



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112015010375-8 B1

(22) Data do Depósito: 07/11/2013

(45) Data de Concessão: 28/03/2023

(54) Título: MOLÉCULA OU COMPOSTO, CONJUGADO DE BAM, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DE UMA MOLÉCULA OU COMPOSTO

(51) Int.Cl.: C07K 7/06; C07K 7/08; A61K 47/00.

(30) Prioridade Unionista: 08/11/2012 EP 12191840.3; 08/11/2012 US 61/723,872; 12/02/2013 EP 13154867.9; 12/02/2013 US 61/763,570.

(73) Titular(es): PHI PHARMA SA.

(72) Inventor(es): CHRISTOPHE BONNY; FABRICE CHENAUX.

(86) Pedido PCT: PCT EP2013073279 de 07/11/2013

(87) Publicação PCT: WO 2014/072411 de 15/05/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 07/05/2015

(57) Resumo: MOLÉCULA OU COMPOSTO, CONJUGADO DE BAM, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DE UMA MOLÉCULA OU COMPOSTO. A presente invenção refere-se às moléculas, peptídeos, e polipeptídeos isolados das sequências ou estruturas de consenso e específicas, e aos compostos compreendendo ou consistindo em tais moléculas, peptídeos e polipeptídeos, que podem atuar como moléculas transportadoras que especificamente reconhecem proteoglicanos, em particular, sulfato de condroitina-4 (C4S). As moléculas, peptídeos, polipeptídeos isolados e os compostos da invenção podem ser conjugados ou de outro modo ligados a uma porção biologicamente ativa (BAM). Assim os conjugados de BAM permitem o alvejamento específico e a liberação da BAM, que pode ser, por exemplo, um peptídeo, entidade química ou ácido nucleico, dentro do citoplasma e/ou núcleos de células que expressam C4S in vitro e in vivo.

“MOLÉCULA OU COMPOSTO, CONJUGADO DE BAM, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DE UMA MOLÉCULA OU COMPOSTO”

1. Campo da invenção

[001] A presente invenção refere-se a moléculas isoladas, peptídeos, e polipeptídeos de sequências ou estruturas de consenso específicas, e aos compostos compreendendo ou consistindo em tais moléculas, peptídeos e polipeptídeos, que podem atuar como moléculas transportadoras que especificamente reconhecem proteoglicanos, em particular, sulfato de condroitina-4 (C4S). As moléculas, peptídeos, polipeptídeos e compostos da invenção isolados podem ser conjugados ou de outro modo ligados a uma porção biologicamente ativa (BAM). Assim os conjugados de BAM permitem o alvejamento específico e a liberação da BAM, que pode ser, por exemplo, um peptídeo, entidade química ou ácido nucleico, dentro do citoplasma e/ou núcleos de células que expressam C4S *in vitro* e *in vivo*.

2. Fundamentos da invenção

[002] As membranas celulares são no geral impermeáveis para as macromoléculas, incluindo proteínas e ácidos nucleicos. Além disso, mesmo moléculas menores podem entrar nas células vivas apenas em taxas muito baixas e na presença de concentrações extracelulares altas, potencialmente tóxicas. A falta de meios para alvejar e liberar especificamente um composto de interesse dentro de células ou tecidos específicos tem sido um obstáculo para o uso terapêutico, profilático e de diagnóstico ou experimental de um número potencialmente grande de moléculas biologicamente ativas tendo sítios intracelulares de ação.

[003] Durante a década passada vários meios para a liberação intracelular de compostos foram investigados em uma tentativa para facilitar a transferência eficiente de uma substância de interesse a partir do meio externo para dentro de tecidos ou células. As construções de liberação mais comuns foram fundamentadas em anticorpos (ou fragmentos de anticorpo) ou nos

peptídeos virais e bacterianos descobertos ter atividade de aglutinação e transporte de membrana. Por exemplo, construções transportadoras foram investigadas com base na proteína VP22 do herpes viral; os polipeptídeos compreendendo a proteína TAT do vírus da imunodeficiência humana (HIV), e polipeptídeos compreendendo um homeodomínio de uma proteína Antennapedia (Antp HD), assim como fragmentos funcionais e modificações da mesma.

[004] A maioria dos peptídeos virais e bacterianos investigados nas construções de liberação (também denominadas peptídeos de penetração celular (CPPs)) compreende peptídeos catiônicos ricos em resíduos básicos tais como lisina e/ou arginina, ou peptídeos compreendendo aminoácidos que realçam a hélice alfa. Os CPPs têm sido usados para transfectar células *in vitro* em alguns modelos experimentais de animal, mas têm demonstrado sucesso limitado em testes clínicos. Foi postulado que a falta de sucesso na clínica pode surgir da sua falta de especificidade para qualquer tipo de célula ou tecido particulares, assim como a instabilidade inerente destes peptídeos *in vivo* (frequentemente exibindo meias-vidas da ordem de vários minutos). Para contornar a falta de estabilidade *in vivo*, vários CPPs estabilizados foram desenvolvidos que foram quimicamente modificados ou que contêm aminoácidos não naturais, incluindo “D” aminoácidos. Por exemplo, uma forma “D”-retroinverso completa (“D-TAT”) do peptídeo de arquétipo “TAT” atingiu Fase 2 clínica, mas a persistência de modo potencial extremamente longa deste peptídeo tem limitado o seu uso para a administração tópica, por exemplo, ao ouvido ou intraocular para o tratamento de inflamação do olho. A administração sistêmica de tais peptídeos estabilizados é contraindicada em virtude da sua toxicidade potencial.

[005] Substituindo-se apenas posições específicas no peptídeo “D-TAT” por L-aminoácidos, peptídeos foram obtidos com uma meia-vida intermediária potencialmente mais adequada para o desenvolvimento clínico.

As construções transportadoras descritas nos pedidos WO 2010/072406, WO 2010/072228 ou WO2010/072275, compreendendo aminoácidos tanto com aminoácido L quanto D são estáveis o bastante para prevenir a degradação pelas proteases antes do transporte da porção de carga para o seu sítio alvo. Além disso, estas construções transportadoras parecem não persistir permanentemente na célula e são em algum grau submetidas à degradação pela protease. Não obstante, embora a atividade transportadora de transmembrana eficaz tenha sido demonstrada, foi descoberto que na captação, a porção de carga da construção transportadora de carga não é facilmente clivada da porção transportadora, que é no geral um pré-requisito para a porção de carga ser biologicamente ativa. Além disso, foi descoberto que a degradação da construção transportadora de carga é lenta, tal que exhibe a tendência de acumular na célula alvo. Portanto, mesmo se a porção de carga ligada seja eventualmente liberada ou seja metabolizada, a construção transportadora pode permanecer na célula por um tempo prolongado e participar em outros processos inter- e intracelulares levando a efeitos colaterais desconhecidos e indesejados. Consequentemente, existe uma necessidade para desenvolver compostos melhorados para a liberação intracelular de porções de carga desejadas.

3. SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[006] Os inventores surpreendentemente descobriram que sequências de consenso específicas de peptídeos e/ou polipeptídeos isoladas são capazes de efetuar aglutinação específica ao proteoglicano C4S, que são seletivos ao C4S em relação a outros proteoglicanos (por exemplo, heparina, dermatana, keritan), que exibem ainda estabilidade *in vivo* melhorada em relação aos peptídeos de tamanho similar e que são capazes de funcionar como peptídeos carregadores/peptídeos melhorados para a liberação celular e intracelular de moléculas conjugadas a eles (por exemplo, pela conjugação química ou fusão recombinante). Os peptídeos e ou polipeptídeos tendo os polipeptídeos têm as

sequências de consenso de acordo com (i) ou (ii), ou os reversos dos mesmos:

(i) Arg₁-X₂-X₃-X₄-Arg₅-X₆-X₇-X₈-Arg₉-(LD₁₀)_n-(XD₁₁)_m, ou

(ii) (XD-2)_m-(LD-1)_n-Arg₁-X₂-X₃-X₄-Arg₅-X₆-X₇-X₈-Arg₉

em que,

(a) Arg₁, Arg₅, e Arg₉ representam L-arginina; LD₁₀ ou LD-1 representam qualquer L- ou D- aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina; L-arginina ou L-lisina e n tem um valor de 0 a 10; em que XD₁₁ ou XD-2 representam qualquer D-aminoácido outro que não D-arginina ou D-lisina e m tem um valor de 0 ou 1; e em que os aminoácidos remanescentes X₂ a X₄ e X₆ a X₈ podem ser qualquer L- ou D- aminoácido outro que não L-lisina, D-lisina, L-arginina ou D-arginina, com a condição de que X₃ ou X₇, mas não ambos, representam L-lisina ou L-arginina;

ou em que,

(b) Arg₁, Arg₅, e Arg₉ representam D-arginina; LD₁₀ ou LD-1 representam qualquer L- ou D- aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina; L-arginina ou L-lisina e n tem um valor de 0 a 10; em que XD₁₁ ou XD-2 representam qualquer D-aminoácido outro que não D-arginina ou D-lisina e m tem um valor de 0 ou 1; e em que os aminoácidos remanescentes de X₂ a X₄ e de X₆ a X₈ podem ser qualquer L- ou D-aminoácido outro que não L-lisina, D-lisina, L-arginina ou D-arginina, com a condição de que X₃ ou X₇, mas não ambos, representam D-lisina ou D-arginina.

[007] A sequência de consenso (i), acima, com as condições (a) é a SEQ ID NO: 17, e com as condições (b) é a SEQ ID NO: 19. A sequência de consenso (ii), acima, com as condições (a) é a SEQ ID NO: 18, e com as condições (b) é a SEQ ID NO: 20.

[008] Os presentes inventores descobriram que, como refletido nas regras de consenso acima, que os resíduos de aminoácido nas posições 2, 4, 6, 8 e 3 (onde a posição 7 é definida/selecionada de acordo com a regra (b)) ou 7 (onde a posição 3 é definida/selecionada de acordo com a regra (b)) não

contribui para a atividade de aglutinação do peptídeo. Portanto, a porção alvejadora dos peptídeos acima, representada por Arg₁-X₂-X₃-X₄-Arg₅-X₆-X₇-X₈-Arg₉ com a condição de que as posições 3 ou 7 (mas não ambas) são uma lisina ou arginina, podem ser observadas serem idênticas para todos os peptídeos possíveis abrangidos pelas sequências de consenso (com respeito à apresentação das cadeias laterais em 1, 5, 9, e 3 ou 7, no espaço 3D). De fato, é o arranjo linear 3D e/ou configuração 3D dos resíduos de arginina nas posições 1, 5 e 9, junto com a lisina ou arginina nas posições 3 ou 7 (mas não ambas) que estabiliza a atividade de aglutinação das sequências da porção alvejadora e contribui para a especificidade e seletividade de aglutinação para C4S em relação a outros proteoglicanos. Os resíduos de aminoácido remanescentes, isto é, as posições 2, 4, 6, 8 e 3 (onde a posição 7 é definida/selecionada de acordo com a regra (b)) ou 7 (onde a posição 3 é definida/selecionada de acordo com a regra (b)) servem primariamente como uma armação estrutural para manter a distância apropriada e configuração relativa entre as argininas nas posições 1, 5 e 9, e a lisina ou arginina nas posições 3 ou 7 (mas não ambas) da porção alvejadora. Assim, desde que a orientação espacial 3D destes resíduos seja mantida, em particular, a apresentação 3D das cadeias laterais de resíduo de aminoácido, o peptídeo e/ou composições da invenção exibirão aglutinação específica e seletiva para um proteoglicano, em particular, C4S.

[009] Como tal, a invenção é no geral descrita para peptídeos e polipeptídeos isolados compreendendo ou consistindo das sequências de consenso de acordo com (i) ou (ii) acima, ou dos compostos compreendendo ou consistindo em tais peptídeos e polipeptídeos, assim como às construções de resíduo de aminoácido (ou compostos que as compreendam) tendo uma apresentação 3D de 3 resíduos de arginina (isto é, Arg₁, Arg₅, e Arg₉) e a uma arginina ou lisina (isto é, Arg/Lys₃ ou Arg/Lys₇ mas não ambas) equivalente aos peptídeos e/ou porções alvejadoras das sequências de consenso (i) e (ii).

Consequentemente, a invenção no geral considera tanto o uso de resíduos de aminoácido nas posições livremente selecionáveis (isto é, 2, 4, 6, 8 e 3 (onde a posição 7 é definida/selecionada de acordo com a regra (b), acima, como uma D- ou L- lisina ou D- ou L- arginina) ou 7 (onde a posição 3 é definida/selecionada de acordo com a regra (b), acima, como uma D- ou L- lisina ou D- ou L- arginina)) na porção alvejadora das sequências de consenso (i) e (ii), e a substituição de um ou mais destes resíduos com qualquer ligador químico ou espaçador químico apropriados adequados para manter o espaçamento equivalente e a orientação/apresentação 3D relativas dos 3 resíduos de arginina (isto é, Arg₁, Arg₅, e Arg₉) e a uma arginina ou lisina (isto é, Arg/Lys₃ ou Arg/Lys₇ mas não ambas). A invenção abrange moléculas compreendendo ou consistindo em resíduos de aminoácido e também abrange moléculas compreendendo tanto resíduos de aminoácido quanto ligadores/espaçadores químicos tal que as moléculas exibam 3 argininas e 1 lisina ou arginina na mesma ou uma confirmação tridimensional equivalente relativa como as argininas nas posições 1, 5 e 9, e a lisina ou arginina nas posições 3 ou 7 (mas não ambas) como nas porções alvejadoras das sequências de consenso (i) e (ii). Como usado por toda esta descrição, uma molécula compreendendo a substituição de um ou mais resíduos de aminoácido com um ligador/espaçador químicos é denominada uma construção de resíduo-espaçador.

[0010] Por conveniência como usado por toda esta descrição, as argininas na construção de resíduo-espaçador que correspondem às argininas 1, 5 e 9 das sequências de consenso (i) e (ii) serão aludidas como Arg₁, Arg₅ e Arg₉, respectivamente. Similarmente a arginina ou lisina na construção de resíduo-espaçador que corresponde à arginina ou lisina nas posições 3 ou 7 (mas não ambas) das sequências de consenso (i) e (ii) dos peptídeos e compostos da invenção serão aludidas como Arg/Lys₃ ou Arg/Lys₇, respectivamente.

[0011] Em vista do precedente, a invenção é no geral direcionada às moléculas em que, Arg₁ é ligada a Arg₅ por intermédio de um ou mais ligadores químicos (que podem consistir exclusivamente de um ou mais resíduos de aminoácido ou podem compreender tanto resíduos de aminoácido quanto espaçadores/ligadores químicos), em que a distância entre Arg₁ e Arg₅ é de $12,9 + 1,5 \text{ \AA}$ quando a molécula/construção está na conformação prolongada; Arg₅ é ligado ainda a Arg₉ por intermédio de um ou mais ligadores químicos (que podem consistir exclusivamente de um ou mais resíduos de aminoácido ou podem compreender tanto resíduos de aminoácido quanto espaçadores/ligadores químicos), em que a distância entre Arg₅ e Arg₉ é de $12,9 + 1,5 \text{ \AA}$ quando a molécula/construção está na conformação prolongada. As ligações devem ser selecionadas de modo que a molécula final Arg₁-Arg₅-Arg₉ seja uma molécula linear quando na conformação prolongada. As moléculas da invenção compreendem ainda (1) um Arg/Lys₃ dentro de um ou mais ligadores químicos entre Arg₁ e Arg₅, em que a distância entre Arg₁ e Arg/Lys₃ quando a molécula está na conformação prolongada é de cerca de $7,5 + 1,5 \text{ \AA}$; ou (2) um Arg/Lys₇ dentro do um ou mais ligadores químicos entre Arg₅ e Arg₉, em que a distância entre Arg₉ e Arg/Lys₇ quando a molécula está na conformação prolongada é de cerca de $7,5 + 1,5 \text{ \AA}$. Cuidado deve ser tomado quando da substituição de um ou mais resíduos com ligadores químicos de acordo com os métodos aqui descritos de modo que as cadeias laterais de Arg₁, Arg₅, Arg₉ e Arg/Lys₃ ou Arg/Lys₇ retêm a mesma ou apresentação 3D similar como suas cadeias laterais de contraparte nos peptídeos e polipeptídeos das sequências de consenso (i) e (ii). Assim, as cadeias laterais de Arg₁, Arg₅, Arg₉ e Arg/Lys₃ ou Arg/Lys₇ dentro da construção de resíduo-espaçador devem apresentar-se em um arranjo linear ou quase linear dentro do espaço 3D quando a molécula/construção está na conformação prolongada. Assim, Arg₁ e Arg₉ serão separadas em $25,8 + 3,0 \text{ \AA}$ quando a molécula/construção está na posição prolongada. Nas

modalidades preferidas, Arg₁, Arg₅, Arg₉ e Arg/Lys₃ ou Arg/Lys₇ são cada um (i) um resíduo de L-aminoácido ou (ii) um resíduo de D-aminoácido.

[0012] A invenção é no geral direcionada a pelo menos uma molécula isolada, ou compostos compreendendo ou consistindo da dita molécula, em que a molécula tem uma estrutura de consenso de acordo com qualquer um de (iii) a (vi), ou os reversos dos mesmos:

(iii) Arg₁-(SP_A)-Arg₅-(SP_B)-X-(SP_C)-Arg₉-(LD₁₀)_n-(XD₁₁)_m;

(iv) Arg₁-(SP_C)-X-(SP_B)-Arg₅-(SP_A)-Arg₉-(LD₁₀)_n-(XD₁₁)_m;

(v) (XD₂)_m-(LD₁)_n-Arg₁-(SP_A)-Arg₅-(SP_B)-X-(SP_C)-Arg₉; ou

(vi) (XD₂)_m-(LD₁)_n-Arg₁-(SP_C)-X-(SP_B)-Arg₅-(SP_A)-Arg₉

em que, LD₁₀ ou LD₁ representam qualquer L- ou D-aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina; L-arginina ou L-lisina e n tem um valor de 0 a 10; em que XD₁₁ ou XD₂ representam qualquer D-aminoácido outro que não D-arginina ou D-lisina e m tem um valor de 0 ou 1; em que

(a) Arg₁, Arg₅, e Arg₉ representam L-arginina; e X representa L-lisina ou L-arginina, ou

(b) Arg₁, Arg₅, e Arg₉ representam D-arginina; e X representa D-lisina ou D-arginina;

em que (SP_A) representa um ligador químico que

(a) consiste em uma cadeia de peptídeo de 3 resíduos de aminoácido, em que cada resíduo pode ser independentemente selecionado de qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; ou

(b) separa os resíduos de aminoácido adjacentes em 12,9 + 1,5 Å;

em que (SP_C) representa um ligador químico que

(a) consiste em um único resíduo de aminoácido que pode ser qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-

arginina ou L-lisina; ou

(b) separa os resíduos de aminoácido adjacentes em $7,5 + 1,5$ Å quando a molécula está na conformação prolongada;

e em que $(SP_B)-X-(SP_C)$ ou seu reverso, $(SP_C)-X-(SP_B)$ representa um ligador químico

(a) em que SP_B e SP_C cada um representa um único resíduo de aminoácido que pode ser independentemente selecionado de qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; ou

(b) que separa os resíduos de aminoácido adjacentes Arg_1 e Arg_5 ou Arg_5 e Arg_9 em $12,9 + 1,5$ Å quando a construção está na conformação prolongada.

[0013] Quando da substituição de um ou mais resíduos de aminoácido com um espaçador/ligador químico nas sequências de consenso (i) ou (ii) (isto é, para formar uma ou mais das moléculas de acordo com as estruturas de consenso de (iii) a (vi)), cuidado deve ser tomado tal que as cadeias laterais de Arg_1 , Arg_5 , Arg_9 e Arg/Lys_3 ou Arg/Lys_7 retenham a mesma ou apresentação 3D similar como suas cadeias laterais de contraparte nas sequências de peptídeo e polipeptídeo de consenso (i) e/ou (ii). Assim, as cadeias laterais de Arg_1 , Arg_5 , Arg_9 e Arg/Lys_3 ou Arg/Lys_7 dentro da construção de resíduo-espaçadores de acordo com os métodos da invenção devem apresentar-se em um arranjo linear ou quase linear dentro do espaço 3D quando a molécula e/ou construção está na conformação prolongada.

[0014] Em certas modalidades as estruturas de consenso de (iii) a (vi) das moléculas da invenção não compreendem nenhum espaçador/ligador químicos, mas compreendem apenas resíduos de aminoácido. Em tais modalidades, a invenção pode ser definida como direcionada a pelo menos um peptídeo ou polipeptídeo isolados, e/ou aos compostos compreendendo ou consistindo em pelo menos um peptídeo ou polipeptídeo isolados, peptídeo ou polipeptídeo estes que tem uma sequência de aminoácido de acordo com a

seguinte sequência de consenso (i) ou (ii), ou os reversos das mesmas:

(i) $\text{Arg}_1\text{-X}_2\text{-X}_3\text{-X}_4\text{-Arg}_5\text{-X}_6\text{-X}_7\text{-X}_8\text{-Arg}_9\text{-(LD}_{10}\text{)}_n\text{-(XD}_{11}\text{)}_m$, ou

(ii) $\text{(XD}_{-2}\text{)}_m\text{-(LD}_{-1}\text{)}_n\text{-Arg}_1\text{-X}_2\text{-X}_3\text{-X}_4\text{-Arg}_5\text{-X}_6\text{-X}_7\text{-X}_8\text{-Arg}_9$

em que,

(a) Arg_1 , Arg_5 , e Arg_9 representam L-arginina; LD_{10} ou LD_{-1} representam qualquer L- ou D-aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina; L-arginina ou L-lisina e n tem um valor de 0 a 10; em que XD_{11} ou XD_{-2} representam qualquer D-aminoácido outro que não D-arginina ou D-lisina e m tem um valor de 0 ou 1; e em que os aminoácidos remanescentes de X_2 a X_4 e de X_6 a X_8 podem ser qualquer L- ou D-aminoácido outro que não L-lisina, D-lisina, L-arginina ou D-arginina, com a condição de que X_3 ou X_7 , mas não ambos, representam L-lisina ou L-arginina;

ou em que,

(b) Arg_1 , Arg_5 , e Arg_9 representam D-arginina; LD_{10} ou LD_{-1} representam qualquer L- ou D-aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina; L-arginina ou L-lisina e n tem um valor de 0 a 10; em que XD_{11} ou XD_{-2} representam qualquer D-aminoácido outro que não D-arginina ou D-lisina e m tem um valor de 0 ou 1; e em que os aminoácidos remanescentes X_2 a X_4 e X_6 a X_8 podem ser qualquer L- ou D-aminoácido outro que não L-lisina, D-lisina, L-arginina ou D-arginina, com a condição de que X_3 ou X_7 , mas não ambos, representam D-lisina ou D-arginina.

[0015] A sequência de consenso (i), acima, com as condições (a) é a SEQ ID NO: 17, e com as condições (b) é a SEQ ID NO: 19. A sequência de consenso (ii), acima, com as condições (a) é a SEQ ID NO: 18, e com as condições (b) é a SEQ ID NO: 20.

[0016] Em certas modalidades as estruturas de consenso de (iii) a (vi) das moléculas da invenção compreendem ligadores/espaçadores químicos para SP_A , SP_B , e SP_C que não são e não compreendem resíduos de aminoácido. Em tais modalidades, a invenção pode ser definida como

direcionada a pelo menos uma construção de resíduo-espaçador, ou compostos compreendendo ou consistindo da mesma, em que a construção tem uma estrutura de consenso de acordo com qualquer um de (vii) a (x), ou os reversos dos mesmos:

- (vii) $\text{Arg}_1\text{-(CL}_A\text{)-Arg}_5\text{-(CL}_B\text{)-X-(CL}_C\text{)-Arg}_9\text{-(LD}_{10}\text{)}_n\text{-(XD}_{11}\text{)}_m$;
- (viii) $\text{Arg}_1\text{-(CL}_C\text{)-X-(CL}_B\text{)-Arg}_5\text{-(CL}_A\text{)-Arg}_9\text{-(LD}_{10}\text{)}_n\text{-(XD}_{11}\text{)}_m$;
- (ix) $\text{(XD}_{-2}\text{)}_m\text{-(LD}_{-1}\text{)}_n\text{-Arg}_1\text{-(CL}_A\text{)-Arg}_5\text{-(CL}_B\text{)-X-(CL}_C\text{)-Arg}_9$;

ou

- (x) $\text{(XD}_{-2}\text{)}_m\text{-(LD}_{-1}\text{)}_n\text{-Arg}_1\text{-(CL}_C\text{)-X-(CL}_B\text{)-Arg}_5\text{-(CL}_A\text{)-Arg}_9$

em que, LD_{10} ou LD_{-1} representam qualquer L- ou D-aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina; L-arginina ou L-lisina e n tem um valor de 0 a 10; em que XD_{11} ou XD_{-2} representam qualquer D-aminoácido outro que não D-arginina ou D-lisina e m tem um valor de 0 ou 1;

em que

(a) Arg_1 , Arg_5 , e Arg_9 representam L-arginina; e X representa L-lisina ou L-arginina, ou

(b) Arg_1 , Arg_5 , e Arg_9 representam D-arginina; e X representa D-lisina ou D-arginina;

em que (SP_A) representa um ligador químico que separa os resíduos de aminoácido adjacentes em $12,9 + 1,5 \text{ \AA}$;

em que (SP_C) representa um ligador químico que separa os resíduos de aminoácido adjacentes em $7,5 + 1,5 \text{ \AA}$ quando a molécula está na conformação prolongada;

e em que $(\text{SP}_B)\text{-X-(SP}_C)$ ou seu reverso, $(\text{SP}_C)\text{-X-(SP}_B)$ representam um ligador químico que separa os resíduos de aminoácido adjacentes Arg_1 e Arg_5 ou Arg_5 e Arg_9 em $12,9 + 1,5 \text{ \AA}$ quando a construção está na conformação prolongada.

[0017] Quando a molécula ou composto da invenção compreendem um ou mais espaçadores/ligadores químicos que não são exclusivamente

compreendidos de resíduos de aminoácido, cuidado deve ser tomado tal que as cadeias laterais de Arg₁, Arg₅, Arg₉ e Arg/Lys₃ ou Arg/Lys₇ retenham a mesma ou apresentação 3D similar como as suas cadeias laterais de contraparte nas sequências de consenso de peptídeo e/ou polipeptídeo (i) e/ou (ii). Assim, as cadeias laterais de Arg₁, Arg₅, Arg₉ e Arg/Lys₃ ou Arg/Lys₇ dentro das construções de resíduo-espaçador de acordo com os métodos da invenção devem apresentar-se em um arranjo linear ou quase linear dentro do espaço 3D quando a molécula e/ou construção está na conformação prolongada.

[0018] As moléculas e compostos descritos acima de acordo com as sequências de consenso (iii) a (vi) (incluindo certas modalidades compreendendo apenas resíduos de aminoácido de acordo com as sequências de consenso (i) e (ii) e/ou compreendendo ligadores químicos e resíduos de aminoácido de acordo com as estruturas de consenso (vii) a (x)) encontram uso particular como porções de transporte e/ou alvejadoras nas moléculas e compostos aqui descritos, especificamente reconhecendo e/ou aglutinando proteoglicanos, por exemplo, como expressados na superfície de uma célula, em particular, aglutinando o proteoglicano C4S seletivamente em relação a outros proteoglicanos. A porção das sequências de consenso (iii) a (vi) acima atuando como a porção alvejadora que especificamente interage com o proteoglicano C4S é representado por Arg₁-(SP_A)-Arg₅-(SP_B)-X-(SP_C)-Arg₉ ou Arg₁-(SP_C)-X-(SP_B)-Arg₅-(SP_A)-Arg₉ (incluindo as modalidades específicas tendo as sequências ou estruturas de consenso da porção alvejadora Arg₁-X₂-X₃-X₄-Arg₅-X₆-X₇-X₈-Arg₉ (SEQ ID NO: 21, onde um fragmento da SEQ ID NO: 17 ou SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 22, onde um fragmento da SEQ ID NO: 19 ou SEQ ID NO: 20), Arg₁-(CL_A)-Arg₅-(CL_B)-X-(CL_C)-Arg₉ e Arg₁-(CL_C)-X-(CL_B)-Arg₅-(CL_A)-Arg₉)) são moléculas idênticas com respeito à apresentação 3D dos resíduos de aminoácido que correspondem a Arg₁, Arg₅, Arg₉, e Arg/Lys₃ ou Arg/Lys₇ e, em particular, as

cadeias laterais destes resíduos. Consequentemente, qualquer molécula compreendendo 3 resíduos de arginina e um resíduo de lisina de acordo com as sequências de consenso de (iii) a (vi) pode ser desenvolvida como a porção alvejadora de acordo com as seguintes regras:

(1) Cada um dos resíduos Arg_1 , Arg_5 , e Arg_9 devem ser o mesmo isômero óptico de arginina, isto é, cada um deve ser uma L-arginina ou cada um deve ser uma D-arginina.

(2) Arg_1 deve ser ligado a Arg_5 usando um ou mais espaçadores químicos (que podem consistir exclusivamente de um ou mais resíduos de aminoácido ou podem compreender tanto resíduos de aminoácido quanto espaçadores/ligadores químicos) tal que os mesmos sejam separados em $12,9 + 1,5 \text{ \AA}$ quando a molécula está na conformação prolongada; Arg_5 deve ser ligado ainda a Arg_9 usando um ou mais espaçadores químicos (que podem consistir exclusivamente de um ou mais resíduos de aminoácido ou podem compreender tanto resíduos de aminoácido quanto espaçadores/ligadores químicos) tal que eles também sejam separados em $12,9 + 1,5 \text{ \AA}$ quando a molécula está na conformação prolongada.

(3) A porção alvejadora também deve compreender um resíduo de lisina ou arginina na ligação entre Arg_1 e Arg_5 ou entre Arg_5 e Arg_9 (mas não ambos) que seja da mesma quiralidade como o Arg_1 , Arg_5 e Arg_9 (este resíduo corresponde ao resíduo como a posição 3 ou 7 (mas não ambas simultaneamente) nas sequências de consenso (i) e (ii) e resíduo “X” nas sequências de consenso de (iii) a (x)). Em outras palavras, onde Arg_1 , Arg_5 e Arg_9 são L-arginina, a lisina/arginina deve ser uma L-lisina ou um L-arginina; e onde Arg_1 , Arg_5 e Arg_9 são D-arginina, a lisina/arginina devem ser uma D-arginina ou uma D-lisina.

(4) Onde a lisina/arginina são posicionadas na ligação entre Arg_1 e Arg_5 , as mesmas são separadas de Arg_1 em $7,5 + 1,5 \text{ \AA}$; onde a lisina/arginina são posicionadas na ligação entre Arg_5 e Arg_9 , as mesmas são

separadas de Arg₉ em 7,5 + 1,5 Å.

(5) As ligações remanescentes podem compreender qualquer espaçador ou ligador químicos conhecidos na técnica e/ou aqui descritos (que podem consistir exclusivamente de um ou mais resíduos de aminoácido ou podem compreender tanto resíduos de aminoácido quanto espaçadores/ligadores químicos) adequados para manter a separação requerida de Arg₁, Arg₅, Arg₉ e X assim como adequados para manter uma orientação 3D e/ou apresentação 3/D de aminoácidos e suas cadeias laterais similares ou as mesmas como aquelas nos resíduos correspondentes nas sequências de consenso (i) e (ii). As ligações entre Arg₁, Arg₅, Arg₉ e X preferencialmente não devem ser positivamente carregadas. Onde as ligações entre Arg₁, Arg₅, Arg₉ e X são resíduos de aminoácido ou compreendem resíduos de aminoácido, os resíduos podem ser qualquer D- ou L- aminoácido outro que não D- ou L-arginina ou D- ou L-lisina.

[0019] Onde as estruturas de consenso da invenção consistem ou compreendem exclusivamente aminoácidos, a porção alvejadora como descrito imediatamente acima pode ser planejada como segue. A sequência da porção alvejadora nas estruturas de consenso (iii) a (vi), onde a estrutura consiste ou compreende exclusivamente resíduos de aminoácido é representada por Arg₁-X₂-X₃-X₄-Arg₅-X₆-X₇-X₈-Arg₉ (ver, por exemplo, as sequências de consenso (i) e (ii)). A estrutura satisfaz a regra (2) acima. Isto é, a ligação que separa Arg₁ e Arg₅ e que separa Arg₅ e Arg₉ em 12,9 + 1,5 Å quando a molécula está na conformação prolongada o que separa é um peptídeo consistindo em 3 resíduos de aminoácido. As regras descritas imediatamente acima como aplicado ainda à sequência de consenso de peptídeo são:

(P1) Cada um dos resíduos Arg₁, Arg₅, e Arg₉ devem ser o mesmo isômero óptico da arginina, isto é, cada um deve ser uma L-arginina ou cada um deve ser uma D-arginina (que correspondem à Regra (1), acima).

(P2) Os resíduos X_3 ou X_7 (mas não ambos) são uma lisina ou arginina da mesma quiralidade como Arg_1 , Arg_5 e Arg_9 . Isto é, onde Arg_1 , Arg_5 e Arg_9 são L-arginina, X_3 ou X_7 (mas não ambos) devem ser uma L-lisina ou uma L-arginina; e onde Arg_1 , Arg_5 e Arg_9 são D-arginina, X_3 ou X_7 (mas não ambos) devem ser uma D-arginina ou uma D-lisina (que correspondem às Regras 3 e 4, acima).

(P3) Os resíduos remanescentes, isto é, X_2 , X_4 , X_6 , X_8 e X_3 (onde X_7 é selecionado de acordo com a regra P2 imediatamente acima) ou X_7 (onde X_3 é selecionado de acordo com a regra P2 imediatamente acima) pode ser qualquer aminoácido outro que não L- ou D- arginina ou L- ou D- lisina.

[0020] Para todas as moléculas e compostos da invenção, isto é, compreendendo ou consistindo em qualquer uma das sequências de consenso (iii) a (vi) (incluindo as modalidades (i), (ii), e (vii) a (x)) é mais preferido, mas não necessário, que LD_{-10} ou LD_{-1} representem um L- ou D-aminoácido outro que não L- ou D- arginina ou L- ou D- lisina e que XD_{-11} ou XD_{-2} representem um D-aminoácido outro que não D-arginina ou D-lisina. É mais preferido que LD_{-10} ou LD_{-1} representa L- ou D- histidina e que XD_{-11} ou XD_{-2} representam D-histidina.

[0021] Onde as estruturas de consenso da invenção consistem ou compreendem exclusivamente aminoácidos (isto é, correspondem às sequências de consenso (i) ou (ii)), é preferido, mas não necessário, que um D-aminoácido esteja presente na posição 4 ou posição 6, isto é, em X_4 ou X_6 . Em outras modalidades preferidas, as “posições livremente selecionáveis”, isto é, 2, 4, 6, 8 e 3 (onde a posição 7 é definida/selecionada de acordo com a regra (b), acima, como uma D- ou L- lisina ou D- ou L- arginina) ou 7 (onde a posição 3 é definida/selecionada de acordo com a regra (b), acima, como um D- ou L- lisina ou D- ou L- arginina) são cada um independentemente selecionados dos aminoácidos fenilalanina, triptofano, valina, metionina, isoleucina e leucina. Também é preferido que não mais do que três das

posições livremente selecionáveis sejam resíduos de alanina. Adicionalmente, é preferido que nenhuma das posições livremente selecionáveis seja um resíduo de prolina.

