, 2001), um agente quimioterapêutico anti-cancro, 5-fluoro 2-desoxiuridina (FUdR), foi conjugado com poli-L-lisina lactosaminada para direccionar o composto para o fígado e tratar micrometástases hepáticas. O fármaco é selectivamente tomado pelas células hepáticas, que clivam a ligação entre FUdR e a molécula direccionadora. Uma porção da FUdR livre sairá então das células hepáticas e é criada uma concentração terapêutica localizada do agente anti-cancro. Esta concentração é suficiente para actividade farmacológica nas células metastáticas que se infiltraram no fígado. Como o fármaco se concentra selectivamente no fígado, a dosagem do fármaco conjugado pode ser significativamente menor que a menor dosagem farmacologicamente activa do composto livre, não conjugado. Esta estratégia pode ser utilizada com qualquer um dos péptidos do presente invento. Por exemplo, a conjugação da poli-L-lisina lactosaminada com um péptido que consista numa sequência de SEQ ID No. 24 pode reduzir significativamente a dosagem necessária para tratar ou prevenir um distúrbio de células proliferativas envolvendo tecidos hepáticos.

O direccionamento de compostos para determinados tipos de tecidos ou células dentro do corpo foi alcançado para vários tipos diferentes de tecidos ou células. Por exemplo, as células tumorais expressam frequentemente níveis anormalmente elevados de receptores de hormonas peptídicas à sua superfície, tais como bombesina, hormona

libertadora da hormona luteinizante e somatostatina. Num estudo, o composto anti-cancro paclitaxel (taxol) foi selectivamente direccionado para células tumorais secretoras de hormona que expressam receptores de somatostatina a uma elevada densidade conjugando o fármaco com octreótido, um análogo da somatostatina. O taxol conjugado com octreótido foi tão eficaz como o taxol livre mas com toxidade reduzida para as células normais (Huang *et al.*, *Chem. Biol.*, 7(7): 453, 2000). A utilização das técnicas de Huang *et al.* para conjugar péptidos do presente invento com análogos de agonistas de receptores de hormonas peptídicas criaria um tratamento direccionado especificamente para células que expressam elevados níveis desse receptor de hormona peptídica particular. Esta abordagem pode ser adaptada para direccionar para células sobre-expressando qualquer um de vários receptores de hormonas peptídicas. Noutro exemplo de direccionamento de um fármaco para um tipo de tecido específico, foi utilizado poli(ácido L-aspártico) como molécula transportadora para direccionar a distribuição do fármaco especificamente para células do cólon (Leopold *et al.*, *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, 23(4): 397, 1995).

Para além do direccionamento específico de um fármaco peptídico para um determinado tipo de célula ou tecido, a conjugação de um péptido consistindo na sequência de SEQ ID no. 24 com moléculas transportadoras pode proporcionar outros modos de melhorar a distribuição de fármacos peptídicos, aumentando deste modo ou melhorando de

outro modo os seus efeitos terapêuticos. Qualquer uma das tecnologias de conjugação descritas abaixo pode ser utilizada com o péptido do presente invento, tal como com outras tecnologias familiares aos peritos na técnica. A eficácia de qualquer fármaco será prejudicada se o composto não puder ser distribuído ao seu alvo eficientemente. Um fármaco tem de ser transportado, activamente ou de outro modo, para o local da sua actividade sem substancial perda de actividade devido a processamento metabólico ou degradação. Os fármacos peptídicos estão sujeitos à actividade de peptidases e, como moléculas altamente carregadas, podem ser refractários ao transporte através de membranas celulares lipídicas e membranas celulares endoteliais, tais como a barreira hematoencefálica. A conjugação com outras moléculas proporciona um modo de proteger os péptidos da degradação e aumentar a absorção dos fármacos peptídicos para células ou compartimentos anatómicos que normalmente excluiriam os compostos.

Permitindo o acesso de péptidos a locais dentro do corpo dos quais eles seriam normalmente excluídos, as técnicas de conjugação podem abrir novas vias para administração de fármacos. Em Patel *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 8(3): 434, 1997, cuja química é detalhada no Exemplo 5 abaixo, os investigadores conjugaram um fármaco peptídico que se sabe ser um potente analgésico, o heptapéptido deltorfina, com uma molécula orgânica que foi especificamente concebida para permitir que o péptido atravessasse a barreira hematoencefálica. Isto permite que o fármaco

seja administrado intravenosamente em vez de através de injecção intra-cerebroventricular.

A molécula transportadora em Patel *et al.* foi concebida para direccionar especificamente para as células endoteliais que constituem a barreira hematoencefálica além de permitir que o péptido atravesse a barreira. As membranas celulares endoteliais por todo o corpo, incluindo a barreira hematoencefálica, são heterogéneas em relação à especificidade da sequência e concentração de endopeptidases ligadas à membrana que são apresentadas à sua superfície. A concepção da molécula explora esta característica para permitir o direccionamento da molécula transportadora e da sua carga.

A molécula contém três cadeias de ácido gordo cujas extremidades livres estão protegidas com o dipéptido Arg-Pro, que interagirão de preferência com as endopeptidases da barreira hematoencefálica. É então permitido o transporte da molécula do fármaco peptídico carregada através das cadeias de ácido gordo lipófilas. Assim a molécula do triglicérido protegido com dipéptido permite ambos o direccionamento e o transporte através da barreira hematoencefálica.

Os métodos de conjugação podem também aumentar a cinética da actividade de um fármaco peptídico. Qualquer uma das tecnologias descritas abaixo para aumentar a cinética da actividade de um péptido bem como outras

tecnologias de conjugação familiares aos peritos na técnica podem ser empregues com um péptido que consiste numa sequência de SEQ ID No. 24. Patel *et al.* verificaram que a forma conjugada do péptido analgésico era não só capaz de entrar no cérebro a partir da corrente sanguínea, como também tinha acção sustida em comparação com o péptido livre. O fármaco administrado intravenosamente demorava mais tempo a ter um efeito terapêutico, mas o efeito durava mais e diminuía mais lentamente que o efeito do péptido livre injectado intra-cranianamente. Os investigadores verificaram que a molécula peptídica conjugada é notavelmente estável no soro, contudo não tinha efeito quando injectada intra-cerebroventricularmente, indicando que a molécula transportadora é provavelmente degradada e removida durante o seu transporte da corrente sanguínea para o cérebro. Eles suspeitam que o tempo necessário para transportar o conjugado e degradar a molécula transportadora é a causa da cinética alterada. Independentemente da mecânica do atraso, numa situação clínica, a estabilidade intravenosa da molécula peptídica conjugada e o início e actividade prolongados dos efeitos do fármaco significarão que esta pode ser administrada menos frequentemente. Um esquema de dosagem menos frequente e, portanto, mais conveniente aumenta o valor prático do fármaco como opção de tratamento.

Como seria aparente para um perito na técnica, as técnicas e procedimentos de Patel *et al.* são facilmente adaptáveis à distribuição de quaisquer péptidos que caiam

dentro de um intervalo de tamanho limitado, incluindo o péptido do presente invento. Por exemplo, o péptido do presente invento que trata e/ou previne distúrbios de células proliferativas ou imunológicos, pode ser conjugado com a mesma molécula utilizada por Patel *et al.*. No tratamento de um indivíduo com uma infecção que afecte o cérebro, a molécula conjugada permitirá que os péptidos do invento acedam ao cérebro a partir da corrente sanguínea e permite que os péptidos exerçam os seus efeitos em células ou tecidos do cérebro. Modificações para alterar o direccionamento da molécula transportadora serão também aparentes a um tal perito. A característica de direccionamento da molécula transportadora é uma função da identidade dos dois aminoácidos que constituem a máscara de dipéptido na extremidade das cadeias de ácido gordo. O dipéptido Arg-Pro interage de preferência com o conjunto de endopeptidases ligadas à membrana que se encontram à superfície da membrana endotelial da barreira hematoencefálica. Outras células endoteliais e membranas podem potencialmente ser alvo através de outras combinações de dipéptidos.

A conjugação foi também utilizada pelos investigadores para criar fármacos peptídicos que possam ser eficazmente absorvidos através do tracto digestivo ou transdermicamente. Qualquer uma das tecnologias de conjugação para aumentar a absorção descritas abaixo, bem como outras tecnologias de conjugação familiares aos peritos na técnica, podem ser utilizadas para aumentar a absorção de um péptido que consista numa sequência de SEQ ID No. 24.

Kramer *et al.* descrevem um procedimento para a união de fármacos peptídicos com ácidos biliares. A taxa de absorção para a molécula conjugada após distribuição oral do composto é significativamente aumentada em comparação com o péptido sozinho (*J. Biol. Chem.*, 269(14): 10621, 1994). Toth *et al.* (*J. Med. Chem.*, 42(19): 4010, 1999) descrevem a conjugação de um fármaco peptídico com propriedades anti-tumorais com lipoaminoácidos (LAA) ou lipossacáridos (LS), para aumentar a taxa de absorção e aumentar a distribuição do péptido anti-cancro para o seu local activo. No seu estudo, um derivado de somatostatina que mostra fortes propriedades anti-proliferativas, mas tem uma farmacocinética comprometida, é conjugado com LAA ou LS. O fármaco conjugado resultante tem melhores perfis de absorção através da pele e do epitélio intestinal e maior resistência à degradação ao mesmo tempo que continua activo contra células tumorais. Estas técnicas seriam muito úteis em conjunto com qualquer um dos péptidos do presente invento. Aumentando a taxa de absorção da molécula através do epitélio intestinal, mais péptido pode ser distribuído à corrente sanguínea e exercer o seu efeito no indivíduo a tratar.

A conjugação pode também ser utilizada para proporcionar libertação sustida de um fármaco peptídico. Qualquer uma das tecnologias de conjugação para proporcionar libertação sustida, bem como outras tecnologias de conjugação familiares aos peritos na técnica, pode ser utilizada para proporcionar libertação sustida de um péptido que consista numa sequência de SEQ ID No. 24. Tal

como observado no trabalho de Patel *et al.*, a libertação sustida de um fármaco peptídico pode ser alcançada com métodos de conjugação. Outro exemplo é o trabalho de Kim *et al.* (*Biomaterials*, 23: 2311, 2002), onde factor de crescimento epidérmico humano recombinante (rhEGF) foi conjugado a polietilenoglicol (PEG) antes de microencapsulação em microsferas biodegradáveis de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA). A microencapsulação em PLGA foi utilizada por vários grupos para distribuir vários factores de crescimento e proteínas morfogénicas (Meinel *et al.*, *J. Controlled Rel.*, 70: 193, 2001). Através da conjugação com PEG, rhEGF tornou-se resistente à formação de agregados insolúveis em água e à adsorção à interface água-fase orgânica durante a formação de micelas com PLGA em comparação com o rhEGF livre, não conjugado. A farmacocinética da formulação com a hormona conjugada foi melhorada, mostrando uma actividade do fármaco mais duradoura, mais estável e globalmente maior do que com a hormona livre, o que os investigadores especulam ser devido à maior estabilidade física da hormona conjugada com PEG. Uma estratégia semelhante pode ser empregue para criar formulações de libertação sustida de qualquer um dos péptidos do presente invento. Por exemplo, tal como observado no Exemplo 1 abaixo, determinados fragmentos e derivados de VAPEEHPTLLTEAPLNPK (CMS-010) exibem potentes efeitos anti-proliferativos e imuno-moduladores. Conjugando PEG com o péptido e incorporando o fármaco conjugado em microsferas de PLGA, os efeitos anti-proliferativos e imuno-moduladores do péptido do invento podem ser mais duradouros e mais

estáveis, uma vez que a dosagem do fármaco, por estar a ser libertado a partir do seu conjugado com PEG, é mais equilibrada e assegura uma distribuição mais constante do fármaco peptídico para o local de infecção.

A libertação prolongada de um fármaco peptídico pode aumentar significativamente a sua actividade. Qualquer uma das tecnologias de conjugação para proporcionar libertação prolongada de um péptido descrito abaixo, bem como outras tecnologias de conjugação familiares aos peritos na técnica, podem ser utilizadas para proporcionar libertação prolongada de um péptido que consista numa sequência de SEQ ID No. 24. Oldham *et al.* (*Int. J. Oncology*, 16: 125, 2000) compara o agente anti-cancro paclitaxel contra uma nova forma do fármaco, paclitaxel conjugado com poli(ácido L-glutâmico) (PG-TXL). PG-TXL pareceu ter actividade anti-tumoral superior em comparação com o paclitaxel livre, sugerindo que o fármaco tem propriedades farmacocinéticas superiores ou talvez mesmo um modo de acção superior. No entanto, os investigadores verificaram que PG-TXL exerceu os seus efeitos através do mesmo mecanismo de acção que o fármaco livre, induzindo paragem do ciclo celular através da perturbação da polimerização das subunidades de microtúbulos. A evidência mostra que a superior actividade anti-tumoral do fármaco conjugado surge de uma libertação contínua e estável do fármaco livre a partir do conjugado, mantendo a sua concentração terapêutica durante um período mais longo em comparação com a administração do péptido livre. A adição

de uma cauda de poli(ácido L-glutâmico) a um péptido do invento com propriedades de combate a infecção pode também aumentar essas propriedades.

A degradação enzimática dos péptidos pode, nalguns casos, reduzir a eficácia dos péptidos como fármacos. Qualquer uma das tecnologias de conjugação para reduzir a degradação enzimática de um péptido descrita abaixo, bem como outras tecnologias de conjugação familiares aos peritos na técnica, podem ser utilizadas para reduzir a degradação enzimática de um péptido que consista numa sequência de SEQ ID No. 24. Os investigadores desenvolveram numerosas abordagens para proteger os péptidos de proteases segregadas no lúmen no intestino bem como de peptidases ligadas à membrana. As últimas encontram-se à superfície de todos os tecidos de mucosa, cujo atravessamento é frequentemente a via de entrada para fármacos peptídicos. Bernkop-Schurch *et al.* (*J. Drug Target.*, 7: 55, 1999) relatam a criação de formulações de fármacos peptídicos contendo inibidores de pepsina. Um análogo da pepstatina foi unido covalentemente a polímeros mucoadesivos; este novo inibidor de pepsina foi incluído em comprimidos contendo insulina. Após incubação sob condições laboratoriais simulando a digestão, toda a insulina dos comprimidos de controlo estava metabolizada, enquanto quase 50% da insulina dos comprimidos contendo o inibidor estavam protegidos da degradação. Noutro estudo, o mesmo grupo utilizou inibidores de proteases a dosagens que normalmente causam efeitos secundários tóxicos para inibir a degradação de

péptidos biologicamente activos (Bernkop-Schnurch *et al.*, *Adv. Drug Del. Rev.*, 52: 127, 2001). Esta abordagem utiliza quitosano, um aminopolissacárido aparentado com a celulose que é extraído da quitina, um dos principais polissacáridos estruturais verificados em crustáceos e outros organismos. Conjugando os inibidores de proteases com quitosano e incluindo esta molécula conjugada na formulação do fármaco peptídico, foi observada uma inibição significativa das proteases do tracto digestivo, aumentando a biodisponibilidade do péptido, sem os efeitos secundários que seriam esperados com a administração de inibidores de proteases livres. No estudo, uma variedade de inibidores de proteases sozinhos e em combinação foi utilizada para conjugação com o transportador de quitosano. Um conjugado quitosano-EDTA inibiu também as proteases endógenas, através da ligação a co-factores minerais necessários para a actividade de certas proteases. Tal como seria facilmente aparente a um perito na técnica, um grande número de combinações possíveis entre moléculas transportadoras e porções efectoras podia ser criado para proporcionar propriedades benéficas às formulações peptídicas, qualquer uma das quais podia ser facilmente adaptada para utilização com um péptido do presente invento. Criando uma formulação para distribuição oral do péptido utilizando inibidores de proteases ligados a quitosano, a distribuição oral de um péptido do invento podia ser utilizada em vez de injecções intramusculares. Esta abordagem não exclui a utilização de uma versão conjugada mais absorvível de um péptido que consista numa sequência de SEQ ID No. 24 nesta formulação, para criar um

nível ainda maior de biodisponibilidade para este péptido e seus derivados.

Além de ser direccionado para um local por outra molécula, os próprios péptidos podem servir como molécula direccionadora. Qualquer uma das tecnologias de conjugação para usar um péptido para direccionar uma molécula para um local desejado descritas abaixo, bem como outras tecnologias de conjugação familiares aos peritos na técnica, podem ser utilizadas com um péptido que consista numa sequência de SEQ ID No. 24. Por exemplo, os investigadores tomaram o fármaco anti-cancro difluorometilornitina (DFMO) e conjugaram-no com um péptido para fins de direccionamento. DFMO é um agente altamente citotóxico que é eficaz a matar uma variedade de tipos celulares tumorais. No entanto, uma vez que é rapidamente eliminado do corpo, o seu valor terapêutico é limitado. Neste estudo, DFMO foi conjugado com um determinado fragmento da α-melanotropina e um análogo do fragmento contendo duas substituições de aminoácidos que se mostrou ligar-se preferencialmente aos receptores de melanotropina numa linha celular de melanoma humano (Suli-Vargha *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 86: 997, 1997). Para facilitar a libertação de DFMO dos fragmentos peptídicos através de aminopeptidases, o fármaco foi conjugado com as extremidades N-terminais dos péptidos. Os investigadores verificaram que os fármacos conjugados são mais eficazes a matar células de melanoma que o fármaco não conjugado sozinho.

Os efeitos do péptido do presente invento podem ser devidos em parte a uma capacidade de direccionamento inerente no próprio péptido. Por exemplo, tal como o fragmento de α-melanotropina, um determinado péptido do invento pode ligar-se a um certo receptor verificado à superfície de um tipo de célula distinto. Utilizando esse péptido como conjugante, um fármaco pode ser direccionado para o local dessas células dentro do corpo num indivíduo a tratar com o fármaco.

Os péptidos como conjugados podem ter funções para além de direccionamento. Qualquer uma das tecnologias de conjugação para aumentar a eficácia terapêutica de um péptido descrito abaixo, bem como outras tecnologias de conjugação familiares aos peritos na técnica, pode ser utilizada para aumentar a eficácia terapêutica de um péptido que consista numa sequência de SEQ ID No. 24. Fitzpatrick *et al.* melhoraram um agente anti-cancro conjugado através da utilização de um espaçador peptídico entre as duas moléculas (*Anticancer Drug Design*, 10: 1, 1995). O metotrexato tinha sido já conjugado com albumina do soro humano (HSA) para aumentar a sua tomada por, e actividade contra, células tumorais. Uma vez tomado por uma célula, algum do metotrexato é libertado do conjugado através de enzimas no lisossoma e pode então exercer os seus efeitos citotóxicos. Inserindo um péptido ligador de quatro aminoácidos entre o metotrexato e a HSA que é facilmente digerido por enzimas lisossómicas, a quantidade

de metotrexato activo gerada dentro das células a partir da molécula conjugada foi aumentada. O péptido do presente invento pode exercer o seu efeito através da interacção específica com determinadas enzimas. Incorporando um péptido do invento numa molécula conjugada como um segmento ligador entre um fármaco e a sua molécula transportadora, ou em adição a outro segmento, a farmacocinética pode ser alterada. Isto pode criar um pro-fármaco que é mais resistente ou mais susceptível à actividade de proteases, que subsequentemente diminui ou aumenta a taxa de libertação da molécula do fármaco a partir do conjugado. Tal como observado nos exemplos dos agentes de quimioterapia conjugados acima, a alteração dessa taxa de distribuição da molécula do fármaco pode aumentar grandemente a eficácia de um fármaco.

Os efeitos de um fármaco numa determinada célula podem ser alterados dependendo de outros factores tais como o estado de activação de uma célula ou a presença de outros sinais moleculares próximo ou dentro da célula. Nalguns casos, para que um fármaco tenha um efeito é necessário que outra molécula ou sinal esteja presente. Damjancic *et al.* (*Exp. Clin. Endocrin.*, 95: 315, 1990) estudaram os efeitos do péptido natriurético auricular humano (hANP) em pacientes com síntese deficiente de glucocorticóides endógenos. O péptido foi dado a pacientes durante uma retirada de terapia de glucocorticóides ou durante o reinício subsequente da terapia utilizando dexametasona. Os pacientes

responderam a hANP com um aumento na diurese e excreção de sódio apenas quando a hormona peptídica foi dada durante o tratamento concomitante de dexametasona. O tratamento com hANP durante a retirada da terapia de glucocorticóides não teve qualquer efeito. O efeito da administração concorrente de hormonas esteróides pode também ser o de aumentar a actividade de um péptido. Num relatório de Zhu *et al.* (*Acta Pharm. Sinica*, 28: 166, 1993), a actividade do péptido analgésico quiotorfina (KTP) foi significativamente aumentada através de conjugação com hidrocortisona através de um segmento ligador curto, em comparação com a acção do péptido sozinho. Não foi observado qualquer efeito com a administração de apenas hidrocortisona.

Os resultados destes estudos ilustram que a capacidade das hormonas esteróides como moléculas conjugadas ou como ingredientes em formulações pode permitir ou aumentar a actividade de péptidos biologicamente activos. O péptido do presente invento pode também ser modulado ou activado através de conjugação ou co-aplicação de hormonas esteróides. As técnicas de Zhu *et al.* podem ser facilmente adaptadas para conjugação de moléculas esteróides com o péptido do presente invento. As Figuras 1 a 5 proporcionam também reacções de síntese passo-a-passo exemplificativas para ligação de hormonas esteróides ao péptido do presente invento.

Os exemplos apresentados acima proporcionam modos

exemplificativos para aumentar a utilidade e as actividades de qualquer um dos péptidos do invento. Outros desenvolvimentos neste campo ajudarão a superar as barreiras para criar tratamentos clínicos baseados em péptidos eficazes. Tal como será aparente para um perito na técnica, as técnicas, os reagentes e os protocolos desenvolvidos para utilização em bioquímica de péptidos, investigação farmacêutica e testes clínicos são todos facilmente aplicáveis a qualquer um dos péptidos do presente invento.

EXEMPLOS

ANTECEDENTES

Antecipou-se que dentro da sequência de VAPEEHPTLLTEAPLNPK (CMS-010), alguns aminoácidos podem ser mais importantes para a bioactividade que outros. Nalgumas concretizações do invento, através da descoberta da porção/porções activas dentro de VAPEEHPTLLTEAPLNPK (CMS-010), os aminoácidos na sequência que não contribuem para a actividade do péptido podem ser removidos para que a molécula bioactiva possa ser tornada mais curta. Podem também ser feitas recombinações de diferentes porções activas do péptido para obter novas moléculas peptídicas possuindo bioactividades modificadas. O encurtamento da molécula peptídica bioativa pode ter significado biológico e económico. Por ter uma sequência mais curta, as propriedades biológicas do péptido são modificadas e tais

modificações podem ter potenciais vantagens terapêuticas, tal como uma semi-vida biológica, afinidade para o receptor ou um perfil de efeitos secundários modificados. Péptidos mais curtos são também mais baratos de produzir e podem baixar o custo de produção.

Para determinar as porções activas dentro de VAPEEHPTLLTEAPLNPK (CMS-010), efectuámos uma série de experiências de truncagem. CMS-010 foi truncado em cada uma das extremidades das ligações peptídicas da extremidade amino para a extremidade carboxilo. Antecipámos que se uma porção activa fosse truncada, a bioactividade do par de péptidos resultante diminuiria, desapareceria ou seria modificada de algum modo (activação/inactivação da bioactividade). Após localização da porção/porções activas dentro de CMS-010, um novo conjunto de péptidos pode ser construído através de combinações das diferentes porções activas.

Um conjunto de péptidos truncados ou recombinantes foi identificado nas nossas experiências como possuindo bioactividades que têm potencial utilização terapêutica humana ou biológica. Este conjunto de péptidos é dado na Tabela 1 abaixo. As nossas descobertas são relatadas nos exemplos que se seguem à Tabela 1. O péptido CMS-010.26 é o péptido do invento. Os resultados em relação a outros péptidos são apresentados para fins de comparação.

Tabela 1: Péptidos truncados e recombinantes com base na sequência de CMS-010

Péptido	Sequência	SEQ ID No.
CMS-010.02	APEEHPTLLTEAPLNPK	2
CMS-010.03	VAPEEHPTLLTEAPLNP	3
CMS-010.04	PEEHPTLLTEAPLNPK	4
CMS-010.05	VAPEEHPTLLTEAPLN	5
CMS-010.07	VAPEEHPTLLTEAPL	6
CMS-010.08	VAPEEHPTLLTEAP	7
CMS-010.09	EHPTLLTEAPLNPK	8
CMS-010.11	HPTLLTEAPLNPK	9
CMS-010.12	VAPEEHPTLLTE	10
CMS-010.13	PTLLTEAPLNPK	11
CMS-010.14	VAPEEHPTLLT	12
CMS-010.15	TLLTEAPLNPK	13
CMS-010.16	VAPEEHPTLL	14
CMS-010.17	LLTEAPLNPK	15
CMS-010.18	VAPEEHPTL	16
CMS-010.19	LTEAPLNPK	17
CMS-010.20	VAPEEHPT	18
CMS-010.21	TEAPLNPK	19
CMS-010.22	VAPEEHP	20
CMS-010.23	EAPLNPK	21
CMS-010.24	APLNPK	22
CMS-010.25	VAPEEH	23
CMS-010.26	PLNPK	24
CMS-010.27	VAPEE	25

(continuação)

Péptido	Sequência	SEQ ID No.
CMS-010.28	LNPK	26
CMS-010.29	VAPE	27
CMS-010.31	NPK	28
CMS-010.32	VA-	29
CMS-010.103	VALLT	30
CMS-010.105	VANPK	31

EXEMPLO 1

O efeito dos péptidos na transformação de linfócitos T de ratinho induzida por ConA *in vitro*

1.1 Materiais

1.1.1 Péptidos

Todos os aminoácidos envolvidos foram de forma L: CS Bio Co., USA

1.1.2 Controlo e outros regentes

Solução salina: OTSUKA Pharmaceutical Co., Ltd, RP China. Meio de cultura RPMI-1640 e soro fetal bovino (FBS): Gibcol Co., USA. MTT e ConA: Sigma Co., USA

1.2 Animais

Ratinhos BALB/c (H-2d, SPF, 6-8 semanas de idade, peso 18-22 g): Military Medical Academy of Science, RP China.