[0022] Os exemplos não limitantes de peptídeos que podem ser usados de acordo com os métodos aqui descritos e, em particular, como definido aqui acima são fornecidos na Tabela 1.

Tabela 1

Peptídeos Exemplares da Invenção*

RSTqRYRVRh (SEQ ID NO: 1)
RYFvRIKYRh (SEQ ID NO: 2)
RYFvRIKARh (SEQ ID NO: 3)
RAAvRAKYRh (SEQ ID NO: 4)
RAAvRIKYRh (SEQ ID NO: 5)
RSTqRYRVRh (SEQ ID NO: 6)
RSTqRYKVRh (SEQ ID NO: 7)
RGGgRGKGRh (SEQ ID NO: 8)
RHHhRHKHRh (SEQ ID NO: 9)
RVVvRVKVRh (SEQ ID NO: 10)
RLlRLKLRLh (SEQ ID NO: 11)
RMMmRMKMRh (SEQ ID NO: 12)
RIiRIKIRh (SEQ ID NO: 13)
RYFVRiKYRh (SEQ ID NO: 25)
RSTqRYRVR (SEQ ID NO: 26)
RYFvRIKYR (SEQ ID NO: 15)
RYFvRIKAR (SEQ ID NO: 27)
RAAvRAKYR (SEQ ID NO: 28)
RAAvRIKYR (SEQ ID NO: 29)
RSTqRYRVR (SEQ ID NO: 30)
RSTqRYKVR (SEQ ID NO: 31)
RGGgRGKGR (SEQ ID NO: 32)
RHHhRHKHR (SEQ ID NO: 33)
RVVvRVKVR (SEQ ID NO: 34)
RLlRLKLRL (SEQ ID NO: 35)
RMMmRMKMR (SEQ ID NO: 36)
RIiRIKIR (SEQ ID NO: 37)
RYFVRIKYR (SEQ ID NO: 14)
RYFVRiKYR (SEQ ID NO: 16)

*A letra minúscula indica enantiômero D; a letra maiúscula indica enantiômero L

[0023] Além dos peptídeos, polipeptídeos e compostos compreendendo ou consistindo dos peptídeos de acordo com as sequências de consenso (i) ou (ii), a invenção abrange ainda variantes das sequências de peptídeo exemplares explicitamente aqui descritas. Tais variantes compreendem a substituição das posições livremente selecionáveis, isto é, substituição nas posições 2, 4, 6, 8 e 3 (onde a posição 7 é definida/

selecionada de acordo com a regra (b), acima, como um D- ou L- lisina ou D- ou L- arginina) ou 7 (onde a posição 3 é definida/selecionada de acordo com a regra (b), acima, como uma D- ou L- lisina ou D- ou L- arginina), com uma substituição de aminoácido conservativa. Como é bem conhecido na técnica, “substituições conservativas” são substituições com um outro aminoácido tendo características similares, por exemplo, aminoácidos pequenos substituídos no lugar de aminoácidos pequenos, aminoácidos ácidos substituídos no lugar de aminoácidos ácidos, etc., para qualquer classe característica de aminoácidos por exemplo, aminoácidos polares, aminoácidos básicos, aminoácidos hidrofóbicos e aminoácidos aromáticos. As substituições preferidas para um resíduo particular de acordo com a presente invenção podem ser escolhidas dentre os outros membros do seu grupo de substituição conservativa. Seis grupos de substituição conservativa são habitualmente reconhecidos na técnica: (1) alanina (A), glicina (G) serina (S) e treonina (T); (2) ácido aspártico (D) e ácido glutâmico (E); (3) asparagina (N) e glutamina (Q); (4) arginina (R), histidina (H) e lisina (K); (5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M) e valina (V); e (6) fenilalanina (F), tirosina (Y) e triptofano (W).

[0024] Entretanto, as substituições nas posições livremente selecionáveis de qualquer sequência de peptídeo de acordo com as sequências de consenso (i) e (ii) expressamente aqui descritas não precisam ser fabricadas com um membro do seu grupo de substituição conservativa. A invenção também considera a substituição de qualquer resíduo em uma posição livremente selecionável, isto é, 2, 4, 6, 8 e 3 (onde a posição 7 é definida/selecionada de acordo com a regra (P2), acima, como uma D- ou L- lisina ou D- ou L- arginina) ou 7 (onde a posição 3 é definida/selecionada de acordo com a regra (P2), acima, como uma D- ou L- lisina ou D- ou L- arginina), com qualquer outro L- ou D-aminoácido outro que não L- ou D-arginina ou L- ou D-lisina submetido às regras das sequências de consenso

aqui resumidas. Como aqui detalhado, as posições não definidas não contribuem substancialmente para os efeitos de alvejamento.

[0025] Em todas as modalidades da invenção, o uso do aminoácido prolina (P) em qualquer uma das sequências de consenso de (i) a (x), por exemplo, em qualquer um dos ligadores/espaçadores químicos definido neste ponto, deve ser evitado visto ser acreditado que este resíduo destruiria ou suficientemente distorceria a conformação tridimensional da molécula ou peptídeo de modo a reduzir significativamente a atividade ou afinidade de aglutinação.

[0026] Qualquer ligador químico ou espaçador químico apropriados adequados para manter o espaçamento e a orientação/apresentação 3D relativas dos 3 resíduos de arginina (isto é, Arg₁, Arg₅, e Arg₉) e a um de arginina ou lisina (isto é, Arg/Lys₃ ou Arg/Lys₇ mas não ambos) equivalentes aos resíduos correspondentes nas sequências de consenso (i) e (ii) conhecidos na técnica ou aqui descritos podem ser usados na construção das moléculas da invenção de acordo com as estruturas de consenso de (iii) a (vi) (incluindo as modalidades tendo qualquer uma das estruturas de consenso de (vii) a (x)). Os exemplos não limitantes de ligadores/espaçadores químicos apropriados incluem beta- e gama- peptídeos; armações com base em aminoácido de açúcar; beta-peptidométicos tipo grampo incluindo, mas não limitada a X, X, e X); miméticos alfa-helicoidal, miméticos de folha beta/filamento beta e miméticos de folha beta e ciclotídeos. Nas modalidades preferidas, os ligadores/espaçadores químicos não são positivamente carregados. Os ligadores devem ser submetidos à decomposição metabólica, não tóxica (incluindo metabólitos) e não devem reduzir significativamente a solubilidade dos compostos da invenção.

[0027] É expressamente considerado que as modalidades descritas por todo este pedido, sejam identificadas como preferidas (incluindo a mais preferida) ou não, podem ser independentemente implementadas e/ou podem

ser combinadas com as outras modalidades descritas no planejamento ou seleção de um peptídeo da invenção. Portanto, uma sequência ou estrutura da porção alvejadora do peptídeo, polipeptídeo, molécula ou composto da invenção devem satisfazer as regras de (1) a (5) listadas acima, e podem opcionalmente satisfazer nenhuma, uma, ou mais do que uma das condições resumidas nas outras modalidades aqui descritas sejam preferidas ou não.

[0028] A invenção pode compreender as moléculas isoladas e compostos (incluindo moléculas isoladas, peptídeos, polipeptídeos e compostos compreendendo ou consistindo das moléculas, peptídeos e/ou polipeptídeos) de acordo com as sequências de consenso de (iii) a (vi) (incluindo as modalidades de acordo com as sequências de consenso (i) e (ii) e estruturas de consenso de (vii) a (x)) e podem compreender ainda uma porção biologicamente ativa (BAM; também aludida como a “carga” da porção alvejadora). A construção (BAM)-(porção alvejadora) também pode ser aludida como um conjugado de BAM da invenção por toda a descrição. A BAM pode ser quimicamente conjugada aos compostos, peptídeos, polipeptídeos e/ou moléculas da invenção diretamente e/ou pode ser ligado a eles através de um grupo ligador.

[0029] Como usado por toda a descrição, a conjugação direta indica a conjugação da porção BAM a qualquer resíduo de aminoácido dentro das sequências de consenso de (iii) a (vi) (incluindo as modalidades de acordo com as sequências de consenso de (i) e (ii) e estruturas de consenso de (vii) a (x)), ou a qualquer resíduo de aminoácido ou grupo químico adequado nesse lugar, usando qualquer ligação química conhecida na técnica ou aqui descrita adequada para a conjugação da porção BAM a um resíduo de aminoácido (por exemplo, uma cadeia lateral de aminoácido) e/ou grupo químico. Consequentemente, A ligação dirigida pode resultar em um ou mais grupos químicos espaçados entre a porção BAM e o aminoácido (por exemplo, cadeia lateral de aminoácido) ou grupo químico da construção de resíduo-

espaçador, grupos estes que se formam como um resultado da reação de ligação como é conhecido na técnica.

[0030] Alternativamente, como aqui descrito, a porção BAM pode ser conjugada a qualquer resíduo de aminoácido ou grupo químico dentro das sequências de consenso de (iii) a (vi) (incluindo as modalidades de acordo com as sequências de consenso (i) e (ii) e estruturas de consenso (vii) a (x)), indiretamente, isto é, por intermédio de um grupo ligador. Portanto, como usado por toda esta descrição, a conjugação indireta significa que a BAM é conjugada ao grupo ligador, grupo ligador este que é conjugado a um resíduo de aminoácido ou grupo químico dentro de uma sequência de consenso como aqui definida. A conjugação entre a BAM e o grupo ligador e entre o grupo ligador e um resíduo de aminoácido ou grupo químico de sequências de consenso de (iii) a (vi) (incluindo as modalidades de acordo com as sequências de consenso (i) e (ii) e estruturas de consenso de (vii) a (x)), pode ser qualquer método de conjugação e/ou composto adequado para efetuar tal conjugação como aqui descrito ou como é de outro modo conhecido na técnica.

[0031] A conjugação direta ou indireta da porção BAM pode ser direcionada a qualquer resíduo de aminoácido ou grupo de ligador/espaçador químicos dentro das moléculas da invenção. Assim, a porção BAM pode ser direta ou indiretamente conjugada a um resíduo de aminoácido que está no terminal N ou C das sequências de consenso de (iii) a (vi) (incluindo as modalidades de acordo com as sequências de consenso (i) e (ii) e estruturas de consenso de (vii) a (x)). Alternativa ou adicionalmente, a porção BAM pode ser direta ou indiretamente conjugada a um resíduo de aminoácido interno ou grupo de ligador/espaçador químicos dentro das moléculas da invenção. Como usado por toda esta descrição, um resíduo interno ou grupo químico interno referem-se a um resíduo de aminoácido ou grupo químico das sequências de consenso de (iii) a (vi) (incluindo as modalidades de acordo

com as sequências de consenso (i) e (ii) e estruturas de consenso de (vii) a (x)) que não estão no terminal da cadeia de peptídeo linear ou construção de resíduo-espaçador linear. Como é conhecido na técnica, os métodos de conjugação (seja direta ou indireta) pode requerer a modificação química de um ou ambos os sítios de conjugação (por exemplo, modificação de um resíduo de aminoácido, modificação de um grupo químico dentro da molécula da invenção e/ou modificação da porção BAM). Consequentemente, a presente invenção também abrange a modificação química das moléculas da invenção, compostos compreendendo ou consistindo das moléculas e/ou componentes conjugados.

[0032] Nas modalidades preferidas, os compostos da invenção compreendem ou consistem em um conjugado de peptídeo, por exemplo, um conjugado de BAM, tendo um conjugado de BAM no terminal de uma sequência de consenso ou estrutura de (i) a (x) como aqui descrito. Portanto, nestas modalidades preferidas, o conjugado de BAM tem uma estrutura de consenso de acordo com as seguintes estruturas de consenso de (xi) a (xiv), ou os reversos do mesmo:

(xi) (BAM)-(LINK)-Arg₁-(SP_A)-Arg₅-(SP_B)-X-(SP_C)-Arg₉-(LD₁₀)_n-(XD₁₁)_m;

(xii) (BAM)-(LINK)-Arg₁-(SP_C)-X-(SP_B)-Arg₅-(SP_A)-Arg₉-(LD₁₀)_n-(XD₁₁)_m;

(xiii) (XD₋₂)_m-(LD₋₁)_n-Arg₁-(SP_A) Arg₅-(SP_B)-X-(SP_C)-Arg₉-(LINK)-(BAM); ou

(xiv) (XD₋₂)_m-(LD₋₁)_n-Arg₁-(SP_C)-X-(SP_B)-Arg₅-(SP_A)-Arg₉-(LINK)-(BAM)

[0033] (BAM) representa uma porção biologicamente ativa; em que (LINK) representa um grupo ligador opcional; em que, LD₁₀ ou LD₋₁ representa qualquer L- ou D-aminoácido e n tem um valor de 0 a 10; em que XD₁₁ ou XD₋₂ representa qualquer D-aminoácido e m tem um valor de 0 ou 1;

em que

(a) Arg₁, Arg₅, e Arg₉ representam L-arginina; e X representa L-lisina ou L-arginina, ou

(b) Arg₁, Arg₅, e Arg₉ representam D-arginina; e X representa D-lisina ou D-arginina;

em que (SP_A) representa um ligador químico que

(a) consiste em uma cadeia de peptídeo de 3 resíduos de aminoácido, em que cada resíduo pode ser independentemente selecionado de qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; ou

(b) separa os resíduos de aminoácido adjacentes em $12,9 + 1,5$ Å;

em que (SP_C) representa um ligador químico que

(a) consiste em um único resíduo de aminoácido que pode ser qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; ou

(b) separa os resíduos de aminoácido adjacentes em $7,5 + 1,5$ Å quando a molécula está na conformação prolongada;

e em que (SP_B)-X-(SP_C) ou seu reverso, (SP_C)-X-(SP_B) representam um ligador químico

(a) em que SP_B e SP_C cada um representa um único resíduo de aminoácido que pode ser independentemente selecionado de qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; ou

(b) que separa os resíduos de aminoácido adjacentes Arg₁ e Arg₅ ou Arg₅ e Arg₉ em $12,9 + 1,5$ Å quando a construção está na conformação prolongada.

[0034] As sequências de consenso de (xi) a (xiv) são idênticas às sequências de consenso de (iii) a (vi), respectivamente, mas quanto a presença da porção BAM e do grupo ligador opcional, (LINK). Portanto, a seleção dos

espaçadores químicos (SP_A), (SP_B) e (SP_C), que pode consistir ou compreender exclusivamente de resíduos de aminoácido ou compreender tanto os ligadores químicos quanto os resíduos de aminoácido como aqui descritos) processa-se como aqui descrito com respeito às sequências de consenso de (iii) a (vi), incluindo

- a seleção destes espaçadores químicos para consistir ou compreender exclusivamente de resíduos de aminoácido de acordo com as modalidades (e combinações dos mesmos) das sequências de consenso (i) e (ii) como detalhado por toda esta descrição, e
- seleção destes espaçadores químicos para compreender tanto ligadores químicos quanto resíduos de aminoácido de acordo com as modalidades (e combinações das mesmas) das estruturas de consenso de (vi) a (x) como detalhado por toda esta descrição.

[0035] Onde um grupo ligador está presente, (por exemplo, (LINK) nas estruturas de consenso de (xi) a (xiv)) e/ou um grupo ligador usado na ligação indireta da BAM a um resíduo de aminoácido ou a um grupo químico em qualquer uma das sequências/estruturas de consenso de (i) a (x), tal ligador pode ser qualquer ligador, por exemplo, um peptídeo ligador, conhecido na técnica ou aqui descrito adequado para ligar a BAM à porção alvejadora remanescente. A BAM pode ser quimicamente conjugada ao grupo de ligação, ou, por exemplo, onde tanto o grupo de ligação, (por exemplo, (LINK) das estruturas de (xi) a (xiv)), quanto a BAM são peptídeos ou polipeptídeos, a BAM pode ser ligada ao grupo de ligação por intermédio de uma ligação de peptídeo e o grupo de ligação também pode ser ligado à porção alvejadora da sequência de consenso/estrutura por intermédio de uma ligação de peptídeo. Os exemplos não limitantes de grupos ligadores incluem ligadores peptídicos, por exemplo, compreendendo um ou mais resíduos de ácido glutâmico, glicina, serina, cisteína e combinações dos mesmos. Em certas modalidades, o grupo de ligação (LINK) das estruturas de (xi) a (xiv) é

um único aminoácido que é ácido L- ou D-glutâmico.

[0036] A invenção também abrange moléculas e compostos compreendendo ou consistindo das moléculas, por exemplo, conjugados de peptídeo/resíduo-espaçador-conjugados/conjugados de BAM, que não compreendem um grupo de ligação, isto é, as estruturas de consenso de (xi) a (xiv) que carecem da porção (LINK) e/ou ligação direta da porção BAM a qualquer resíduo de aminoácido ou grupo químico dentro de qualquer sequência de consenso/estrutura de (i) a (x). Onde o conjugado de BAM da invenção está carecendo do grupo de ligação, a BAM pode ser conjugada, por exemplo, quimicamente conjugada, diretamente ao resíduo de aminoácido ou grupo químico das moléculas (por exemplo, um grupo químico do ligador químico). Os exemplos não limitantes de tal conjugação química incluem ligação covalente à molécula no terminal N e/ou ao resíduo de aminoácido do terminal N por intermédio de uma ligação de amida ou no terminal C e/ou resíduo de aminoácido do terminal C por intermédio de uma ligação de éster. Onde a BAM é um peptídeo ou polipeptídeo, a BAM pode ser diretamente conjugada ao terminal N e/ou aminoácido do terminal N ou ao terminal C e/ou aminoácido do terminal C por intermédio de uma ligação de peptídeo.

[0037] A invenção abrange qualquer BAM esperada exercer uma atividade terapeuticamente relevante na administração a um organismo ou na liberação a uma ou mais células de um organismo, seja *in vitro* ou *in vivo*. Consequentemente, os exemplos não limitantes de BAMs abrangidos pela invenção incluem mono- e polissacarídeos, agentes citotóxicos, agentes antineoplásicos, agentes anti-inflamatórios, agentes antivirais, agentes antibacterianos, e agentes para o tratamento de infecções protozoárias. A BAM também pode ser uma desoxirribose ou ribose.

[0038] Os exemplos não limitantes de agentes antineoplásicos que podem ser usados como BAM de acordo com os métodos da invenção incluem, mas não são limitados a, aldesleucina, alentuzumab, alitretinoína,

alopurinol, altretamina, amifostina, anastrozol, abiraterona, arsênico, axitinib, azacitidina, bendamustina, bexaroteno, bleomicina, bortezomib, busulfan, cabazitaxel, calusterona, capecitabina, carboplatina, carfilzomib, carmustina, carmustina, celecoxib, clorambucila, cisplatina, cladribina, clofarabina, crizotinib, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, actinomicina D, dasatinib, daunorrubicina, decitabina, dexrazoxana, docetaxel, doxorubicina, entinostat, epirubicina, eribulina, erlotinib, estramustina, etoposida, everolimus, exemestano, fostamatinib, floxuridina, fludarabina, fluorouracila, 5-FU, fulvestrant, gefitinib, gencitabina, hidroxiureia, idarrubicina, lenalidomida, ifosfamida, imatinib, iomustina, irinotecano, isotretinoína, ixabepilona, lapatinib, lenalidomida, letrozol, leucovorina, levamisol, lomustina, CCNU, marizomib, mecloretamina, mostarda nitrogenada, melfalan, L-PAM, mercaptopurina, 6-MP, mertansina, mesna, metotrexato, metoxsalen, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, nandrolona, nelarabina, nilotinib, oxaliplatina, paclitaxel, pamidronato, pazopanib, pegademase, pemetrexed, pentostatina, pipobroman, plerixafor, plicamicina, mitramicina, porfímero, pralatrexato, procarbazona, quinacrina, rapamicina, romidepsina, ruxolitinib, sorafenib, estreptozocina, sunitinib, tamoxifeno, temozolomida, tensirolimus, teniposida, VM-26, testolactona, talidomida, tioguanina, 6-TG, tiotepa, topotecano, toremifeno, tretinoína, ATRA, mostarda de uracila, valrubicina, vandetanib, vemurafenib, verteporfina, vimblastina, vincristina, vinorelbina, vismodegib, vorinostat, zoledronato, análogos de nucleosídeo AZT, b-D-arabinofuranose, vidarrabina, 2-clorodesoxiadenosina, drogas intercalantes, inibidores da cinase, cofarabina, laromustina, clofosfamida, asparaginase, dexametasona, prednisona e lestaurtinib. Os agentes antineoplásicos listados acima podem ser usados de acordo com os métodos aqui descritos não apenas em conexão com doenças neoplásicas, mas também no tratamento, prevenção e/ou melhora de outras doenças, ou sintomas do mesmo, como é conhecido na técnica, por exemplo,

em conexão com o tratamento, prevenção e/ou melhora de doenças anti-inflamatórias ou autoimunes, e/ou sintomas das mesmas.

[0039] Os exemplos de agentes anti-inflamatórios que podem ser usados como BAMs de acordo com os métodos da invenção incluem, mas não são limitados a, inibidores de COX-2, prednisona, pazopanib, famotidina, dalfampridina, pegloticase, esomeprazol, aspirina, celecoxib, diclofenaco, valdecoxib, rofecoxib, diflunisal, etodolac, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, cetoprofeno, ceterolac, ácido mefenâmico, meloxicam, nabumetona, naproxeno, oxaprozin, piroxicam, sulindaco, tolmetina, lansoprazol, meclofenamato, triancinolona, metilprednisolona, betametasona, budesonida, prednisolona, hidrocortisona, dexametasona e cortisona.

[0040] Os exemplos de agentes antiprotozoários que podem ser usados como BAMs de acordo com os métodos da invenção incluem, mas não são limitados a, cloroquina, mefloquina, primaquina, cloridrato de proguanil, cloridrato de proguanil com atovaquona, pirimetamina, sulfadoxina, quinina, quinolina, doxiciclina, clindamicina, artesunato, diloxanida, metronidazol, tinidazol, cloridrato de mepacrina, anfotericina, pentamidina, pirimetamina, sulfadiazina, azitromicina, atovaquona, trimetoprim-sulfametoxazol, trimetoprim, dapsona, atovaquona, isetionato de pentamidina, amodiaquina, cloroguanida, eflornitina, hidroxicloroquina, iodoquinol, meglumina antimoniató, melarsoprol, nifurtimox, paromomicina, estibogliconato de sódio, suramin, e triparsamida.

[0041] Como aqui detalhado, os compostos da invenção compreendem ou consistem em um conjugado de BAM (isto é, um conjugado de BAM à porção alvejadora; também aludida como um conjugado de peptídeo) que pode efetuar o transporte intracelular da BAM. Consequentemente, nas modalidades preferidas, a invenção abrange uma composição farmacêutica compreendendo um composto da invenção, por

exemplo, um conjugado de BAM, e um carregador farmacêuticamente aceitável. As composições farmacêuticas da invenção compreendendo, por exemplo, o conjugado de BAM, pode ser usado para qualquer indicação conhecida ou prevista ser tratável com a BAM. Por exemplo, onde a BAM é um agente antiviral, a composição farmacêutica compreendendo o conjugado de BAM pode ser usada no tratamento de uma infecção viral, ou o sintoma da mesma, incluindo mas não limitada a HIV; vírus Epstein Barr; morbilivírus; paramixovírus; rubivírus; vírus do herpes; vírus da dengue; vírus do herpes simples; parvovírus; vírus sincicial respiratório; vírus da varíola; varicela; flavivírus; vírus linfotrópico humano; vírus da hepatite A, B, C, D ou E, vírus lassa e/ou vírus da influenza. Onde a BAM é um agente antiprotosoário, a composição farmacêutica compreendendo o conjugado de BAM pode ser usada no tratamento de infecções protozoárias, tais como leishmaniose e/ou malária.

[0042] As porções alvejadoras das sequências/estruturas de consenso de (i) a (xiv) interagem especificamente com proteoglicanos, em particular, sulfato de condroitina-4 (C4S). C4S é preferencialmente expressado em conexão com certos marcadores da superfície celular, por exemplo, CD68, e preferencialmente expressado, em relação a outros proteoglicanos, por certos tipos de célula, por exemplo, leucócitos e mielócitos. Consequentemente, a invenção abrange o uso das moléculas e compostos, por exemplo, conjugados de BAM, para especificamente alvejar as células que expressam CD68 e/ou C4S. A invenção abrange o uso das moléculas e compostos, por exemplo, conjugados de BAM, para facilitar o transporte da porção de BAM para dentro das células que expressam CD68 e/ou C4S, tais como mielócitos e leucócitos.

[0043] As moléculas e compostos da invenção (incluindo moléculas isoladas peptídeos, polipeptídeos e compostos compreendendo ou consistindo em qualquer uma das sequências de consenso de (i) a (xiv)) encontram uso

particular no alvejamento de leucócitos e/ou mielócitos e, assim, podem encontrar uso particular no tratamento, prevenção ou melhora de sintomas associados com doenças ou condições em que os leucócitos têm um envolvimento fisiopatológico. Os exemplos não limitantes de tais doenças ou condições incluem neutrofilia, neutropenia, leucopenia, basopenia, basofilia, eosinopenia, eosinofilia, síndrome hipereosinofílica idiopática, leucocitose linfocítica, linfocitose, linfocitopenia, monocitose, monocitopenia, Anomalia de May Hegglin, Anomalia de Pelger-Huet, Anomalia de Alder-Reilly, síndrome de Chedial-Higashi, síndrome de Job's (hiper-IgE), síndrome de leucócito preguiçoso, síndrome da deficiência C3 congênita, doença granulomatosa crônica, leucócito, deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase, deficiência da mieloperoxidase benigna, doença da imunodeficiência combinada severa, síndrome de DiGeorge, síndrome de Nezelof, agamaglobulinemia infantil ligada ao sexo, hipogamaglobulinemia, mucopolissacaridose, lipodoses, doença de Gaucher, doença de Niemann-pick, doença de Fabry, doença de Farber, gangliosidoses; Tay Sachs, doença de Sandhoff, doença de Krabbe, leucodistrofia metacromática, doença de Wolman, leucemia, leucemia linfocítica aguda (L1, L2, L3), leucemia linfocítica crônica, todas as formas de leucemia mielógena aguda (AML), incluindo AML não diferenciado (M0), leucemia mieloblástica (M1), leucemia mieloblástica, (M2), leucemia promielocítica, (M3), leucemia mielomonocítica (M4), leucemia monocítica (M5), eritoleucemia (M6), leucemia megacarioblástica, (M7), leucemia mielógena crônica assim como leucemias agudas não diferenciadas ou bifenotípicas (leucemias que tem características tanto linfocíticas quanto mieloides), e todas as formas de linfomas incluindo linfoma de Hodgkin, linfoma de célula T, linfoma de célula B, linfoma linfoplasmacítico, macroglobulinemia de Waldenström, mieloma múltiplo, e linfoma folicular.

4. DEFINIÇÕES

[0044] O termo “doenças ou condições em que os leucócitos têm um envolvimento fisiopatológico” e frases análogas como aqui usadas referem-se a: i) condições, onde a etiologia da doença reside primariamente dentro das células mieloide ou linfoide, tais como transformações malignas, incluindo todas as formas de leucemia assim como distúrbios de leucócito não malignos, incluindo distúrbios genéticos da função de leucócito; ii) distúrbios secundários de função de leucócito que resulta de inoculação tóxica, ou que resulta de infecções virais, bacteriana, protozoária ou outras infecções parasíticas do leucócito; ou iii) em virtude do envolvimento ubíquo de leucócitos na inflamação e a resposta imune no geral, tal como em doenças e condições ou sintomas do mesmo, que não são nem primária nem secundariamente causados pelos leucócitos, mas que podem ser tratados, prevenidos, atenuados ou melhorados pela modulação (estimulação ou inibição) da atividade de leucócito.

[0045] O termo “derivados químicos” como aqui usado refere-se à modificação (química) de aminoácidos, cadeias laterais de aminoácido e ligações de peptídeo (incluindo aquelas no terminal N, no terminal C, dentro da armação da estrutura/sequência de consenso) assim como modificação de qualquer grupo químico dentro do espaçador/ligador químico de estruturas de consenso de (iii) a (xiv). O termo não pretende referir-se a nenhuma adição, substituição ou deleção de resíduos de aminoácidos em uma cadeia de aminoácido ou peptídeo. Os derivados químicos de L-aminoácidos ou L-aminoácidos enantioméricos tipicamente compreendem qualquer derivado que ocorra natural ou não naturalmente destes aminoácidos, incluindo, sem estar limitado aos mesmos, aminoácidos como definidos acima compreendendo modificações pós-traducionais ou modificações sintéticas, incluindo acetilação (no terminal N da sequência de (poli-)peptídeo, nos resíduos lisina, etc.), desacetilação, alquilação, tal como metilação, etilação, etc. (preferivelmente nos resíduos de lisina ou arginina dentro da sequência de

(poli-)peptídeo), desalquilação, tal como demetilação, desetilação, etc., amidação (preferivelmente no terminal C da sequência de (poli-)peptídeo), formilação, gama-carboxilação, glutamilação, glicosilação (preferivelmente nos resíduos de asparagina, lisina, hidroxilisina, serina ou treonina, etc., dentro da sequência de (poli-)peptídeo), a adição de uma porção de heme ou haem, hidroxilação, iodação, isoprenilação adição de uma porção de isoprenoide tal como farnesila ou geranilgeraniol, etc.), lipoilação (ligação da funcionalidade de lipoato), tal como prenilação, formação de uma âncora de GPI, incluindo miristoilação, farnesilação, geranilgeranilação, etc., oxidação, fosforilação (por exemplo, para uma porção de serina, tirosina, treonina ou um histidina, etc., dentro da sequência de (poli-)peptídeo), sulfatação (por exemplo, de tirosina), selenoilação, sulfatação, etc. Os derivados químicos de aminoácidos também incluem, sem estar limitado a estes, aminoácidos modificados, que foram modificados pela introdução de um rótulo, incluindo rótulos radioativos, um grupo corante ou fluorescente, ou um grupo quimioluminescente.

[0046] Como aqui usado, o termo “posições livremente selecionáveis”, “aminoácidos livremente selecionáveis” e termos análogos faz referência às posições dentro da porção alvejadora das modalidades que abrangem as sequências de consenso (i) e (ii) que não são explicitamente definidas. A porção alvejadora das sequências de consenso (i) e (ii) é representada por Arg₁-X₂-X₃-X₄-Arg₅-X₆-X₇-X₈-Arg₉, em que Arg₁, Arg₅, e Arg₉ representam D- ou L-arginina (todas da mesma quiralidade), e em que os aminoácidos remanescentes X₂ a X₄ e X₆ a X₈ podem ser qualquer L- ou D-aminoácido outro que não L-lisina, D-lisina, L-arginina ou D-arginina, com a condição de que X₃ ou X₇, mas não ambos, seja uma lisina ou arginina tendo a mesma quiralidade como Arg₁, Arg₅, e Arg₉. Assim, existem 5 posições livremente selecionáveis de sequências de consenso (i) e (ii), que são X₂, X₄, X₆, X₈ e X₃ (onde posição a X₇ é definida/selecionada como uma D- ou L-

lisina ou D- ou L- arginina) ou X₇ (onde a posição 3 é definida/selecionada como uma D- ou L- lisina ou D- ou L- arginina). Como aqui definido ainda, a invenção também abrange a substituição dos aminoácidos livremente selecionável com espaçadores químicos (que também podem incluir resíduos de aminoácido) para formar a construção de resíduo-espaçadores tal que a orientação 3D relativa de três argininas e uma lisina ou arginina seja equivalente àquela de Arg₁, Arg₅ e Arg₉ e Arg/Lys nas posições 3 ou 7 (mas não ambas) de sequências de consenso (i) e (ii) (isto é, denominada uma construção de resíduo-espaçador do começo ao fim). Os espaçadores/ligadores químicos que podem substituir o aminoácido livremente selecionável nas moléculas da invenção (por exemplo, uma construção de resíduo-espaçador) são apresentadas por (SP_A), (SP_B), e (SP_C) nas estruturas de consenso de (iii) a (vi) e de (xi) a (xiv) e por (CL_A), (CL_B) e (CL_C) nas estruturas de consenso de (vii) a (x).

[0047] No contexto da presente invenção, os L-aminoácidos, também conhecidos na técnica e aqui aludidos como L-aminoácidos enantioméricos, são preferivelmente aminoácidos selecionados de aminoácidos que ocorrem nativamente ou seus derivados. Os aminoácidos que ocorrem naturalmente são reconhecidos como os aminoácidos padrão (proteínogênicos) alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutamínico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenil alanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina, e valina, mas também incluem aminoácidos não padrão tais como ornitina, citrulina, homocisteína, S-adenosil metionina, hidroxiprolina, selenocisteína, pirrolisina, lantionina, ácido 2-aminoisobutírico, desidroalanina, e ácido gama-aminobutírico.

[0048] Similarmente, no contexto da presente invenção, os D-aminoácidos, também conhecidos na técnica e aqui aludidos como aminoácidos D-enantioméricos, são preferivelmente aminoácidos não nativos (não protéinogênicos) “retroinversos”, em que estes aminoácidos não nativos

(não proteinogênicos) “retroinversos” são reconhecidos derivados de L-aminoácidos que ocorrem naturalmente e/ou seus derivados como definidos acima. Neste contexto, o termo “retroinverso” refere-se a um isômero de um L-aminoácido que ocorre naturalmente como definido acima (e peptídeos fabricados a partir destes) em que a quiralidade do resíduo de L-aminoácido que ocorre naturalmente é invertida no D-aminoácido correspondente. Em outras palavras, nas ligações peptídicas de D-aminoácidos as posições de grupos carbonila e amino são trocadas, enquanto que a posição dos grupos de cadeia lateral em cada carbono alfa é preservada. Consequentemente, os D-aminoácidos podem ser inseridos dentro de uma sequência de peptídeo consistindo em ou compreendendo L-aminoácidos e, portanto, podem ser conjugados com L-aminoácidos como definido acima pelos métodos conhecidos na técnica ou aqui definidos.

[0049] As abreviações de aminoácidos usadas na presente descrição são mostradas na seguinte Tabela de Correspondência. Como usado por toda a presente descrição e como detalhado na seguinte tabela, uma letra maiúscula no símbolo de 1 letra faz referência a um L-aminoácido, enquanto que um símbolo de 1 letra minúscula faz referência a um D-aminoácido.