1.3 Método(1)

Os baços de ratinhos saudáveis foram isolados assepticamente e manualmente dispersos em solução de RPMI-1640 com FBS a 10% utilizando uma agulha de injecção. A suspensão celular dispersa foi ainda filtrada através de um crivo de aço inoxidável de 150 µm de diâmetro de calibre 100. A suspensão de células do baço foi ajustada a uma densidade de 4×10^6/ml e foi aliquotada para placas de cultura de células de 96 poços a 100 µl/poço. Os péptidos foram dissolvidos em RPMI-1640 completo. O desenho dos agrupamentos foi tal como é dado abaixo.

Grupo de péptido: 100 µl de solução de trabalho do péptido + 75 µl de suspensão de células do baço + 25 µl de solução de trabalho de ConA.

Grupo de controlo de ConA: 100 µl de RPMI-1640 + 75 µl de suspensão de células do baço +25 µl de solução de trabalho de ConA.

Grupo de controlo negativo: 125 µl de RPMI-1640 + 75 µl de suspensão de células do baço.

A concentração final de ConA no poço foi de 5 µg/ml. As concentrações finais de péptido no poço foram de 80 µg/ml, 16 µg/ml, 3,24 µg/ml, 0,64 µg/ml e 0,128 µg/ml. Cada grupo de péptido continha três poços paralelos, e oito ou doze poços para os grupos de controlo. As células foram incubadas durante 68 h a 37°C, CO_2 a 5%. O método MTT foi utilizado para obter uma leitura de DO_{570nm} de cada poço com referência a 630 nm num leitor de ELISA.

1.4 Resultados

Tabela 2. O efeito dos péptidos na transformação de linfócitos T de ratinho induzida por ConA *in vitro*

Grupo	Concentração	N	DO
CMS-010.26	80 µg/ml	3	0,353±0,016*
CMS-010.26	16 µg/ml	3	0,356±0,006*
CMS-010.26	3,2 µg/ml	3	0,332±0,015*
CMS-010.26	0,64 µg/ml	3	0,348±0,025*
CMS-010.26	0,128 µg/ml	3	0,354±0,017*
CMS-010.105	80 µg/ml	3	0,407±0,019*
CMS-010.105	0,64 µg/ml	3	0,386±0,008*
Controlo negativo	-	12	0,134±0,011*
Controlo de ConA	5 µg/ml	12	0,467±0,043
*Comparado com o grupo de controlo positivo de ConA, P<0,05			

Tabela 3. O efeito dos péptidos na transformação de linfócitos T de ratinho induzida por ConA *in vitro*

Grupo	Concentração	N	DO
CMS-010.32	80 µg/ml	3	0,276±0,034*
CMS-010.32	16 µg/ml	3	0,273±0,023*
CMS-010.32	3,2 µg/ml	3	0,309±0,030*
CMS-010.32	0,64 µg/ml	3	0,321±0,048
CMS-010.32	0,128 µg/ml	3	0,306±0,033*
Controlo negativo	5 µg/ml	8	0,108±0,012*
Controlo de ConA	-	8	0,358±0,028
*Comparado com o grupo de controlo positivo de ConA, P<0,05			

1.5 Conclusão

Verificou-se que CMS-010.26, CMS-010.32 e CMS-010.105, nas concentrações adequadas, eram capazes de suprimir a transformação de linfócitos T de ratinho induzida por ConA *in vitro*, com significância estatística em comparação o controlo positivo de ConA (P<0,05).

EXEMPLO 2

O efeito dos péptidos na transformação de linfócitos T de ratinho e na actividade de células NK *in vivo*

2.1 Materiais

2.1.1 Péptidos

Todos os aminoácidos envolvidos foram da forma L: CS Bio Co., USA.

2.1.2 Controlos e outros reagentes

Ciclosporina A: Novartis Pharma AG., Suíça. Solução salina: OTSUKA Pharmaceutical Co. Ltd, RP da China. Meio de cultura RPMI-1640 e soro fetal bovino (FBS): GIBCOL, USA. MTT e ConA: Sigma Co., USA.

2.1.3 Animais

Ratinhos BALB/c (H-2d, SPF, 6-8 semanas de idade, peso 18-22g, 50% fêmeas e 50% machos): Military Medical Academy of Science, RP China.

2.2 Método

2.2.1 Agrupamento dos animais e administração

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de péptido (200 µg/kg/dia e 50 µg/kg/dia), grupo de ciclosporina A (10mg/kg/dia), e grupo de solução salina (0,5 ml/dia). Cada grupo continha 10 ratinhos, nos quais metade eram fêmeas e a outra metade eram machos.

Todas as substâncias de teste foram dissolvidas em 0,5 ml de solução salina e administradas intraperitonealmente uma vez por dia durante 20 dias. A transformação de linfócitos T e a actividade de células NK foram examinadas no dia imediatamente após a última injecção.

2.2.2 Transformação de linfócitos T[1-2]

No dia após a última administração da substância de teste, os ratinhos foram sacrificados através de deslocamento cervical. Os baços foram isolados assepticamente e manualmente dispersos em solução de RPMI-1640 e FBS a 10% utilizando uma agulha de injecção. A suspensão de células dispersas foi ainda crivada através de um crivo de aço inoxidável de 150 µm de diâmetro de calibre 100 e ajustadas a 4×10^6/ml. As suspensões celulares foram inoculadas numa placa de cultura de células de 96 poços, 100 µl/poço com o seguinte desenho.

Poços de ensaio: 100 µl de suspensão celular + 100 µl de ConA

Poços de controlo: 100 µl de suspensão celular + 100 µl de RPMI-1640

Foram preparados para cada animal quatro poços de ensaio e quatro de controlo. As placas foram incubadas a 37°C, CO_2 a 5% durante 68 horas. MTT foi então adicionado e as placas lidas a DO_{570nm} com referência a 630 nm com um leitor de ELISA. Índice de estimulação SI (%) = (DO do poço de ensaio/DO do poço de controlo)×100%.

2.2.3 O efeito dos péptidos na actividade de células NK[3-5]

Células alvo YAC-1 foram levadas até à fase logarítmica e ajustadas a uma densidade de 1×10^5/ml. As células de baço de ratinho preparadas na secção 2.2.2 acima foram ajustadas a uma densidade de 4×10^6/ml e utilizadas como células efectoras. As suspensões celulares foram inoculadas em placas de cultura de células de 96 poços como se segue:

Poços de células efectoras: 100 µl de suspensão de células do baço + 100 µl de RPMI-1640

Poços de ensaio: 100 µl de suspensão de células do baço + 100 µl de suspensão de células YAC-1

Poços de células alvo: 100 µl de suspensão de células YAC-1 + 100 µl de RPMI-1640

Foram preparados três poços de ensaio e três poços de células efectoras para cada animal e foram preparados 12 poços de células alvo por placa de cultura de células. As placas foram incubadas a 37°C, CO_2 a 5% durante 4 horas, depois foi adicionado MTT e as placas foram lidas a DO_{570nm} com referência a 630 nm com um leitor de ELISA. A actividade de células NK (%) = 1-[(DO dos poços de ensaio - DO dos poços de células efectoras)/DO dos poços de células alvo]×100%

2.3 Resultados

2.3.1 Experiência de transformação de linfócitos T

Tabela 4. O efeito dos péptidos na transformação de linfócitos T de ratinho(1)

Grupo	Dosagem	N	SI
CMS-010.24	50 µg/kg/dia	10	2,40±0,31**
CMS-010.26	200 µg/kg/dia	7	2,19±0,59**
CMS-010.28	200 µg/kg/dia	9	2,70±0,37**
Solução salina	0,5 ml/dia	8	3,63±0,69

**Comparado com o grupo de solução salina, P<0,01

Tabela 5. O efeito dos péptidos na transformação de linfócitos T de ratinho(2)

Grupo	Dosagem	N	SI
CMS-010.25	200 µg/kg/dia	10	2,43±0,69*
Solução salina	0,5 ml/dia	10	3,15±0,83

*Comparado com o grupo de solução salina, P<0,05

Tabela 6. O efeito dos péptidos na transformação de linfócitos T de ratinho(3)

Grupo	Dosagem	N	SI
CMS-010.04	50 µg/kg/dia	8	1,56±9,25**
Solução salina	0,5 ml/dia	9	2,24±0,52

**Comparado com o grupo de solução salina, P<0,01

Tabela 7. O efeito dos péptidos na transformação de linfócitos T de ratinho[4]

Grupo	Dosagem	N	SI
CMS-010.12	50 µg/kg/d	10	2,12±0,42**
CMS-010.14	50 µg/kg/d	9	2,12±0,51**
Solução salina	0,5 ml/dia	10	2,96±0,61

**Comparado com o grupo de solução salina, P<0,01

2.3.2 Experiência de actividade de células NK

Tabela 8. O efeito dos péptidos na actividade de células NK de ratinho[1]

Grupo	Dosagem	N	Actividade de células NK (%)
CMS-010.24	200 µg/kg/dia	10	69,0±7,4*
CMS-010.24	50 µg/kg/dia	10	56,0±6,0**
CMS-010.26	200 µg/kg/dia	9	67,7±5,3**
CMS-010.26	50 µg/kg/dia	10	68,5±7,2*
CMS-010.28	200 µg/kg/dia	9	70,3±6,7*
Solução salina	0,5 ml/dia	10	76,0±4,3

*Comparado com o grupo de solução salina, P<0,05

**Comparado com o grupo de solução salina, P<0,01

Tabela 9. O efeito dos péptidos na actividade de células NK de ratinho[2]

Grupo	Dosagem	N	Actividade de células NK (%)
CMS-010.11	50 µg/kg/dia	9	63,5±4,7**
CMS-010.13	50 µg/kg/dia	10	70,9±17,5*
CMS-010.14	200 µg/kg/dia	8	43,1±13,7*
CMS-010.14	50 µg/kg/dia	9	75,3±9,0**
Solução salina	0,5 ml/dia	10	55,3± 6,1

*Comparado com o grupo de solução salina, P<0,05

**Comparado com o grupo de solução salina, P<0,01

2.4 Conclusão

Verificou-se que, em dosagens adequadas, CMS-010.04, CMS-010.12, CMS-010.14, CMS-010.24, CMS-010.25, CMS-010.26 e CMS-010.28 suprimem a transformação de linfócitos T de ratinho *in vivo*, com significância estatística em comparação com o controlo de solução salina (P<0,05).

Verificou-se que, em dosagens adequadas, CMS-010.24, CMS-010.26 e CMS-010.28 suprimem a actividade de células NK de ratinho *in vivo*, com significância estatística em comparação com o controlo de solução salina (P<0,05).

Verificou-se que, em dosagens adequadas, CMS-

010.11, CMS-010.13 e CMS-010.14 aumentam a actividade de células NK de ratinho *in vivo*, com significância estatística em comparação com o controlo de solução salina (P<0,05).

EXEMPLO 3

O efeito do péptido na formação de anticorpos de ratinho *in vivo*

3.1 Materiais

3.1.1 Péptido

Todos os aminoácidos envolvidos foram da forma L: CS Bio Co., USA.

3.1.2 Controlos e outros reagentes

Ciclosporina A: Novartis Pharma AG., Suíça. Solução salina: OTSUKA Pharmaceutical Co. Ltd., RP China

3.1.3 Animais

Ratinhos BALB/c (H-2d, SPF, 6-8 semanas de idade, peso 18-22g, 50% fêmeas e 50% machos): Military Medical Academy of Science, RP China.

3.2 Método

3.2.1 Agrupamento dos animais e administração das substâncias de teste

Os ratinhos foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: péptido (200 µg/kg/dia), Ciclosporina A (10 mg/kg/dia), e solução salina (0,5 ml). Cada grupo continha 12 ratinhos, 6 fêmeas e 6 machos. As substâncias de teste foram dissolvidas em 0,5 ml de solução salina e aplicadas intraperitonealmente uma vez por dia durante 20 dias consecutivos.

3.2.2 Criação e quantificação de anticorpos[7]

Glóbulos vermelhos de ovelha (SRBC) foram ressuspensos com solução salina a 2% (v/v) e 0,2 ml da solução de células ressuspensas foram aplicados intraperitonealmente a cada ratinho no 16° dia da administração da substância de teste. No dia após a última administração de substância de teste, foi colhido sangue do canto lacrimal que se deixou à temperatura ambiente durante uma hora para exsudação do soro. Após centrifugação a 200 g durante 10 minutos, o soro foi diluído 200 vezes com solução salina normal.

Para a preparação da solução de trabalho do

complemento, foram adicionados 10 volumes de soro Cavy fresco a um volume de SRBC empacotado na centrífuga. Esta mistura foi suavemente agitada durante 30 minutos a 4°C. As SRBC foram então removidas através de centrifugação a 200 g durante 10 minutos. Foram adicionados dez volumes de solução salina ao sobrenadante para obter a solução de trabalho do complemento.

Para ensaio do título de anticorpo de ratinho, foram adicionados 0,2 ml de suspensão de SRBC a 1% a 1 ml de soro de ratinho diluído gelado de cada ratinho. Foi então adicionado 1 ml de solução de trabalho do complemento e a mistura incubada a 37°C durante 20 minutos. A reacção foi terminada através de arrefecimento de cada amostra em gelo durante 10 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 200 g durante 10 minutos para obter o sobrenadante. A 1 ml deste sobrenadante, foram adicionados 3 ml de solução Drabkin e deixou-se à temperatura ambiente durante 10 minutos, e depois foi medida a DO_{540nm}. A leitura de lise 50 de referência a DO_{540nm} foi determinada seguindo exactamente o mesmo procedimento que a amostra, excepto a substituição de metade dos SRBC por solução salina e sem a remoção por centrifugação dos SRBC não lisados. Índice de soro da amostra (HC50) = DO_{540nm} da amostra/DO_{540nm} da lise 50 × 200

3.3 Resultados

Tabela 10. O efeito do péptido na formação de anticorpos de ratinho

Grupo	Dosagem	N	HC_{50}
CMS-010.26	200 µg/kg/dia	10	141,3±29,3*
Ciclosporina A	10 mg/kg/d	12	148,9±21,7*
Solução salina	0,5 ml/d	11	167,6±21,5
*Comparado com o grupo de solução salina, P<0,05			

3.4 Conclusão

Verificou-se que CMS-010.26 nas dosagens adequadas suprime a formação de anticorpos de ratinho *in vivo*, com significância estatística em comparação com o grupo de controlo de solução salina (P<0,05).

EXEMPLO 4

O efeito dos péptidos na taxa de crescimento de células de sarcoma S180 transplantadas em ratinhos KM *in vivo*

4.1 Materiais

4.1.1 Péptidos

Todos os aminoácidos envolvidos foram da forma L: CS Bio Co., USA.

4.1.2 Controlos e outros reagentes

Solução salina: OTSUKA Pharmaceutical Co. Ltd., RP China. Adriamicina: Zhejiang Haizheng Pharmaceutical Co., Ltd., RP China

4.1.3 Animais

Ratinhos KM fêmeas saudáveis (SPF, 6-8 semanas de idade, peso 18-22g): Military Medical Academy of Science, RP China

4.2 Método

4.2.1 Agrupamento dos animais, administração de substâncias de teste e implantação de células tumorais[8]

Células de sarcoma S_{180} foram transplantadas intraperitonealmente para ratinhos KM durante 6-8 dias e as ascites colhidas assepticamente. A concentração de células foi ajustada a 1×10^7 por ml com RPMI-1640 e FBS a 10%, e foram injectados 0,2 ml de suspensão celular através da axila em cada um dos ratinhos KM para desenvolver o modelo de ratinho possuindo sarcoma. Os ratinhos transplantados com células de sarcoma S_{180} foram distribuídos aleatoriamente por cinco grupos: péptido (dois grupos: 50 µg/kg/dia e 10 µg/kg/dia), Adriamicina (2 mg/kg/dia), Ciclofosfamida (40 mg/kg/dia), e solução salina (0,5 ml/dia). A injecção intraperitoneal das substâncias de teste começou no dia imediatamente após o transplante do tumor e continuou uma vez por dia durante 20 dias consecutivos.

4.2.2 Determinação do desenvolvimento do sarcoma

No dia após a última administração de substâncias de teste, os sarcomas foram removidos dos ratinhos e pesados. Os diâmetros de cada sarcoma nos três planos (A, B, C) foram medidos através de um paquímetro de vernier. O volume do sarcoma foi calculado através da fórmula: V = (1/6)πABC. O índice de inibição do crescimento do tumor foi calculado através da fórmula: Índice de inibição de crescimento do tumor = (peso do tumor do grupo de controlo - peso do tumor do grupo de tratamento)/peso do tumor do grupo de controlo × 100%

4.3 Resultados

Tabela 11. O efeito dos péptidos no desenvolvimento de células de sarcoma S_{180} transplantadas para ratinhos *in vivo*(1)

Grupo	Dosagem	N	Peso do sarcoma
CMS-010.31	50 μg/kg/dia	17	1,20±1,60*
CMS-010.31	10 μg/kg/dia	14	1,05±1,28*
CMS-010.103	50 μg/kg/dia	15	1,48±1,44*
CMS-010.103	10 μg/kg/dia	15	1,72±1,53*
Adriamicina	2 mg/kg/dia	17	1,52±1,75*
Solução salina	0,5 ml/dia	12	5,07±5,46
*Comparado com o grupo de solução salina normal, P<0,05			

Tabela 12. O efeito dos péptidos no desenvolvimento de células de sarcoma S_{180} transplantadas para ratinhos *in vivo*(2)

Grupo	Dosagem	N	Peso do sarcoma	Volume do sarcoma
CMS-010.02	500 µg/kg/dia	10	0,97±0,85*	0,65±0,67*
CMS-010.02	250 µg/kg/dia	10	0,68±0,72*	0,36±0,40*
CMS-010.03	500 µg/kg/dia	10	0,33±0,35*@	0,27±0,33*@
CMS-010.03	250 µg/kg/dia	10	0,68±0,46*	0,31±0,22*
CMS-010.04	500 µg/kg/dia	10	0,62±0,44*	0,40±0,28*
CMS-010.04	250 µg/kg/dia	10	0,27±0,19*@	0,17±0,12*@
CMS-010.05	500 µg/kg/dia	10	0,47±0,29*@	0,34±0,22*
CMS-010.05	250 µg/kg/dia	10	0,56±0,33*	0,23±0,19*@
CMS-010.07	500 µg/kg/dia	10	0,52±0,25*	0,37±0,20*
CMS-010.07	250 µg/kg/dia	10	0,32±0,14*@	0,24±0,13*@
CMS-010.08	500 µg/kg/dia	10	1,05±0,64*	1,01±0,63
CMS-010.08	250 µg/kg/dia	10	0,38±0,27*@	0,20±0,14*@
CMS-010.09	500 µg/kg/dia	10	0,85±0,70*	0,84±0,84
CMS-010.09	250 µg/kg/dia	10	0,45±0,38*@	0,37±0,44*
CMS-010.11	500 µg/kg/dia	10	1,14±0,74*	0,95±0,54
CMS-010.11	250 µg/kg/dia	10	0,64±0,31*	0,63±0,40*
CMS-010.13	500 µg/kg/dia	10	0,73±0,43*	0,38±0,23*
CMS-010.13	250 µg/kg/dia	10	0,92±0,56*	0,91±0,59
CMS-010.14	500 µg/kg/dia	9	0,67±0,70*	0,56±0,53*
CMS-010.14	250 µg/kg/dia	10	0,44±0,30*@	0,29±0,21*
CMS-010.15	500 µg/kg/dia	10	0,68±0,36*	0,63±0,35*
CMS-010.15	250 µg/kg/dia	9	0,45±0,35*@	0,41±0,37

(continuação)

Grupo	Dosagem	N	Peso do sarcoma	Volume do sarcoma
CMS-010.16	500 µg/kg/dia	10	0,99±0,42*	0,92±0,36
CMS-010.16	250 µg/kg/dia	9	0,63±0,47*	0,61±0,44*
CMS-010.17	500 µg/kg/dia	10	0,91±0,46*	0,55±0,34*
CMS-010.17	250 µg/kg/dia	9	0,65±0,41*	0,40±0,24*
CMS-010.18	500 µg/kg/dia	9	0,59±0,48*	0,58±0,42*
CMS-010.18	250 µg/kg/dia	9	0,44±0,31*@	0,27±0,20*@
CMS-010.19	500 µg/kg/dia	9	0,68±0,68*	0,40±0,42*
CMS-010.19	250 µg/kg/dia	10	0,41±0,45*@	0,46±0,58*
CMS-010.20	500 µg/kg/dia	10	0,59±0,46*	0,54±0,51*
CMS-010.20	250 µg/kg/dia	9	1,00±0,76*	0,88±0,77
CMS-010.21	500 µg/kg/dia	10	0,44±0,22*@	0,44±0,21*
CMS-010.21	250 µg/kg/dia	10	0,51±0,29*	0,44±0,22*
CMS-010.22	500 µg/kg/dia	10	0,85±0,73*	0,73±0,87
CMS-010.22	250 µg/kg/dia	10	0,28±0,12*@	0,24±0,08*@
CMS-010.23	250 µg/kg/dia	9	0,27±0,18@	0,21±0,15*@
CMS-010.24	500 µg/kg/dia	10	1,20±0,79*	0,62±0,47*
CMS-010.24	250 µg/kg/dia	10	0,61±0,39*	0,36±0,30*
CMS-010.25	500 µg/kg/dia	10	0,52±0,38*	0,26±0,21*@
CMS-010.25	250 µg/kg/dia	9	0,65±0,53*	0,48±0,37*
CMS-010.27	500 µg/kg/dia	9	1,05±0,86*	0,51±0,33*
CMS-010.27	250 µg/kg/dia	10	0,78±0,68*	0,58±0,58*
CMS-010.29	500 µg/kg/dia	10	0,55±0,41*	0,40±0,11*
CMS-010.29	250 µg/kg/dia	10	1,24±0,72*	1,02±0,66
CMS-010.31	500 µg/kg/Dia	10	0,78±0,89*	0,43±0,50*
CMS-010.31	250 µg/kg/dia	10	0,27±0,19*@	0,25±0,20*@

(continuação)

Grupo	Dosagem	N	Peso do sarcoma	Volume do sarcoma
CMS-010.32	500 µg/kg/dia	10	0,41±0,35*@	0,40±0,31*
CMS-010.32	250 µg/kg/dia	10	0,38±0,24*@	0,25±0,14*@
Ciclofosfamida	40 mg/kg/dia	10	1,07±0,80*@	0,76±0,66*
Solução salina	0,5 ml/dia	10	1,87±0,52	1,20±0,28
*Comparado com o grupo de solução salina normal, P<0,05 @Comparado com o grupo de Ciclofosfamida, P<0,05				

4.4 Conclusão

Verificou-se que CMS-010.103, CMS-010.02, CMS-010.03, CMS-010.04, CMS-010.05, CMS-010.07, CMS-010.08, CMS-010.09, CMS-010.11, CMS-010.13, CMS-010.14, CMS-010.15, CMS-010.16, CMS-010.17, CMS-010.18, CMS-010.19, CMS-010.20, CMS-010.21, CMS-010.22, CMS-010.23, CMS-010.24, CMS-010.25, CMS-010.27, CMS-010.29, CMS-010.31 e CMS-010.32, nas dosagens adequadas, suprimiam o desenvolvimento *in vivo* de células de sarcoma S_{180} transplantadas para ratinhos KM, com significância estatística em comparação com o grupo de controlo de solução salina normal (P<0,05).

EXEMPLO 5

O efeito dos péptidos em nefrite de Masugi em coelhos

5.1 Materiais

5.1.1 Péptidos

Todos os aminoácidos envolvidos foram da forma L: CS Bio Co., USA.

5.1.2 Controlos e outros reagentes

Injecção de fosfato sódico de dexametasona: Tianjin Jinyao Aminophenal Ltd., RP China. Solução salina: OTSUKA Pharmaceutical Co. Ltd., RP China. Vacina de BCG: Beijing Institute of Biological Products, RP China. Lanolina: Tianjin sixth chemical product factory, RP China. Parafina líquida: Tianjin sixth chemical product factory, RP China. Reagente de Diagnóstico para BUN sérico: BECKMAN443350, USA. Reagente de Diagnóstico para Creatinina sérica: BECKMAN 443340, USA.

5.1.3 Animais

Um carneiro (8 meses de idade): Department of Laboratory Animal, Tianjin Medical University, RP China. Coelhos (MDA, macho, 2-2,5 kg): Beijing Fuhao Breed Farm, RP China.

5.2 Métodos[9-10]

5.2.1 Preparação de anti-soro de ovelha anti-córtex renal de coelho

5.2.1.1 Preparação de antigénio de córtex renal de coelho

Um coelho saudável foi anestesiado com 4 ml/kg de uretano a 25% através de injecção intravenosa na veia auricular, e injectado intravenosamente com heparina a 1250 U/kg para heparinização sistémica. O abdómen do coelho foi aberto assepticamente e as artérias e veias renais foram expostas. As artérias renais foram cateterizadas e as veias renais cortadas. Os rins foram lavados com solução salina até o tecido renal se tornar cinzento. Os rins foram então extirpados. O córtex renal foi isolado e homogeneizado em 0,5 volumes de solução salina gelada, e depois armazenado a -20°C.

5.2.1.2 Preparação de anti-soro de ovelha

7,5 ml do homogenato de córtex renal foram misturados com 2,5 ml de adjuvante completo de Freund (Lanolina para parafina líquida numa razão de 1:5, com vacina de BCG a 5 mg/ml). Após completa emulsificação, o antigénio foi injectado numa ovelha em cinco locais dorsais diferentes, 1 ml por local, uma vez a cada duas semanas, durante um total de três ciclos de injecções. Começando com a quarta imunização, foram homogeneizados 5 g de córtex renal com um volume de solução salina que foram injectados intramuscularmente em 5 locais na ovelha, 1 ml por local, uma vez cada duas semanas. O título do anticorpo de ovelha

anti-córtex renal de coelho foi monitorizado através de dupla imunodifusão numa base bissemanal. Quando o título alcançou 1:32, o anti-soro de ovelha foi colhido a partir da artéria carótida. O anti-soro de ovelha foi misturado com um volume igual de glóbulos vermelhos de coelho e colocado a 4°C durante 12 horas para a remoção de anticorpo anti-glóbulos vermelhos de coelho. Depois o anti-soro foi colhido através de centrifugação e colocado a 56°C para inactivar o complemento e proteases. O anti-soro foi armazenado a -20°C.