Símbolo			Aminoácido
1 Letra		3-Letras	
L-aminoácido	D-aminoácido		
A	a	Ala	Alanina
R	r	Arg	Arginina
N	n	Asn	Asparagina
D	d	Asp	Ácido aspártico
C	c	Cys	Cisteína
E	e	Glu	Ácido glutâmico
Q	q	Gln	Glutamina
G	g	Gly	Glicina
H	h	His	Histidina
I	i	Ile	Isoleucina
L	l	Leu	Leucina
K	k	Lys	Lisina
M	m	Met	Metionina
F	f	Phe	Fenilalanina
P	p	Pro	Prolina
S	s	Ser	Serina
T	t	Thr	Treonina
W	w	Trp	Triptofano
Y	y	Tyr	Tirosina
V	v	Val	Valina

X	x	Xaa	desconhecido ou outro
---	---	-----	-----------------------

[0050] O termo “Leucócitos” como aqui usado refere-se a qualquer tipo de célula sanguínea branca como aqui definida ou como conhecido na técnica. O termo também abrange células precursoras e/ou estágios de desenvolvimento diferentes de células sanguíneas brancas. O termo “leucócitos” tipicamente inclui granulócitos, linfócitos, monócitos, macrófagos, células dendríticas, mastóides e/ou células microgliais. Os granulócitos incluem, mas não são limitados a neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Os linfócitos incluem, mas não são limitados a células NK, células T auxiliares, células T citotóxicas, células T $\gamma\delta$, e células B.

[0051] Como aqui usado, o termo “peptídeos”, “polipeptídeos” e “proteínas” têm o seu significado como no geral entendido na técnica, isto é, referindo-se a uma cadeia de aminoácidos. Entretanto, os termos não devem ser interpretados como limitando o comprimento da cadeia de aminoácido.

5. BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1 Representação do peptídeo TAT (molécula à esquerda) e C4S (molécula à direita) na conformação prolongada, indicando distâncias calculadas entre certos grupos químicos de acordo com previsões modelo.

Figura 2 Representação tridimensional da modelagem da interação entre as porções alvejadoras (isto é, os nove peptídeos mer) de acordo com a invenção (molécula à esquerda) e o proteoglicano C4S (molécula à direita).

Figura 3 Representação esquemática da interação entre C4S e o peptídeo alvejador da invenção.

Figura 4 Aglutinação de um peptídeo da invenção tendo a sequência RYFvRIKYRh (“RYF”) aos vários proteoglicanos (3A) quando comparado à aglutinação do peptídeo TAT (3B); HS: sulfato de heparana; C4S: sulfato de condroitina-4; C6S: sulfato de condroitina-6-; HA: ácido hialurônico. O peptídeo RYF da

invenção específica e seletivamente liga C4S em relação aos outros proteoglicanos.

- Figura 5 Aglutinação de peptídeos de acordo com a invenção ao C4S. As letras maiúsculas indicam enantiômeros L e as letras minúsculas indicam enantiômeros D. A aglutinação ao C4S é mantida apenas onde todas as posições 1, 5, 9 e 3 ou 7 têm a mesma quiralidade.
- Figura 6 Aglutinação de peptídeos de acordo com a invenção à C4S. As letras maiúsculas indicam enantiômeros L e as letras minúsculas indicam enantiômeros D. A aglutinação seletiva ao C4S em relação à aglutinação aos proteoglicanos heparina e hialuronato está correlacionada com a carga negativa diminuída do peptídeo.
- Figura 7 Imagens de microscopia de fluorescência LUMASCOPE® de células CHO que expressam C4S e células Sog9 deficientes em C4S previamente incubadas com um peptídeo rotulado com FITC da invenção: RYFvRIKYRh (“RYF”; SEQ ID NO: 2). RYF falhou em ligar as células Sog9, que careceram da expressão C4S.
- Figura 8 Imagens de microscopia de fluorescência LUMASCOPE® desta aglutinação de um peptídeo rotulado com FITC da invenção: RYFvRIKYRh (“RYF”; SEQ ID NO: 2) para macrófagos pré-incubados por 16 horas com 0, 3, 10 ou 30 µM de clorato, um inibidor das sulfotransferases (e assim, a expressão de C4S). Ligação de RYF diminuída com expressão de C4S diminuída.
- Figura 9 Dados de expressão de gene CHST11 dos arranjos Atlas.
- Figura 10 Liberação de conjugados FITC de terminal N de peptídeos da invenção na exposição aos extratos de macrófago. Os peptídeos 1, 5 e 6 têm o consenso: RXXxRXXXRh; os peptídeos 14, 15 e 16 têm o consenso: RXxRXXXRh; os peptídeos 23, 24 e 25 têm o consenso: rXXXrXXXr. A conjugação entre os peptídeos e

FITC foi feita através de uma ligação de peptídeo covalente regular ao a.a. de terminal N dos peptídeos. +/- indica a presença ou ausência de extratos de célula.

Figura 11 Crescimento de células derivadas de macrófago bruto incubadas com 2,5 μ M do análogo de nucleosídeo indicado ou do análogo como um conjugado com o peptídeo RYF (SEQ ID NO: 2) na presença de vermelho de fenol. As culturas contendo células que se dividem viram para claro o meio, enquanto que o meio de culturas contendo células que não se dividem permanece escuro (compostos ativos) (Figura 11A). O crescimento percentual também foi determinado medindo-se o teor relativo de LDH (Figura 11B).

Figura 12 Crescimento de células derivadas de macrófago bruto expostas ao 3' amino β -D-arabinofuranosídeo sozinha ou na forma de um conjugado com o peptídeo RYF (SEQ ID NO: 2) na presença de vermelho de fenol. As culturas contendo células que se dividem viram para claro no meio, enquanto que o meio de culturas contendo células que não se dividem permanece escuro. Apenas a conjugação ao RYF (SEQ ID NO: 2) por intermédio de uma ligação de D-aminoácido demonstrou citotoxicidade.

Figura 13 Crescimento de células derivadas de macrófago bruto expostas ao 3'AdT (3' amino desoxitimidina) e 3' amino β -D-arabinofuranosídeo (Ribo) sozinha ou na forma de um conjugado com o peptídeo RYF (SEQ ID NO: 2) na presença de vermelho de fenol. As culturas contendo células que se dividem viram para claro o meio, enquanto que o meio de culturas contendo células que não se dividem permanece escuro. A ligação com o entantiômero D "e" converte compostos inativos naqueles altamente citostáticos.

- Figura 14 Crescimento de células MOLT4 expostas ao composto indicado ou ao composto como um conjugado com o peptídeo RYF (SEQ ID NO: 2) (um peptídeo exemplar da invenção).
- Figura 15 Esquemático detalhando as distâncias médias entre resíduos químicos que interagem potencialmente de TAT e C4S. Os números nas caixas identificam a numeração de resíduo para cada molécula usada nas simulações e como aqui descritas.
- Figura 16 Esquemático detalhando as distâncias médias entre resíduos químicos que interagem potencialmente de TAT e C4S. Os números nas caixas identificam a numeração de resíduo para cada molécula usada nas simulações e como aqui descritas.
- Figura 17 Frequência de ocorrência de interações entre pares de resíduo de TAT e C4S, calculado em simulações 30 MD, cada um com 20 ns no comprimento, partindo de (a) o triplo de pares de resíduo interativos 1/4; 3/5; e 5/6 de TAT e C4S, respectivamente; e (B) o triplo de pares interativos 3/4; 5/5 e 7/6 de TAT e C4S, respectivamente. Os intervalos de frequências calculadas de ocorrência são de 90 a 100% (quadrado), de 80 a 90% (cruz), de 70 a 80% (triângulo), de 50 a 70% (estrela) e de 30 a 50% (diamante). Os círculos de linha sólida mostram os pares de resíduo interativos introduzidos no início da simulação MD, enquanto que os círculos com linha tracejada mostram os pares de resíduo interativos esperados que devem se formar espontaneamente se o esquema de interação hipotizado estiver correto.
- Figura 18 (A) Partindo da conformação do complexo TAT/C4S usado para iniciar a simulação de MD (os resultados dos quais estão presentes na Figura 17 A). Apenas os resíduos 1/4, 3/5 e 5/6 de TAT e C4S, respectivamente estão interagindo. (B) Uma

armação extraída de uma das simulações de MD mostrando a formação espontânea de interações entre os resíduos 7 e 9 de TAT e resíduos altamente numerados de C4S, incluindo os resíduos 7 e 8.

6. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0052] A presente invenção refere-se às moléculas, peptídeos, polipeptídeos e compostos compreendendo ou consistindo em tais moléculas, peptídeos ou polipeptídeos tendo as sequências de consenso específicas ou estruturas e o seu uso para o transporte específico de porções biologicamente ativos (BAMs) para o ambiente intercelular, isto é, para o citoplasma e/ou o núcleo. Os inventores surpreendentemente descobriram que certas estruturas de consenso ou sequências de moléculas e peptídeos são capazes de alvejar seletivamente proteoglicanos específicos, em particular sulfato de condroitina-4 (C4S). Consequentemente, as moléculas, proteínas, polipeptídeos e compostos compreendendo ou consistindo em tais moléculas, peptídeo ou polipeptídeo compreendendo ou consistindo em uma ou mais das sequências de consenso aqui descritas podem encontrar uso particular como porções de transporte para a liberação alvejada de BAMs às células que expressam C4S.

[0053] Embora a aglutinação de certos peptídeos aos proteoglicanos e fosfolipídeos seja conhecida, foi previamente visualizado como um processo não específico dirigido primariamente através das interações hidrostáticas ubíquas. Como tal, não foi anteriormente sugerido que tais interações pudessem ser manipuladas para comunicar seletividade, prevenção dos peptídeos de serem usados para alvejamento específico. Apesar da natureza ubíqua percebida destas interações, os presentes inventores surpreendentemente descobriram que sequências de peptídeo específicas podem ser planejadas de modo que exibam seletividade para certos proteoglicanos em relação aos fosfolipídeos no geral. Especificamente, os

presentes inventores descobriram que um peptídeo compreendendo uma sequência de 9 resíduos tendo argininas nas posições 1, 5, e 9, e uma lisina ou arginina nas posições 3 ou 7, ou uma construção molecular que exiba uma conformação 3D relativa equivalente destes 4 resíduos (por exemplo, uma construção de resíduo-espaçador), idealmente interage por intermédio de ligação em ponte eletrostática com os sulfatos nas unidades de aminoglicano de C4S. Além disso, incluindo aminoácidos não carregados ou espaçadores químicos não positivamente carregados nas posições remanescentes fornecem seletividade, inibição ou substancialmente reduzindo a interação não específica do peptídeo com outros proteoglicanos e/ou fosfolipídeos. Assim, a combinação única de resíduos e/ou apresentação 3D de resíduos específicos permite que os peptídeos e construção de resíduo-espaçadores sejam planejadas de modo que exibam aglutinação seletiva para proteoglicanos C4S, em relação aos outros proteoglicanos e outros fosfolipídeos.

[0054] C4S é conhecido ser apenas parcialmente sulfatados, isto é, a molécula não é sulfatada em todos os sítios potencial para sulfatação. As simulações de computador de interações moleculares revelaram que as argininas, pelo menos nas posições 1, 5 e 9 de um peptídeo de 9 mer (e/ou nas posições 3D equivalentes de um peptídeo de 9 mer, por exemplo, em uma construção espaçadora de resíduo) especificamente interagiu com o padrão de sulfato específico para C4S. Um aminoácido, em particular, uma arginina ou uma lisina, nas posições 3 ou 7 (e/ou na sua posição 3D equivalente), mas não ambas, também foi descoberta ser necessária para a aglutinação específica. As simulações modelo sugerem que a posição 3 ou posição 7 são tridimensionalmente equivalentes dentro dos 9 mer, em particular, dentro da orientação especial dos outros resíduos relevantes para a interação, isto é, nas posições 1, 5 e 9.

[0055] Os resíduos remanescentes não são previstos pelo modelo estar envolvidos na aglutinação do peptídeo a C4S, e, contanto que as

conformações lineares tridimensional dos resíduos 1, 5, 9 e (3 ou 7) não fossem perturbadas no peptídeo, a substituição com uma ampla variedade de aminoácidos (incluindo aminoácidos não naturais, tais como D-aminoácidos) nas posições livremente selecionáveis 2, 4, 6, 8 e (3 (onde 7 é selecionado como lisina ou arginina) ou 7 (onde 3 é selecionada como lisina ou arginina)) teve pouco a nenhum efeito sobre a aglutinação específica ao C4S. Consequentemente, os inventores surpreendentemente descobriram que contanto que a apresentação e/ou orientação 3D destes 3 resíduos de arginina e um resíduo de lisina ou arginina sejam mantidas na molécula, a aglutinação específica a C4S será mantida. Portanto, a invenção abrange a substituição dos resíduos nestas posições livremente selecionáveis com espaçadores químicos contanto que a orientação 3D relativa das argininas nas posições 1, 5 e 9 e a arginina ou lisina nas posições 3 ou 7 sejam mantidas como nas sequências de consenso (i) e (ii). Entretanto, o uso dos aminoácidos carregados arginina ou lisina nestas posições livremente selecionáveis (onde os resíduos de aminoácido estão presentes) e/ou grupos de ligação carregados, em particular grupos positivamente carregados aumentou a probabilidade de interações não específicas com outros proteoglicanos e fosfolipídeos. Portanto, para manter a especificidade, o uso de arginina e lisina nas posições livremente selecionáveis é evitado nos peptídeos da invenção e/ou o uso de grupos de ligação carregados onde um ou mais dos resíduos livremente selecionáveis são substituídos por um ligador químico nas construções de resíduo-ligador da invenção é evitado.

[0056] Adicionalmente, foi descoberto que a especificidade pode ser mantida usando D-aminoácidos nas moléculas da invenção (por exemplo, peptídeos ou construção de resíduo-espaçadores) nas posições relevantes para a aglutinação de C4S, isto é, Arg₁, Arg₅, Arg₉ e (Arg/Lys₃ ou Arg/Lys₇), contanto que todas as posições tenham a mesma quiralidade. Acredita-se que o uso de uma única quiralidade nestas posições apresenta a mesma estrutura

tridimensional das cadeias laterais de aminoácido. Onde uma ou mais destas posições tem uma quiralidade diferente, o arranjo linear tridimensional é distorcido. Assim, a invenção abrange uma molécula compreendendo 3 resíduos de arginina e um resíduo de arginina ou lisina, em que cada um dos 4 resíduos é um resíduo L ou em que cada um dos 4 resíduos é um resíduo D, contanto que a molécula apresenta os resíduos na mesma ou orientação 3D similar e configuração como Arg₁, Arg₅, Arg₉ e Arg/Lys₃ ou Arg/Lys₇ nas sequências de consenso (i) e (ii) (em particular, quando as moléculas estão em solução).

[0057] As sequências de consenso das moléculas da invenção são preferivelmente preconizadas como porções transportadoras, de uso no transporte intercelular de moléculas/porções de carga associadas. As moléculas da superfície celular contendo proteoglicanos, por exemplo, CD68, são conhecidas ser cicladas por intermédio de endossomas. Para favorecer a liberação do composto da invenção do endossoma (e ajudar ainda a evitar a degradação), um a vários resíduos de aminoácido capazes de atuar como uma esponja de próton podem ser opcionalmente adicionados aos terminais N ou C da porção transportadora. A esponja de próton aumenta a osmolaridade do endossoma, causando intumescimento e ruptura, levando à liberação citossólica de seus conteúdos ao invés de sua degradação. Qualquer resíduo de aminoácido ou combinação de resíduos conhecidos na técnica ou aqui descritos capazes de funcionar como uma esponja de próton podem ser usados de acordo com a invenção. O aminoácido final desta série opcional de esponja de próton reside (isto é, o resíduo final do terminal N ou terminal C dos resíduos da esponja de próton (onde presente)) opcionalmente também podem ser um enantiômero D para evitar a degradação/clivagem dos resíduos da esponja de próton. Consequentemente, a invenção abrange o uso opcional de um ou mais resíduos de aminoácido adicionados ao terminal N ou C da porção transportadora, em que o resíduo de terminal N ou C, respectivamente,

é opcionalmente um enantiômero D. Nas modalidades preferidas, o um ou mais resíduos dos resíduos da esponja de próton não são resíduos de lisina ou de arginina. Os resíduos opcionais da esponja de próton como aqui definida são representadas nas sequências de consenso de (i) a (xiv) da invenção por LD₁₀ ou LD₋₁. O resíduo de terminal N ou C opcional da esponja de próton é representada na sequências de consenso de (i) a (xiv) da invenção por XD₁₁ ou XD₋₂. Assim, nas modalidades preferidas, LD₁₀ ou LD₋₁ das sequências de consenso de (i) a (xiv) (onde presente) representam qualquer aminoácido L ou D outro que não a arginina L ou D ou lisina L ou D; em conexão com estas modalidades preferidas ou como modalidades independentes, XD₁₁ ou XD₋₂ de sequências de consenso de (i) a (xiv) (onde presentes) é preferencialmente qualquer aminoácido D outro que não D-arginina ou D-lisina. Nas modalidades mais preferidas, o um ou mais resíduos dos resíduos da esponja de próton são resíduos de histidina. Assim, nas modalidades mais preferidas, LD₁₀ ou LD₋₁ das sequências de consenso de (i) a (xiv) representam L- ou D-histidina; em conexão com estas modalidades mais preferidas ou como modalidades independentes, XD₁₁ ou XD₋₂ das sequências de consenso de (i) a (xiv) são mais preferencialmente D-histidina.

6.1 Estruturas da Molécula de Consenso

[0058] As descobertas acima dos inventores podem ser apresentadas como uma estrutura de consenso. A invenção é no geral direcionada a pelo menos uma molécula isolada, ou compostos compreendendo ou consistindo da dita molécula, em que a molécula tem uma estrutura de consenso de acordo com qualquer um de (iii) a (vi), ou os reversos dos mesmos:

(iii) Arg₁-(SP_A)-Arg₅-(SP_B)-X-(SP_C)-Arg₉-(LD₁₀)_n-(XD₁₁)_m;

(iv) Arg₁-(SP_C)-X-(SP_B)-Arg₅-(SP_A)-Arg₉-(LD₁₀)_n-(XD₁₁)_m;

(v) (XD₋₂)_m-(LD₋₁)_n-Arg₁-(SP_A) Arg₅-(SP_B)-X-(SP_C)-Arg₉; ou

(vi) (XD₋₂)_m-(LD₋₁)_n-Arg₁-(SP_C)-X-(SP_B)-Arg₅-(SP_A)-Arg₉

em que, LD₁₀ ou LD₋₁ representam qualquer aminoácido L ou

D outro que não D-arginina, D-lisina; L-arginina ou L-lisina e n tem um valor de 0 a 10; em que XD₁₁ ou XD₂ representam qualquer D-aminoácido outro que não D-arginina ou D-lisina e m tem um valor de 0 ou 1;

em que

(a) Arg₁, Arg₅, e Arg₉ representa L-arginina; e X representa L-lisina ou L-arginina, ou

(b) Arg₁, Arg₅, e Arg₉ representa D-arginina; e X representa D-lisina ou D-arginina;

em que (SP_A) representa um ligador químico que

(a) consiste em uma cadeia de peptídeo de 3 resíduos de aminoácido, em que cada resíduo pode ser independentemente selecionado de qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; ou

(b) separa os resíduos de aminoácido adjacentes em 12,9 + 1,5 Å;

em que (SP_C) representam um ligador químico que

(a) consiste em um único resíduo de aminoácido que pode ser qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; ou

(b) separa os resíduos de aminoácido adjacentes em 7,5 + 1,5 Å quando a molécula está na conformação prolongada;

e em que (SP_B)-X-(SP_C) ou seu reverso, (SP_C)-X-(SP_B) representam um ligador químico

(a) em que SP_B e SP_C cada um representa um único resíduo de aminoácido que pode ser independentemente selecionado de qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; ou

(b) que separa os resíduos de aminoácido adjacentes Arg₁ e Arg₅ ou Arg₅ e Arg₉ em 12,9 + 1,5 Å quando a construção está na conformação prolongada.

[0059] Quando a molécula ou composto da invenção compreendem um ou mais espaçadores/ligadores químicos que não são exclusivamente compreendidos de resíduos de aminoácido, cuidado deve ser tomado tal que as cadeias laterais de Arg₁, Arg₅, Arg₉ e Arg/Lys₃ ou Arg/Lys₇ retenham a mesma ou apresentação 3D similar como as suas cadeias laterais de contraparte nas sequências de consenso de peptídeo e/ou polipeptídeo (i) e/ou (ii). Assim, as cadeias laterais de Arg₁, Arg₅, Arg₉ e Arg/Lys₃ ou Arg/Lys₇ dentro das construções de resíduo-espaçador de acordo com os métodos da invenção devem se apresentar em um arranjo linear ou quase linear dentro do espaço 3D quando a molécula e/ou construção estão na conformação prolongada.

6.2 Sequências de Peptídeo de Consenso

[0060] Nas modalidades da invenção em que as moléculas e/ou compostos de acordo com qualquer uma das estruturas de consenso de (iii) a (vi) compreendem ou consistem apenas de resíduos de aminoácido, as estruturas de consenso podem ser representadas por sequências de consenso de um peptídeo ou polipeptídeo. Consequentemente, em certas modalidades, a presente invenção é direcionada aos compostos compreendendo ou consistindo em pelo menos um peptídeo ou polipeptídeo isolados tendo uma sequência de aminoácido de acordo com as seguintes sequências de consenso (i) ou (ii), ou os reversos das mesmas:

(i) Arg₁-X₂-X₃-X₄-Arg₅-X₆-X₇-X₈-Arg₉-(LD₁₀)_n-(XD₁₁)_m, ou

(ii) (XD₋₂)_m-(LD₋₁)_n-Arg₁-X₂-X₃-X₄-Arg₅-X₆-X₇-X₈-Arg₉

em que,

(a) Arg₁, Arg₅, e Arg₉ representam L-arginina; LD₁₀ ou LD₋₁ representam qualquer aminoácido L ou D outro que não D-arginina, D-lisina; L-arginina ou L-lisina e n tem um valor de 0 a 10; em que XD₁₁ ou XD₋₂ representam qualquer aminoácido D outro que não D-arginina ou D-lisina e m tem um valor de 0 ou 1; e em que os aminoácidos remanescentes de X₂ a X₄ e

de X_6 a X_8 podem ser qualquer aminoácido L ou D outro que não L-lisina, D-lisina, L-arginina ou D-arginina, com a condição de que X_3 ou X_7 , mas não ambos, representam L-lisina ou L-arginina;

ou em que,

(b) Arg_1 , Arg_5 , e Arg_9 representam D-arginina; LD_{10} ou LD_{-1} representam qualquer aminoácido L ou D outro que não D-arginina, D-lisina; L-arginina ou L-lisina e n tem um valor de 0 a 10; em que XD_{11} ou XD_{-2} representam qualquer aminoácido D outro que não D-arginina ou D-lisina e m tem um valor de 0 ou 1; e em que os aminoácidos remanescentes de X_2 a X_4 e de X_6 a X_8 podem ser qualquer aminoácido L ou D outro que não L-lisina, D-lisina, L-arginina ou D-arginina, com a condição de que X_3 ou X_7 , mas não ambos, representam D-lisina ou D-arginina.

[0061] A sequência de consenso (i), acima, com as condições (a) é a SEQ ID NO: 17, e com as condições (b) é a SEQ ID NO: 19. A sequência de consenso (ii), acima, com as condições (a) é a SEQ ID NO: 18, e com as condições (b) é a SEQ ID NO: 20.

6.3 Estruturas de Consenso de Resíduo-Espaçador

[0062] Nas modalidades da invenção em que os ligadores/ espaçadores químicos representados por SP_A , SP_B , e SP_C em qualquer uma das estruturas de consenso de (iii) a (vi) não compreendem resíduos de aminoácido, as estruturas de consenso podem ser representadas por estruturas de consenso para uma construção de resíduo-espaçador. Em tais modalidades, a invenção pode ser definida como direcionada a pelo menos uma construção de resíduo-espaçador, ou compostos compreendendo ou consistindo em, em que a construção tem uma estrutura de consenso de acordo com qualquer um de (vii) a (x), ou os reversos dos mesmos:

(vii) $Arg_1-(CL_A)-Arg_5-(CL_B)-X-(CL_C)-Arg_9-(LD_{10})_n-(XD_{11})_m$;

(viii) $Arg_1-(CL_C)-X-(CL_B)-Arg_5-(CL_A)-Arg_9-(LD_{10})_n-(XD_{11})_m$;

(ix) $(XD_{-2})_m-(LD_{-1})_n-Arg_1-(CL_A)-Arg_5-(CL_B)-X-(CL_C)-Arg_9$;

ou



em que, LD_{10} ou LD_{-1} representam qualquer aminoácido L ou D outro que não D-arginina, D-lisina; L-arginina ou L-lisina e n tem um valor de 0 a 10; em que XD_{11} ou XD_{-2} representam qualquer aminoácido D outro que não D-arginina ou D-lisina e m tem um valor de 0 ou 1;

em que

(a) Arg_1 , Arg_5 , e Arg_9 representam L-arginina; e X representa L-lisina ou L-arginina, ou

(b) Arg_1 , Arg_5 , e Arg_9 representam D-arginina; e X representa D-lisina ou D-arginina;

em que (SP_A) representam um ligador químico que separa os resíduos de aminoácido adjacentes em $12,9 + 1,5 \text{ \AA}$;

em que (SP_C) representa um ligador químico que separa os resíduos de aminoácido adjacentes em $7,5 + 1,5 \text{ \AA}$ quando a molécula está na conformação prolongada;

e em que $(SP_B)-X-(SP_C)$ ou seu reverso, $(SP_C)-X-(SP_B)$ representam um ligador químico que separa os resíduos de aminoácido adjacentes Arg_1 e Arg_5 ou Arg_5 e Arg_9 em $12,9 + 1,5 \text{ \AA}$ quando a construção está na conformação prolongada.

[0063] Quando a molécula ou composto da invenção compreendem um ou mais espaçadores/ligadores químicos que não são exclusivamente compreendidos de resíduos de aminoácido, cuidado deve ser tomado tal que as cadeias laterais de Arg_1 , Arg_5 , Arg_9 e Arg/Lys_3 ou Arg/Lys_7 retêm a mesma ou apresentação 3D similar como as suas cadeias laterais de contraparte nas sequências de consenso de peptídeo e/ou polipeptídeo (i) e/ou (ii). Assim, as cadeias laterais de Arg_1 , Arg_5 , Ang_9 e Arg/Lys_3 ou Arg/Lys_7 dentro das construções de resíduo-espaçador de acordo com os métodos da invenção devem se apresentar em um arranjo linear ou quase linear dentro do espaço

3D quando a molécula e/ou construção está na conformação prolongada.

6.4 Porções Alvejadoras

[0064] As moléculas e compostos descritos acima de acordo com as sequências de consenso de (iii) a (vi) encontram uso particular como porções de transporte e/ou alvejadoras, especificamente reconhecendo e/ou aglutinando proteoglicanos, por exemplo, como expressado na superfície de uma célula, em particular, aglutinando a seletividade C4S do proteoglicano em outros proteoglicanos. A porção das sequências de consenso de (iii) a (vi) acima atuando como a porção alvejadora que especificamente interage com o proteoglicano C4S é representado por Arg₁-(SP_A)-Arg₅-(SP_B)-X-(SP_C)-Arg₉ ou Arg₁-(SP_C)-X-(SP_B)-Arg₅-(SP_A)-Arg₉ (incluindo as modalidades específicas tendo sequências ou estruturas de consenso da porção alvejadora Arg₁-X₂-X₃-X₄-Arg₅-X₆-X₇-X₈-Arg₉ (SEQ ID NO: 21, onde um fragmento da SEQ ID NO: 17 ou SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 22, onde um fragmento da SEQ ID NO: 19 ou SEQ ID NO: 20), Arg₁-(CL_A)-Arg₅-(CL_B)-X-(CL_C)-Arg₉ e Arg₁-(CL_C)-X-(CL_B)-Arg₅-(CL_A)-Arg₉)) são moléculas idênticas com respeito à apresentação 3D dos resíduos de aminoácido que correspondem a Arg₁, Arg₅, Arg₉, e Arg/Lys₃ ou Arg/Lys₇ e, em particular, as cadeias laterais destes resíduos. Consequentemente, qualquer molécula compreendendo 3 resíduos de arginina e um resíduo de lisina de acordo com as sequências de consenso de (iii) a (vi) pode ser desenvolvida como a porção alvejadora de acordo com as seguintes regras:

(1) Cada um dos resíduos Arg₁, Arg₅, e Arg₉ devem ser o mesmo isômero óptico de arginina, isto é, cada um deve ser uma L-arginina ou cada um deve ser uma D-arginina.

(2) Arg₁ deve ser ligado a Arg₅ usando um ou mais espaçadores químicos (que podem consistir exclusivamente de um ou mais resíduos de aminoácido ou podem compreender tanto resíduos de aminoácido quanto espaçadores/ligadores químicos) tal que eles sejam separados em 12,9

+ 1,5 Å quando a molécula está na conformação prolongada; Arg₅ deve ser ligado ainda ao Arg₉ usando um ou mais espaçadores químicos (que podem consistir exclusivamente de um ou mais resíduos de aminoácido ou podem compreender tanto resíduos de aminoácido quanto espaçadores/ligadores químicos) tal que eles também sejam separados em 12,9 + 1,5 Å quando a molécula está na conformação prolongada.

(3) A porção alvejadora também deve compreender um resíduo de lisina ou arginina na ligação entre Arg₁ e Arg₅ ou entre Arg₅ e Arg₉ (mas não ambos) que é da mesma quiralidade como o Arg₁, Arg₅ e Arg₉ (este resíduo corresponde ao resíduo como a posição 3 ou 7 (mas não ambos simultaneamente) nas sequências de consenso (i) e (ii) e ao resíduo “X” nas sequências de consenso de (iii) a (x)). Em outras palavras, onde Arg₁, Arg₅ e Arg₉ são L-arginina, a lisina/arginina devem ser uma L-lisina ou uma L-arginina; e onde Arg₁, Arg₅ e Arg₉ são D-arginina, a lisina/arginina devem ser uma D-arginina ou uma D-lisina.

(4) Onde a lisina/arginina são posicionadas na ligação entre Arg₁ e Arg₅, as mesmas são separadas de Arg₁ em 7,5 + 1,5 Å; onde a lisina/arginina são posicionadas na ligação entre Arg₅ e Arg₉, as mesmas são separadas de Arg₉ em 7,5 + 1,5 Å.

(5) As ligações remanescentes podem compreender qualquer espaçador ou ligador químicos conhecidos na técnica e/ou aqui descritos (que pode consistir exclusivamente de um ou mais resíduos de aminoácido ou pode compreender tanto resíduos de aminoácido quanto espaçadores/ligadores químicos) adequados para manter a separação requerida de Arg₁, Arg₅, Arg₉ e X assim como adequados para manter uma orientação 3D e/ou apresentação 3D de aminoácidos e suas cadeias laterais similares ou as mesmas como aquelas nos resíduos correspondentes nas sequências de consenso (i) e (ii). As ligações entre Arg₁, Arg₅, Arg₉ e X não devem ser positivamente carregadas. Onde as ligações entre Arg₁, Arg₅, Arg₉ e X são resíduos de aminoácido ou

compreendem resíduos de aminoácido, os resíduos podem ser qualquer aminoácido D ou L outro que não D- ou L-arginina ou D- ou L-lisina.

[0065] Onde as estruturas de consenso da invenção consistem ou compreendem exclusivamente aminoácidos, a porção alvejadora como descrita imediatamente acima pode ser planejada como segue. A sequência da porção alvejadora nas estruturas de consenso de (iii) a (vi), onde a estrutura consiste ou compreende exclusivamente resíduos de aminoácido é representada por Arg₁-X₂-X₃-X₄-Arg₅-X₆-X₇-X₈-Arg₉ (ver, por exemplo, as sequências de consenso (i) e (ii)). A estrutura satisfaz a regra (2) acima. Isto é, a ligação que separa Arg₁ e Arg₅ e que separa Arg₅ e Arg₉ em 12,9 + 1,5 Å quando a molécula está na conformação prolongada que separa é um peptídeo consistindo em 3 resíduos de aminoácido. As regras descritas imediatamente acima como aplicado ainda à sequência de consenso de peptídeo são:

(P1) Cada um dos resíduos Arg₁, Arg₅, e Arg₉ devem ser o mesmo isômero óptico de arginina, isto é, cada um deve ser uma L-arginina ou cada um deve ser uma D-arginina (que correspondem à Regra (1), acima).

(P2) Os resíduos X₃ ou X₇ (mas não ambos) são uma lisina ou arginina da mesma quiralidade como Arg₁, Arg₅ e Arg₉. Isto é, onde Arg₁, Arg₅ e Arg₉ são L-arginina, X₃ ou X₇ (mas não ambos) devem ser uma L-lisina ou uma L-arginina; e onde Arg₁, Arg₅ e Arg₉ são D-arginina, X₃ ou X₇ (mas não ambos) devem ser uma D-arginina ou uma D-lisina (que correspondem à Regra 3 e 4, acima).

(P3) Os resíduos remanescentes, isto é, X₂, X₄, X₆, X₈ e X₃ (onde X₇ é selecionado de acordo com a regra P2 imediatamente acima) ou X₇ (onde X₃ é selecionado de acordo com a regra P2 imediatamente acima) podem ser qualquer aminoácido outro que não L- ou D- arginina ou L- ou D-lisina.

6.5 Ligadores Químicos

[0066] SP_A, SP_B, e SP_C nas sequências de consenso de (iii) a (xiv)

representam ligadores/espaçadores químicos que formam parte da espinha dorsal da molécula da invenção e pode compreender ou consistir exclusivamente de um ou mais resíduos de aminoácido; podem compreender ou consistir em um ou mais ligadores químicos (isto é, que não são resíduos de aminoácido); ou podem compreender tanto resíduos de aminoácido quanto ligadores químicos. Os ligadores químicos que não são resíduos de aminoácido que são de uso de acordo com os métodos da invenção podem ser qualquer ligador químico ou espaçador químico adequados apropriados para manter o espaçamento e a orientação/apresentação 3D relativas dos 3 resíduos de arginina (isto é, Arg₁, Arg₅, e Arg₉) e a uma arginina ou lisina (isto é, Arg/Lys₃ ou Arg/Lys₇ mas não ambos) equivalentes aos resíduos correspondentes nas sequências de consenso (i) e (ii). Qualquer um de tais ligadores/espaçadores químicos conhecidos na técnica ou aqui descritos pode ser usado na construção das moléculas da invenção, e está dentro das capacidades de uma pessoa de habilidade na técnica selecionar e adaptar tais ligadores aos métodos da invenção. Os exemplos não limitantes de ligadores/espaçadores químicos apropriados incluem beta- e gama- peptídeos tais como aqueles descritos e descritos por exemplo, em Seebach *et al.*, Chem. Biodivers. 1(2004), 1111-1239; armações com base em aminoácido de açúcar tais como aquelas descritas e descritas por exemplo, em Chakraborty *et al.*, Comb. Chem. High Throughput Screen. 5(2002), 373-387; beta-peptidomiméticos de tipo grampo tais como aqueles descritos e descritos por exemplo, em Robinson, Acc. Chem. Res. 41(2008), 1278-1288; miméticos alfa-helicoidais, miméticos de folha beta/posição beta e miméticos de volta beta tais como aqueles descritos e descritos por exemplo, em Hershberger *et al.*, Curr. Top. Med. Chem. 7(2007), 928-924 e ciclotídeos tais como aqueles descritos e descritos por exemplo, em Jagadish e Camarero, Biopolymers 94(2010), 611-616. Nas modalidades preferidas, os ligadores/espaçadores químicos não são positivamente carregados.

6.6 Conjugados de BAM

[0067] Como aqui detalhado, as moléculas e compostos da invenção compreendendo ou consistindo das moléculas, peptídeos e/ou polipeptídeos de acordo com as sequências de consenso e estruturas de (i) a (x) são consideradas nas modalidades preferidas para funcionar como porções transportadoras capazes de especificamente transportar moléculas/ porções de carga associadas. Nas modalidades preferidas, as moléculas e compostos da invenção compreendem ou consistem das sequências e/ou estruturas de acordo com qualquer uma das sequências de consenso de (i) a (x) conjugados ainda a uma porção biologicamente ativa (BAM); a estrutura é aludida como um conjugado de BAM por todo este pedido. A BAM é qualquer porção conhecida ou esperada exibir um efeito terapêutico quando administrado a um organismo, ou quando introduzido em uma célula, *in vitro* ou *in vivo*. Nas modalidades preferidas, os compostos da invenção compreendem ou consistem em um conjugado de BAM, tendo um BAM conjugado no terminal de uma sequência ou estrutura de consenso de (i) a (x) como aqui descrita. Portanto, nesta modalidade preferida, o conjugado de BAM tem uma estrutura de consenso de acordo com as seguintes estruturas de consenso de (xi) a (xiv), ou os reversos das mesmas:

(xi) (BAM)-(LINK)-Arg₁-(SP_A)-Arg₅-(SP_B)-X-(SP_C)-Arg₉-(LD₁₀)_n-(XD₁₁)_m;

(xii) (BAM)-(LINK)-Arg₁-(SP_C)-X-(SP_B)-Arg₅-(SP_A)-Arg₉-(LD₁₀)_n-(XD₁₁)_m;

(xiii) (XD₋₂)_m-(LD₋₁)_n-Arg₁-(SP_A) Arg₅-(SP_B)-X-(SP_C)-Arg₉-(LINK)-(BAM); ou

(xiv) (XD₋₂)_m-(LD₋₁)_n-Arg₁-(SP_C)-X-(SP_B)-Arg₅-(SP_A)-Arg₉-(LINK)-(BAM)

em que (BAM) representam uma porção biologicamente ativa; em que (LINK) representa um grupo ligador opcional; em que, LD₁₀ ou LD₋₁

representam qualquer aminoácido L ou D outro que não D-arginina, D-lisina; L-arginina ou L-lisina e n tem um valor de 0 a 10; em que XD₁₁ ou XD₂ representam qualquer aminoácido D outro que não D-arginina ou D-lisina e m tem um valor de 0 ou 1;

em que

(a) Arg₁, Arg₅, e Arg₉ representa L-arginina; e X representa L-lisina ou L-arginina, ou

(b) Arg₁, Arg₅, e Arg₉ representa D-arginina; e X representa D-lisina ou D-arginina;

em que (SP_A) representa um ligador químico que

(a) consiste em uma cadeia de peptídeo de 3 resíduos de aminoácido, em que cada resíduo pode ser independentemente selecionado de qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; ou

(b) separa os resíduos de aminoácido adjacentes em 12,9 + 1,5 Å;

em que (SP_C) representa um ligador químico que

(a) consiste em um único resíduo de aminoácido que pode ser qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; ou

(b) separa os resíduos de aminoácido adjacentes em 7,5 + 1,5 Å quando a molécula está na conformação prolongada;

e em que (SP_B)-X-(SP_C) ou seu reverso, (SP_C)-X-(SP_B) representam um ligador químico

(a) em que SP_B e SP_C cada um representa um único resíduo de aminoácido que pode ser independentemente selecionado de qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; ou

(b) que separa os resíduos de aminoácido adjacentes Arg₁ e Arg₅ ou Arg₅ e Arg₉ em 12,9 + 1,5 Å quando a construção está na

conformação prolongada.

6.6.1 O Grupo de Ligação Opcional

[0068] As sequências de consenso de (xi) a (xiv) são idênticas às sequências de consenso de (iii) a (vi), respectivamente, exceto quanto à presença da porção BAM e do grupo ligador opcional, (LINK). Portanto, a seleção dos espaçadores químicos (SP_A), (SP_B) e (SP_C), que pode consistir em ou compreender exclusivamente resíduos de aminoácido ou compreender tanto ligadores químicos quanto resíduos de aminoácido como aqui descritos) processa-se como aqui descrito com respeito às sequências de consenso de (iii) a (vi), incluindo

- a seleção destes espaçadores químicos para consistir em ou compreender exclusivamente resíduos de aminoácido de acordo com as modalidades (e combinações dos mesmos) das sequências de consenso (i) e (ii) como detalhado por toda esta descrição, e
- a seleção destes espaçadores químicos para compreender tanto ligadores químicos quanto resíduos de aminoácido de acordo com as modalidades (e combinações dos mesmos) de estruturas de consenso de (vi) a (x) como detalhado por toda esta descrição.

[0069] O grupo de ligação opcional (LINK) pode ser um ligador peptídico. Se sequências ligadoras peptídicas são usadas, as sequências ligadoras preferivelmente formam uma sequência flexível de 2 a 10 resíduos, mais preferivelmente de 1 a 5 resíduos. Em uma modalidade preferida, a sequência ligadora contém pelo menos 20%, mais preferivelmente pelo menos 40% e ainda mais preferivelmente pelo menos 50% de resíduos Gly ou β -alanina. Os exemplos não limitantes de grupos de ligação incluem, GlyGlyGlyGlyGly (SEQ ID NO: 23), GlyGlyGlyGly (SEQ ID NO: 24), GlyGlyGly, CysGlyGly ou GlyGlyCys, etc. As sequências ligadoras apropriadas são bem conhecidas e podem ser facilmente selecionadas e preparadas por uma pessoa versada na técnica. O grupo ligador opcional pode

ser composto de aminoácidos D, aminoácidos L, e/ou combinações dos mesmos.

[0070] Alternativamente, a BAM e a porção transportadora podem ser ligados pela ligação química em qualquer maneira adequada conhecida na técnica ou aqui descrita, tal como métodos de reticulação. Entretanto, atenção é dada para o fato de que muitos métodos de reticulação química conhecidos não são específicos, isto é, eles não direcionam o ponto de ligação a nenhum sítio particular na porção carregador/transportador ou na porção de carga (por exemplo, BAM). Assim, o uso de agentes de reticulação não específica pode atacar sítios funcionais ou estericamente bloquear sítios ativos, tornando um ou ambos dos componentes BAM/transportador da molécula do conjugado de BAM inventiva biologicamente inativos. É recorrido ao conhecimento do técnico habilitado para bloquear potencialmente grupos reativos pelo uso de grupos de proteção apropriados. Alternativamente, o uso das técnicas de ligação de oxima e hidrazona poderosas e versáteis, que são entidades quimiosseletivas que podem ser aplicadas para a reticulação de componente (a) para o componente (B), pode ser utilizado. Esta tecnologia de ligação é descrita, por exemplo, por Rose *et al.* (1994), JACS 116, 30.

[0071] A especificidade de ligação também pode ser aumentada pela ligação química direta a um grupo funcional encontrado apenas uma vez ou umas poucas vezes no componente BAM e a porção transportadora. A ligação dos dois componentes da molécula do conjugado de peptídeo inventiva pode ser realizada por intermédio de um agente de ligação ou conjugação como é conhecido na técnica, incluindo a síntese de (poli-) peptídeo padrão que liga reagentes tais como HOBt, HBTU, DICl, TBTU. Existem vários reagentes de reticulação intermolecular que podem ser utilizados, ver, por exemplo, Means e Feeney, Chemical Modification of Proteins, Holden-Day, 1974, pp. 39-43. Estes reagentes incluem, mas não são limitados a, 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidila (SPDP) ou N,N'-(1,3-fenileno) bismaleimida; N,N'-

etileno-bis-(iodoacetamida) ou outro tal reagente tendo de 6 a 11 carbonos de metileno ligados em ponte; e 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno. Outros reagentes de reticulação úteis para este propósito incluem, mas não são limitados a: p,p'-difluoro-m,m'-dinitrodifenilsulfona; adipimidato de dimetila; cloreto de fenol-1,4-dissulfonila; diisocianato ou diisotiocianato de hexametileno, ou azofenil-p-diisocianato; glutaraldeído e disdiazobenzidina. Os reagentes de reticulação também podem ser homobifuncionais, isto é, tendo dois grupos funcionais que sofrem a mesma reação. Um reagente de reticulação homobifuncional preferido é bismaleimidohexano (BMH). BMH contém dois grupos funcionais de maleimida, que reagem especificamente com compostos contendo sulfidrilas sob condições brandas (pH 6,5 a 7,7). Os dois grupos maleimida são conectados por uma cadeia de hidrocarboneto. Portanto, BMH é útil para a reticulação irreversível de proteínas (ou polipeptídeos) que contêm resíduos de cisteína. Os reagentes de reticulação também podem ser heterobifuncionais. Os agentes de reticulação heterobifuncionais têm dois grupos funcionais diferentes, por exemplo um grupo reativo em amina e um grupo reativo em tiol, que reticulará duas proteínas tendo aminas e tiois livres, respectivamente. Os exemplos não limitantes de agentes de reticulação heterobifuncionais são 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidila (SMCC), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida (MBS), e 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimida (SMPB), um análogo de cadeia prolongada de MBS. O grupo succinimidila destes reticuladores reage com uma amina primária, e a maleimida reativa em tiol forma uma ligação covalente com o tiol de um resíduo de cisteína. Porque os reagentes de reticulação frequentemente têm solubilidade baixa em água, uma porção hidrofílica, tal como um grupo sulfonato, pode ser adicionada ao reagente de reticulação para melhorar a sua solubilidade em água. Sulfo-MBS e sulfo-SMCC são exemplos de reagentes de reticulação modificados quanto à

solubilidade em água. Muitos reagentes de reticulação produzem um conjugado que essencialmente não é clivável sob condições celulares, o que não seria preferido. Portanto, alguns reagentes de reticulação contêm uma ligação covalente, tal como um dissulfeto, que é clivável sob condições celulares. Por exemplo, reagente de Traut, ditiobis(propionato de succinimidila) (DSP), e 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidila (SPDP) são reticuladores cliváveis bem conhecidos. O uso de um reagente de reticulação clivável permite que a porção de carga, por exemplo, BAM, separe da nova porção transportadora depois da liberação na célula alvo. Para este propósito, a ligação de dissulfeto direta também pode ser útil. A reticulação química também pode incluir o uso de ramificações espaçadoras. As ramificações espaçadoras fornecem flexibilidade intramolecular ou ajusta as distâncias intramoleculares entre porções conjugadas e deste modo podem ajudar a preservar a atividade biológica. Uma ramificação espaçadora pode estar na forma de uma porção de proteína (ou polipeptídeo) que inclui aminoácidos espaçadores, por exemplo, prolina. Alternativamente, uma ramificação espaçadora pode ser parte do reagente de reticulação, tal como em “SPDP de cadeia longa” (por exemplo, Pierce Chem. Co., Rockford, Ill., cat. No. 21651 H). Numerosos reagentes de reticulação, incluindo aqueles debatidos acima, são comercialmente disponíveis. As instruções detalhadas para o seu uso são facilmente disponíveis a partir de fornecedores comerciais. Uma referência geral sobre a reticulação de proteína e preparação de conjugado é: Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Reticulation*, CRC Press (1991).

[0072] Será avaliado que os componentes diferentes da molécula conjugada de BAM devem ser ligados em uma maneira de modo que os componentes diferentes possam ainda conduzir pelo menos parte da sua atividade e/ou propriedades individuais para a molécula conjugada com a carga transportadora inteira. Por exemplo, a ligação dos componentes

preferivelmente não deve levar a uma perda total no alveijamento para C4S.

6.6.2 A Porção BAM

[0073] A invenção abrange qualquer BAM conhecido ou esperado ser um componente terapeuticamente ativo para o tratamento ou prevenção de uma doença, distúrbio ou condição, ou melhora de um sintoma do mesmo, por exemplo, tal como compostos químicos, proteínas, lipossomas, nanopartículas e (poli-)peptídeos. Adicional ou alternadamente, a BAM pode ser um marcador detectável de uso no diagnóstico de uma doença ou condição tal como um corante fluorescente, um rótulo radioativo ou um grupo quimioluminescente.

A. Drogas Citotóxicas

[0074] Preferivelmente a BAM do “conjugado de BAM” da invenção é uma droga farmacêutica, por exemplo, selecionado de drogas citotóxicas ou antitumor que são adequados como uma droga de quimioterapia. No geral, as drogas de quimioterapia adequadas para o componente (B) podem ser divididas em três categorias principais com base no seu mecanismo de ação. Elas podem

(a) parar a síntese de blocos de construção de molécula pré-DNA. Estes agentes trabalham em vários modos diferentes. Os blocos de construção de DNA são ácido fólico, bases heterocíclicas, e nucleotídeos, que são fabricados naturalmente dentro das células. Todos estes agentes trabalham para bloquear alguma etapa na formação de nucleotídeos ou desoxirribonucleotídeos (necessários para fabricar DNA). Quando estas etapas são bloqueadas, os nucleotídeos, que são os blocos de construção de DNA e RNA, não podem ser sintetizados. Assim, as células não podem replicar porque elas não podem fabricar DNA sem os nucleotídeos. Os exemplos de drogas nesta classe incluem metotrexato (Abitrexate®), fluorouracila (Adrucil®), hidroxiureia (Hydrea®), e mercaptopurina (Purineto®), tioguanina, tocoferol, ou, mais no geral, qualquer análogo de

nucleotídeo, por exemplo, análogos de 2'-desoxicitidina;

(b) danificar diretamente o DNA no núcleo da célula. Estes agentes quimicamente danificam DNA e RNA. Eles rompem a replicação do DNA e totalmente param a replicação ou causam a fabricação de DNA ou RNA sem sentido (isto é, o novo DNA ou RNA não codifica nada útil). Os exemplos de drogas nesta classe incluem cisplatina (Platinol®) e antibióticos - daunorrubicina (Cerubidine®), doxorrubicina (Adriamicina®) pertencente à classe de agentes antitumor de antraciclina e etoposida (VePesid®) ou qualquer intercalador; são incluídos ainda radionuclídeos (por exemplo, alfa-radionuclídeos) habitualmente usados no tratamento contra o câncer alvo (por exemplo, Bismuto-213); ou

(c) efeito da síntese ou ruptura dos fusos mitóticos. Os fusos mitóticos servem como estradas moleculares com “Polos Norte e Sul” na célula quando uma célula começa a se dividir a si mesma em duas novas células. Estes fusos são muito importantes porque eles ajudam a dividir o DNA recém copiado tal que uma cópia vai para cada uma das duas novas células durante a divisão celular. Estas drogas rompem a formação destes fusos e portanto interrompem a divisão celular. Os exemplos de drogas nesta classe de rompedores mitóticos incluem: Vinblastina (Velban®), Vincristina (Oncovin®) e Paclitaxel (Taxol®).

[0075] A BAM do “conjugado de BAM” da invenção pode atuar de acordo com um dos modos acima de ação. Em outros termos, cada uma das classes de drogas antitumor, isto é, agentes de alquilação, nitrosoureas, antimetabólitos, alcaloides vegetais, antibióticos antitumor, e hormônios esteroides podem ser usados como componente da BAM da molécula conjugada de carga transportadora inventiva. Para descrever estas classes de droga em mais detalhes é enfatizado que cada droga anticâncer também pode ser categorizada de acordo com o seu efeito sobre o ciclo celular e química celular como descrito acima. Os agentes de alquilação matam as células pelo

ataque direto ao DNA.

[0076] Os agentes de alquilação podem ser usados, em particular, no tratamento de leucemias crônicas, doença de Hodgkin, linfomas, e certos carcinomas do pulmão, mama, próstata e ovário. A ciclofosfamida é um exemplo de um agente de alquilação habitualmente usado. Nitrosoureas atuam de modo similar aos agentes de alquilação e também inibem as mudanças necessárias para o reparo do DNA. Estes agentes cruzam a barreira hematoencefálica e são, portanto, usados para tratar tumores cerebrais, linfomas, mieloma múltiplo, e melanoma maligno. A carmustina e a lomustina são as drogas principais nesta categoria. Os antimetabólitos são drogas que bloqueiam o crescimento de célula pela interferência com certas atividades, usualmente a síntese de DNA. Uma vez ingeridos pela célula eles param o desenvolvimento e reprodução normais. As drogas nesta categoria afetam a célula durante a fase “S” do ciclo celular. Antimetabólitos podem ser usados no tratamento de leucemias agudas e crônicas, coriocarcinoma, e alguns tumores do trato gastrointestinal, mama e ovário. Os exemplos não limitantes de antimetabólitos habitualmente usados são 6-mercaptopurina e 5-fluorouracila (5FU). Os antibióticos antitumor são um grupo diverso de compostos. No geral, eles atuam pela aglutinação com DNA e prevenindo a síntese de RNA. Estes agentes são amplamente usados no tratamento de uma variedade de cânceres. As drogas mais habitualmente usadas neste grupo são doxorubicina (Adriamicina), mitomicina-C, e bleomicina. Os alcaloides vegetais (vinca) são agentes antitumor derivados de plantas. Estas drogas atuam especificamente pelo bloqueio da divisão celular durante a mitose. Eles são habitualmente usados no tratamento da leucemia linfoblástica aguda, linfomas de Hodgkin e de não Hodgkin, neuroblastomas, tumor de Wilms, e cânceres do pulmão, mama e testículos. Vincristina e vinblastina são agentes habitualmente usados neste grupo. Os hormônios esteroides são úteis no tratamento de alguns tipos de tumores. Esta classe inclui

adrenocorticosteroides, estrogênios, antiestrogênios, progesteronas e androgênios. Embora seu mecanismo específico de ação não esteja claro, os hormônios esteroides modificam o crescimento de certos cânceres dependentes de hormônio. Tamoxifeno é um exemplo, que é usado para o câncer de mama dependente de estrogênio. Todas as espécies de tumor mencionadas acima podem ser tratadas pelas moléculas de conjugado de BAM inventivas compreendendo como a BAM qualquer um dos agentes antitumor acima.

[0077] Um grupo de drogas citotóxicas ou antitumor, que pode ser usado como o componente de BAM do “conjugado de BAM” da invenção é selecionado de drogas alquilantes, antimetabólicos, citostáticos ou drogas relacionadas com tratamento hormonal. Neste contexto, é preferido selecionar como drogas citotóxicas ou antitumor compostos de metal, em particular das classes da platina (derivado) e taxol. Em particular, a porção de droga é selecionada do grupo de drogas consistindo, por exemplo, em cisplatina, transplatina, satraplatina, oxaliplatina, carboplatina, nedaplatina, clorambucila, ciclofosfamida, mefalan, azatioprin, fluorouracila, (6)-mercaptopurina, metrexato, nandrolona, aminoglutemida, medroxiprogesterona, acetato de megestrol, procarbazona, docetaxel, paclitaxel, irinotecano, epipodofilotoxina, podofilotoxina, vincristina, vinblastina, docetaxel, daunomicina, daunorrubicina, doxorubicina, mitoxantrona, topotecano, bleomicina, gencitabina, fludarabina, navelbina e 5-FUDR. Particularmente preferida é a classe de drogas anticâncer contendo metal, por exemplo, a classe dos compostos de platina.

[0078] Outros drogas citotóxicas ou antitumor, que podem ser usados como o componente de BAM do “conjugado de BAM” da invenção são Alitretinoína, Altretamina, Azatioprina, Bicalutamida, Busulfan, Bortezomib, Capecitabina, Carfilzomib, Ciclofosfamida, Exemestano, Letrozol, Finasterida, Fostamatinib, Gefitinib, Imatinib, Lenalidomida, Marizomib,

Acetato de Megestrol, Nilotinib, Triptorelin, Temozolomida, Mifepristone, Tretinoína, Tamoxifeno, Teniposida, sulfato de peplomicina ou a classe de camptotecinas.

[0079] Outras drogas citotóxicas ou antitumor que podem ser usadas como o componente de BAM do “conjugado de BAM” da invenção são radionuclídeos (por exemplo, radionuclídeos que emitem partículas alfa) tais como aqueles habitualmente usados nas terapias de câncer alvo bem conhecidas na técnica. Os exemplos não limitantes de tais radionuclídeos que podem ser de uso de acordo com a invenção incluem Molibdênio-99, Tecnécio-99m, Bismuto-213, Cromo-51, Cobalto-60, Cobre-64, Disprósio-165, Érbio-169, Hólmio-166, Iodo-125, Iodo-131, Irídio-192, Ferro-59, Lutécio-177, Paládio-103, Fósforo-32, Potássio-42, Rênio-186, Rênio-188, Samário-153, Selênio-75, Sódio-24, Estrôncio-89, Xenônio-133, Itérbio-169, Itérbio-177, Ítrio-90, Radioisótopos de cézio, ouro e rutênio. Também são incluídos Radioisótopos de Ciclotron tais como Carbono-11, Nitrogênio-13, Oxigênio-15, Flúor-18, Cobalto-57, Gálio-67, Índio-111, Iodo-123, Criptônio-81m, Rubídio-82, Estrôncio-92, Tálcio-201. Alternativa ou adicionalmente, qualquer um dos exemplos não limitantes acima também pode ser implementado para usos em diagnóstico ou formação de imagem.

[0080] Um outro grupo de drogas citotóxicas ou antitumor que pode ser usado como o componente BAM do “conjugado BAM” da invenção são compostos de indolocarbazol, por exemplo, estaurosporina (e seus análogos) e rebecamicina. Deve ser mencionado que os compostos pertencentes à classe de anilinoquinazolininas (por exemplo, gefitinib) são também particularmente preferidos como o componente BAM dos conjugados de BAM da invenção.

[0081] Um outro grupo de drogas citotóxicas ou antitumor que pode ser usado como o componente BAM do “conjugado de BAM” da invenção pode ser selecionado de inibidores das topoisomerasas, tais como irinotecano, ou cinesinas mitóticas ou DHFR.

[0082] Adicionalmente, drogas citotóxicas ou antitumor, que podem ser usadas como o componente de BAM do “conjugado de BAM” da invenção podem ser selecionados de fatores inibidores ou estimuladores da proliferação celular (PDGF), caminhos intracelulares, por exemplo, o caminho da sinalização de RAS/RAF, tal como um membro do caminho de sinalização de RAF/MEK/ERK (por exemplo, RAF-1) ou caminho da cinase de proteína ativado por mitógeno, família da CMGC cinase (contendo CDK (cinases dependentes de ciclina), MAPK, GSK3, CLK), Ser/Thr cinases que pertencem à família da AGC cinase contendo as famílias de PKA, PKG, PKC cinases, tirosina cinases receptoras envolvidas, por exemplo, na neovascularização e progressão de tumor, incluindo o receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR)-2, VEGFR-3, receptor β do fator de crescimento derivado de plaqueta, Flt-3, o sistema de endotelina (ET), que inclui ET-1, ET-2, ET-3, e o receptor ETA (ETAR) e ETBR, e c-KIT, que são alvejados, por exemplo, pela inibição da sua função, e membros da família de IGF, tal como IGF-1, IGF-2, IGF-1 R, IGF2R, etc.

[0083] Um outro grupo de drogas citotóxicas ou antitumor, que podem ser usadas como o componente BAM do “conjugado transportador de BAM” da invenção pode ser selecionado de inibidores que alvejam a proliferação de célula de tumor e angiogênese de tumor. Particularmente preferido neste contexto são os inibidores da cinase antitumor de molécula pequena direcionada para alvos nas células malignas e/ou células vasculares tendo atividade antiangiogênica. Os inibidores da cinase tais como aqueles direcionados para EGFR, Her2/neu, BCR-ABL, c-KIT, PKC, Raf e PI3, são antiangiogênicos em virtude de bloquear a secreção de fatores angiogênicos pelas células malignas afetadas. Inibidores da cinase tais como aqueles direcionados para VEGFR2, VEGFR1, PDGFR, PKC, Raf e PI3, são antiangiogênicos pelos efeitos sobre as células vasculares. Os exemplos de inibidores sintéticos de cinases dependentes de ciclina (CDKIs) são, por

exemplo, olomoucina, flavopiridol, butirolactona e seus derivados e assim restringem a proliferação de célula de tumor. Por outro lado, compostos antitumor adequados como o componente BAM da molécula do conjugado de peptídeo/conjugado de BAM inventiva podem ser selecionados de ativadores de programas de apoptose em células cancerosas (por exemplo, estaurosporina) ou pela infra-regulagem de proteínas antiapoptóticas, por exemplo, Bcl-2.

6.7 As Posições Livremente Seleccionáveis

[0084] Como aqui debatido, quando a estrutura de consenso da molécula ou composto da invenção de acordo com as estruturas de (iii) a (vi) consistem ou compreendem exclusivamente resíduos de aminoácido, a porção alvejadora que especificamente interage com C4S é representada pela sequência

Arg₁-X₂-X₃-X₄-Arg₅-X₆-X₇-X₈-Arg₉

(SEQ ID NO: 21, submetida às regras da SEQ ID NO: 17 ou SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 22, submetida às regras da SEQ ID NO: 19 ou SEQ ID NO: 20)

[0085] Como aqui detalhado, as posições 2, 4, 6, 8 e (3 (onde a posição 7 é definida como uma D- ou L- arginina ou lisina de acordo com as regras aqui apresentadas) ou 7 (onde a posição 7 é definida como uma D- ou L- arginina ou lisina de acordo com as regras aqui apresentadas)) têm pouco efeito sobre a aglutinação específica dos compostos da invenção a um proteoglicano C4S, assim estas posições são aqui aludidas como livremente seleccionáveis. Como aqui mencionado, o uso dos aminoácidos arginina ou lisina carregados é evitado, visto que estes tendem a aumentar a probabilidade de interações não específicas com proteoglicanos, no geral.

[0086] Adicionalmente, acredita-se que as porções alvejadoras exibam especificidade para C4S devido ao arranjo linear ideal de argininas nas posições 1, 5, 9 e uma arginina ou lisina nas posições 3 ou 7, assim, os aminoácidos remanescentes são preferivelmente selecionados de modo a

evitar a indução de estruturas 3-dimensionais tais como, por exemplo, hélices α . A propensão para a formação de hélice α para cada um dos aminoácidos peptídicos que ocorrem naturalmente é conhecida, por exemplo, de Chakrabartty *et al.*, Protein Sci. 3(1994), 843-852, a classificação do potencial de hélice α de mais alto para mais baixo é como segue:

Ala > Arg⁺ > Leu > Lys⁺ > Glu^o > Met > Gln > Glu⁻ > Ile > Tyr > His^o > Ser > Cys > Asn > Asp⁻ > Asp > Trp > Phe > Val > Thr > His⁺ > Gly > Pro

[0087] Assim, é preferido que não mais do que 3 aminoácidos com uma alta probabilidade de formar uma hélice α sejam usados nas posições livremente selecionáveis. Consequentemente, nas modalidades preferidas, não mais do que 3 alaninas sejam usadas nas posições livremente selecionáveis. Em outras modalidades preferidas adicionais ou alternativas, a prolina não deve ser usada na posição livremente selecionável.

[0088] É preferido ainda que as posições livremente selecionáveis sejam aminoácidos volumosos e/ou hidrofóbicos. Visto que tais aminoácidos podem ajudar na inserção de membrana e penetração de célula (ver, por exemplo, Rothbard, Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications. Lanel Ü (Ed), CRC Press (2000)). Assim, nas modalidades preferidas em que a molécula ou composto da invenção consistem ou compreendem uma sequência de acordo com as sequências de consenso (i) ou (ii), as posições livremente selecionáveis, 2, 4, 6, 8 e (3 (onde a posição 7 é definida como uma D- ou L- arginina ou lisina de acordo com as regras aqui apresentadas) ou 7 (onde a posição 7 é definida como uma D- ou L- arginina ou lisina de acordo com as regras aqui apresentadas) são independentemente selecionadas de Phe, Trp, Tyr, Val, Met, Ile e Leu.

[0089] É conhecido que os aminoácidos D realçam a resistência às proteases e/ou outros meios de degradação de proteína. Assim, em outras modalidades preferidas, a posição 4 ou posição 6 são um aminoácido D.

[0090] Também é mencionado que a sequência de consenso dos

compostos da invenção contêm resíduos de aminoácido opcionais que atuam como uma esponja de próton. Nas sequências de consenso de (i) a (xiv), $(XD_{11})_m$ ou $(XD_{-2})_m$ e $(LD_{10})_n$ ou $(LD_{-1})_n$, em que m é 0 ou 1 e n é de 0 a 10, representa os aminoácidos opcionais da esponja de próton. Os resíduos da esponja de próton podem ser selecionados dentre qualquer resíduo ou combinação de resíduos que é(são) conhecido(s) na técnica ou aqui descrito(s) capaz(es) de atuar como uma esponja de próton. Nas modalidades preferidas, XD_{11} ou XD_{-2} representam qualquer D- aminoácido outro que não D- arginina ou D- lisina (se o resíduo estiver presente) e LD_{10} ou LD_{-1} representam qualquer aminoácido L ou D outro que não L- ou D- arginina ou L- ou D- lisina (se o(s) resíduo(s) estiver(em) presente(s)). Nas modalidades mais preferidas, XD_{11} ou XD_{-2} representam D-histidina (se o resíduo estiver presente) e LD_{10} ou LD_{-1} representam L- ou D- histidina (o(s) resíduo(s) estiver(em) presente(s)). Como é reconhecido na técnica, o acúmulo de resíduos de aminoácido específicos (por exemplo, histidina) dentro das vesículas ácidas tais como um endossoma produz o efeito de esponja de proteína. Por exemplo, o anel de imidazol de histidina é uma base fraca que tem a capacidade para adquirir uma carga catiônica quando o pH do ambiente cai abaixo de 6, que pode promover ainda a fusão de membrana e escape de endossoma.

[0091] É expressamente considerado que as modalidades descritas nesta seção e por todo esse pedido, sejam identificadas como preferidas (incluindo as mais preferidas) ou não, podem ser independentemente implementadas ou podem ser combinadas com as outras modalidades descritas no planejamento ou seleção de um composto da invenção. Portanto, a sequência de consenso e/ou porção alvejadora do composto podem opcionalmente satisfazer nenhuma, uma, ou mais do que uma das modalidades esboçadas nesta seção e/ou por todo o pedido. Como um exemplo não limitante de tal combinação, as posições livremente

selecionáveis pode cada uma ser independentemente selecionada de Phe, Trp, Tyr, Val, Met, Ile e Leu, a posição 4 pode ser um aminoácido D, n de $(LD_{10})_n$ pode ser 0 e m de $(XD_{11})_m$ pode ser 1.

[0092] A nova configuração de aminoácido D/L e/ou a nova combinação de ligadores/espaçadores químicos e/ou a combinação dos compostos da invenção permitem que uma pessoa habilitada defina a persistência *in vivo* ou *in vitro* da molécula ou composto inventivos como definido acima na célula, especificamente, com uma meia-vida que intimamente se iguale à meia-vida, por exemplo, da BAM a ser administrada na célula ou núcleo antes da degradação da construção transportadora pelas proteases.

[0093] No contexto da presente invenção, variantes e/ou fragmentos de peptídeos e/ou polipeptídeos preferivelmente compreendem ou consistem em uma sequência de (poli-)peptídeo tendo pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, ou 85%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95% e o mais preferivelmente pelo menos 99% de identidade de sequência em relação ao comprimento inteiro da sequência dos (poli-)peptídeos expressamente aqui descritos e submetidos às regras para a seleção da(s) sequência(s) de consenso.

6.8 Uso de Compostos da Invenção

[0094] As sequências de consenso de (i) a (x) da invenção são consideradas como porções transportadoras que efetuam o transporte através da membrana celular e dentro do citoplasma e/ou núcleo de uma célula. É comum a todos dos compostos terapêuticos (isto é, BAMs) aqui descritos que eles têm que cruzar a membrana celular de modo a atuar como drogas anticâncer. Ligando-se os compostos pertencentes a estas classes (os compostos que diretamente danificam o DNA no núcleo da célula, efetuando a síntese ou ruptura dos fusos mitóticos ou interrompendo a síntese de blocos de construção da molécula pré-DNA) às sequências de consenso de (i) a (x)

da invenção, a entrada dos compostos anticâncer dentro da célula é realçada e/ou a sua solubilidade é realçada, aumentando deste modo a eficácia destes compostos terapêuticos. Por sua vez, a recepção pela célula aumentada e, preferivelmente, melhor solubilidade destes compostos no ambiente aquoso (por exemplo, o citossol) permite diminuir a dosagem do composto anticâncer terapêutico pode ser obtido.

[0095] As sequências de consenso das porções alvejadoras dos compostos alvo da invenção, em particular, o proteoglicano C4S. Estes proteoglicanos são preferencialmente expressados em conjunção com as proteínas de superfície, por exemplo, CD68, de leucócitos. De fato, é provável que os leucócitos não expressem nenhuma outra forma de proteoglicano. Consequentemente, as moléculas e compostos da invenção permitem o alveijamento específico de leucócitos. Portanto, as moléculas, compostos e métodos da invenção facilitam a liberação eficiente de porções de carga, por exemplo, BAMs, aos leucócitos e fornece um meio geral de seletividade liberando uma substância de interesse em um leucócito. Assim, é preferido que a BAM a ser conjugada à porção transportadora seja qualquer substância que a pessoa versada na técnica sabe ou espera exerça um efeito sobre a atividade de leucócito, incluindo efeitos terapêuticos (tais como tratar, prevenir, atenuar ou melhora de uma doença), ou para o propósito de rotular leucócitos tais como para propósito de diagnóstico ou para o propósito de pesquisa científica. De interesse particular é o alveijamento de células de mieloide.

[0096] Os conjugados de BAM da invenção podem ser usados para o tratamento, melhora, profilaxia, ou diagnóstico de uma ampla faixa de doenças ou condições em que os leucócitos têm um envolvimento fisiopatológico. As condições exemplares não limitantes envolvendo a disfunção de leucócito primário ou secundário incluem: neutrofilia, neutropenia, leucopenia, basopenia, basofilia, eosinopenia, eosinofilia,

síndrome hipereosinofílica idiopática, leucocitose linfocítica, linfocitose, linfocitopenia, monocitose, monocitopenia, Anomalia de May Hegglin, Anomalia de Pelger-Huet, Anomalia de Alder-Reilly, síndrome de Chedial-Higashi, síndrome de Job (hiper-IgE), síndrome do leucócito preguiçoso, deficiência de C3 congênita, doença granulomatosa crônica, leucócito, deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase, deficiência de mieloperoxidase benigna, doença da imunodeficiência combinada severa, síndrome de DiGeorge, síndrome de Nezelof, agamaglobulinemia infantil ligada ao sexo, hipogamaglobulinemia comum variável, mucopolissacaridose, lipodoses, doença de Gaucher, doença de Niemann-pick, doença de Fabry, doença de Farber, gangliosidoses; Tay Sachs, doença de Sandhoff, doença de Krabbe, leucodistrofia metacromática, doença de Wolman, leucemia, leucemia linfocítica aguda (L1, L2, L3), leucemia linfocítica crônica, todas as formas de leucemia mielógena aguda (AML), incluindo AML não diferenciado (M0), leucemia mieloblástica (M1), leucemia mieloblástica, (M2), leucemia promielocítica, (M3), leucemia mielomonocítica (M4), leucemia monocítica (M5), eritoleucemia (M6), leucemia megacarioblástica, (M7), leucemia mielógena crônica assim como leucemias agudas não diferenciadas ou bifenotípicas (leucemias que tem características tanto linfocíticas quanto mieloides), e todas as formas de linfomas incluindo linfoma de Hodgkin, linfoma de célula T, linfoma de célula B, linfoma linfoplasmacítico, macroglobulinemia de Waldenström, mieloma múltiplo, e linfoma folicular.