5.2.2 Agrupamento dos animais, administração de substâncias de teste, e estabelecimento do modelo de nefrite de Masugi

Vinte e dois coelhos saudáveis foram distribuídos aleatoriamente por 5 grupos: péptido (107,3 µg/kg/dia e 58,5 µg/kg/dia, 4 coelhos por grupo), dexametasona (0,1 mg/kg/dia, 4 coelhos), tratamento de solução salina (1 ml/dia, 7 coelhos), e saudáveis normais (3 coelhos). Antes do estabelecimento de um estado de doença nos coelhos, foram tomadas para cada coelho medições do BUN e creatinina séricos e da proteína na urina durante 24 horas. Se não houvesse anomalia nestas medições, o modelo de nefrite de Masugi era estabelecido em coelhos experimentais através de injecção intravenosa de anti-soro de ovelha anti-córtex renal de coelho através da veia auricular, 0,5 ml por injecção, uma injecção a cada 30 minutos, num total de 4

injecções por coelho. O grupo de coelhos saudáveis normais (controlo) foi injectado com solução salina do mesmo modo. A administração intravenosa das substâncias de teste através da veia auricular foi iniciada no dia seguinte à injecção do anti-soro, uma vez por dia, 1 ml por injecção, durante 30 dias consecutivos.

5.2.3 Monitorização do efeito terapêutico

5.2.3.1 Quantificação da proteína na urina

A urina foi colhida a partir de cada coelho ao longo de um período de 24 horas uma vez por semana e o teor proteico determinado através do método de ácido sulfossalicílico.

5.2.3.2 Exame patológico

Para observação dos efeitos dos péptidos na eliminação de anticorpo IgG de ovelha anti-córtex renal de coelho de coelhos com nefrite de Masugi, no dia a seguir à última administração de substâncias de teste, os coelhos foram sacrificados através de sufocação e o rim direito foi extirpado, cortado por congelação e depois corado imunofluorescentemente quanto à presença de IgG de ovelha. A área positiva para fluorescência de cada glomérulo foi contada. Foram examinados trinta glomérulos por coelho e foi calculada a área positiva média por glomérulo.

5.2.3.3 Estatística

A significância estatística foi determinada através do teste t do suporte lógico SPSS.

5.3 Resultados

Tabela 13. Efeito do péptido na proteinúria de coelhos com nefrite de Masugi (mg/dl)

Grupo	Dosagem/ dia	N	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
CMS-010.26	107,3 µg/kg	4	9,84± 4,29	187± 184	114± 145	26± 24*	28± 32*
CMS-010.26	58,5 µg/kg	4	9,53± 4,64	77± 62	150± 123	20± 12*	36± 16*
Dexame-tasona	0,1 mg/kg	4	9,48± 8,46	29± 12	13,6± 6,3*	13,7± 3,1*	25± 19
Tratamento com solução salina	0,5 ml	7	11,72* 3,18	122± 91	160± 138	145± 33	157± 71
Saudáveis normais	-	3	23,43± 8,42	7,7± 2,0*	-	6,9± 4,5*	24± 7*
*Comparado com o grupo de tratamento com solução salina, P<0,05							

Tabela 14. Efeito do péptido na eliminação do anticorpo IgG de ovelha anti-córtex renal de coelho de coelhos com nefrite de Masugi

Grupo	Dosagem/dia	N	Contagem da área positiva/glomérulo
CMS-010.26	107,3 µg/kg	5	5,6±1,2**
CMS-010.26	58,5 µg/kg	4	6,3±1,4**
Dexametasona	0,1 mg/kg	4	7,5±1,0
Tratamento com solução salina	0,5 ml	7	8,7±0,9
Saudáveis normais	-	3	-
**Comparado com o grupo de tratamento com solução salina, P<0,01			

5.4 Conclusão

Verificou-se que CMS-010.26 é capaz de diminuir a gravidade da proteinúria e promover a eliminação do anticorpo de ovelha anti-córtex renal de coelho em coelhos com nefrite de Masugi *in vivo*, com significância estatística em comparação com o grupo de controlo de tratamento com solução salina, P<0,05.

EXEMPLO 6

O efeito dos péptidos em ratos com nefrite de Heymann *in vivo*

6.1 Materiais

6.1.1 Péptido

Todos os aminoácidos utilizados foram da forma L: CS Bio Co., USA.

6.1.2 Controlos e outros reagentes

Injecção de Fosfato Sódico de Dexametasona: Tianjin Jinyao Aminophenal Ltd., RP China. Solução salina: OTSUKA Pharmaceutical Co. Ltd., RP China. Vacina de BCG: Beijing Institute of Biological Products. Lanolina: Tianjin sixth factory of chemical product, RP China. Parafina líquida: Tianjin sixth factory of chemical product, RP China. Reagente de diagnóstico para BUN sérico: BECKMAN 443350, USA. Reagente de diagnóstico para creatinina sérica: BECKMAN 4.43340, USA.

6.1.3 Animais

Ratos Wistar (SPF, 6-8 semanas de idade, peso 150-200 g): Beijing Vital River Laboratory Animais Co., Ltd., RP China.

6.2 Métodos[11-12]

6.2.1 Preparação de homogenato renal de rato

Os abdómenes de ratos Wistar saudáveis foram abertos assepticamente. A veia portal e a veia cava inferior foram expostas. A veia portal foi cateterizada e a veia cava inferior cortada. Os rins foram lavados com solução salina até o tecido renal se tornar cinzento. Os rins foram extirpados e o córtex renal isolado. O córtex renal foi então homogeneizado em gelo e armazenado a -20°C.

6.2.2 Preparação do antigénio de córtex renal de rato

Lanolina foi misturada com parafina líquida numa razão de 1:2 v/v, aquecida a 70°C com agitação e depois autoclavada. Foi adicionada suficiente vacina de BCG à mistura de lanolina/parafina para produzir uma concentração de vacina de 3 mg/ml para formar adjuvante completo de Freund. O homogenato de córtex renal, adjuvante completo de Freund e a solução salina foram misturados numa razão de 1:1:2 com maceração até completamente emulsionados.

6.2.3 Agrupamento dos animais e estabelecimento do modelo

Foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos 20 ratos Wistar saudáveis: péptido (200 µg/kg/dia) e tratamento com solução salina (2 ml/dia). Foram injectados intraperitonealmente 2 ml de antigénio em cada rato, uma vez cada duas semanas, durante um total de 5 ciclos de injecção. A administração da substância de teste através de injecção intraperitoneal foi iniciada no dia após a terceira imunização, uma vez por dia até ao final da experiência.

6.2.4 Monitorização da eficácia

6.2.4.1 Quantificação da proteína na urina

A quantificação da proteína na urina começou na terceira semana do estabelecimento do modelo. Uma amostra de urina foi colhida de cada rato ao longo de um período de 24 horas uma vez cada duas semanas e o teor de proteína na urina quantificado através do método de ácido sulfossalicílico.

6.2.5 Estatística

Os valores da amostra foram comparados através do teste t utilizando o suporte lógico SPSS.

6.3. Resultados

Tabela 15. Efeito da administração de péptido na concentração de proteína na urina em 24 h (mg/dl) de ratos com nefrite de Heymann

Grupo	N	Semana 3	Semana 5	Semana 7	Semana 9
CMS-010.26	10	6,2±2,3	3,1±1,4	3,9±1,6*	3,8±2,2*
Tratamento com solução salina	10	4,1±1,3	3,1±0,8	10,9±2,8	12,6±1,2

*Comparado com o grupo de solução salina, P<0,05

6.4 Conclusão

A dosagens adequadas verificou-se que CMS-010.26 diminui a gravidade da proteinúria em ratos com nefrite de Heymann *in vivo*, com significância estatística em comparação com o grupo de tratamento de solução salina (P<0,05).

Referências para os Exemplos 1-6

1. Shuyun Xu, Rulian Bian, Xiu Chen. "Methodology of pharmacological experiment". People's Health Publishing House. 2002, 1: 1426-1428

2. "Principles of Pre-clinical Research of New Drugs", República Popular da China. 1993, 7: 134-135

3. Shuyun Xu, Rulian Bian, Xiu Chen. "Methodology of pharmacological experiment". People's Health Publishing House. 2002, 1: 1429

4. Jinsheng He, Ruizhu Li, Tingyi Zong. "The study on MTT reduction method of testing NK cell activity". *China Immunology Journal*. 1996, 1(6): 356-358

5. "Principles of Pre-clinical Research of New Drugs", República Popular da China. 1993, 7: 128-129

6. Yuanpei Zhang, Huaide Su. "Pharmacological experiment" (segunda edição). People's Health Publishing House. 1998, 137-138

7. Shuyun Xu, Rulian Bian, Xiu Chen. "Methodology of pharmacological experiment". People's Health Publishing House. 2002, 1: 1429

8. "Principles of Pre-clinical Research of New Drugs", República Popular da China. 1993, 7: 137-139

9. "Principles of Pre-clinical Research of New Drugs", República Popular da China. 1993, 7: 96

10. Shuyun Xu, Rulian Bian, Xiu Chen. "Methodology of pharmacological experiment". People's Health Publishing House. 2002, 1: 1227-1228

11. "Principles of Pre-clinical Research of New Drugs", República Popular da China. 1993, 7: 97

12. Shuyun Xu, Rulian Bian, Xiu Chen. "Methodology of pharmacological experiment". People's Health Publishing House. 2002, 1: 1227

EXEMPLO 7

Distribuição do péptido através de espécies bacterianas de *Lactobacillus* geneticamente modificadas

O seguinte é proporcionado como um método exemplificativo para distribuir o péptido deste invento a um hospedeiro tal como descrito acima. Uma sequência de ADN que codifica um péptido consistindo na sequência de aminoácidos de SEQ ID No: 24 é sintetizada por meios químicos e esta sequência de ADN é inserida num vector de expressão utilizando técnicas padrão de engenharia genética familiares aos peritos na técnica. O vector de expressão seleccionado contém um promotor constitutivo funcional em *Lactobacilli*, um local de clonagem múltipla para a introdução de sequências de ADN numa orientação 5' para 3'

específica bem como um gene marcador seleccionável que confere resistência a um antibiótico (para ajudar em procedimentos de clonagem) e pode compreender outras sequências para ajudar na produção e/ou secreção dos péptidos, tais como sequências de péptido sinal. Um exemplo de um tal vector é proporcionado pela Patente U.S. No. 5592908, para Pavla. Resumidamente, esta patente discute vários promotores conhecidos que funcionam em espécies de *Cracksbacillus*, bem como um método para descobrir novos promotores nas referidas bactérias, qualquer um dos quais pode ser operativamente ligado a um ácido nucleico codificando um péptido do presente invento para expressar o péptido em *Lactobacilli*. Um ácido nucleico codificando um péptido sinal, tal como péptidos compreendendo de 16 a 35 aminoácidos principalmente hidrófobos que são activos em *Lactobacillus lactis* descritos na Patente U.S. No. 5529908, citada acima, é interposto entre o promotor e o ácido nucleico codificando o péptido do presente invento para que o ácido nucleico codificando o péptido sinal esteja enquadrado com o ácido nucleico codificando o péptido do presente invento.

Para além da sequência de codificação do péptido, a sequência de ADN sintetizada pode compreender sequências para auxiliar na ligação e clonagem do referido ADN no vector de expressão. Por exemplo, locais de reconhecimento de enzimas de restrição que correspondam aos verificados no local de clonagem múltipla do vector podem ser incorporados no ADN sintetizado nas extremidades 5' e 3' da sequência,

para que a sequência possa ser clonada na orientação correcta dentro do vector. Tanto o vector como o ADN sintetizado são digeridos com as enzimas de restrição particulares e depois purificados. As reacções de ligação com o vector e o ADN sintetizado são seguidas de transformação numa estirpe adequada de *E. coli*. As bactérias transformadas são plaqueadas em meio contendo o antibiótico ao qual o vector confere resistência. Uma colónia de bactérias transformadas é seleccionada para crescer culturas e procedimentos de preparação de plasmídeos; a presença do ADN sintetizado na orientação correcta é confirmada.

Este vector de expressão é então transformado numa célula hospedeira de uma espécie de *Lactobacillus*, tal como *L. acidophilus*. As células transformadas são seleccionadas em virtude do marcador seleccionável verificado dentro da sequência do vector e a secreção do péptido pode ser verificada através de - realização de um *western blot*, realização de electroforese em gel de péptidos presentes no meio de crescimento ou outras técnicas padrão. Uma colónia transformada de bactérias é escolhida e utilizada para preparar culturas em grande escala das bactérias geneticamente modificadas. Uma cultura das bactérias geneticamente modificadas expressando o péptido desejado é criada e pelo menos uma porção desta é administrada ao canal alimentar, à vagina, à traqueia ou a outra área do organismo hospedeiro na qual as bactérias sejam capazes de se replicar. Se desejado, as culturas bacterianas podem ser

tratadas de uma variedade de modos para produzir um suplemento para consumo entérico pelo hospedeiro. Este tratamento inclui liofilização ou outros métodos de conservação das bactérias, além da combinação das bactérias com agentes transportadores, tais como soluções, solventes, meios de dispersão, agentes de retardamento, emulsões e semelhantes. A utilização destes agentes para preparar suplementos é bem conhecida na técnica. Por exemplo, as bactérias podem ser utilizadas para produzir produtos lácteos em cultura ou outros produtos alimentares para consumo humano, para que o organismo expressando o péptido colonize o intestino do organismo hospedeiro. Vários métodos diferentes para a incorporação de estirpes específicas de bactérias de ácido láctico em produtos alimentares tais como iogurte, kimchi, queijo e manteiga são divulgados na Patente U.S. No. 6036952, para Oh. Após consumo das bactérias através de uma de várias vias, os organismos modificados podem colonizar o intestino e permitir a apresentação e/ou absorção dos péptidos deste invento através da camada mucosa do intestino.