[0097] Os conjugados de BAM da invenção são de uso, adicional ou alternativamente, no tratamento de doenças em que a etiologia é primariamente a disfunção de células mieloide ou linfoide. Os exemplos não limitantes de tais doenças incluem as várias formas de leucemia mielógena aguda (AML), em particular, Leucemia Linfoblástica Aguda, Leucemia Mieloblástica Aguda, Leucemia Mielógena Aguda, Leucemia Mieloide

Aguda, Leucemia Promielocítica Aguda, Leucemia Não diferenciada Aguda, Leucemia linfocítica crônica de célula B, Leucemia (aguda) de célula B, Leucemia linfocítica crônica, Leucemia Mielocítica Crônica, Leucemia Mieloide, Leucemia pré célula B, Leucemia de célula T, Leucemia Linfoblástica Aguda de célula T, Leucemia de célula T (em carcinoma pulmonar), Leucemia de célula T Cutânea, Leucemia Monocítica Humana, Leucemia de Mastoide, Leucemia de Ligação Mista, leucemia de célula pilosa, leucemia prolinfocítica de célula T, leucemia linfocítica granular grande, leucemia de célula T no adulto, e todas as formas de linfomas incluindo linfoma de Hodgkin, linfoma de célula T, linfoma de célula B, linfoma linfoplasmacítico, macroglobulinemia Waldenström, mieloma múltiplo, e linfoma folicular.

[0098] As condições exemplares envolvendo a disfunção de leucócito secundária incluem infecções por qualquer um dos seguintes patógenos: HIV, Vírus Epstein Barr, Morbilivírus (sarampo), Paramixovírus, Rubivírus, Vírus do Herpes Tipo 6, Vírus do Herpes, Vírus da Dengue, Vírus Simples do Herpes 1, Vírus Simples do Herpes 2, Parvovírus, Vírus Sincicial Respiratório, Vírus da Varíola, Varicela, Flavivírus, Vírus Linfotrópico T Humano Tipo 1, Vírus Linfotrópico T Humano Tipo 2, Vírus Linfotrópico T Humano Tipo 3, Vírus Linfotrópico T Humano Tipo 4, Vírus da Hepatite A, Vírus da Hepatite B, Vírus da Hepatite C, Vírus da Hepatite D, Vírus da Hepatite E, Vírus Lassa, Influenza A, Vírus da Influenza A, Influenza B, ou Influenza C Subtipos H1N1 e H3N2 ou protozoários Tripanossomatídeo, incluindo Leishmaniose. Mais preferivelmente, a doença envolvendo a disfunção de leucócito secundário é a infecção pelo HIV e AIDS ou leishmaniose.

[0099] As condições e doenças exemplares que podem ser tratadas, prevenidas, atenuadas ou melhoradas pela modulação da atividade de leucócito incluem condições inflamatórias agudas ou crônicas, incluindo

doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD). Artrite reumatoide (RA), artrite psoriática, doença intestinal inflamatória, psoríase, lupo, asma, reações alérgicas, e doenças autoimunes, incluindo mas não limitadas à Encefalomielite disseminada aguda (ADEM), doença de Addison, Agamaglobulinemia, Alopecia areata, Esclerose Lateral Amiotrófica, Espondilite Ancilosante, síndrome de antifosfolípídeo, síndrome de antissintetase, Alergia atópica, dermatite atópica, anemia aplástica autoimune, cardiomiopatia autoimune, enteropatia autoimune, Anemia hemolítica autoimune, hepatite autoimune, doença do ouvido interno autoimune, síndrome linfoproliferativa autoimune, neuropatia periférica autoimune, pancreatite autoimune, síndrome poliendócrina autoimune, dermatite de progesterona autoimune, púrpura trombocitopênica autoimune, urticaria autoimune, uveíte autoimune, doença de Balo/esclerose concêntrica de Balo, doença de Behçet, doença de Berger, encefalite de Bickerstaff, síndrome de Blau, penfigoide bolhoso, Câncer, doença de Castleman, doença celíaca, doença de Chagas, polineuropatia desmielinante inflamatória crônica, osteomielite multifocal recorrente crônica, doença pulmonar obstrutiva crônica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de Cogan, doença de aglutinina fria, deficiência de componente 2 de complemento, dermatite de contato, arterite craniana, síndrome de CREST, doença de Crohn (incluindo cada um dos dois tipos de doença intestinal inflamatória “IBD” idiopática), síndrome de Cushing’s, angiíte leucocitoclástica cutânea, doença de Dego, doença de Dercum, Dermatite herpetiforme, Dermatomiosite, Diabetes mellitus tipo 1, esclerose sistêmica cutânea difusa, síndrome de Dressler, lupo induzido por droga, lupo eritematoso discoide, Eczema, Endometriose, artrite relacionada com entesite, Fasciíte eosinofílica, gastroenterite eosinofílica, Epidermólise bulhosa adquirida, Eritema nodoso, Eritroblastose fetal, crioglobulinemia essencial mista, síndrome de Evan, Fibrodisplasia ossificante progressiva, alveolite

fibrosante (ou fibrose pulmonar idiopática), Gastrite, penfigoide gastrointestinal, arterite de célula gigante, Glomerulonefrite, síndrome de Goodpasture, doença de Graves, síndrome de Guillain-Barré (GBS), encefalopatia de Hashimoto, tiroidite de Hashimoto, púrpura de Henoch-Schonlein, Herpes Gestacional também conhecido como Penfigoide Gestacional, Hidradenite supurativa, síndrome de Hughes-Stovin, Hipogamaglobulinemia, doenças demielinantes inflamatórias idiopáticas, fibrose pulmonar idiopática, púrpura trombocitopênica idiopática (Ver púrpura trombocitopênica autoimune), nefropatia de IgA, miosite de corpo de inclusão, polineuropatia desmielinante inflamatória crônica, cistite intersticial, Artrite idiopática juvenil também conhecida como Artrite reumatoide juvenil, doença de Kawasaki, síndrome miastênica de Lambert-Eaton, Vasculite leucocitoclástica, Liquen plano, Liquen escleroso, doença de IgA linear (LAD), doença de Lou Gehrig (Também Esclerose Lateral Amiotrófica), hepatite lupoide também conhecida como hepatite autoimune, Lupo eritematoso, síndrome de Majeed, doença de Ménière, poliangiíte microscópica, síndrome de Miller-Fisher ver síndrome de Guillain-Barre, doença do tecido conectivo misto, Morféia, doença de Mucha-Habermann também conhecida como Pitiríase liquenoide e varioliforme aguda, esclerose múltipla, Miastenia grave, Miosite, Narcolepsia, Neuromielite óptica (também doença de Devic), Neuromiotonia, penfigoide cicatricial ocular, síndrome de opsoclono mioclono, tireoidite de Ord, reumatismo palindrômico, PANDAS (distúrbios neuropsiquiátricos autoimunes pediátricos associados com estreptococos), degeneração cerebelar paraneoplástica, hemoglobinúria noturna paroxismal (PNH), síndrome de Parry Romberg, síndrome de Parsonage-Turner, *Pars planitis*, Pênfigo vulgar, Anemia perniciosa, encefalomielite perivenosa, POEMS, síndrome de poliarterite nodosa, Polimialgia reumática, Polimiosite, cirrose biliar primária, colangeíte esclerosante primária, neuropatia inflamatória progressiva, psoríase, Artrite

psoriática, Pioderma gangrenosa, aplasia de célula vermelha pura, encefalite de Rasmussen, fenômeno de Raynaud, policondrite de recaída, síndrome de Reiter, síndrome das pernas inquietas, síndrome de fibrose retroperitoneal, artrite reumatoide, febre reumática, Sarcoidose, Esquizofrenia, síndrome de Schmidt uma outra forma de APS, Schnitzler, síndrome de Esclerite, Escleroderma, doença de soro, síndrome de Sjögren, espondiloartropatia, doença de Still ver Artrite reumatoide juvenil, síndrome da pessoa rígida, endocardite bacteriana subaguda (SBE), síndrome de Susac, síndrome de Sweet, caréia de Sydenham ver PANDAS, ostalmia simpática, Lupo eritematoso sistêmico ver Lupo eritematoso, arterite de Takayasu, arterite Temporal (também conhecido como “arterite de célula gigante”), Trombocitopenia, síndrome de Tolosa-Hunt, mielite transversal, colite ulcerativa (um de dois tipos de doença intestinal inflamatória idiopática “IBD”), doença de tecido conectivo não diferenciado diferente de doença de tecido conectivo misto, espondiloartropatia não diferenciada, vasculite urticarial, Vasculite, Vitiligo, e granulomatose de Wegener.

6.8.1 Malignidades Hematológicas

[00100] Em uma modalidade preferida, o “conjugado de BAM” da invenção pode ser usado para o tratamento ou melhora de várias malignidades hematológicas, tais como Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL), leucemia linfocítica crônica, leucemia de mieloide (ou mielógena) crônica (CML), todas as formas de linfoma e mieloma, e, em particular, todas as formas de leucemia mieloide (ou mielógena) aguda (AML).

[00101] A AML é um grupo heterogêneo de doenças, caracterizados pela proliferação descontrolada de células precursoras neoplásticas clonais, e produção prejudicada de hematopoiese normal, levando à neutropenia, anemia e trombocitopenia. Para os propósitos de prognóstico e terapêutica a World Health Organization (WHO) tem fornecido a seguinte classificação ampla para AML:

AML com certas anormalidades genéticas, incluindo

- AML com uma translocação entre os cromossomas 8 e 21
- AML com uma translocação ou inversão no cromossoma

16

- AML com mudanças no cromossoma 11
- APL (M3), que usualmente tem translocação entre os

cromossomas 15 e 17

AML com displasia multilinhagem (mais do que um tipo de célula mieloide anormal está envolvido)

AML relacionada com quimioterapia ou radiação prévias

AML não de outro modo especificada, incluindo

- AML não diferenciada (M0)
- AML com maturação mínima (M1)
- AML com maturação (M2)
- Leucemia promielocítica, (M3),
- Leucemia mielomonocítica aguda (M4)
- Leucemia monoblástica aguda (M5a)
- Leucemia monocítica aguda (M5b)
- Leucemia eritroide aguda (M6)
- Leucemia megacarioblástica aguda (M7)
- Leucemia basofílica aguda
- Panmielose aguda com fibrose
- Sarcoma mieloide (também conhecido como sarcoma ou

cloroma granulocíticos)

[00102] Leucemias agudas não diferenciadas ou bifenotípicas (leucemias que têm traços tanto linfocíticos quanto mieloides). Algumas vezes chamados de ALL com marcadores mieloides, AML com marcadores linfoides, ou leucemias de linhagem mista.

[00103] Qualquer um dos agentes quimioterapêuticos convencionais

como especificado acima podem ser usados como a porção biologicamente ativa conjugada aos peptídeos transportadores da invenção para o tratamento de AML.

[00104] Preferivelmente, para o tratamento de AML, a BAM é selecionada de um dos seguintes agentes quimioterapêuticos:

- antimetabólitos tais como citosina arabinosidas incluindo citarabina, análogos de purina tais como tioguanina, antifolatos incluindo trimetopina e pemetred, ou análogos de pirimidina incluindo gencitabina e flouroacila;

- inibidores da topoisomerase, tais como as antraciclinas, incluindo daunorrubicina, adriamicina (doxorrubicina), epirubicina, idarrubicina, anamicina, e MEN 10755; os alcaloides de quinolina, incluindo camptotecina, SN-38, DX-8951f, topotecano, 9-aminocamptotecina, BN 80915, irinotecano, DB 67, BNP 1350, exatecano, lurtotecano, ST 1481 , e CKD 602; os análogos de podofilotoxina etoposida e teniposida, e as antracenodionas, mitoxantrona e ansacrina ou outros produtos naturais incluem azatioprina; brequinar; bisciclopeptídeos de fenoxizona, tais como dactinomicina; glicopeptídeos básicos, por exemplo, bleomicina; antraquinona glicosídeos, tais como plicamicina (mitramicina); antracenodionas, por exemplo, mitoxantrona; azirinopirrolo indoldionas, por exemplo, mitomicina; imunossuppressores macrocíclicos, por exemplo, ciclosporina, FK-506 (tacrolimus, prograf), rapamicina, etc.; e os semelhantes;

- agentes que interferem com a montagem de microtúbulo, tais como a família de alcaloides vinca incluindo alcaloides vinca incluem vinblastina, vincristina; vinorelbina, vindesina; vindolina e vincamina; os taxanos e diterpenos, incluindo paclitaxel e docetaxel,

- complexos metálicos, por exemplo, cisplatina (cis-DDP), carboplatina, etc.; ureias, por exemplo, hidroxiiureia; e hidrazinas, por

exemplo, N-metilhidrazina, trióxido de arsênico;

- retinoides, por exemplo, vitamina A, ácido β -cis-retinóico, ácido trans-retinóico, isotretinoína, etc.; carotenoides, por exemplo, beta-caroteno, vitamina D, etc.

[00105] Um corpo crescente de evidência documenta que as malignidades mieloides, incluindo as várias formas de AML são causadas pelas mutações genéticas que constitutivamente ativam as enzimas envolvidas na transdução de sinal. Consequentemente, em certas modalidades, os conjugados de BAM da invenção podem compreender uma porção de BAM designada para alvejar estas enzimas, mediadores a jusante destas enzimas ou uma ou mais sequelas da sua atividade constitutiva. Os exemplos não limitantes de tais enzimas e/ou efeitos a jusante incluem farnesil transferase; fator de crescimento endotelial vascular e outras proteínas angiogênicas; as enzimas que contribuem para a capacidade proliferativa e de sobrevivência realçada de blastos de leucemia, tais como FLT3 ou RAS; enzimas que contribuem para a diferenciação hematopoiética prejudicada, tal como inibidores de HDAC, o gene anti-apoptótico BCL-2, inibidores de M-CSF, af10, alox 12, arhgef12, arnt, axl, bax, bad, bcl, bcl3, bcl6, btg1, cav1, cbfb, cdc23, cdh17, cdX₂, cebpa, CL_C, cr1, crebbp, dek, dleu1, dleu2, egfr, ets1, evi2a, evi2b, foxo3a, fus, gli2, gmps, hox11, hoxa9, irf1, kit, laf4 , lcp1, ldb1, lmo1, lmo2, lil1, madh5, mll3, mllt2, mllt3, mov10l1, mtcp1, myc, nfkb2, notch1, notch3, npm1, nup214 , nup98, p53, pbx1, pbX₂, pbX₃, pbxp1, pitX₂, pml, rab7, rgs2, runx1, set, sp140, tal1, tal2, tcl1b, tcl6, thra, tra,e znfn1a1.

[00106] Em linha com isso, mais recentemente, alvos de droga específicos de genótipo para o tratamento das várias formas de AML foram identificados. Tais terapias alvejadas incluem em particular inibidores da cinase de proteína, incluindo inibidores de tirosina cinases (Flt3, c-kit, BCR-ABL), Aurora cinases e outros componentes de caminhos da sinalização intracelular (por exemplo, Ras).

[00107] Em uma modalidade preferida, a porção biologicamente ativa conjugada à porção transportadora da invenção pode ser um agente que interfira com tal transdução de sinal aberrante, tal como inibidores da farnesil transferase, histona desacetilase e inibidores de proteossoma, agentes antiangiogênese, inibidores de FLT3, inibidores de apoptose ou inibidores de M-CSF.

[00108] Estes agentes podem seletivamente inibir um componente específico do caminho da sinalização ou podem interagir com vários componentes, tais como o inibidor de multi-cinase sorafenib.

[00109] Os inibidores da cinase de proteína que podem ser usados de acordo com a presente invenção incluem crizotinib, gefitinib, imatinib, erlotinib, pazopanib, sunitinib, sorafenib, dasatenib, lapatinib, lestaurtinib, nilotinib, ruxolitinib, tandutinib, vandetanib, cediranib, seliciclib, midostaurin, L-21649, ABT-869, dovitinib e PKC412, tipifarnib, AFG206, AFG210, e AHL196, AUZ454 e ATH686, SU5416 e SU6668.

[00110] Os exemplos não limitantes de BAMs que podem ser usados no tratamento de malignidades hematológicas outras que não a leucemia mieloide aguda de acordo com os métodos aqui descritos incluem inibidores da protease (por exemplo, bortezomib, carfilzomib, marizomib), inibidores de mTOR (por exemplo, rapamicina), inibidores das cinases de proteína primariamente expressadas em leucócitos (por exemplo, fostamatinib) e drogas de modificação epigenética (compostos que atuam na escrita e/ou deleção do código epigenético, por exemplo, vorinostat).

6.8.2 Condições Inflamatórias e Doenças Autoimunes

[00111] As moléculas e compostos da invenção também podem ser usados no tratamento ou prevenção de condições inflamatórias; doenças ou condições associadas com doença e distúrbios autoimunes; e/ou ou melhora dos sintomas de tais condições inflamatórias e/ou doença autoimune. Os exemplos não limitantes de condições que podem ser tratadas com os

compostos e métodos da invenção incluem Encefalomielite disseminada aguda (ADEM), doença de Addison, Agamaglobulinemia, Alopecia areata, Esclerose Lateral Amiotrófica, Espondilite Ancilosante, síndrome de antifosfolípídeo, síndrome de antissintetase, Alergia atópica, dermatite atópica, anemia aplástica autoimune, cardiomiopatia autoimune, enteropatia autoimune, Anemia hemolítica autoimune, hepatite autoimune, doença do ouvido interno autoimune, síndrome linfoproliferativo autoimune, neuropatia periférica autoimune, pancreatite autoimune, síndrome poliendócrina autoimune, dermatite de progesterona autoimune, púrpura trombocitopênica autoimune, urticária autoimune, uveíte autoimune, doença de Balo/esclerose concêntrica de Balo, doença de Behçet, doença de Berger, encefalite de Bickerstaff, síndrome de Blau, síndrome de pênfigo bolhoso, Câncer, doença de Castleman, doença celíaca, doença de Chagas, polineuropatia desmielinante inflamatória crônica, osteomielite multifocal recorrente crônica, doença pulmonar obstrutiva crônica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de Cogan, doença de aglutinina fria, deficiência do componente 2 de complemento, dermatite de contato, arterite craniana, síndrome de CREST, doença de Crohn (um de dois tipos de doença intestinal inflamatória idiopática “IBD”), síndrome de Cushing’s, Angiíte leucocitoclástica cutânea, doença de Dego, doença de Dercum, Dermatite herpetiforme, Dermatomiosite, Diabetes mellitus tipo 1, Esclerose sistêmica cutânea difusa, síndrome de Dressler, lupo induzido por droga, lupo eritematoso discoide, Eczema, Endometriose, artrite relacionada com entesite, fasciíte eosinofílica, gastroenterite eosinofílica, epidermólise bolhosa adquirida, Eritema nodoso, Eritroblastose fetal, crioglobulinemia mista essencial, síndrome de Evan, Fibrodisplasia ossificante progressiva, alveolite fibrosante (ou Fibrose pulmonar idiopática), Gastrite, penfigoide gastrointestinal, arterite de célula gigante, Glomerulonefrite, síndrome de Goodpasture, doença de Graves, síndrome de Guillain-Barré (GBS),

encefalopatia de Hashimoto, tireoidite de Hashimoto, púrpura de Henoch-Schonlein, Herpes gestacional também conhecido como Penfigoide gestacional, Hidradenite supurativa, síndrome de Hughes-Stovin, Hipogamaglobulinemia, doenças desmielinantes inflamatórias idiopáticas, Fibrose pulmonar idiopática, púrpura trombocitopênica idiopática (Ver púrpura trombocitopênica autoimune), nefropatia de IgA, miosite de corpo de inclusão, polineuropatia desmielinante inflamatória crônica, cistite intersticial, Artrite idiopática juvenil também conhecida como Artrite reumatoide juvenil, doença de Kawasaki, síndrome miastênica de Lambert-Eaton, Vasculite leucocitoclástica, Liquen plano, Liquen escleroso, doença de IgA linear (LAD), doença de Lou Gehrig (Também Esclerose Lateral Amiotrófica), hepatite kupoide também conhecida como hepatite autoimune, Lupo eritematoso, síndrome de Majeed, doença de Ménière, poliangiíte microscópica, síndrome de Miller-Fisher ver síndrome de Guillain-Barre, doença do tecido conectivo mista, Morféia, doença de Mucha-Habermann também conhecida como Pitiríase liquenoide e varioliforme aguda, esclerose múltipla, miastenia grave, miosite, Narcolepsia, Neuromielite óptica (também doença de Devic), Neuromiotonia, penfigoide cicatricial ocular, síndrome de opsoclono mioclono, tireoidite de Ord, reumatismo palindrômico, PANDAS (distúrbios neuropsiquiátricos autoimunes pediátricos associados com estreptococo), degeneração cerebelar paraneoplásticas, hemoglobinúria noturna paroxismal (PNH), síndrome de Parry Romberg, síndrome de Parsonage-Turner, *Pars planitis*, Pênfigo vulgar, anemia perniciosa, encefalomielite perivenosa, síndrome de POEMS, Poliarterite nodosa, Polimialgia reumática, Polimiosite, cirrose biliar primária, colangiíte esclerosante primária, neuropatia inflamatória progressiva, Psoríase, Artrite psoriática, Pioderma gangrenosa, aplasia de célula vermelha pura, encefalite de Rasmussen, fenômeno de Raynaud, policondrite relapsante, síndrome de Reiter's, síndrome das pernas inquietas, fibrose retroperitoneal, artrite

reumatoide, febre reumática, Sarcoidose, Esquizofrenia, síndrome de Schmidt uma outra forma de APS, síndrome de Schnitzler, Esclerite, Escleroderma, doença do soro, síndrome de Sjögren's, Espondiloartropatia, doença de Still ver Artrite reumatoide juvenil, síndrome da pessoa rígida, endocardite bacteriana subaguda (SBE), síndrome de Susac, síndrome de Sweet, coréia de Sydenham ver PANDAS, oftalmia simpática, lupo eritematoso sistêmico ver Lupo eritematoso, arterite de Takayasu, arterite temporal (também conhecido como “arterite de célula gigante”), Trombocitopenia, síndrome de Tolosa-Hunt, mielite transversal, colite ulcerativa (um de dois tipos de doença intestinal inflamatória idiopática “IBD”), doença do tecido conectivo não diferenciada diferente da doença de tecido conectivo mista, espondiloartropatia não diferenciada, Vasculite urticária, Vasculite, Vitiligo, e granulomatose de Wegener.

[00112] Os exemplos não limitantes de BAMs que podem ser usados no tratamento de tais condições incluem inibidores de COX-2, prednisona, pazopanib, famotidina, dalfampridina, pegloticase, esomeprazol, aspirina, celecoxib, diclofenaco, valdecoxib, rofecoxib, diflunisal, etodolac, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, cetoprofeno, ceterolac, ácido mefenâmico, meloxicam, nabumetona, naproxen, oxaprozin, piroxicam, sulindac, tolmetina, lansoprazol, meclofenamato, triancinolona, metilprednisolona, betametasona, budesonida, prednisolona, hidro cortisona, dexametasona e cortisona.

6.8.3 Doenças Protozoárias E Condições Infecciosas

[00113] As moléculas e compostos da invenção também podem ser usados no tratamento ou prevenção de doenças e condições associadas com infecções protozoárias ou outras condições infecciosas, e/ou ou melhora dos sintomas associados com as mesmas. Os exemplos não limitantes de tais doenças e condições que podem ser tratadas com os compostos e métodos da invenção incluem infecções pelo Acinetobacter, Actinomicose, Doença do

sono africana (tripanosomíase africana), AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida), Amebíase, Anaplasmosse, Antrax, infecção hemolítica de arcanobactéria, febre hemorrágica argentina, Ascaríase, Aspergilose, infecção por Astrovírus, Babesiose, infecção pelo *Bacilo cereus*, pneumonia bacteriana, vaginose bacteriana (BV), infecção por *Bacteroides*, Balantidíase, infecção por *Bailissascaris*, infecção pelo vírus BK, pedra negra, infecção por *Blastocystis hominis*, Blastomicose, febre hemorrágica boliviana, infecção por *Borrelia*, Botulismo (e botulismo infantil), febre hemorrágica brasileira, Brucelose, infecção por *Burkholderia*, úlcere de Buruli, infecção por Calicivírus (Norovírus e Sapovírus), Campilobacteriose, Candidíase (Monilíase; afta), doença de arranhão de gato, Celulite, Doença de Chagas (tripanossomíase americana), Cancroide, Catapora, Clamídia, infecção pulmonar por *Clamidophila*, Cólera, Cromoblastomicose, Clonorquíase, infecção por *Clostridium difficile*, Coccidioidomicose, febre do carrapato do Colorado (CTF), resfriado comum (rinofaringite viral aguda; coriza aguda), doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), febre hemorrágica de Criméia-Congo (CCHF), Criptococose, Criptosporidiose, larva migratória cutânea (CLM), Ciclosporíase, Cisticercose, infecção por Citomegalovírus, febre da dengue, Dientamebíase, Difteria, Difilobotríase, Dracunculíase, febre hemorrágica pelo Ebola, Equinococose, Erliciose, Enterobíase (infecção por Lombriga), infecção por Enterococos, infecção por Enterovírus, tifo epidêmico, Eritema infeccioso (Quinta doença), Exantema súbito (Sexta doença), Fasciolopsíase, Fasciolose, insônia familiar fatal (FFI), Filaríase, Envenenamento alimentar pelo *Clostridium perfringens*, infecção amébia não parasita, infecção por Fusobactéria, gangrena gasosa (*Clostridial myonecrosis*), Geotricose, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), Giardíase, mormos, Gnatostomíase, Gonorréia, Granuloma inguinal (Donovanose), infecção estreptocócica do Grupo A, infecção estreptocócica do Grupo B, infecção por *Haemophilus influenzae*, doença da mão, pé e boca (HFMD), Síndrome

Pulmonar por Hantavírus (HPS), infecção por *Helicobacter pylori*, síndrome hemolítica- urêmica (HUS), Febre hemorrágica com síndrome renal (HFRS), Hepatite A, Hepatite B, Hepatite C, Hepatite D, Hepatite E, Herpes simples, Histoplasmosse, infecção de tênia, infecção humana pelo bocavírus, *ehrlichiosis ewingii* humano, anaplasmosse granulocítica humana (HGA), infecção humana por metapneumovírus, *ehrlichia monocítica* humana, infecção pelo papilomavírus (HPV), infecção pelo vírus da parainfluenza humana, Himenolepíase, Mononucleose Infecciosa pelo Vírus de Epstein-Barr (Mono), Influenza (flu), Isosporíase, doença de Kawasaki, Queratite, infecção por *Kingella kingae*, Kuru, febre de Lassa, Legionelose (doença dos Legionários), Legionelose (febre de Pontiac), Leishmaniose, Lepra, Leptospirose, Listeriose, doença de Lyme (*Lyme borreliosis*), filaríase Linfática (Elefantíase), coriomeningite linfocítica, Malária, febre hemorrágica de Marburg (MHF), Sarampo, Melioidose (doença de Whitmore), Meningite, doença meningocócica, Metagonimíase, Microsporidiose, Molusco contagioso (MC), Cachumba, tifo de murino (tifo endêmico), pneumonia de micoplasma, Micetoma, Miíase, conjuntivite neonatal (Oftalmia neonatal), (Nova) Variante da doença de Creutzfeldt-Jakob (vCJD, nvCJD), Nocardiose, Oncocercíase (cegueira do rio), Paracoccidioidomicose (blastomicose da América do Sul), Paragonimíase, Pasteurelose, doença inflamatória pélvica (PID), Coqueluche (tosse comprida), Praga, infecção pneumocócica, pneumonia pneumocística (PCP), Pneumonia, Poliomielite, infecção por *Prevotella*, meningoencefalite amébrica primária (PAM), leucoencefalopatia multifocal progressiva, Psitacose, febre Q, Raivas, febre da mordida do rato, infecção pelo vírus sincicial respiratório, Rinosporidiose, infecção por Rinovírus, infecção Rickettsial, Rickettsialpox, Febre do Vale Rift (RVF), febre pintada das Montanhas Rochosas (RMSF), infecção por Rotavírus, Rubéola, Salmonelose, SARS (Síndrome respiratória aguda severa), Escabiose, Esquistosomíase, Septicemia, Shigelose (desintéria Bacilar),

Cobreiros (Herpes zoster), *Smallpox* (Varíola), Esporotricose, envenenamento alimentar estafilocócico, infecção estafilocócica, Estrongiloidíase, Sífilis, Teníase, Tétano (tetania), Tinha da barba (coceira do barbeiro), Tinha da cabeça (Dermatofitose do Escalpo), Tinha do corpo (Dermatofitose do corpo), Tinha crural (coceira Jock), Tinha da mão (Dermatofitose da Mão), Tinha negra, Tinha do pé (pé de atleta), Tinha ungueal (Onicomicose), Tinha versicolor (Pitiríase versicolor), Toxocaríase (Larva Migratória Ocular (OLM)), Toxocaríase (Larva Migratória Visceral (VLM)), Toxoplasmose, Triquinelose, Tricomoniase, Tricuríase (infecção de Whipworm), Tuberculose, Tularemia, infecção por *Ureaplasma urealyticum*, encefalite equina venezuelana, febre hemorrágica venezuelana, pneumonia viral, febre do Nilo Ocidental, Pedra branca (Tinha branca), infecção por *Yersinia pseudotuberculosis*, Yersiniose, Febre amarela e Zigomicose.

[00114] Os exemplos não limitantes de BAMs que podem ser usados no tratamento de tais condições incluem cloroquina, mefloquina, primaquina, cloridreto de proguanil, cloridreto de proguanil com atovaquona, pirimetamina, sulfadoxina, quinina, quinolina, doxiciclina, clindamicina, artesunato, diloxanida, metronidazol, tinidazol, cloridreto de mepacrina, amfotericina, pentamidina, pirimetamina, sulfadiazina, azitromicina, atovaquona, trimetoprim-sulfametoxazol, trimetoprim, dapsona, atovaquona, isetionato de pentamidina, amodiaquina, cloroguanida, eflornitina, hidroxicloroquina, iodoquinol, antimoniato de meglumina, melarsoprol, nifurtimox, paromomicina, estibogluconato de sódio, suramin, triparsamida.

6.8.4 HIV/AIDS

[00115] É bem estabelecido que leucócitos, em particular macrófagos desempenham um papel crucial na infecção pelo HIV-1. Eles estão entre as primeiras células infectadas pelo HIV-1, e foram propostos formar um reservatório de HIV-1 nas pessoas infectadas. Eles também servem como um meio de disseminar o vírus para outros tecidos tais como o cérebro. Além

disso, o vírus pode ser armazenado aqui enquanto permanece escondido dos anticorpos potencialmente neutralizantes ou outras formas de resposta imune.

[00116] Considerando o acima, as porções de transporte da invenção, que seletivamente alvejam macrófagos e facilitam o transporte intracelular são idealmente adaptados como porções carregadoras de agentes intracelulares do HIV.

[00117] Assim, a BAM que pode ser conjugada à porção de transporte da invenção pode em particular ser

- um NRTI (inibidor da transcriptase reversa de nucleosídeo ou nucleotídeo) incluindo zidovudina, didanosina, estavudina, lamivudina, entricitabina, abacavir e Tenofovir, apricitabina elvucitabina, OBP-601, andoxovir, epivir, retrovir, estavudina, zalcitabina, AZT, estavudina, 4-Ed4T, Andoxovir, Dexelvucitabina, DOT (dioxolano timidina), Fosaltuvudina, GS-9131, GS-9148, IDX12899, IDX12989, Quinolonas, Racivir, Tiovir, derivados de TSAO-T;

- um NNRTI (inibidor da transcriptase reversa de não nucleosídeo) incluindo nevirapina, delaviradme, efavirenz, etravina e rilpivirina, etravirina, HBY097, IDX899, V026048, RDEA806, RDEA427, RDEA640, UK-435061; ou

- um inibidor da protease incluindo ritonavir, tipranavir, saquinavir, nelfinavir, indinavir, amprenavir, fosamprenavir, atazanavir, lopinavir, darunavir (TMC-114), lasinavir e brecanavir (VX-385), GRL-02031, SPI-256.

6.8.5 Agentes antiprotozoários/Leishmaniose

[00118] A Leishmaniose são protozoários pertencentes à ordem *Kinetoplastida* e à família *Trypanosomatidae*. A leishmaniose é uma doença transportada por vetor que é transmitida pelo mosquito pólvora. A infecção humana é causada por cerca de 30 espécies diferentes que infectam mamíferos. Estas incluem o complexo da *L. donovani* com 3 espécies (*L.*

donovani, *L. infantum*, e *L. chagasi*); o complexo da *L. mexicana* com 3 espécies principais (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, e *L. venezuelensis*); *L. tropica*; *L. major*; *L. aetiopica*; e o subgênero *Viannia* com 4 espécies principais (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, e *L. (V.) peruviana*). As espécies diferentes são morfologicamente indistinguíveis, mas elas podem ser diferenciadas pela análise de isoenzima, métodos moleculares, ou anticorpos monoclonais.

[00119] A leishmaniose é responsável por vários tipos de doenças, incluindo leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea (do tipo localizado ou difuso) e leishmaniose mucocutânea. Esta variabilidade dos traços clínicos resulta tanto da diversidade das espécies de Leishmaniose quanto da resposta imune dos hospedeiros.

[00120] Nos seres humanos assim como em outros mamíferos, o parasita é inoculado através da pele como um flagelado, promastigoto extracelular pelo seu vetor artrópodo. No seu hospedeiro mamífero, os promastigotos de Leishmaniose devem primeiro evadir da lise mediada por complemento até que eles sejam engolfados por um macrófago. O promastigoto de Leishmaniose então diferencia-se no estágio de amastigotos mais resistentes e permanece um patógeno intracelular constrangido infectando as células hematopoiéticas da linhagem do monócito/macrófago. Sequestrando a si mesmo no interior das células do hospedeiro permite a Leishmaniose de escapar de muitas das respostas imunes que de outro modo seriam direcionadas contra ela. Entretanto, de modo a sobreviver as atividades antimicrobianas da sua célula hospedeira e prevenir a ativação de uma resposta imune eficaz, as várias espécies de Leishmaniose desenvolveram mecanismos complexos para subverter a função de macrófago normal, particularmente aqueles envolvidos na vigilância imune e ativação de macrófago, ao nível de expressão de proteína ou gene.

[00121] Além de reprimir as atividades microbidas do macrófago

hospedeiro, a Leishmaniose inibe a capacidade da célula hospedeira para demonstrar antígenos de parasita a outros componentes do sistema imune. Assim, a Leishmaniose impede a ativação de uma resposta imune eficaz pela inibição da produção de várias citocinas, particularmente aquelas envolvidas nas respostas inflamatórias (IL-1 e fator alfa de necrose de tumor [TNF- α]) ou na ativação de linfócito T (IL-12)). A capacidade poderosa da Leishmaniose para paralisar o mecanismo antimicrobiano do macrófago permite que o parasita evite a resposta imune inata inicial e crie um ambiente seguro para a proliferação. Além disso, a localização escondida dentro do macrófago hospedeiro é amplamente responsável pela falta de quimioterapia eficaz visto que o mesmo prejudica o acesso de drogas terapêuticas.

[00122] De modo a realçar a atividade anti-Leishmaniose e reduzir a toxicidade da medicação, sistemas de liberação de droga lipossômicos foram desenvolvidos de modo a alvejar o sistema fagocítico mononuclear. Assim, por exemplo, a anfotericina B lipossômica foi usada para tratar a leishmaniose visceral.

[00123] Não obstante, até agora, o antimônio pentavalente (Sb), que foi desenvolvido mais do que 50 anos atrás, permanece o tratamento de primeira linha para o tratamento de Leishmaniose, a despeito da sua eficácia insuficiente e efeitos colaterais. Existe assim uma necessidade substancial quanto a um agente anti-Leishmaniose eficaz, que seletividade alveje as células hospedeiras de macrófago de modo a aumentar a atividade anti-Leishmaniose e reduzir a toxicidade. Em virtude de sua capacidade para especificamente alvejar as células mieloides, os compostos da invenção podem ser usados para transportar e liberar agentes com atividade anti-Leishmaniose para as células hospedeiras de macrófago infectadas.

[00124] Assim, de acordo com uma modalidade preferida da invenção, a BAM que pode ser conjugada para formar o conjugado de BAM para a invenção pode ser um agente com atividade antiprotozoária, incluindo mas

não limitada a cloroquina, mefloquina, primaquina, cloridreto de proguanila, cloridreto de proguanila com atovaquona, pirimetamina, sulfadoxina, quinina, quinolina, doxiciclina, clindamicina, artesunato, diloxanida, metronidazol, tinidazol, cloridreto de mepacrina, anfotericina, pentamidina, pirimetamina, sulfadiazina, azitromicina, atovaquona, trimetoprim-sulfametoxazol, trimetoprim, dapsona, atovaquona, isetionato de pentamidina, amodiaquina, cloroguanida, eflornitina, hidroxicloroquina, iodoquinol, antimoniato de meglumina, melarsoprol, nifurtimox, paromomicina, estibogliconato de sódio, suramina e triparsamida.

6.9 Composições Farmacêuticas E Sua Administração

[00125] A invenção também se refere às composições farmacêuticas compreendendo as moléculas e compostos da invenção, por exemplo, conjugados de BAM. Tais composições compreendem uma quantidade terapêuticamente eficaz do composto, e um carregador ou excipiente farmacêuticamente aceitáveis. Um tal carregador ou excipiente inclui, mas não é limitado a solução salina, solução salina tamponada, dextrose, água, glicerol, etanol, e/ou combinações dos mesmos. As composições farmacêuticas também podem incluir agentes terapêuticos adicionais para o tratamento da doença dada que é tratada. A formulação é feita para se adaptar ao modo de administração. No geral, os métodos de administrar polipeptídeos são bem conhecidos na técnica e podem ser aplicados à administração dos conjugados da invenção.

[00126] A administração é por qualquer uma das vias normalmente usadas para introduzir uma molécula em contato extremo com o sangue. Os métodos adequados de administrar tais conjugados no contexto da presente invenção a um paciente estão disponíveis incluindo as vias oral e parenteral. Embora mais do que uma via possa ser usada para administrar uma composição particular, uma via particular pode frequentemente fornecer uma ação ou reação mais imediata e mais eficaz do que uma outra via.

[00127] Preferivelmente os conjugados de BAM da invenção são administrados pelos modos parenterais de administração, em particular pelos meios intravenoso, intraperitoneal, intramuscular, intradérmico, subcutâneo, intratecal, intraocular, retrobulbar, intrapulmonar ou intraarticular. Tais vias de administração e as formulações apropriadas são no geral conhecidas por aqueles de habilidade na técnica. As formulações adequadas para a administração parenteral incluem soluções de injeção aquosas e não aquosas, isotônicas estéreis, que podem conter antioxidantes, tampões, bacteriostatos, e solutos que tornam a formulação isotônica com o sangue do receptor pretendido, e suspensões estéreis aquosas e não aquosas que podem incluir agentes de suspensão, solubilizantes, agentes de espessamento, estabilizantes e preservantes. Os conjugados de polipeptídeo carregador-polipeptídeo alvo também podem ser administrados por intermédio de lipossomas.

[00128] As moléculas e compostos da invenção, sozinhos ou em combinação com outros componentes adequados, também podem ser fabricados em formulações de aerossol (isto é, eles podem ser “nebulizados”) a ser administrada por intermédio de inalação. As formulações em aerossol podem ser colocadas em propelentes pressurizados aceitáveis, tais como diclorodifluorometano, propano, nitrogênio, e os semelhantes.

[00129] Em uma modalidade preferida, as composições farmacêuticas da invenção são fornecidas na forma liofilizada a ser reconstituída antes da administração. Os tampões e soluções para a reconstituição das composições farmacêuticas podem ser fornecidos junto com a formulação farmacêutica para produzir composições aquosas da presente invenção para a administração.

[00130] A frase “farmacêutica ou farmacologicamente aceitável” refere-se às entidades moleculares e composições que não produzem reações adversas, alérgicas, ou outras reações indesejáveis quando administradas a um animal ou um ser humano. Como aqui usado, “carregador farmacêuticamente

aceitável” inclui qualquer um e todos os solventes, meios de dispersão, agentes antibacterianos e antifúngicos, isotônicos e agentes retardantes de absorção e os semelhantes.

[00131] Os carregadores farmacêuticamente aceitáveis são determinados em parte pela composição particular que é administrada, assim como pelo método particular usado para administrar a composição. Consequentemente, existe uma ampla variedade de formulações adequadas de composições farmacêuticas da presente invenção. Os carregadores e excipientes farmacêuticamente aceitáveis são bem conhecidos na técnica, e um ou mais conjugados da invenção podem ser formulados em composições farmacêuticas pelos métodos bem conhecidos (ver, por exemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª edição, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (2005); Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer e L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis (2000); e Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edição, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000)).

[00132] As composições farmacêuticas compreendendo um ou mais conjugados de BAM da invenção são opcionalmente testados em um ou mais modelos de animal *in vitro* e/ou *in vivo* apropriados de doença, para confirmar a eficácia, metabolismo de tecido, e estimar as dosagens, de acordo com os métodos bem conhecidos na técnica. Assim, é entendido que a dose adequada de uma composição de acordo com a presente invenção dependerá da idade, saúde e peso do receptor, tipo de tratamento concorrente, se algum, frequência de tratamento, e da natureza do efeito desejado. Entretanto, a dosagem é adaptada para o paciente individual, como é determinável por uma pessoa de habilidade na técnica, sem experimentação indevida. A dose total de agente terapêutico pode ser administrada em doses múltiplas ou em uma única dose. Em certas modalidades, as composições são administradas sozinhas, em outras modalidades as composições são administradas em conjunção com

outros produtos terapêuticos direcionados para a doença ou direcionada a outros sintomas da mesma.

[00133] A dose administrada a um paciente, no contexto da presente invenção, é suficiente para efetuar uma resposta terapêutica benéfica no paciente com o tempo, ou, por exemplo, para inibir a infecção por um patógeno, para reduzir ou prevenir os sintomas de um estado de doença, ou outra atividade apropriada, dependendo da aplicação. A dose é determinada pela eficácia de uma composição/formulação particular, e a atividade, estabilidade ou meia-vida sérica do conjugado de polipeptídeo BAM utilizado e pela condição do paciente, assim como o peso corporal ou área de superfície do paciente a ser tratado. O tamanho da dose também é determinado pela existência, natureza, e extensão de qualquer um dos efeitos colaterais adversos que acompanham a administração de uma composição/formulação particulares, ou os semelhantes em um paciente particular.

[00134] A invenção também se refere aos seguintes itens:

Item 1, A molécula ou composto compreendendo ou consistindo em uma das seguintes estruturas de consenso compreendendo aminoácidos L e D:

$\text{Arg}_1\text{-(SP}_A\text{)-Arg}_5\text{-(SP}_B\text{)-X-(SP}_C\text{)-Arg}_9\text{-(LD}_{10}\text{)}_n\text{-(XD}_{11}\text{)}_m$;

$\text{Arg}_1\text{-(SP}_C\text{)-X-(SP}_B\text{)-Arg}_5\text{-(SP}_A\text{)-Arg}_9\text{-(LD}_{10}\text{)}_n\text{-(XD}_{11}\text{)}_m$;

$\text{(XD}_{-2}\text{)}_m\text{-(LD}_{-1}\text{)}_n\text{-Arg}_1\text{-(SP}_A\text{)-Arg}_5\text{-(SP}_B\text{)-X-(SP}_C\text{)-Arg}_9$; ou

$\text{(XD}_{-2}\text{)}_m\text{-(LD}_{-1}\text{)}_n\text{-Arg}_1\text{-(SP}_C\text{)-X-(SP}_B\text{)-Arg}_5\text{-(SP}_A\text{)-Arg}_9$;

em que, LD_{10} ou LD_{-1} representam qualquer aminoácido L ou D outro que não D-arginina, D-lisina; L-arginina ou L-lisina e n tem um valor de 0 a 10;

em que XD_{11} ou XD_{-2} representam qualquer aminoácido D outro que não D-arginina ou D-lisina e m tem um valor de 0 ou 1;

em que

(a) Arg_1 , Arg_5 , e Arg_9 representam L-arginina; e X representa

L-lisina ou L-arginina, ou

(b) Arg₁, Arg₅, e Arg₉ representam D-arginina; e X representa D-lisina ou D-arginina;

em que (SP_A) representa um ligador químico que

(a) consiste em uma cadeia de peptídeo de 3 resíduos de aminoácido, em que cada resíduo pode ser independentemente selecionado de qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; ou

(b) separa os resíduos de aminoácido adjacentes em $12,9 + 1,5$ Å;

em que (SP_C) representa um ligador químico que

(a) consiste em um único resíduo de aminoácido que pode ser qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; ou

(b) separa os resíduos de aminoácido adjacentes em $7,5 + 1,5$ Å;

e em que (SP_B)-X-(SP_C) ou seu reverso, (SP_C)-X-(SP_B) representam um ligador químico

(a) em que SP_B e SP_C cada um representa um único resíduo de aminoácido que pode ser independentemente selecionado de qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; ou

(b) que separa os resíduos de aminoácido adjacentes Arg₁ e Arg₅ ou Arg₅ e Arg₉ em $12,9 + 1,5$ Å.

Item 2, A molécula ou composto de acordo com o item 1, em que

(SP_A) representa um ligador químico que separa os resíduos de aminoácido adjacentes em $12,9 + 1,5$ Å;

(SP_C) representa um ligador químico que separa os resíduos de aminoácido adjacentes em $7,5 + 1,5$ Å;

e em que (SP_B)-X-(SP_C) ou seu reverso, (SP_C)-X-(SP_B) representam um ligador químico que separa os resíduos de aminoácido adjacentes Arg₁ e Arg₅ ou Arg₅ e Arg₉ em 12,9 + 1,5 Å.

Item 3, A molécula ou composto dos itens 1 ou 2, em que um ou mais dos ditos ligadores químicos é um beta-peptídeo, uma armação com base em aminoácido de açúcar, um beta-peptidomimético de tipo grampo, um mimético de hélice alfa ou um ciclotídeo.

Item 4, A molécula ou composto do item 1, em que (SP_A) representa uma cadeia de peptídeo consistindo em três resíduos de aminoácido, cada um independentemente selecionado de qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; e em que (SP_B) e (SP_C) cada um representa um único resíduo de aminoácido que pode ser independentemente selecionado de qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina.

Item 5, A molécula ou composto de acordo com os itens 1 ou 4, em que (SP_A), (SP_B) e (SP_C) juntos contêm não mais do que 3 resíduos de alanina.

Item 6, A molécula ou composto de acordo com os itens 1, 4 ou 5, em que (SP_A), (SP_B) e (SP_C) juntos não contêm nenhum dos resíduos de prolina.

Item 7, A molécula ou composto de acordo com qualquer um dos itens 1 e 4 a 6 em que (SP_A), (SP_B) e (SP_C) juntos incluem um ou mais aminoácidos selecionados de Phe, Trp, Tyr, Val, Met, Ile, e Leu.

Item 8, A molécula ou composto de acordo com qualquer um dos itens 1 e 4 a 7, em que (SP_B) representa um aminoácido D.

Item 9, A molécula ou composto de acordo com qualquer um dos itens de 1 a 8, em que LD₁₀ representa L- ou D-histidina.

Item 10, A molécula ou composto de acordo com qualquer um dos itens de 1 a 9, em que XD₁₁ representa D-histidina.

Item 11, A molécula ou composto de acordo com qualquer um dos itens de 1 a 10, em que m tem um valor de 1.

Item 12, A molécula ou composto de acordo com qualquer um dos itens de 1 a 11, em que n tem um valor de 0.

Item 13, A molécula ou composto de acordo com qualquer um dos itens 1 ou de 4 a 8 tendo as sequências

RSTqRYRVRh (SEQ ID NO: 1);

RYFvRIKYRh (SEQ ID NO: 2);

RYFvRIKARh (SEQ ID NO: 3);

RAAvRAKYRh (SEQ ID NO: 4);

RAAvRIKYRh (SEQ ID NO: 5);

RSTqRYRVRh (SEQ ID NO: 6);

RSTqRYKVRh (SEQ ID NO: 7);

RGGgRGKGRh (SEQ ID NO: 8);

RHHhRHKHRh (SEQ ID NO: 9);

RVVvRVKVRh (SEQ ID NO: 10);

RLLlRLKLRh (SEQ ID NO: 11);

RMMmRMKMRh (SEQ ID NO: 12);

RIIiRIKIRh (SEQ ID NO: 13);

RYFVRIKYR (SEQ ID NO: 14);

RYFvRIKYR (SEQ ID NO: 15); ou

RYFVRiKYR (SEQ ID NO: 16).

Item 14, A molécula ou composto de qualquer um dos itens de 1 a 13, conjugados ainda a uma porção biologicamente ativa (BAM).

Item 15, O conjugado de BAM do item 14, em que a dita BAM é conjugada ao terminal da dita estrutura de consenso de acordo com as seguintes estruturas de consenso:

(BAM)-(LINK)-Arg₁-(SP_A)-Arg₅-(SP_B)-X-(SP_C)-Arg₉-
(LD₁₀)_n-(XD₁₁)_m;

$(\text{BAM})-(\text{LINK})-\text{Arg}_1-(\text{SP}_C)-\text{X}-(\text{SP}_B)-\text{Arg}_5-(\text{SP}_A)-\text{Arg}_9-$
 $(\text{LD}_{10})_n-(\text{XD}_{11})_m;$
 $(\text{XD}_{-2})_m-(\text{LD}_{-1})_n-\text{Arg}_1-(\text{SP}_A) \quad \text{Arg}_5-(\text{SP}_B)-\text{X}-(\text{SP}_C)-\text{Arg}_9-$
 $(\text{LINK})-(\text{BAM});$ ou
 $(\text{XD}_{-2})_m-(\text{LD}_{-1})_n-\text{Arg}_1-(\text{SP}_C)-\text{X}-(\text{SP}_B)-\text{Arg}_5-(\text{SP}_A)-\text{Arg}_9-$
 $(\text{LINK})-(\text{BAM})$

em que (BAM) representa uma porção biologicamente ativa;

em que (LINK) representa um grupo ligador opcional;

em que, LD_{10} ou LD_{-1} representam qualquer aminoácido L ou D outro que não D-arginina, D-lisina; L-arginina ou L-lisina e n tem um valor de 0 a 10;

em que XD_{11} ou XD_{-2} representam qualquer aminoácido D outro que não D-arginina ou D-lisina e m tem um valor de 0 ou 1;

em que

(a) Arg_1 , Arg_5 , e Arg_9 representam L-arginina; e X representa L-lisina ou L-arginina, ou

(b) Arg_1 , Arg_5 , e Arg_9 representam D-arginina; e X representa D-lisina ou D-arginina;

em que (SP_A) representa um ligador químico que

(a) consiste em uma cadeia de peptídeo de 3 resíduos de aminoácido, em que cada resíduo pode ser independentemente selecionado de qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; ou

(b) separa os resíduos de aminoácido adjacentes em $12,9 + 1,5$ Å;

em que (SP_C) representa um ligador químico que

(a) consiste em um único resíduo de aminoácido que pode ser qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; ou

(b) separa os resíduos de aminoácido adjacentes em $7,5 + 1,5$ Å;

e em que $(SP_B)-X-(SP_C)$ ou seu reverso, $(SP_C)-X-(SP_B)$ representam um ligador químico

(a) em que SP_B e SP_C cada um representa um único resíduo de aminoácido que pode ser independentemente selecionado de qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; ou

(b) que separa os resíduos de aminoácido adjacentes Arg_1 e Arg_5 ou Arg_5 e Arg_9 em $12,9 + 1,5$ Å.

Item 16, O conjugado de BAM do item 15, em que o grupo ligador (LINK) é L- ou D-Glu.

Item 17, O conjugado de BAM de qualquer um dos itens de 14 a 16, em que BAM é conjugado ao Arg_1 ou Arg_9 por uma ligação covalente de amida do terminal N ou de éster do terminal C.

Item 18, O conjugado de BAM do item 14, em que a dita BAM é conjugada a um resíduo de aminoácido e/ou um grupo químico dentro de (SP_A) , (SP_B) ou (SP_C) .

Item 19, O conjugado de BAM do item 16, em que a dita conjugação é conjugação direta a um resíduo interno da dita sequência de peptídeo ou indireta por intermédio de um grupo ligador.

Item 20, O conjugado de BAM de acordo com qualquer um dos itens de 14 a 19, em que a BAM é um mono- ou poli sacarídeo, um agente citotóxico, um agente antineoplásico, um agente antiinflamatório, um agente antiviral, um agente antibacteriano ou um agente para o tratamento de infecções protozoárias.

Item 21, O conjugado de BAM de acordo com qualquer um dos itens de 14 a 19, em que o BAM é desoxirribose ou ribose.

Item 22, Uma composição farmacêutica compreendendo a molécula ou composto do item 14 ou o conjugado de BAM de qualquer um

dos itens de 15 a 21.

Item 23, A composição farmacêutica do item 22 para o uso no tratamento de distúrbios envolvendo leucócitos, selecionados de doença neoplásica, doença inflamatória, doença autoimune, doença de imunodeficiência, infecções virais, bacterianas, protozoárias ou parasíticas.

Item 24, A composição farmacêutica de acordo com o item 22 para o uso no tratamento do HIV, Vírus Epstein Barr, Morbilivírus, Paramixovírus, Rubivírus, Vírus do Herpes, Vírus da Dengue, vírus do Herpes Simples, Parvovírus, Vírus Sincicial Respiratório, Vírus da Variola, Varicela, Flavivírus, Vírus linfotrófico T humano, Vírus da Hepatite A, B, C, D, ou E, Vírus de Lassa, ou Vírus da Influenza.

Item 25, A composição farmacêutica do item 22 para o uso no tratamento de uma doença ou condição em que leucócitos têm um envolvimento fisiopatológico: neutrofilia, neutropenia, leucopenia, basopenia, basofilia, eosinopenia, eosinofilia, síndrome hipereosinofílica idiopática, leucocitose linfocítica, linfocitose, linfocitopenia, monocitose, monocitopenia, Anomalia de May Hegglin, Anomalia de Pelger-Huet, Anomalia de Alder-Reilly, síndrome de Chediak-Higashi, síndrome de Job (hiper-IgE), síndrome do leucócito preguiçoso, deficiência de C3 congênita, doença granulomatosa crônica, leucócito, deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase, deficiência de mieloperoxidase benigna, doença da imunodeficiência combinada severa, síndrome de DiGeorge, síndrome de Nezelof, agamaglobulinemia infantil ligada ao sexo, hipogamaglobulinemia variável comum, mucopolissacaridose, lipodoses, doença de Gaucher, doença de Niemann-pick, doença de Fabry, doença de Farber, gangliosidose; Tay Sachs, doença de Sandhoff, doença de Krabbe, leucodistrofia metacromática, doença de Wolman, leucemia, leucemia linfática aguda (L1, L2, L3), leucemia linfática crônica, leucemia mielógena aguda (AML), AML não diferenciada (M0), leucemia mieloblástica (M1), leucemia mieloblástica (M2), leucemia promielocítica

(M3), leucemia mielomonocítica (M4), leucemia monocítica (M5), eritoleucemia (M6), leucemia megacarioblástica (M7), leucemia mielógena crônica.

Item 26, A composição farmacêutica do item 22 para o uso no tratamento da leishmaniose.

Item 27, Uso da molécula ou composto de acordo com qualquer um dos itens de 1 a 14 para facilitar o transporte de uma molécula biologicamente ativa para dentro das células mieloides.

Item 28, Uso da molécula ou composto de acordo com qualquer um dos itens de 1 a 14 para a preparação de um conjugado de droga-peptídeo.

[00135] A presente invenção não deve ser limitada no escopo pelas modalidades específicas aqui descritas. De fato, várias modificações da invenção além daquelas aqui descritas tornar-se-ão evidentes para aqueles habilitados na técnica a partir da descrição precedente e figuras anexas. Tais modificações caem dentro do escopo das reivindicações anexas.

[00136] Várias publicações são aqui citadas, as descrições das quais são incorporadas por referência em sua totalidade.

7. EXEMPLOS

7.1 Aglutinação de Peptídeo A C4S

[00137] A aproximação da interação de peptídeo TAT com C4S foi modelada em uma simulação de computador. A simulação modelou o peptídeo TAT e moléculas de C4S na conformação prolongada, que é a mais comum destas moléculas em solução. Os resultados do modelo indicaram que os resíduos de Arg dos resíduos TAT que correspondem às argininas nas posições 1, 5 e 9 dos peptídeos de nove mer de acordo com a invenção (por exemplo, de acordo com a sequência Arg₁-X₂-X₃-X₄-Arg₅-X₆-X₇-X₈-Arg₉ (SEQ ID NO: 21 submetida às regras da SEQ ID NO: 17 ou SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 22 submetidos às regras da SEQ ID NO: 19 ou SEQ ID NO:

20)) foram espaçadas em intervalos favoráveis para interagir de modo ideal com os sulfatos de repetição de C4S. A distância entre os resíduos de Arg de TAT foi de 13,2 Å, que adapta-se de modo ideal com o espaçamento repetido dos sulfatos na C4S que são separados em 12,9 Å (ver a Fig. 1). Adicionalmente, a lisina ou arginina nas posições equivalentes X₃ ou X₇, estariam a aproximadamente 6,6 Å dos resíduos Arg₁ ou Arg₉, de modo ideal interagindo com o carboxilato localizado a 7,5 Å do(s) sulfato(s) no C4S (Fig. 1). O modelo implicou que as sequências TAT devem estar na conformação prolongada para interagir com C4S, e exclui qualquer restrição helicoidal quanto à aglutinação eficiente e seletiva.

[00138] A aproximação da interação de um peptídeo da invenção com C4S também foi modelada em uma simulação de computador. Como prognosticado pelos resultados de modelo descritos acima, os resultados da simulação indicaram qque as argininas nas posições 1, 5 e 9 dos peptídeos de nove mer de acordo com a invenção exibiram interações favoráveis com os sulfatos nos açúcares de C4S (por exemplo, nas posições 1, 3 e 7 na estrutura simulada representada na Figura 2. Adicionalmente, uma lisina na posição 3 do peptídeo de nove mer foi capaz de interagir com o carboxilato no açúcar nas posições 2 do C4S como modelado na Figura 2.

[00139] As interações favoráveis nas posições 1, 5 e 9 dos peptídeos alvejadores da invenção com a molécula C4S são esquematicamente representadas na Figura 3 usando o peptídeo TAT viral. Como determinado pelo modelo e como representado na Figura 3, apenas Arg nas posições 1, 5 e 9 (bolas na Figura 3), e Lys em 3 são engajados nas interações com os sulfatos nos açúcares de C4S em 1, 3 e 7 e o carboxilato nas posições 2 no C4S, respectivamente. Além disso, porque as estruturas são simétricas, Lys +3 pode ser movido em +7 com resultados idênticos.

[00140] A aglutinação do peptídeo de nove mers da invenção ao C4S prognosticado pelos modelos, em particular, quando comparada à aglutinação

a outros proteoglicanos foi testada usando um protocolo de ELISA modificado. As placas de ELISA foram revestidas durante a noite com 1 mg/ml de sulfato de heparina (HS), sulfato de condroitina-4 (C4S), sulfato de condroitina-6 (C6S) ou ácido hialurônico (HA) em PBS. Os reservatórios foram depois lavados com PBS e incubados por 1 hora na temperatura ambiente com 1 mg/ml de um peptídeo exemplar da invenção tendo as sequências RYFvRIKYRh (“RYF”; SEQ ID NO: 2) ou um peptídeo TAT padrão. As placas foram depois completamente lavadas com PBS e subsequentemente fotografadas com um microscópio luminescente LUMASCOPE®. As imagens foram depois quantificadas usando o software ImageJ (Figura 4). Os resultados apresentados na Figura 4 demonstram, que ao contrário do peptídeo TAT padrão (Fig. 4B), o peptídeo RYF de acordo com a invenção especificamente se liga ao proteoglicano C4S, e em particular, seletivamente liga C4S em relação aos outros proteoglicanos testados (Fig. 4A).

[00141] O mesmo protocolo de ELISA modificado foi usado para examinar o impacto de alterar a quiralidade dos resíduos de aminoácido nas posições 1, 5, 9 e 3 ou 7 na aglutinação dos peptídeos ao C4S. A Figura 5 demonstra que a alta atividade de aglutinação foi apenas mantida onde todas das posições Arg₁, Arg₅, Arg₉ e Arg/Lys₃ ou Arg/Lys₇ tiveram a mesma quiralidade (isto é, todas destas posições foram D- aminoácidos ou todas foram L-aminoácidos). Na Figura 5, uma letra maiúscula indica um enantiômero L e uma letra minúscula indica um enantiômero D.

[00142] O mesmo ELISA modificado foi depois usado para investigar o impacto de charge líquida do peptídeo sobre a aglutinação seletiva ao C4S. Os resultados da Figura 6 demonstram que o número de resíduos negativamente carregados nas “posições livremente selecionáveis” do peptídeo diretamente correlacionou-se com a aglutinação não específica aos proteoglicanos, e que diminuindo o número de resíduos negativamente

carregados nestas posições aumentou a especificidade e/ou seletividade para o C4S.

7.2 Aglutinação de Peptídeo Ao C4S Como Expressado Na Superfície da Célula

[00143] Como explicado por toda a descrição, as presentes moléculas são capazes de ligar seletividade C4S em relação aos outros proteoglicanos. A seletividade de aglutinação de um peptídeo conjugado a FITC da invenção, RYFvRIKYRh (“RYF”; SEQ ID NO: 2) foi avaliada em células que expressam C4S (células CHO) e células que carecem de C4S (células Sog9; deficientes em condroitina 4-o-sulfotransferase 1 (C4ST-1, também conhecida como CHST11). As células Sog9 (C4ST-) e CHO foram incubadas por 24 horas na presença do peptídeo RYF (sequência: RYFvRIKYRh) (2,5 M). As células foram depois lavadas 3x em PBS antes de serem fixadas em metanol-acetona (1:1) e fotografadas com um microscópio de fluorescência LUMASCOPE®. A Figura 7 demonstra que o peptídeo RYF da invenção não se ligou às células Sog9 que carecem de C4S; ao contrário, as células CHO que expressam C4S exibiram aglutinação intensa, uniforme.

[00144] O mesmo procedimento de microscopia fluorescente foi usado para avaliar a aglutinação do peptídeo FITC-RYF nas células que expressam C4S pré-tratadas com clorato. O clorato é um inibidor das sulfotransferases, e, assim, o tratamento com clorato diminui ou inibe a expressão de C4S. Os macrófagos foram tratados com 0, 3, 10 ou 30 µM de clorato por 16 horas antes da lavagem, incubação com peptídeo RYF (SEQ ID NO: 2) e fotografia como descrito acima. A Figura 8 demonstra que a aglutinação de RYF (SEQ ID NO: 2) correlacionou-se com a expressão do sulfato de condroitina.

[00145] Os experimentos mostrados nas Figuras 7 e 8 revelaram que os peptídeos da invenção foram altamente seletivos para C4S em relação aos outros proteoglicanos. Assim, os peptídeos permitem o alvejamento específico de células que exclusivamente expressam C4S ou altos níveis de

C4S em relação aos outros proteoglicanos. A enzima primária responsável pela 4-sulfatação de condroitina, e assim a produção de C4S, é a CHST11. Os dados de expressão dos arranjos Atlas revelaram que o gene CHST11 é preferencialmente expressado em células da linhagem de leucócito (Figura 9). Consequentemente, os peptídeos e métodos da invenção preferencialmente permitem o alvejamento de leucócitos.

7.3 Uso de Peptídeos Da invenção Como Uma Molécula Carregadora Para Um Produto Terapêutico

[00146] A capacidade para os peptídeos da invenção atuarem como porções carregadoras, e a dependência dos níveis e espaçamento dos resíduos de D-aminoácido neste ponto foi examinada pela liberação de uma porção de FITC do peptídeo devido aos extratos de macrófago. 1 µg de peptídeos rotulados com FITC de acordo com a invenção com níveis e espaçamento diferentes de aminoácidos D foi incubado por até 48 horas em extratos de macrófago “Bruto” (ver, por exemplo, J Exp Med. 129(1969), 227–245) a 37°C. Juntos com FITC livre como controle, 0,5 µg de peptídeos foi depois manchado sobre papel de celulose (Whatman #1) antes de ser submetido à cromatografia (de camada fina) usando n-butanol, ácido acético, água (4:1:1) como solvente. As 0,5 µg remanescentes de amostras foi usado para a análise de HPLC-MS/MS. A legenda para os peptídeos usados na Figura 10 é: os peptídeos 1, 5 e 6 têm o consenso: RXXxRXXXRh; os peptídeos 14, 15 e 16 têm o consenso: RXxXRXXXRh; os peptídeos 23, 24 e 25 têm o consenso: rXXXrXXXr (ver, por exemplo, a WO 2010/072228). A conjugação entre os peptídeos e FITC foi feita através de uma ligação de peptídeo covalente regular aos a.a. de terminal N do peptídeo. Nenhuma degradação foi observada para os peptídeos 23, 24 e 25 por causa da conjugação ao terminal N “r” (“d”-aminoácido). A quantidade de FITC livre liberado dos peptídeos varia de 100% (#5) (consenso: RXXxRXXXRh) a 30% (#15) (consenso: RXxXRXXXRh). Os dados indicaram que a inclusão de um aminoácido D

nas posições 4 do peptídeo pode modular a estabilidade e a sua capacidade para liberar a porção de BAM livre.

[00147] O uso do peptídeo exemplar da invenção como uma porção carregadora também foi examinado em um ensaio de proliferação de célula. As células derivadas de macrófago bruto foram incubadas por 48 horas com 2,5 μ M do análogo de nucleosídeo indicado ou o análogo como um conjugado com o peptídeo RYF na presença de vermelho de fenol. As culturas contendo células que se dividem mudam o meio para claro, enquanto que o meio das culturas contendo as células que não se dividem permanece escuro (compostos ativos). As imagens das culturas são apresentadas na Figura 11A. o crescimento percentual também foi determinado medindo-se o teor relativo de LDH (Figura 11B). O experimento demonstrou que o conjugado de peptídeo-citotóxicos da invenção foi capaz de matar uma das células de macrófago de tumor (isto é, células derivadas de macrófago bruto) e que o peptídeo foi capaz de transportar os citotóxicos para dentro da célula, convertendo compostos ineficazes em agentes citotóxicos eficazes. Por exemplo, os compostos “ribo” e “tg” (Tioguanina) não têm nenhum efeito na concentração testada (2,5 μ m), mas se tornam potencialmente citotóxicos quando conjugados a um peptídeo transportador exemplar da invenção (isto é, RYF).

[00148] O Experimento foi repetido para investigar os efeitos das ligações L ou D sobre as propriedades citotóxicas da porção de BAM. As células foram incubadas com 3' amino β -D-arabinofuranosídeo sozinho ou na forma de um conjugado com o peptídeo RYF. Como a Figura 12 demonstra, o composto foi apenas internalizado como apresentado na forma de um conjugado. Adicionalmente, foi surpreendentemente descoberto que apenas o uso do resíduo de ligação em D (isto é, “e” representando ácido D-glutâmico) foi citotóxico. Isto demonstra que a ligação à posição 3' do açúcar do nucleosídeo por intermédio de um enantiômero L (isto é, um L- aminoácido)

poderia ser removida pelas proteases, convertendo o nucleosídeo modificado em um “normal” (isto é, com um grupo –OH na posição 3’, que não atua como um terminador de cadeia). Entretanto, uma vez que a posição 3’ é conjugada a um enantiômero D, o mesmo não pode ser removido por uma protease, e uma vez incorporado dentro do filamento de DNA, o mesmo funcionará para prevenir alongamento de DNA adicional.

[00149] O experimento foi repetido com 3’AdT (3’ amino desoxitimidina) e 3’ amino β -D-arabinofuranosídeo (Ribo). As células foram incubadas com cada um dos compostos sozinhos ou como um conjugado de ligação Nly terminal ao peptídeo RYF por intermédio de L-Glu (E) ou D-Glu (e). As células foram depois incubadas por 72 horas antes que o teor de LDH fosse medido. A Figura 13 demonstra que a ligação com o enantiômero D, D-ácido glutâmico (“e”), converte os compostos inativos naqueles altamente citostáticos.

[00150] Um ensaio similar foi realizado usando células MOLT4. As células MOLT4 foram incubadas por 5 dias com os compostos indicados ou os compostos como um conjugado com o peptídeo PYF. As células MOLT4 agregam-se juntas, permitindo assim visualização fácil do crescimento celular. A Figura 14 mostra que, similar às células derivadas de macrófago bruto, os conjugados citotóxicos de RYF matam as células de tumor *in vitro*.

7.4 Modelagem Da Interação de C4S-TAT

[00151] Os estudos de mutagênese de TAT como aqui descritos demonstraram que os resíduos Arg₁, Lys/Arg 3 ou 7, Arg₅, e Arg₉ foram os resíduos mais importantes para a aglutinação ao C4S. Além disso, a comparação das estruturas 3D de TAT e C4S, nas suas conformações prolongadas, revelou que a distância média entre as cadeias laterais n e n+3 de TAT está muito próxima àquela dos grupos sulfato e carboxilato dos resíduos n e n+1 de C4S (Figura 15).