EXEMPLO 8

Distribuição de péptidos através de uma forma geneticamente modificada de *Bacillus subtilis*

O seguinte é proporcionado como outro método exemplificativo para distribuir o péptido deste invento a um hospedeiro tal como descrito acima. Uma sequência de ADN

que codifica um péptido consistindo na sequência de aminoácidos de SEQ ID No: 24 é sintetizada através de meios químicos e esta sequência de ADN é inserida num vector de expressão através de técnicas de engenharia genética, sendo todas as técnicas conhecidas na técnica. O vector de expressão seleccionado compreende um vector vaivém, tal como pTZ18R (Pharmacia, Piscataway, NJ), capaz de ser propagado tanto em *E. coli* como em *B. subtilis* e contendo um gene de resistência a antibióticos para selecção de colónias das bactérias transformadas. Este vector pode conter um promotor constitutivo activo em *B. subtilis*, tal como um promotor derivado do gene Sac B de *B. subtilis* bem como uma sequência nucleotídica codificando um péptido sinal activo em *B. subtilis* que dirija a exportação eficiente das proteínas heterólogas expressas a partir da célula bacteriana. Um exemplo de um tal vector é divulgado na Patente U.S. No. 6268169, para Fahnestock. Resumidamente, tal como detalhado acima, o ADN codificando um péptido deste invento será sintetizado com locais de enzimas de restrição e/ou outras sequências para facilitar a clonagem do ADN através de técnicas familiares aos peritos na técnica. Após transformação em *E. coli*, plaqueamento, selecção e propagação do plasmídeo para criar uma reserva de plasmídeo, o plasmídeo é então transformado em *B. subtilis* e os transformantes são seleccionados em virtude da resistência a um antibiótico no meio de plaqueamento.

A produção do péptido e a secreção a partir da *B.*

subtilis geneticamente modificada são verificadas utilizando técnicas bem conhecidas dos peritos na técnica, tais como radiomarcação de péptidos para detecção autoradiográfica após análise de SDS-PAGE ou *Western blotting*.

Uma cultura de bactérias geneticamente modificadas é criada e pelo menos uma porção desta é administrada ao canal alimentar, à vagina, à traqueia ou a outra área do organismo hospedeiro em que as bactérias sejam capazes de se replicar.

EXEMPLO 9

Distribuição de péptidos através de espécies de levedura *Saccharomyces* geneticamente modificadas

O seguinte é proporcionado como outro método exemplificativo para distribuir o péptido deste invento a um hospedeiro tal como descrito acima. Uma sequência de ADN que codifica um péptido consistindo na sequência de aminoácidos de SEQ ID No: 24 é sintetizada através de meios químicos e esta sequência de ADN é inserida num vector de expressão através de técnicas de engenharia genética, sendo todas as técnicas conhecidas na técnica. O vector de expressão seleccionado compreende um vector de expressão de proteínas em levedura estavelmente mantido, compreendendo um promotor de levedura constitutivo tal como pADH1, locais para replicação do vector tanto em levedura como em *E. coli*, um gene ou genes que conferem prototrofia a um

mutante de levedura auxotrófico para fins de selecção, um local de clonagem múltipla (MCS) e, se desejado, sequências que codificam para um péptido sinal. Vectores tais como este estão comercialmente disponíveis e são bem conhecidos na técnica ou podem ser facilmente construídos utilizando técnicas padrão. Após inserção do ADN sintetizado no vector de levedura, transformação em *E. coli*, plaqueamento da *E. coli* transformada em meios selectivos, selecção de uma colónia de bactérias transformadas e preparação de ADN plasmídico a partir de uma cultura de crescimento de bactérias da referida colónia, o vector é transformado em *Saccharomyces cerevisiae* através de técnicas bem conhecidas tais como transformação com acetato de lítio ou electroporação. A estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* seleccionada para transformação é uma estirpe auxotrófica mutante que requererá um gene no plasmídeo para crescer em placas de meio mínimo. As colónias de levedura transformadas são isoladas através de plaqueamento da levedura em meio de crescimento sem o gene proporcionado no vector. Apenas as leveduras que receberam o vector e o seu gene selectivo e expressam esse produto génico serão capazes de crescer em colónias no meio mínimo. A verificação da secreção peptídica pode ser obtida através de realização de um *Western blot*, realização de electroforese em gel dos péptidos presentes no meio de crescimento ou outras técnicas padrão.

Uma colónia transformada de levedura é escolhida e utilizada para preparar culturas em larga escala. Uma

cultura da levedura geneticamente modificada expressando o péptido desejado é criada e pelo menos uma porção desta é administrada ao canal alimentar, à vagina, à traqueia ou a outra área do organismo hospedeiro em que as bactérias sejam capazes de se replicar. Se desejado, as culturas de levedura podem ser tratadas numa variedade de modos para produzir um suplemento para consumo entérico pelo hospedeiro. Estes tratamentos incluem liofilização ou outros métodos de conservação de leveduras, além da combinação das bactérias com agentes transportadores, tais como soluções, solventes, meios de dispersão, agentes de retardamento, emulsões e semelhantes. A utilização destes agentes para preparar suplementos é bem conhecida na técnica. Noutra concretização, as leveduras transformadas são utilizadas em criação de produtos alimentares, tais como produtos de leite fermentado como iogurte e kefir, através de técnicas conhecidas dos peritos na técnica. Tal como com as culturas bacterianas de ácido láctico vivas nestes produtos alimentares, as leveduras transformadas colonizam o intestino pelo menos transientemente e servem para apresentar os péptidos ao hospedeiro através do lúmen do intestino.

EXEMPLO 10

Direccionamento de um péptido para um determinado local

O seguinte é proporcionado como um método exemplificativo para distribuir selectivamente o péptido deste invento a um determinado compartimento, órgão, tipo celular

ou local dentro do corpo. Neste caso, um distúrbio de células proliferativas é tratado através do direccionamento de um péptido consistindo na sequência de aminoácidos de SEQ ID No: 24 para tecidos no rim de um indivíduo. Por exemplo, o péptido é ligado através de ligações covalentes por meio de reacções químicas conhecidas na técnica a uma lisozima de baixo peso molecular (LMW), uma porção proteica comercialmente disponível que se concentra especificamente no tecido renal. As técnicas para alcançar conjugação de moléculas com uma lisozima LMW estão documentadas (Folgert *et al.*, *Br. J. Pharmcology*, 136: 1107, 2002). As técnicas gerais para conjugar proteínas ou péptidos uns aos outros são também ensinadas na literatura do campo (Fischer *et al.*, *Bioconj. Chem.*, 12: 825, 2001). A amostra de péptido conjugado recentemente criado é então purificada de reagentes químicos utilizados no processo de ligação através de métodos de cromatografia tais como FPLC de permuta catiónica e/ou centrifugação em gradiente. Uma vez purificado, o péptido conjugado é administrado a um indivíduo necessitado de terapia para distúrbio nefrítico de células proliferativas. Para esta actividade anti-proliferativa, os péptidos do invento são de preferência direccionados para tecido renal em virtude da ligação entre eles e a lisozima LMW, que é selectivamente concentrada no tecido renal em virtude da afinidade da lisozima LMW para as células dos túbulos proximais do rim. Esta distribuição preferencial permite um maior efeito anti-proliferativo em comparação com o de uma quantidade molar equivalente dos péptidos por si próprios. Inversamente, pode reduzir a quantidade de

fármaco peptídico necessária para alcançar um certo nível de actividade anti-proliferativa.

EXEMPLO 11

Aumento da distribuição de um péptido ao seu local activo

O seguinte é apresentado como um método exemplificativo para aumentar a distribuição de um péptido neuroactivo ao cérebro. O péptido do presente invento que exerce os seus efeitos em receptores expressos por neurónios do cérebro é sintetizado através de métodos químicos conhecidos dos peritos na técnica. Alternativamente, pode ser expresso por um microrganismo modificado e recuperado a partir de uma cultura de tais organismos, tal como detalhado nos exemplos acima. Uma vez obtido numa forma purificada, o péptido é utilizado numa série de reacções químicas orgânicas para criar uma porção éster de triglicérido conjugada, ligado ao péptido. A porção conjugada consiste num centro de carbono quaternário substituído unido ao péptido do invento através de uma ligação amida com o carbono do carboxilo terminal do péptido. Os outros três grupos ligados ao centro de carbono quaternário consistem em ligações éster de carbono a 16 cadeias de ácidos gordos de carbono. As cadeias de ácido gordo terminam elas próprias num grupo terminal dipeptídico, conhecido como máscara peptídica, que torna as cadeias mais hidrófilas e as direcciona especificamente para a membrana de células endoteliais da barreira hematoencefálica. O

procedimento para esta síntese é explicado detalhadamente em Patel *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 8(3): 434, 1997, e utiliza reagentes comuns e equipamento familiar aos peritos na técnica.

Uma vez introduzido num indivíduo num local periférico, o composto viaja ao longo do corpo através do sistema circulatório, interagindo com a membrana endotelial da barreira hematoencefálica. A degradação passo-a-passo da máscara dipeptídica e das cadeias lipídicas durante o transporte da molécula através da camada epitelial da barreira hematoencefálica resulta na libertação do péptido do invento para o compartimento cerebral. Aí o péptido pode interagir com receptores à superfície dos neurónios para exercer o seu efeito na função cerebral. O tempo necessário para que o fármaco alcance a barreira hematoencefálica e seja transportado para o cérebro, com a concomitante degradação da porção transportadora, altera a cinética da actividade do fármaco, criando um efeito mais estável e mais duradouro em comparação com a injecção intracerebroventricular do péptido livre.

EXEMPLO 12

Criação de formulações peptídicas que são resistentes a degradação enzimática

O seguinte é proporcionado como um método exemplificativo para a criação de uma formulação de um

péptido biologicamente activo para administração oral que é resistente à actividade de proteases e peptidases verificadas ao longo da superfície do tracto digestivo. Neste exemplo, um péptido consistindo na sequência de aminoácidos de SEQ ID No: 24 é utilizado na produção de uma formulação farmacêutica para administração oral a um paciente. Tal como descrito em Larionova *et al.* (*Int. J. Pharma.*, 189: 171, 1999), o péptido é utilizado na criação de micropartículas com amido solúvel e um inibidor de proteases, aprotinina, que é um forte inibidor de uma variedade de proteases segregadas para o lúmen e ligadas à membrana com microvilosidases. Resumidamente, o amido solúvel, a aprotinina inibidora de proteases e o péptido do invento são dissolvidos num tampão aquoso. As razões de amido solúvel, aprotinina e péptido são determinadas através de métodos experimentais familiares a um perito na técnica; por exemplo, Larionova *et al.* utilizaram ensaios de digestão simulada *in vitro* para determinar as razões e as condições de preparação mais eficazes para a proteína utilizada no seu estudo. A solução aquosa é emulsionada sob agitação mecânica em ciclo-hexano (razão 1:3, v/v) contendo Span-80 a 5%, um tensioactivo não iónico. Uma solução de cloreto de tereftaloilo em clorofórmio é adicionada à emulsão e a agitação é continuada 30 minutos, durante os quais as moléculas de amido são ligadas de forma cruzada com a aprotinina e o péptido. As micropartículas criadas nesse processo são lavadas sequencialmente com ciclo-hexano, uma solução de etanol a 95% com detergente Tween 85 a 2% v/v, etanol a 95% e água. As micropartículas são

ressuspensas em água e liofilizadas. O composto liofilizado pode ser colocado em cápsulas de gelatina para distribuição oral ao indivíduo a necessitar de tratamento.

Uma vez ingerido, o composto é libertado à medida que a cápsula de gelatina é dissolvida. As micropartículas são degradadas no intestino delgado através da acção da α-amilase nas moléculas de amido, conduzindo à libertação gradual de aprotinina e do péptido do invento. A libertação concorrente do potente inibidor de proteases aprotinina ao mesmo tempo e no local do péptido diminui a degradação enzimática do péptido e aumenta a proporção de péptido intacto disponível para absorção através da membrana do intestino.

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

<110> CMS Peptides Patent Holding Company Limited

<120> Derivados Biologicamente Activos do Péptido VAPEEHPTLLTEAPLNPK

<130> P88671EP01

<140> Pedido divisionário de EP 05743126.4
<141> 25 Abril 2005

<150> US 60/566,455
<151> 28 Abril 2004

<150> PCT/EP05/04419
<151> 25 Abril 2005

<160> 31

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1
<211> 18
<212> PRT
<213> *Sus scrofa*

<400> 1

Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn
1 5 10 15

Pro Lys

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 2

Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn Pro
1 5 10 15

Lys

<210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 3

Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn
1 5 10 15

Pro

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 4

Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn Pro Lys
1 5 10 15

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 5

Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn
1 5 10 15

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 6

Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu
1 5 10 15

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

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 7

Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro
1 5 10

<210> 8
<211> 14
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 8

Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn Pro Lys
1 5 10

<210> 9
<211> 13

<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 9

His Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn Pro Lys
1 5 10

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 10

Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Glu
1 5 10

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 11

Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn Pro Lys
1 5 10

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 12

Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr
1 5 10

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 13

Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn Pro Lys
1 5 10

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 14

Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu
1 5 10

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 15

Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn Pro Lys
1 5 10

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 16

Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 17

Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn Pro Lys
1 5

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 18

Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr
1 5

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 19

Thr Glu Ala Pro Leu Asn Pro Lys
1 5

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

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 20

Val Ala Pro Glu Glu His Pro
1 5

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 21

Glu Ala Pro Leu Asn Pro Lys
1 5

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 22

Ala Pro Leu Asn Pro Lys
1 5

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

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 23

Val Ala Pro Glu Glu His
1 5

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 24

Pro Leu Asn Pro Lys
1 5

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 25

Val Ala Pro Glu Glu
1 5

<210> 26
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 26

Leu Asn Pro Lys
1

<210> 27
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 27

Val Ala Pro Glu
1

<210> 28
<211> 3
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 28

Asn Pro Lys
1

<210> 29
<211> 2
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 29

Val Ala
1

<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 30

Val Ala Leu Leu Thr
1 5

<210> 31
<211> 5
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência peptídica sintética

<400> 31

Val Ala Asn Pro Lys
1 5

Lisboa, 17 de Junho de 2011

REIVINDICAÇÕES

1. Péptido substancialmente puro consistindo na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO. 24.

2. Composição farmacêutica compreendendo um péptido substancialmente puro e um transportador farmaceuticamente aceitável, em que o referido péptido consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO. 24.