[00152] Estas descobertas revelaram que TAT e C4S provavelmente se

ligam devido às interações eletrostáticas favoráveis entre o par de resíduos $1/n$; $3/n+1$; $5/n+2$; $7/n+3$; e $9/n+4$ de TAT e C4S, respectivamente. Nos pares A/B citados, A e B designam resíduos de TAT e C4S, respectivamente; ver, por exemplo, as Figuras 15 e 16, fornecendo esquemáticos de moléculas TAT e C4S em que os resíduos são indicados de acordo com a numeração aqui usada. As interações favoráveis entre estes conjuntos de resíduos podem ser explicadas por 2 mecanismos (que não são de modo necessário mutuamente exclusivos), dependendo de se Arg₁ de TAT ligar-se-ia a uma porção de açúcar que carrega um grupo sulfato ou um carboxilato.

[00153] Devido à natureza, ao tamanho e à flexibilidade dos dois parceiros, não foi possível identificar o modo de aglutinação mais provável usando software de ancoragem. Portanto, nós usamos uma estratégia consistindo em (i) partir dos confôrmeros 3D prolongados de ambas moléculas, (ii) manualmente posicionar as moléculas para formar os 3 contatos adjacentes como descrito acima (por exemplo, $3/n+1$, $5/n+2$, $7/n+3$); (iii) realizar um total de 600 ns de simulações Molecular Dynamics (MD) a 300 K enquanto se mantêm o triplete escolhido de interações; e, eventualmente, (iv) calcular se novas interações emergiriam durante as simulações MD, e em que frequência. Importantemente, no início da simulação MD, nenhuma das interações outras que não as interações de partida escolhidas ocorrem entre TAT e C4S.

[00154] O argumento que sustenta este método é que, se o esquema de interação considerado constituído pelos cinco pares principais de resíduos de interação está correto, e se, por exemplo Arg₁ de TAT liga-se preferivelmente a uma porção sulfatada de C4S, então, uma simulação MD partindo de um complexo com apenas o triplete interativo ($1/n$, $3/n+1$, $5/n+2$) deve levar à formação espontânea de interações mais preferidas, por exemplo, $7/n+3$ e $9/n+4$, mas apenas se o resíduo n de C4S é um resíduo sulfatado.

[00155] As interações entre TAT e C4S foram modeladas usando o

pacote de modelagem molecular CHARMM, versão c36b1 (Brooks *et al.*, J. Comput. Chem. 30(2009), 1545-1614). O peptídeo TAT (sequência: RKKRRQRRR) foi descrito usando os campos de força de todos os hidrogênios de CHARMM22 (Mackerell *et al.*, J. Phys. Chem. B 102(1998), 3586-3616), enquanto que a topologia e os parâmetros foram obtidos usando SwissParam para a molécula C4S (Zoete *et al.*, J. Comput. Chem. 32(2011), 2359-2368). A molécula C4S foi modelada para conter 10 porções de açúcar, por exemplo, como esquematicamente representado na Figura 16.

[00156] Os pontos de partida da simulação MD foram gerados posicionando-se manualmente TAT e C4S, usando o software de visualização UCSF Chimera para formar os esquemas de interação de interesse, isto é, envolvendo três resíduos consecutivos de C4S e 3 resíduos de TAT (por exemplo, resíduos 1,3,5 ou 3,5,7 ou 5,7,9) (Pettersen *et al.*, J. Comput. Chem. 25(2004), 1605-1612). Para manter a interação entre os pares de resíduo TAT/C4S escolhidos durante a simulação de MD, uma restrição de distância “NOE” foi aplicada a eles: RMIN e RMAX foram ajustados a 5 e 7 Å, respectivamente; e KMIN ajustado a 1000 kcal mol⁻¹ Å⁻². O sistema foi depois minimizado usando 5000 etapas de ABNR. Finalmente, para cada esquema de interação de partida, uma reunião de 30 simulações de MD independentes, cada uma com 20 ns no comprimento, foi realizada a 300K para checar se interações adicionais ocorreriam entre C4S e TAT. O efeito de solvente foi estimado pelo modelo de solvatação implícito de de FACTS, com uma constante dielétrica de 1 para o soluto. Para cada simulação MD, 1000 armações, regularmente separadas, foram extraídas do arquivo de trajetória. Para cada matriz, pares de resíduos interativos foram identificados como aqueles tendo átomos pesados em uma distância menor do que 5 Å. Finalmente, a frequência de existência de cada par possível de resíduos de interação foi calculada em média sobre todas as armações extraídas das simulações 30 MD de cada reunião.

[00157] A Figura 17 fornece dois exemplos de esquemas de interação formados durante as simulações MD partindo de (a) dos 3 contatos formados pelos resíduos 1/4, 3/5 e 5/6 ou (B) dos 3 contatos formados pelos resíduos 3/4, 5/5 e 7/6 entre as moléculas TAT e C4S, respectivamente. Como pode ser observado, durante as simulações de MD ilustradas em (a), o sistema espontaneamente formou interações entre o terminal C de TAT e os resíduos de número alto de C4S (ver, por exemplo, as Figuras 18 A e B), notavelmente criando os pares de interação 7/7 e 9/8 que foram esperados de acordo com a hipótese mencionada acima. Ao contrário, nas simulações MD ilustradas em (B), apenas novas interações limitadas foram formadas. Importaneamente, as duas interações esperadas 1/3 e 9/7 não se formaram. Interessantemente, nas simulações MD ilustradas em (A), o esquema de interação corresponde ao um onde Arg₁ é esperado interagir com um resíduo sulfatado de C4S, enquanto que nas simulações MD que ocorrem a (B), Arg₁ foi esperado interagir com um resíduo carboxilado de C4S.

[00158] Vários outros grupos de simulações foram realizados, cada um usando esquemas de interação diferentes. Em todos os casos onde o esquema envolveu a interação de Arg₁ com um resíduo sulfatado de C4S, quase todas as interações esperadas de acordo com a nossa hipótese mencionada acima ocorreram espontaneamente durante a simulação de MD. Ao contrário, as interações esperadas não ocorreram quando o esquema de partida envolveu uma interação entre Arg₁ e um resíduo C4S carboxilado. Os resultados das simulações sustentam a hipótese de que TAT e C4S interagem devido às interações eletrostáticas favoráveis entre o par de resíduos 1/n, 3/n+1, 5/n+2, 7/n+3 e 9/n+4, onde os resíduos n, n+2 e n+4 de C4S são porções sulfatadas, e os resíduos n+1 e n+3 são porções carboxiladas.

7.5 Uso de Peptídeos Da invenção Como Uma Molécula Carregadora Em Linhagens de Célula Múltipla

[00159] O uso de peptídeos da invenção como moléculas carregadoras

foi investigado em um painel de triagem de linhagens de célula de câncer humano. As linhagens de célula de tumor humano do painel de triagem de câncer foram cultivadas em meio RPMI 1640 contendo 5% de soro bovino fetal e 2 mM de L-glutamina. Para um experimento de triagem típico, as células foram inoculadas em placas de microtítulo de 96 reservatórios em volumes de 100 µL nas densidades de plaqueamento variando de 5.000 a 40.000 células/reservatório dependendo do tempo dobrado de linhagens de célula individuais. Depois da inoculação da célula, as placas microtituladoras foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂, 95% de ar e 100% de umidade relativa por 24 h antes da adição de drogas experimentais.

[00160] Depois de 24 h, duas placas de cada linhagem de célula foram fixadas *in situ* com TCA fornecendo uma medição da população de célula no momento da adição de droga (Tz). Os produtos terapêuticos experimentais foram solubilizados em sulfóxido de dimetila a 400 vezes a concentração de teste máxima final desejada e armazenados congelados antes do uso. No momento da adição de produto terapêutico, uma alíquota de concentrado congelado foi descongelada e diluída duas vezes a concentração de teste máxima final desejada usando meio completo com 50 µg/ml de gentamicina. Quatro diluições em série de 10 vezes ou ½ log adicionais também foram realizadas fornecendo um total de cinco concentrações de teste mais o controle. Alíquotas de 100 µl das diluições diferentes foram adicionadas aos reservatórios de microtítulo apropriados, que já continham 100 µl de meio, resultando nas concentrações de teste final desejadas.

[00161] A seguir da adição do composto de teste, as placas foram incubadas por um adicional de 48 h a 37°C, 5% de CO₂, 95% de ar, e 100% de umidade relativa. Para as células aderentes, o ensaio foi terminado pela adição de TCA frio. As células foram fixadas *in situ* pela adição suave de 50 µl de TCA (concentração final, 10% de TCA) e incubadas por 60 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e as placas foram lavadas cinco vezes

com água de torneira e secadas ao ar. Solução de sulforrodamina B (SRB) (100 µl) a 0,4% (p/v) em ácido acético a 1% foi adicionada a cada reservatório, e as placas foram incubadas por 10 minutos na temperatura ambiente. Depois de tingir, o corante não ligado foi removido lavando-se cinco vezes com ácido acético a 1% seguido pela secagem ao ar. O corante ligado foi subsequentemente solubilizado com 10 mM de base trizma, e a absorbância foi lida em uma leitora de placa automatizada em um comprimento de onda de 515 nm. Para as células em suspensão, a metodologia foi a mesma exceto que o ensaio foi terminado pela fixação das células sedimentadas no fundo dos reservatórios pela adição suave de 50 µl de TCA a 80% (concentração final, 16% de TCA). Usando as sete medições de absorbância [tempo zero, (Tz), cultivo de controle, (C), e cultivo de teste na presença de composto nos níveis de concentração (Ti)], o crescimento percentual foi calculado em cada um dos níveis de concentração de composto. A inibição do crescimento percentual foi calculada como:

$[(Ti - Tz) / (C - Tz)] \times 100$ para concentrações para as quais $Ti \geq Tz$

$[(Ti - Tz) / Tz] \times 100$ para as concentrações para as quais $Ti < Tz$.

[00162] A porcentagem de crescimento calculada para cada linhagem de célula testada é fornecida na Tabela 2

Tabela 2

Linhagem de célula	Porcentagem de crescimento		
	3'AdT-RYF	Tioguanina-RYF	5'AdT-RYF
Leucemia			
CCRF-CEM	53,45	43,90	98,70
HL-60(TB)	70,62	51,19	95,89
K-562	87,52	64,70	109,56
MOLT-4	45,40	23,05	98,54
RPMI-8226	81,35	68,08	104,25
SR	84,80	13,87	109,65
Câncer Pulmonar de Célula Não Pequena			
A549/ATCC	82,45	92,64	102,66
HOP-62	102,03	79,43	114,67
HOP-92	98,25	94,99	99,83
NCI-H226	96,97	90,76	106,10
NCI-H23	98,27	104,79	115,75
NCI-H322M	---	120,25	118,09
NCI-H460	33,43	38,65	102,43
NCI-H522	110,62	102,59	119,23
Câncer Colônico			
COLO 205	108,84	114,86	111,19

HCC-2998	102,58	106,69	117,32
HCT-116	97,74	75,06	106,17
HCT-15	106,90	100,79	111,73
HT29	100,38	83,18	98,93
KM12	105,07	97,68	107,42
SW-620	92,66	61,11	107,90
Câncer do CNS			
SF-268	104,00	66,64	112,32
SF-295	105,74	79,05	106,60
SF-539	91,48	100,54	98,34
SNB-19	110,60	101,24	107,37
SNB-75	97,21	97,85	93,69
U251	86,13	83,47	102,81
Melanoma			
LOX IMVI	97,19	42,72	104,99
MALME-3M	94,33	84,12	130,94
M14	98,60	58,68	109,68
MDA-MB-435	85,83	79,84	100,66
SK-MEL-2	124,24	126,86	112,17
SK-MEL-28	107,37	105,71	105,50
SK-MEL-5	97,47	96,96	102,45
UACC-257	96,89	84,76	105,98
UACC-62	87,13	26,64	106,42
Câncer Ovariano			
IGROV1	126,74	95,59	111,16
OVCAR-3	118,06	103,06	113,03
OVCAR-4	103,44	88,49	92,35
OVCAR-5	122,59	109,15	107,73
OVCAR-8	87,74	67,03	102,70
NCI/ADR-RES	88,17	54,63	113,90
SK-OV-3	107,27	98,27	113,84
Câncer Renal			
786-0	106,78	94,97	112,19
A498	107,72	97,50	117,71
ACHN	60,47	45,46	100,75
RXF 393	96,63	91,71	97,28
SN12C	---	84,02	102,57
TK-10	108,34	111,91	110,77
UO-31	100,01	57,20	114,49
Câncer Prostático			
PC-3	81,48	76,13	104,03
DU-145	90,48	64,98	107,78
Câncer Mamário			
MCF7	74,99	86,30	111,41
MDA-MB-231/ATCC	98,27	94,34	96,92
HS 578T	109,43	108,12	113,42
BT-549	103,38	91,09	122,81
T-47D	100,40	89,47	109,17
MDA-MB-468	99,93	98,01	104,66

[00163] Três parâmetros de dose resposta também foram calculados para cada agente experimental (dados não mostrados). A inibição do crescimento de 50% (GI_{50}) foi calculada a partir de $[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100 = 50$, que é a concentração de droga que resulta em uma redução de 50% no aumento de proteína líquido (como medido pelo tingimento com SRB) nas células de controle durante a incubação de droga. A concentração de droga

que resulta na inibição de crescimento total (TGI) é calculada a partir de $T_i = T_z$. A LC_{50} (concentração de droga que resulta em uma redução de 50% na proteína medida no final do tratamento com droga quando comparado com aquela no começo) indicando uma perda líquida de células a seguir do tratamento foi calculada a partir de $[(T_i - T_z)/T_z] \times 100 = -50$. Os valores foram calculados para cada um destes três parâmetros se o nível de atividade foi atingido; entretanto, se o efeito não foi atingido ou é excedido, o valor para este parâmetro foi expressado como maior ou menor do que a concentração máxima ou mínima testadas.

[00164] Como observado a partir da Tabela 2, o experimento testou dois compostos ativos (3'AdT e Tioguanina) conjugados a uma porção RYF para formar um conjugado de BAM como aqui descrito. O conjugado de BAM foi testado quanto à inibição do crescimento em 60 linhagens de célula de tumor (leucemias, Câncer Pulmonar de Célula Não Pequena, Câncer Colônico, Câncer do CNS, melanoma, câncer ovariano, câncer renal, câncer prostático, câncer mamário). Um conjugado não ativo (5'AdT, um análogo de nucleotídeo inativo) foi incluído como controle negativo. Duas vezes o desvio padrão entre as linhagens de células não de leucemia/linfoma foram usados como o limiar arbitrário para detectar a inibição do crescimento (crescimento abaixo de 85% das células não tratadas).

[00165] Como esperado, o controle negativo não inibiu o crescimento celular: nenhuma das 60 linhagens de células cresceu abaixo de 85% das células não tratadas. Isto demonstra que os peptídeos de acordo com a invenção não têm inibição do crescimento intrínseco neste cenário experimental.

[00166] A inibição do crescimento para ambos os conjugados de composto ativo foi observada entre 5 das 6 linhagens de célula de leucemia/linfoma (3'AdT: crescimento médio de 71% de não tratada; Tioguanina: 44,13% de não tratada). Ao contrário, apenas 3 das 54 linhagens de célula de

outras linhagens mostraram crescimento inibido abaixo de 85% (3'AdT: crescimento médio 98,26% de não tratada; Tioguanina: 86,65% de não tratada). A diferença na inibição do crescimento entre as linhagens de célula de leucemia e linhagens de célula de câncer de outra origem foi estatisticamente significativa tanto para 3'AdT ($p = 0,010$) quanto para Tioguanina ($p = 0,003$), mas não para o controle negativo 5'AdT ($p > 0,05$).

[00167] O perfil de resposta de inibição do crescimento correspondeu à expressão esperada do gene CHST11 e C4S em células mieloides normais e de tumor, e em células linfoides de tumor. Em conclusão, os resultados demonstram que os peptídeos de acordo com a invenção seletivamente alvejaram as células de tumor das linhagens mieloide e linfoide, que expressam tanto o gene CHST11 quanto C4S.

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula ou composto, caracterizados pelo fato de que compreendem ou consistem em uma das seguintes estruturas de consenso de (I) a (IV):

(I) Arg₁-(SP_A)-Arg₅-(SP_B)-X-(SP_C)-Arg₉-(LD₁₀)_n-(XD₁₁)_m;

(II) Arg₁-(SP_C)-X-(SP_B)-Arg₅-(SP_A)-Arg₉-(LD₁₀)_n-(XD₁₁)_m;

(III) (XD₋₂)_m-(LD₋₁)_n-Arg₁-(SP_A)-Arg₅-(SP_B)-X-(SP_C)-Arg₉; ou

(IV) (XD₋₂)_m-(LD₋₁)_n-Arg₁-(SP_C)-X-(SP_B)-Arg₅-(SP_A)-Arg₉;

(a) em que, LD₁₀ ou LD₋₁ representam qualquer aminoácido L ou D outro que não D-arginina, D-lisina; L-arginina ou L-lisina e n tem um valor de 0 a 10;

(b) em que XD₁₁ ou XD₋₂ representam qualquer aminoácido D outro que não D-arginina ou D-lisina e m tem um valor de 0 ou 1;

(c) em que

(i) Arg₁, Arg₅, e Arg₉ representam L-arginina; e X representa L-lisina ou L-arginina, ou

(ii) Arg₁, Arg₅, e Arg₉ representam D-arginina; e X representa D-lisina ou D-arginina;

(d) em que (SP_A) representa um ligador químico que

(i) consiste em uma cadeia de peptídeo de 3 resíduos de aminoácido, em que cada resíduo pode ser independentemente selecionado de qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; ou

(ii) separa os resíduos de aminoácido adjacentes em 12,9 + 1,5 Å;

(e) em que (SP_C) representam um ligador químico que

(i) consiste em um único resíduo de aminoácido que pode ser qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; ou

(ii) separa os resíduos de aminoácido adjacentes em $7,5 + 1,5 \text{ \AA}$;

(f) em que $(SP_B)\text{-X}\text{-(}SP_C)$ ou seu reverso, $(SP_C)\text{-X}\text{-(}SP_B)$ representam um ligador químico

(i) em que SP_B e SP_C cada um representa um único resíduo de aminoácido que pode ser independentemente selecionado de qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; ou

(ii) que separa os resíduos de aminoácido adjacentes Arg_1 e Arg_5 ou Arg_5 e Arg_9 em $12,9 + 1,5 \text{ \AA}$

(g) e em que onde

(i) Arg_1 , Arg_5 , e Arg_9 representam L-arginina; e X representa L-lisina ou L-arginina;

(ii) (SP_A) consiste em uma cadeia de peptídeo de 3 resíduos de aminoácido; e

(iii) (SP_B) e (SP_C) cada um representa um único resíduo de aminoácido;

as estruturas de consenso de (I) a (IV) são representadas por

(V) $Arg_1\text{-X}_2\text{-X}_3\text{-X}_4\text{-Arg}_5\text{-X}_6\text{-X}_7\text{-X}_8\text{-Arg}_9\text{-(LD}_{10})_n\text{-(XD}_{11})_m$; ou

(VI) $(XD_{-2})_m\text{-(LD}_{-1})_n\text{-Arg}_1\text{-X}_2\text{-X}_3\text{-X}_4\text{-Arg}_5\text{-X}_6\text{-X}_7\text{-X}_8\text{-Arg}_9$;

tendo Arg_1 , Arg_5 e Arg_9 como as ditas L-argininas; tendo X_3 ou X_7 como as ditas L-lisina ou L-arginina;

em que nas estruturas (V) ou (VI), X_4 ou X_6 são um aminoácido D.

2. Molécula ou composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pelo fato de que

(SP_A) representa um ligador químico que separa os resíduos de aminoácido adjacentes em $12,9 + 1,5 \text{ \AA}$;

(SP_C) representa um ligador químico que separa os resíduos de

aminoácido adjacentes em $7,5 + 1,5 \text{ \AA}$;

e em que $(SP_B)\text{-X}\text{-(}SP_C)$ ou seu reverso, $(SP_C)\text{-X}\text{-(}SP_B)$ representam um ligador químico que separa os resíduos de aminoácido adjacentes Arg_1 e Arg_5 ou Arg_5 e Arg_9 em $12,9 + 1,5 \text{ \AA}$.

3. Molécula ou composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pelo fato de que um ou mais dos ditos ligadores químicos são um beta-peptídeo, uma armação com base em aminoácido de açúcar, um beta-peptidomimético tipo grampo, um mimético de hélice alfa ou um ciclotídeo.

4. Molécula ou composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pelo fato de que (SP_A) representa uma cadeia de peptídeo consistindo em três resíduos de aminoácido, cada um independentemente selecionado de qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; e em que (SP_B) e (SP_C) cada um representa um único resíduo de aminoácido que pode ser independentemente selecionado de qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina.

5. Molécula ou composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pelo fato de que (SP_A) , (SP_B) e (SP_C) juntos não contêm mais do que 3 resíduos de alanina.

6. Molécula ou composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pelo fato de que (SP_A) , (SP_B) e (SP_C) juntos não contêm nenhum dos resíduos de prolina.

7. Molécula ou composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pelo fato de que (SP_A) , (SP_B) e (SP_C) juntos incluem um ou mais aminoácidos selecionados de Phe, Trp, Tyr, Val, Met, Ile, e Leu.

8. Molécula ou composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pelo fato de que (SP_B) representa um aminoácido D.

9. Molécula ou composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pelo fato de que LD_{10} representa L- ou D-histidina.

10. Molécula ou composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pelo fato de que XD₁₁ representa D-histidina.

11. Molécula ou composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pelo fato de que m tem um valor de 1, e/ou m tem um valor de 0.

12. Molécula ou composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pelo fato de que compreende a sequência selecionada a partir do grupo que consiste em:

RSTqRYRVRh (SEQ ID NO: 1);
 RYFvRIKYRh (SEQ ID NO: 2);
 RYFvRIKARh (SEQ ID NO: 3);
 RAAvRAKYRh (SEQ ID NO: 4);
 RAAvRIKYRh (SEQ ID NO: 5);
 RSTqRYRVRh (SEQ ID NO: 6);
 RSTqRYKVRh (SEQ ID NO: 7);
 RGGgRGKGRh (SEQ ID NO: 8);
 RHHhRHKHRh (SEQ ID NO: 9);
 RVVvRVKVRh (SEQ ID NO: 10);
 RLLIRLKLRLh (SEQ ID NO: 11);
 RMMmRMKMRh (SEQ ID NO: 12);
 RIIiRIKIRh (SEQ ID NO: 13);
 RYFVRiKYRh (SEQ ID NO: 25);
 RSTqRYRVR (SEQ ID NO: 26);
 RYFvRIKYR (SEQ ID NO: 15);
 RYFvRIKAR (SEQ ID NO: 27);
 RAAvRAKYR (SEQ ID NO: 28);
 RAAvRIKYR (SEQ ID NO: 29);
 RSTqRYRVR (SEQ ID NO: 30);
 RSTqRYKVR (SEQ ID NO: 31);

RGGgRGKGR (SEQ ID NO: 32);
 RHHhRHKHR (SEQ ID NO: 33);
 RVVvRVKVR (SEQ ID NO: 34);
 RLLlRLKLR (SEQ ID NO: 35);
 RMMmRMKMR (SEQ ID NO: 36);
 RIIiRIKIR (SEQ ID NO: 37); ou
 RYFVRiKYR (SEQ ID NO: 16).

13. Conjugado de uma porção biologicamente ativa (BAM) e uma estrutura de consenso, caracterizado pelo fato de que a dita BAM é conjugada ao terminal da dita estrutura de consenso e em que é selecionado a partir das seguintes estruturas de consenso:

(VII) (BAM)-(LINK)-Arg₁-(SP_A)-Arg₅-(SP_B)-X-(SP_C)-Arg₉-(LD₁₀)_n-(XD₁₁)_m;

(VIII) (BAM)-(LINK)-Arg₁-(SP_C)-X-(SP_B)-Arg₅-(SP_A)-Arg₉-(LD₁₀)_n-(XD₁₁)_m;

(IX) (XD₋₂)_m-(LD₋₁)_n-Arg₁-(SP_A) Arg₅-(SP_B)-X-(SP_C)-Arg₉-(LINK)-(BAM); ou

(X) (XD₋₂)_m-(LD₋₁)_n-Arg₁-(SP_C)-X-(SP_B)-Arg₅-(SP_A)-Arg₉-(LINK)-(BAM)

(a) em que (BAM) representa uma porção biologicamente ativa;

(b) em que (LINK) representa um grupo ligador opcional;

(c) em que, LD₁₀ ou LD₋₁ representam qualquer aminoácido L ou D outro que não D-arginina, D-lisina; L-arginina ou L-lisina e n tem um valor de 0 a 10;

(d) em que XD₁₁ ou XD₋₂ representam qualquer aminoácido D outro que não D-arginina ou D-lisina e m tem um valor de 0 ou 1;

(e) em que

(i) Arg₁, Arg₅, e Arg₉ representam L-arginina; e X

representa L-lisina ou L-arginina, ou

(ii) Arg_1 , Arg_5 , e Arg_9 representam D-arginina; e X representa D-lisina ou D-arginina;

(f) em que (SP_A) representa um ligador químico que

(i) consiste em uma cadeia de peptídeo de 3 resíduos de aminoácido, em que cada resíduo pode ser independentemente selecionado de qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; ou

(ii) separa os resíduos de aminoácido adjacentes em $12,9 + 1,5 \text{ \AA}$;

(g) em que (SP_C) representa um ligador químico que

(i) consiste em um único resíduo de aminoácido que pode ser qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; ou

(ii) separa os resíduos de aminoácido adjacentes em $7,5 + 1,5 \text{ \AA}$;

(h) em que $(\text{SP}_B)\text{-X-}(\text{SP}_C)$ ou seu reverso, $(\text{SP}_C)\text{-X-}(\text{SP}_B)$ representam um ligador químico

(i) em que SP_B e SP_C cada um representa um único resíduo de aminoácido que pode ser independentemente selecionado de qualquer resíduo de aminoácido outro que não D-arginina, D-lisina, L-arginina ou L-lisina; ou

(ii) que separa os resíduos de aminoácido adjacentes Arg_1 e Arg_5 ou Arg_5 e Arg_9 em $12,9 + 1,5 \text{ \AA}$

(i) e em que onde

(i) Arg_1 , Arg_5 , e Arg_9 representam L-arginina; e X representa L-lisina ou L-arginina;

(ii) (SP_A) consiste em uma cadeia de peptídeo de 3 resíduos de aminoácido; e

(iii) (SP_B) e (SP_C) cada um representa um único resíduo de aminoácido;

as estruturas de consenso de (VII) a (X) são representadas por

(XI) (BAM)-(LINK)-Arg₁-X₂-X₃-X₄-Arg₅-X₆-X₇-X₈-Arg₉-(LD₁₀)_n-(XD₁₁)_m; ou

(XII) (XD₋₂)_m-(LD₋₁)_n-Arg₁-X₂-X₃-X₄-Arg₅-X₆-X₇-X₈-Arg₉-(LINK)-(BAM);

tendo Arg₁, Arg₅ e Arg₉ como as ditas L-argininas; tendo X₃ ou X₇ como as ditas L-lisina ou L-arginina;

em que na estrutura (XI) ou (XII), X₄ ou X₆ é um aminoácido D.

14. Conjugado de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o grupo ligador (LINK) é L- ou D-Glu.

15. Conjugado de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que BAM é conjugada ao Arg₁ ou Arg₉ por uma ligação de amida de terminal N covalente ou éster de terminal C.

16. Conjugado de acordo com a reivindicação 13,, caracterizado pelo fato de que a dita BAM é conjugada a um resíduo de aminoácido e/ou um grupo químico dentro de (SP_A), (SP_B) ou (SP_C).

17. Conjugado de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a dita conjugação é conjugação direta a um resíduo interno da dita sequência de peptídeo ou indireta por intermédio de um grupo ligador.

18. Conjugado de de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o BAM é um mono- ou polissacarídeo, um agente citotóxico, um agente antineoplásico, um agente anti-inflamatório, um agente antiviral, um agente antibacteriano ou um agente para o tratamento de infecções protozoárias.

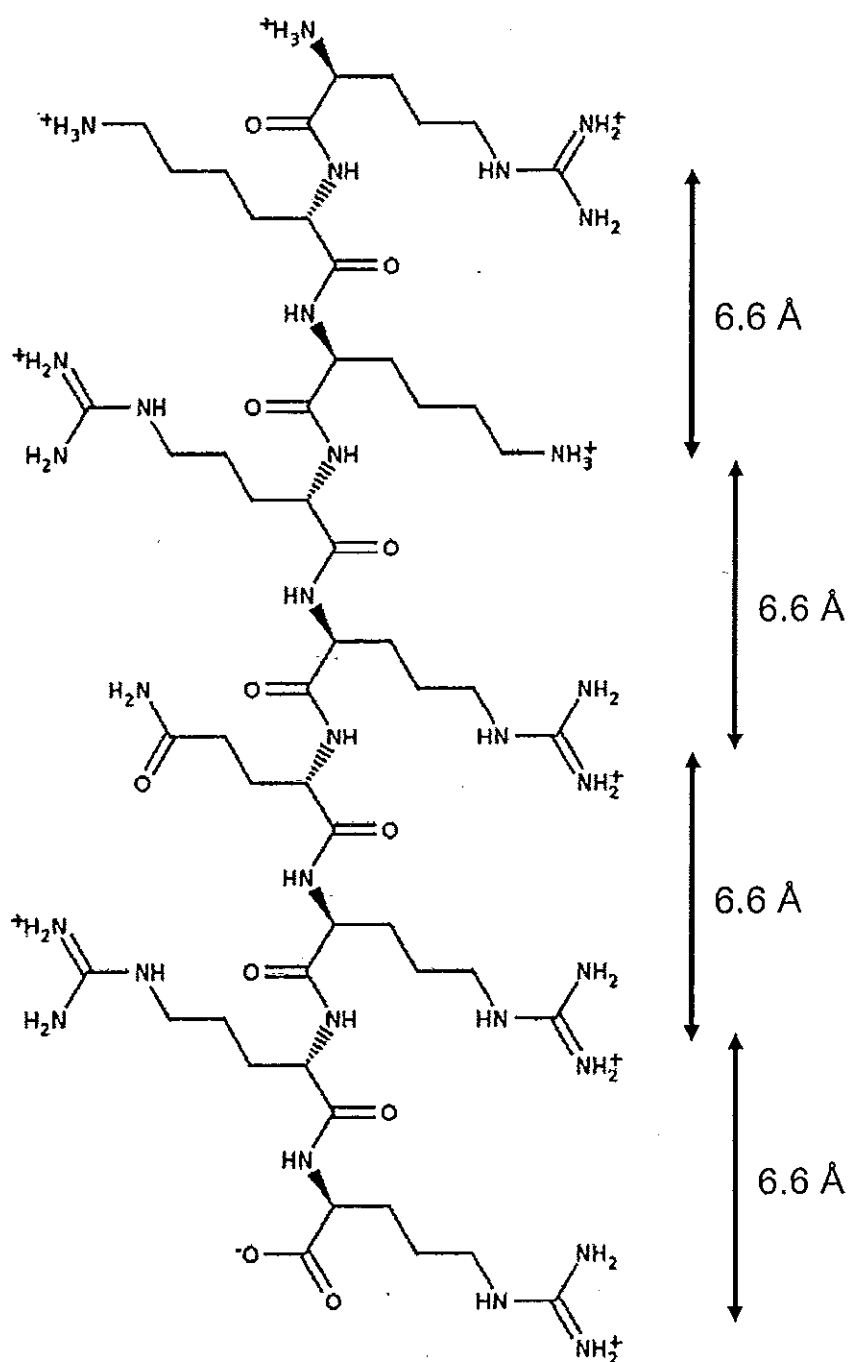
19. Conjugado de acordo com a reivindicação 13,,

caracterizado pelo fato de que a BAM é desoxirribose ou ribose.

20. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o conjugado como definido na reivindicação 13.

21. Uso do conjugado como definido em qualquer uma das reivindicações 13 a 19, ou da molécula ou composto como definidos nas reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato que é para a manufatura de um medicamento para o tratamento de distúrbios envolvendo leucócitos, selecionados de doença neoplásica, doença inflamatória, doença autoimune, doença de imunodeficiência, infecções virais, bacterianas, protozoárias ou parasitárias.