3. Método de produção de uma composição farmacêutica compreendendo o proporcionar de um péptido consistindo na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO. 24, e a mistura do referido péptido com um transportador farmaceuticamente aceitável.

4. Péptido substancialmente puro consistindo na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO. 24 para utilização em redução dos efeitos de uma doença humana.

5. Péptido substancialmente puro de acordo com a reivindicação 4 para utilização em redução dos efeitos de uma doença humana em que a referida doença humana é uma condição seleccionada a partir do grupo consistindo em nefrite e um distúrbio imunológico.

6. Utilização de um péptido substancialmente puro consistindo na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO.

24 no fabrico de um medicamento para tratamento de uma condição seleccionada a partir do grupo consistindo em nefrite e um distúrbio imunológico.

7. Péptido substancialmente puro consistindo na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO. 24 para utilização em modulação do sistema imunitário.

8. Utilização de um péptido substancialmente puro consistindo na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO. 24 no fabrico de um medicamento para modulação do sistema imunitário.

9. Péptido substancialmente puro de acordo com a reivindicação 7 para utilização em modulação do sistema imunitário ou utilização de acordo com a reivindicação 8, em que a referida modulação do sistema imunitário é uma modulação seleccionada a partir do grupo consistindo em transformação de linfócitos T *in vivo*, transformação de linfócitos T através de ConA *in vitro*, supressão de formação de anticorpos e supressão de células NK.

10. Utilização de um péptido substancialmente puro como suplemento nutricional, em que o referido péptido consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO. 24.

Lisboa, 17 de Junho de 2011

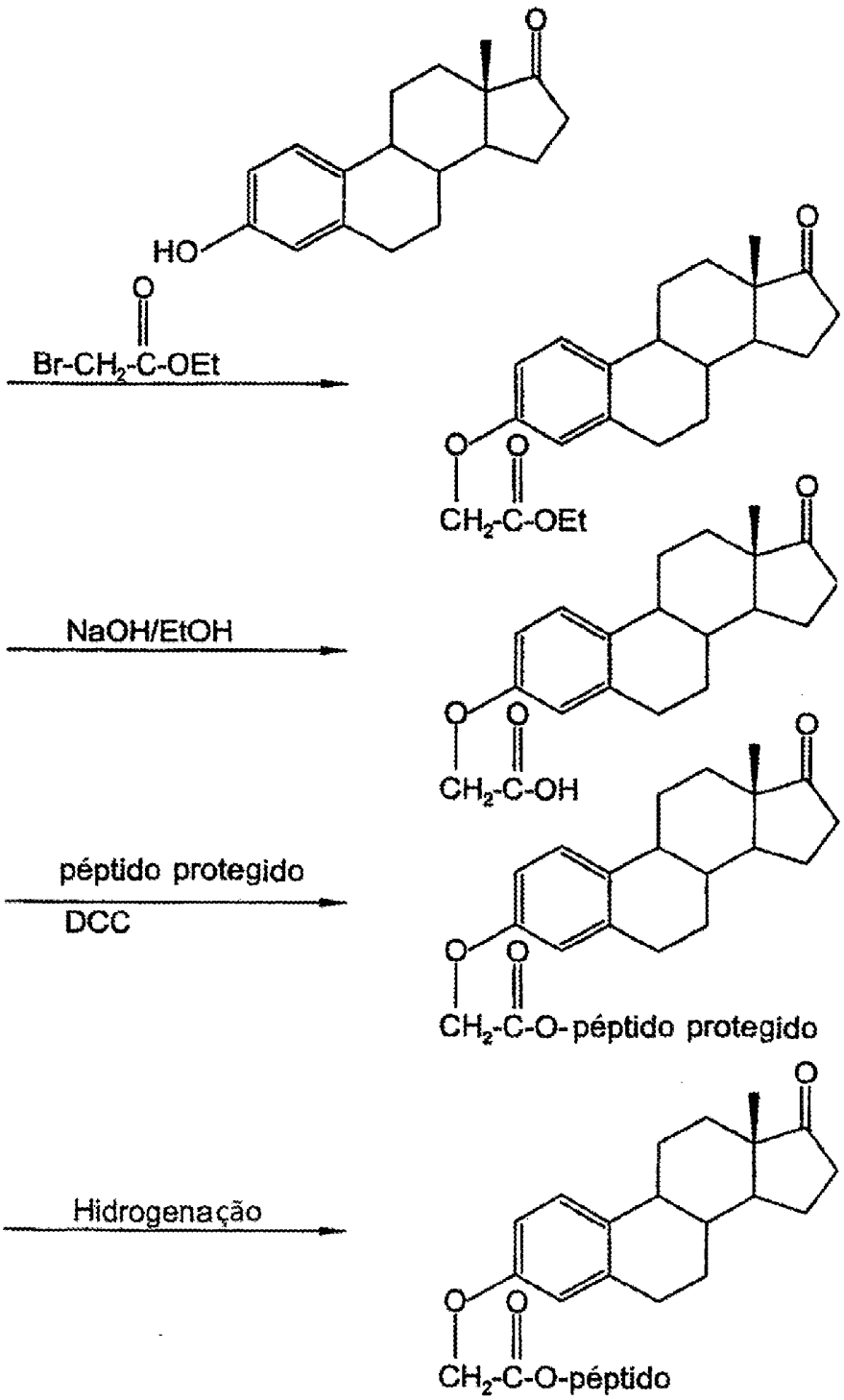

HO
Br-CH2-C-OEt
CH2-C-OEt
NaOH/EtOH
CH2-C-OH
péptido protegido
DCC
CH2-C-O-péptido protegido
Hidrogenação
CH2-C-O-péptido

FIG. 1

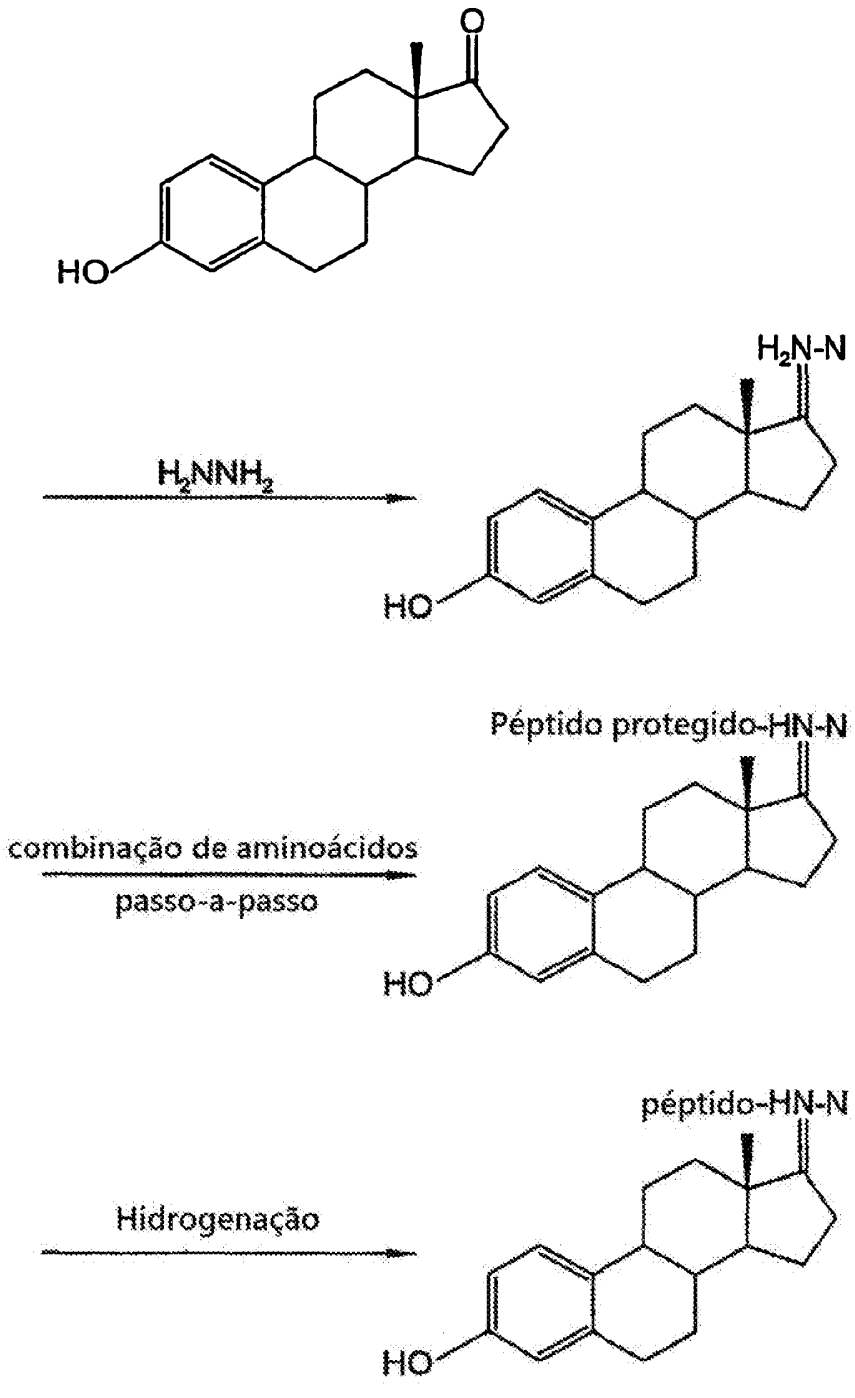

O
HO
H2N-N
H2NNH2
HO
Péptido protegido-HN-N
combinação de aminoácidos
passo-a-passo
HO
péptido-HN-N
Hidrogenação
HO

FIG. 2

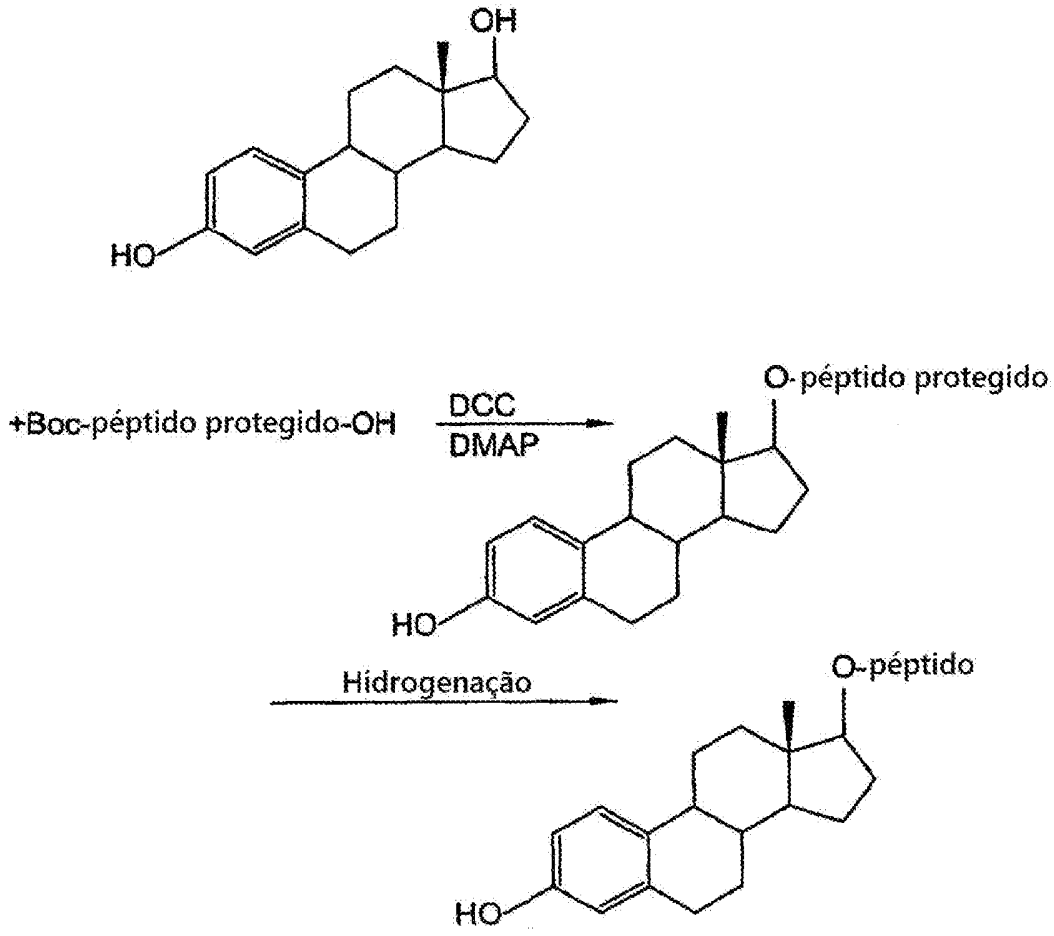

OH
HO
+Boc-péptido protegido-OH
DCC
DMAP
O-péptido protegido
HO
Hidrogenação
O-péptido
HO

FIG. 3

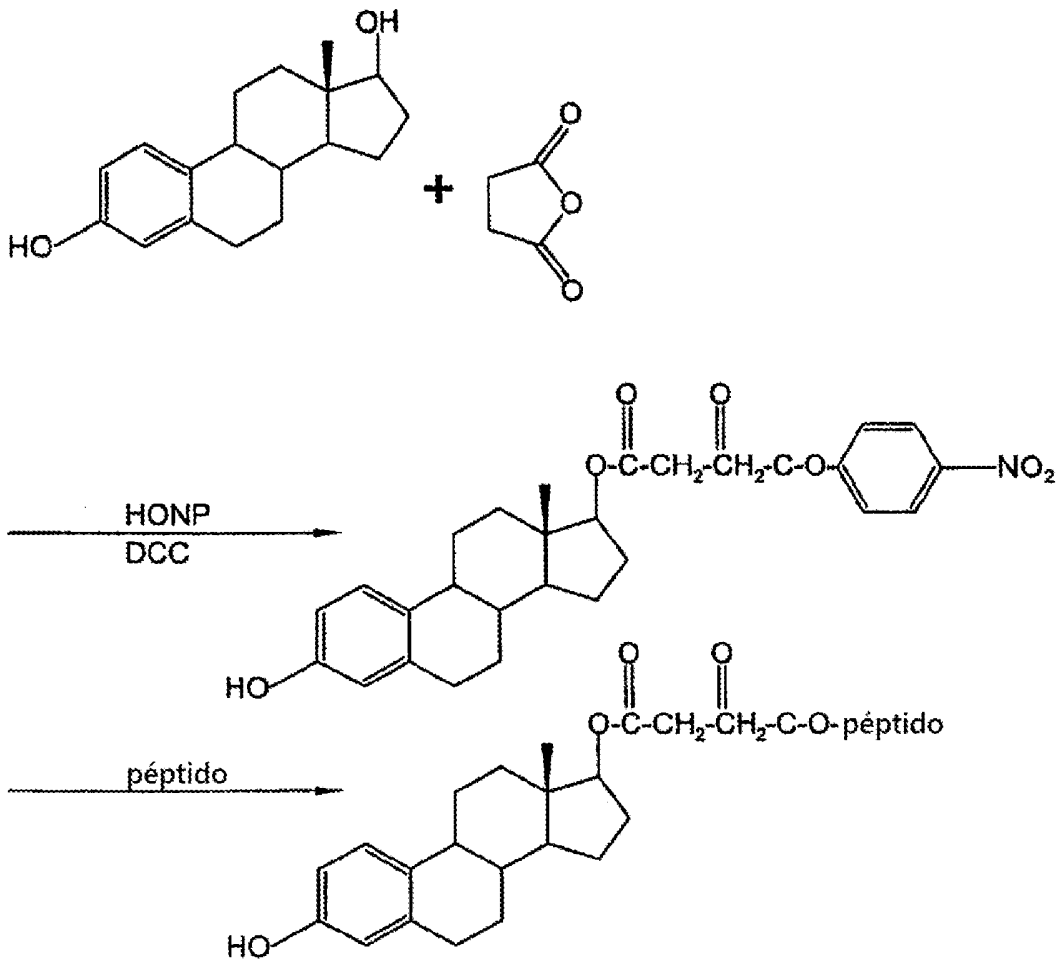

OH
HO
O
O
O
HONP
DCC
O-C-CH2-CH2-C-O
NO2
HO
O-C-CH2-CH2-C-O-péptido
péptido
HO

FIG. 4

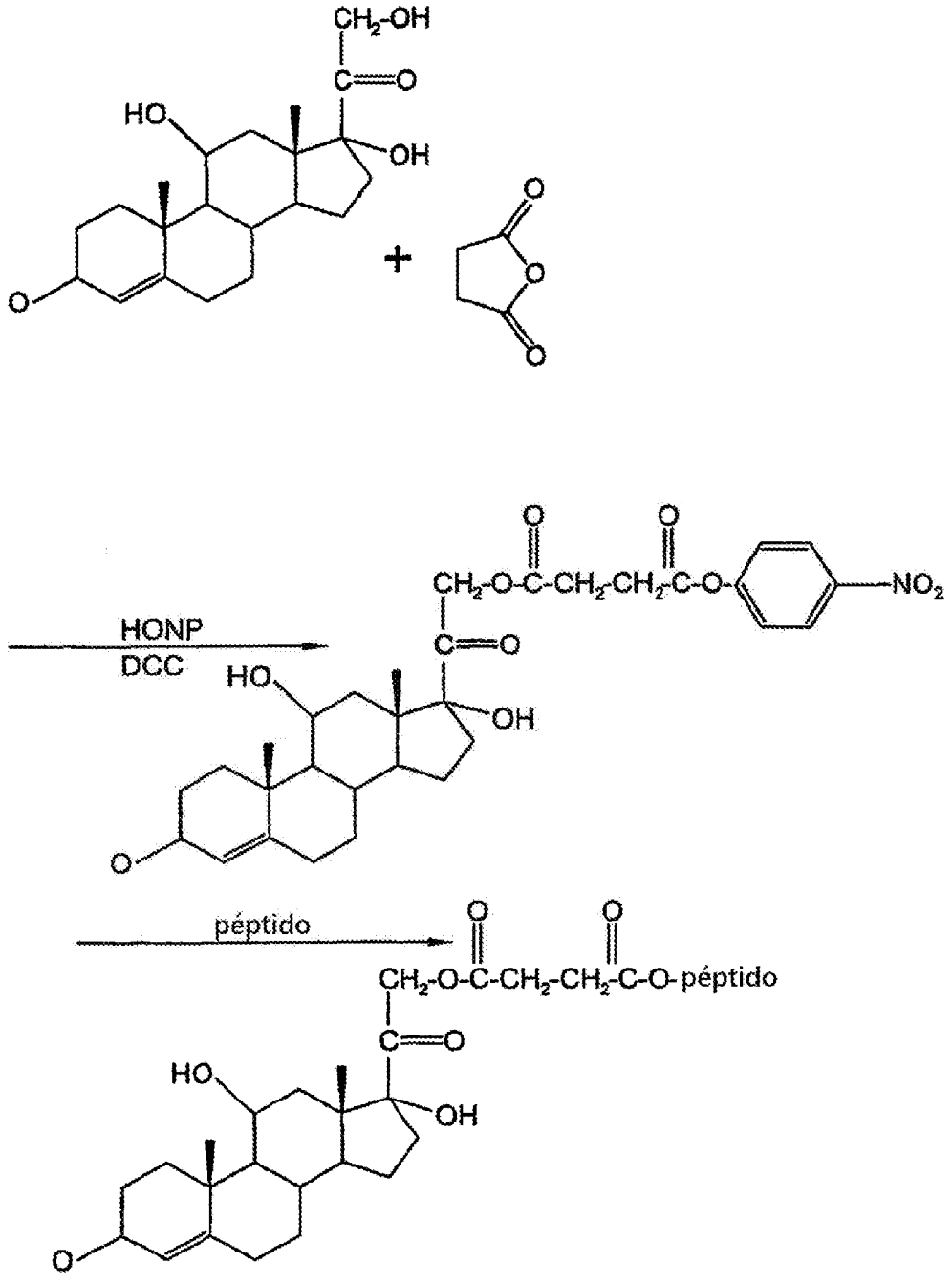

CH2-OH
C=O
HO
OH
O
+
O
O
O
HONP
DCC
CH2-O-C-CH2-CH2-C-O-
NO2
C=O
HO
OH
O
péptido
CH2-O-C-CH2-CH2-C-O-péptido
C=O
HO
OH
O

FIG. 5

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- US 6191113 B
- US 6184208 B
- WO 03006482 A
- US 2003219447 A
- US 6100388 A, Casas
- US 5726571 A, Bellini
- US 6391585 B, Jang
- WO 9535389 A, Leer
- US 6207456 B
- US 6245427 B
- US 5592908 A, Pavia
- US 5529908 A
- US 6038952 A, Oh
- US 6268189 B, Fahmestock
- EP 05743126 A
- US 60566455 B
- EP 0504419 W

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- **Mizuno, M. et al.** *Jpn J Cancer Res*, 1998, vol. 89, 76-80
- **Miller, A.D. et al.** *Methods Enzymol*, 1993, vol. 217, 581-599
- **Goldman, M.J. et al.** *Hum Gene Ther*, 1997, vol. 8, 2261-2268
- **Gao, X. ; Huang, L.** *Gene Ther*, 1995, vol. 2, 710-722
- **Shuyun Xu ; Rulian Bian ; Xiu Chen.** *Principles of Pre-clinical Research of New Drugs*, 1993, vol. 7, 134-135
- Methodology of pharmacological experiment. People's Health Publishing House, 1991, 1221-1234
- *Principle of new drug research in pre-clinic*, 1993, vol. 7, 140
- **Jinsheng He ; Ruizhu Li ; Tingyi Zong.** The study on MTT reduction method of testing NK cell activity. *China Immunology Journal*, 1998, vol. 1 (6), 356-358
- **Qian Wang.** Modern medical experiment method. People's Health Publishing House, 1998, 482-483
- Principle of new drug research in pre-clinic. Ministry of Health, People's Republic of China, 1993, vol. 7, 141
- Principle of new drug research in pre-clinic. Ministry of Health, People's Republic of China, 1993, vol. 7, 132-133
- *Principle of new drug research in pre-clinic*, 1993, vol. 7, 128-129
- **Yuanpei Zhang ; Hualde Su.** Pharmalogical experiment. People's Health Publishing House, 1998, 137-138
- **Jiatai Li.** clinical pharmacology. People's Health Publishing House, 1998, 1338-1339
- **Fiume et al.** *Ital J Gastroenterol Hepatol*, 1997, vol. 29 (3), 275
- **Di Stefano et al.** *Biochem. Pharmacol.*, 2001, vol. 61 (4), 459
- **Huang et al.** *Chem. Biol.*, 2000, vol. 7 (7), 453
- **Leopold et al.** *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, 1995, vol. 23 (4), 397
- **Patel et al.** *Bioconjugate Chem.*, 1997, vol. 8 (3), 434
- *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269 (14), 10621
- **Toth et al.** *J. Med.Chem.*, 1999, vol. 42 (19), 4010
- **Kim et al.** *Biomaterials*, 2002, vol. 23, 2311
- **Meinel et al.** *J. Controlled Rel.*, 2001, vol. 70, 193
- **Oldham et al.** *Int. J. Oncology*, 2000, vol. 16, 125
- **Bernkop-Schurch et al.** *J. Drug Target*, 1999, vol. 7, 55
- **Bernkop-Schnurch et al.** *Adv. Drug Del. Rev.*, 2001, vol. 52, 127
- **Suli-Vargha et al.** *J. Pharm. Sci.*, 1997, vol. 86, 997
- **Fitzpatrick et al.** have improved upon a conjugated anticancer agent by using a peptide spacer between the two molecules. *Anticancer Drug Design*, 1995, vol. 10, 1
- **Damjancic et al.** *Exp. Clin. Endocrin.*, 1990, vol. 95, 315
- **Zhu et al.** *Acta Pharm. Sinica*, 1983, vol. 28, 166
- **Shuyun Xu ; Rulian Bian ; Xiu Chen.** Methodology of pharmacological experiment. People's Health Publishing House, 2002, vol. 1, 1426-1428

- Principles of Pre-clinical Research of New Drugs. People's Republic of China, 1993, vol. 7, 134-135
- **Shuyun Xu ; Rulian Bian ; Xiu Chen.** Methodology of pharmacological experiment. People's Health Publishing House, 2002, vol. 1, 1429
- Principles of Pre-clinical Research of New Drugs. People's Republic of China, 1993, vol. 7, 128-129
- **Yuanpei Zhang ; Huaide Su.** Pharmacological experiment. People's Health Publishing House, 1998, 137-138
- *Principles of Pre-clinical Research of New Drugs*, 1993, vol. 7, 137-139
- Principles of Pre-clinical Research of New Drugs. People's Republic of China, 1993, vol. 7, 98
- **Shuyun Xu ; Rulian Bian ; Xiu Chen.** Methodology of pharmacological experiment. People's Health Publishing House, 2002, vol. 1, 1227-1228
- Principles of Pre-clinical Research of New Drugs. People's Republic of China, 1993, vol. 7, 97
- **Shuyun Xu ; Rulian Bian ; Xiu Chen.** Methodology of pharmacological experiment. People's Health Publishing House, 2002, vol. 1, 1227
- **Folgert et al.** *Br. J. Pharmacology*, 2002, vol. 136, 1107
- **Fischer et al.** *Bioconj. Chem.*, 2001, vol. 12, 825
- **Larionova et al.** *Int. J. Pharms.*, 1998, vol. 169, 171