22. Uso de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que a doença é leishmaniose.



TAT

FIG. 1 (ESQUERDA)

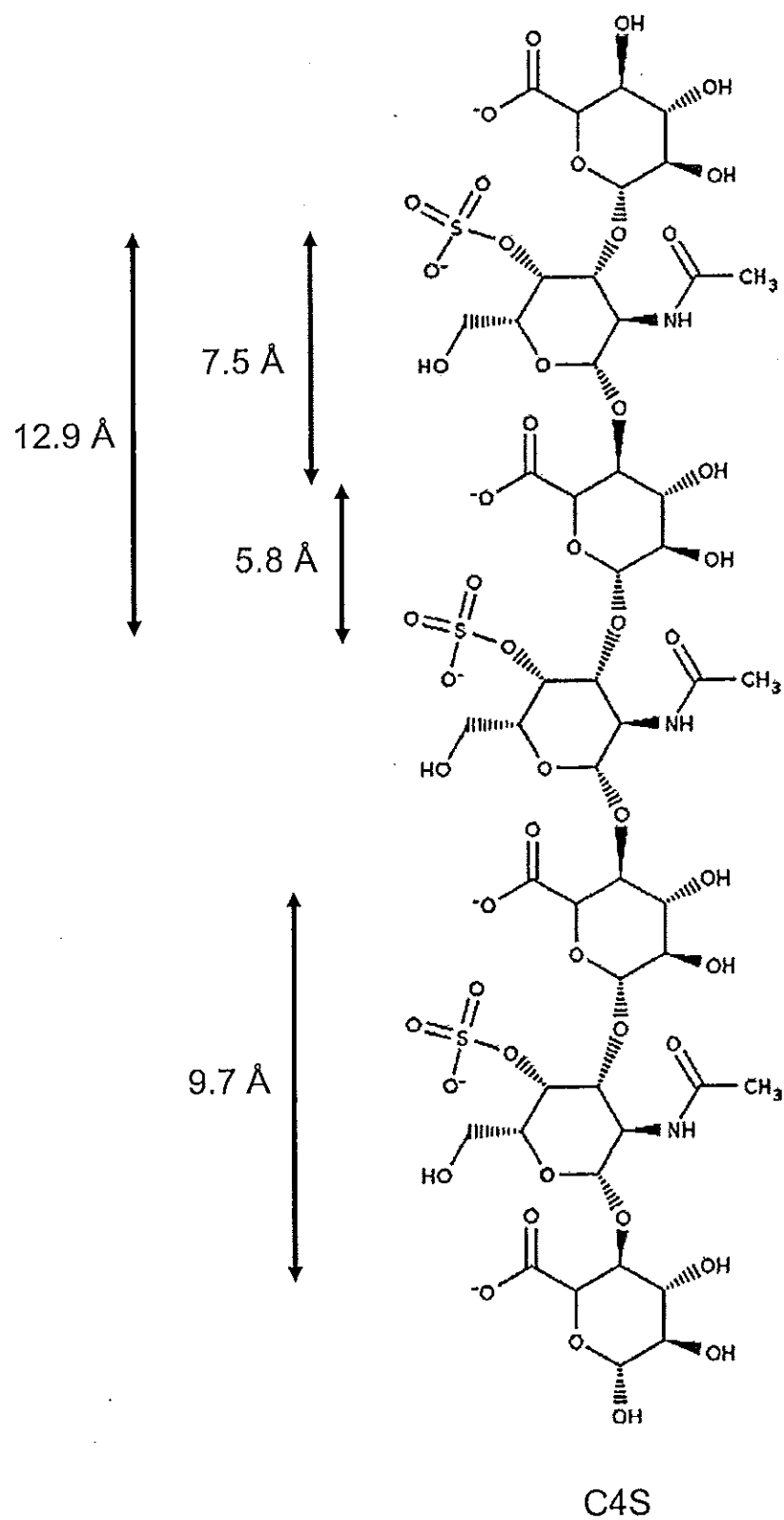


FIG. 1 (DIREITA)

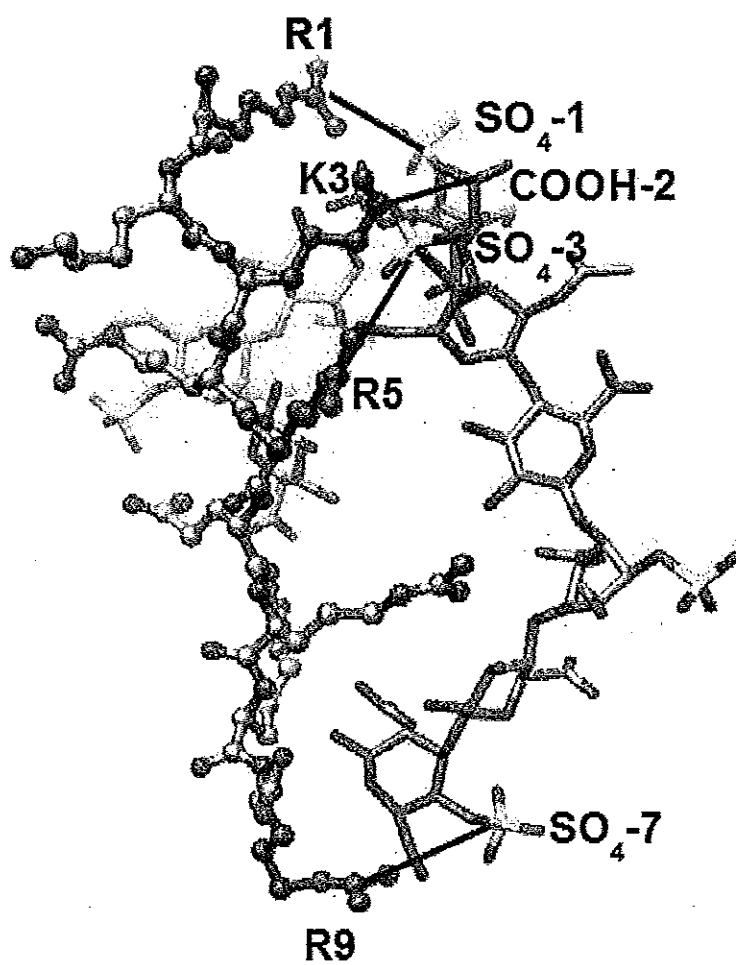


FIG. 2

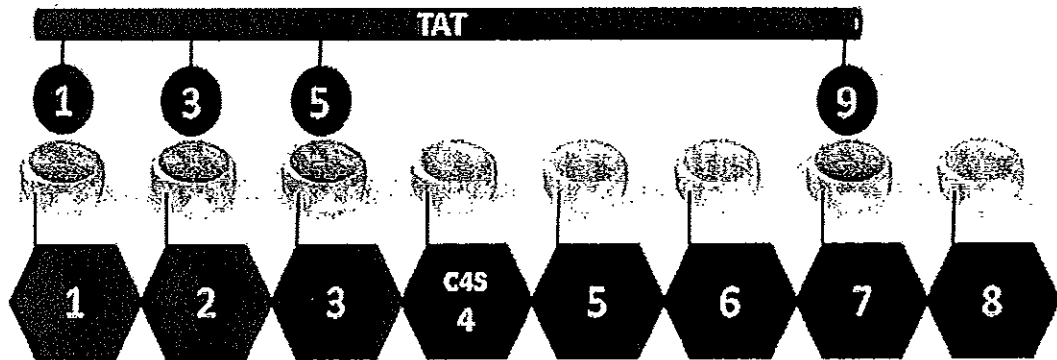


FIG. 3

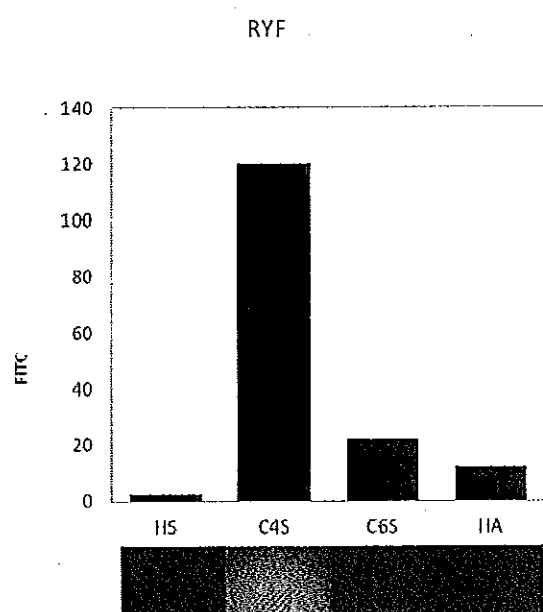


FIG. 4A

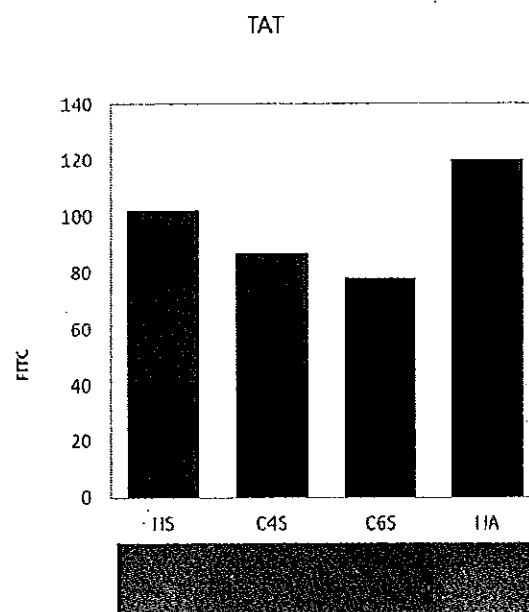


FIG. 4B

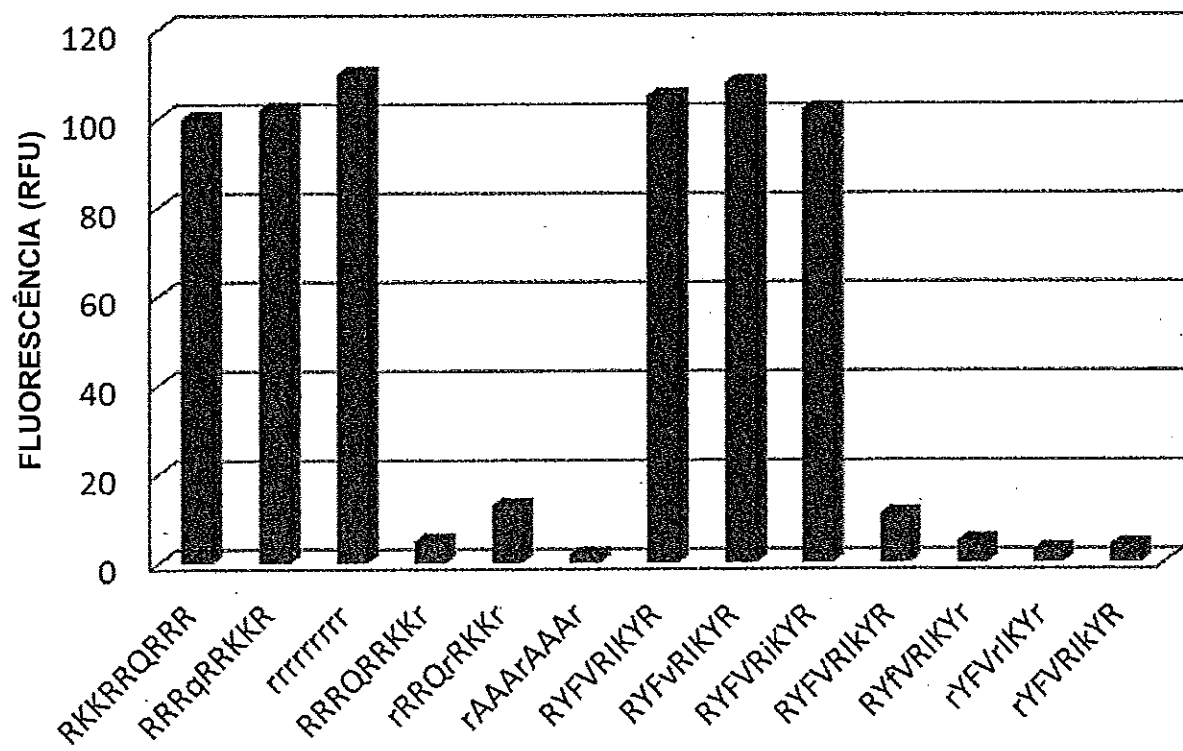


FIG. 5

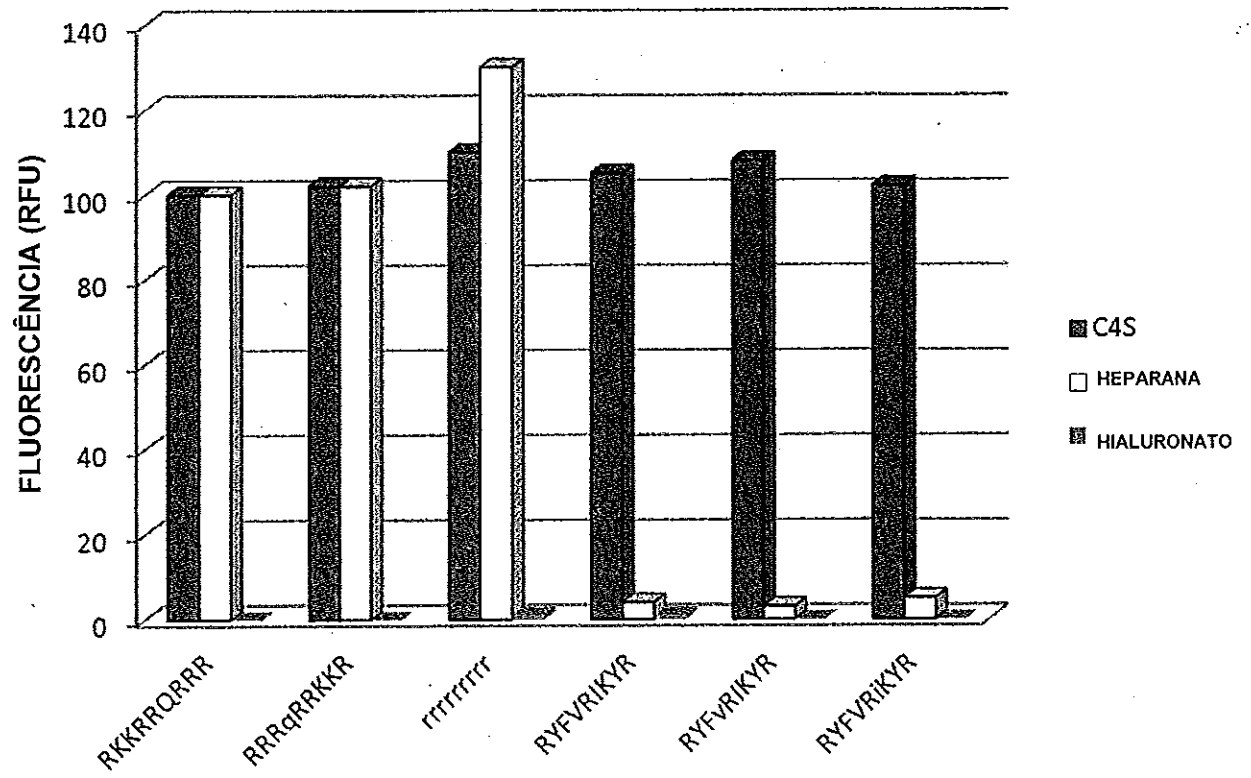


FIG. 6

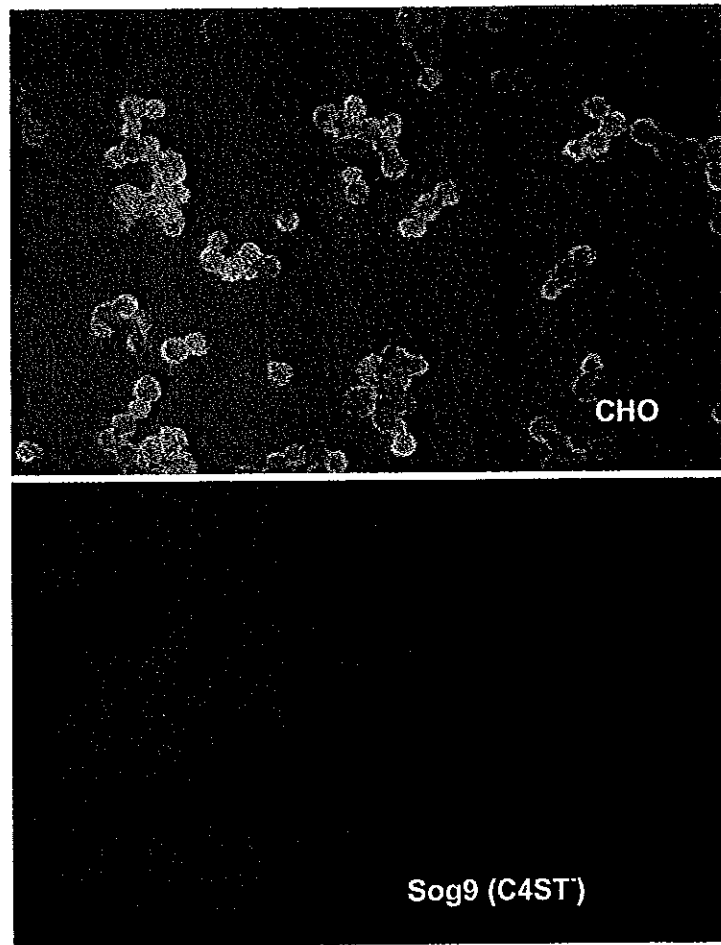


FIG. 7

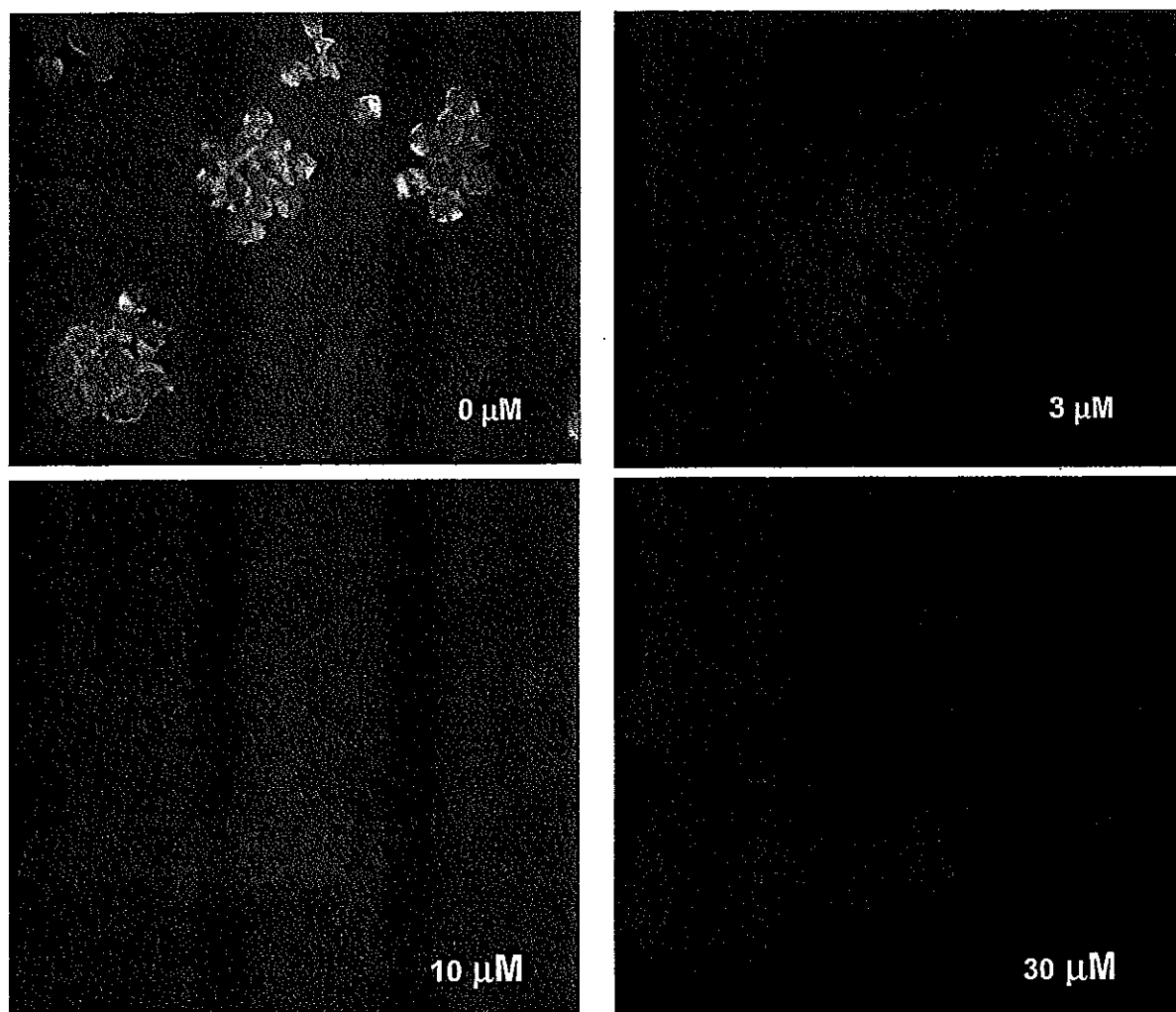


FIG. 8

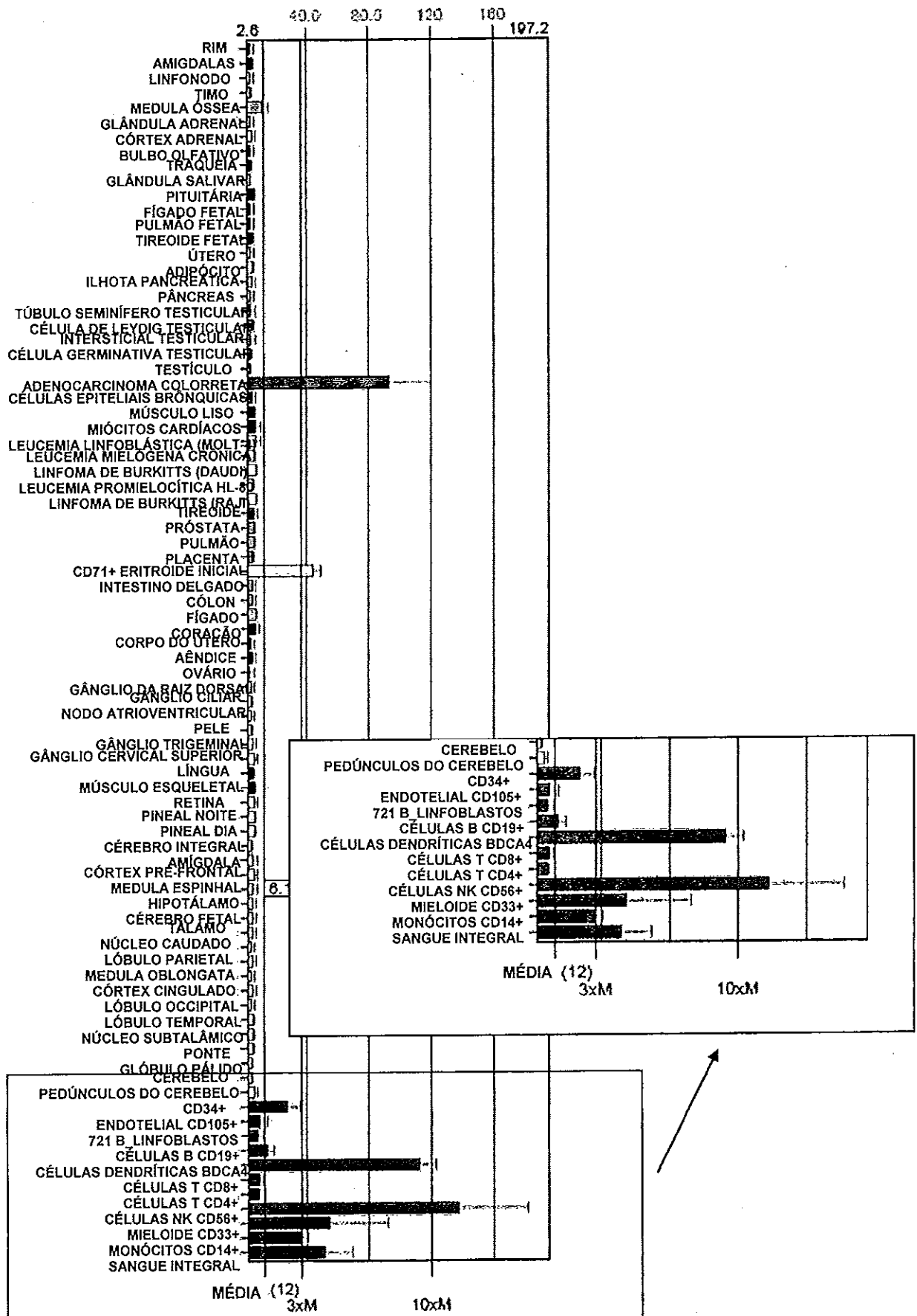


FIG. 9

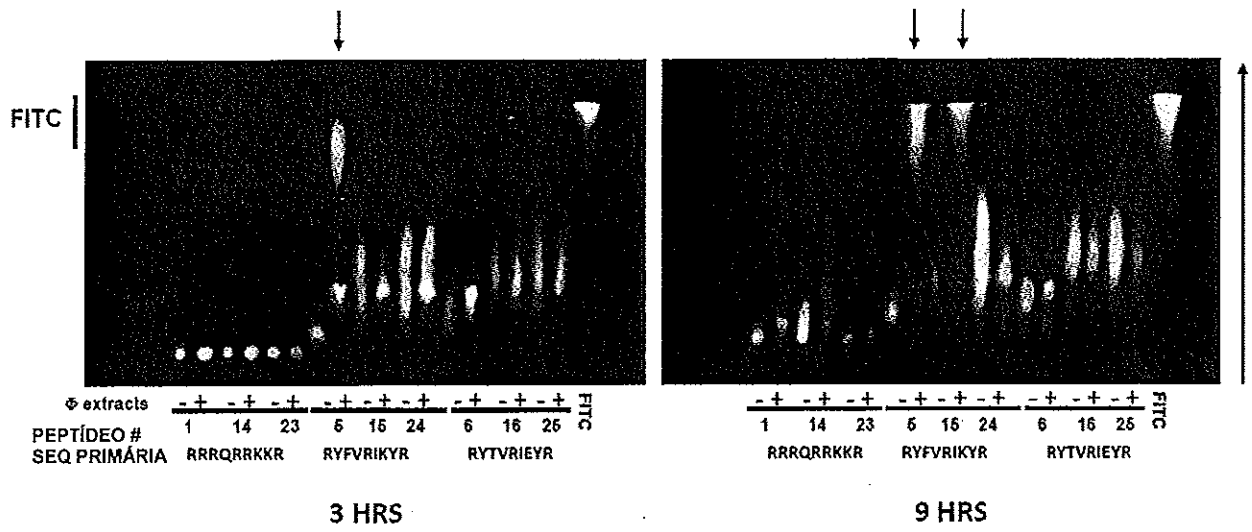


FIG. 10

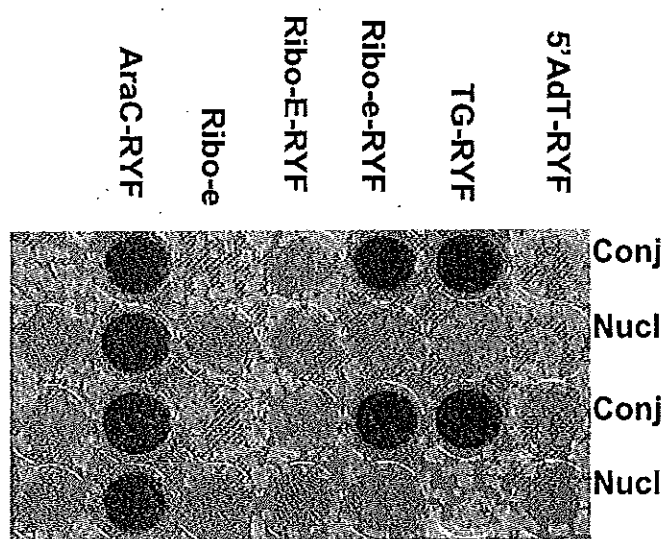


FIG. 11A

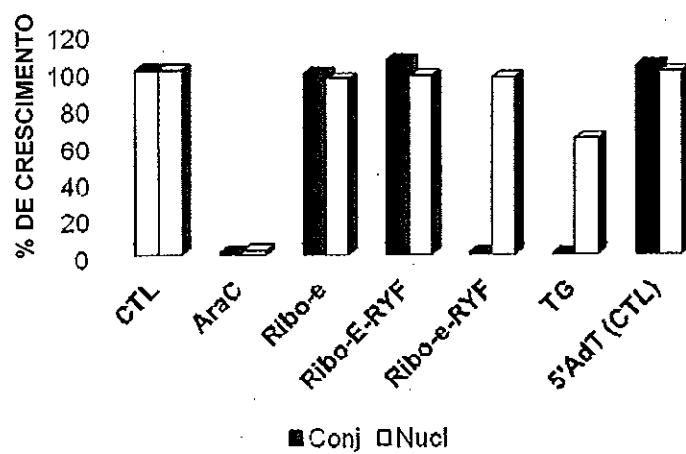


FIG. 11B

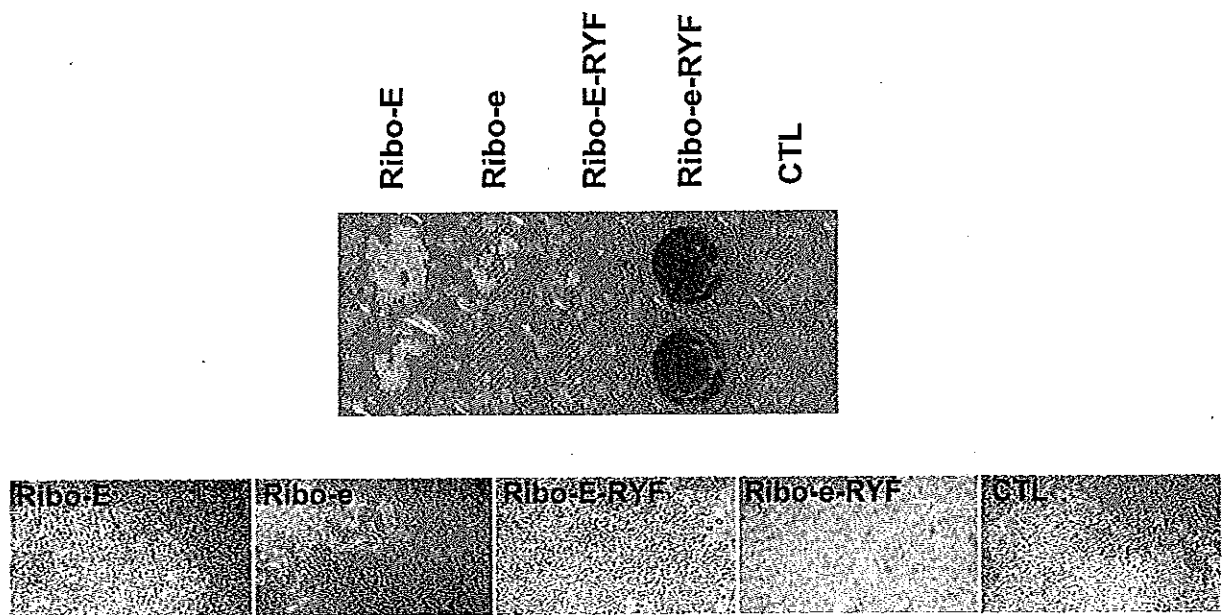


FIG. 12

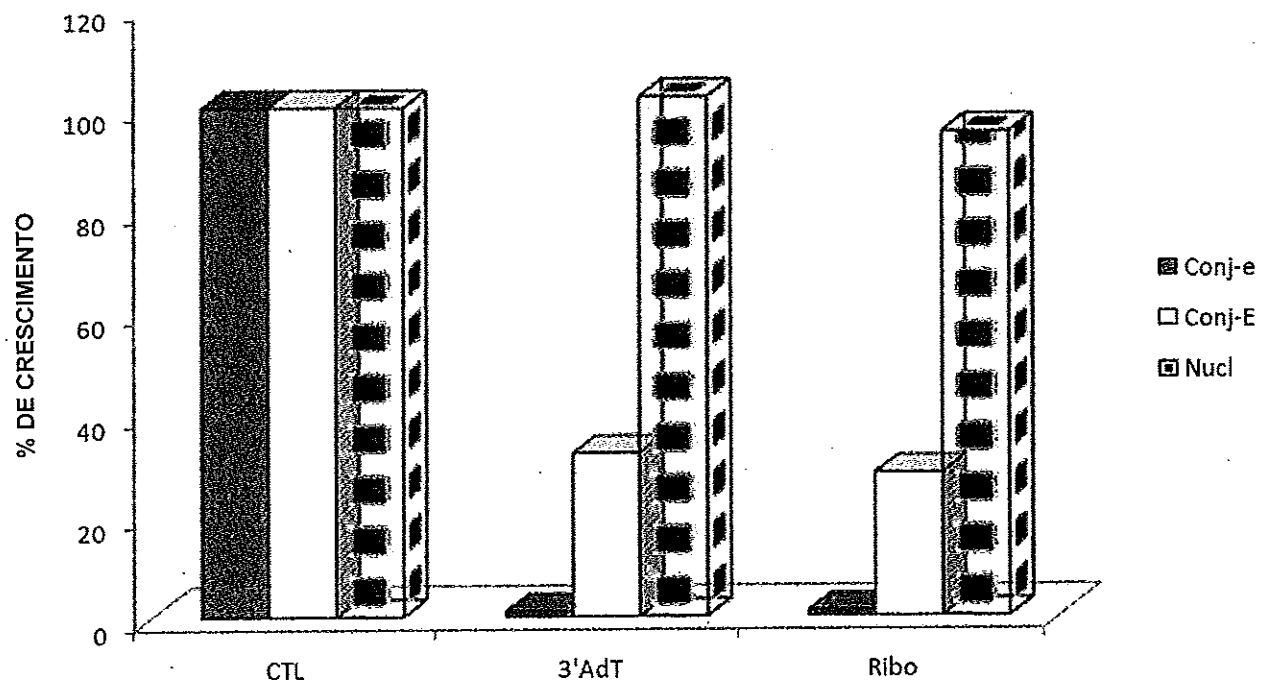


FIG. 13

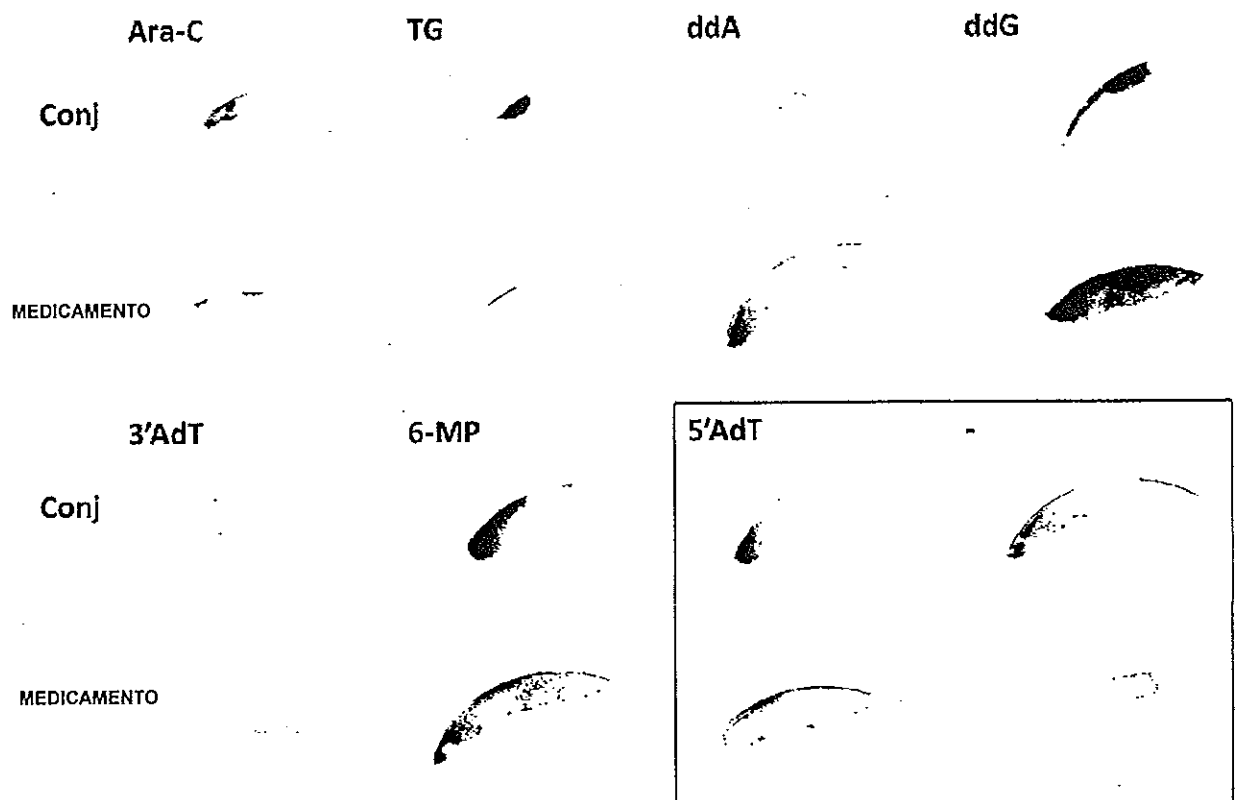


FIG. 14

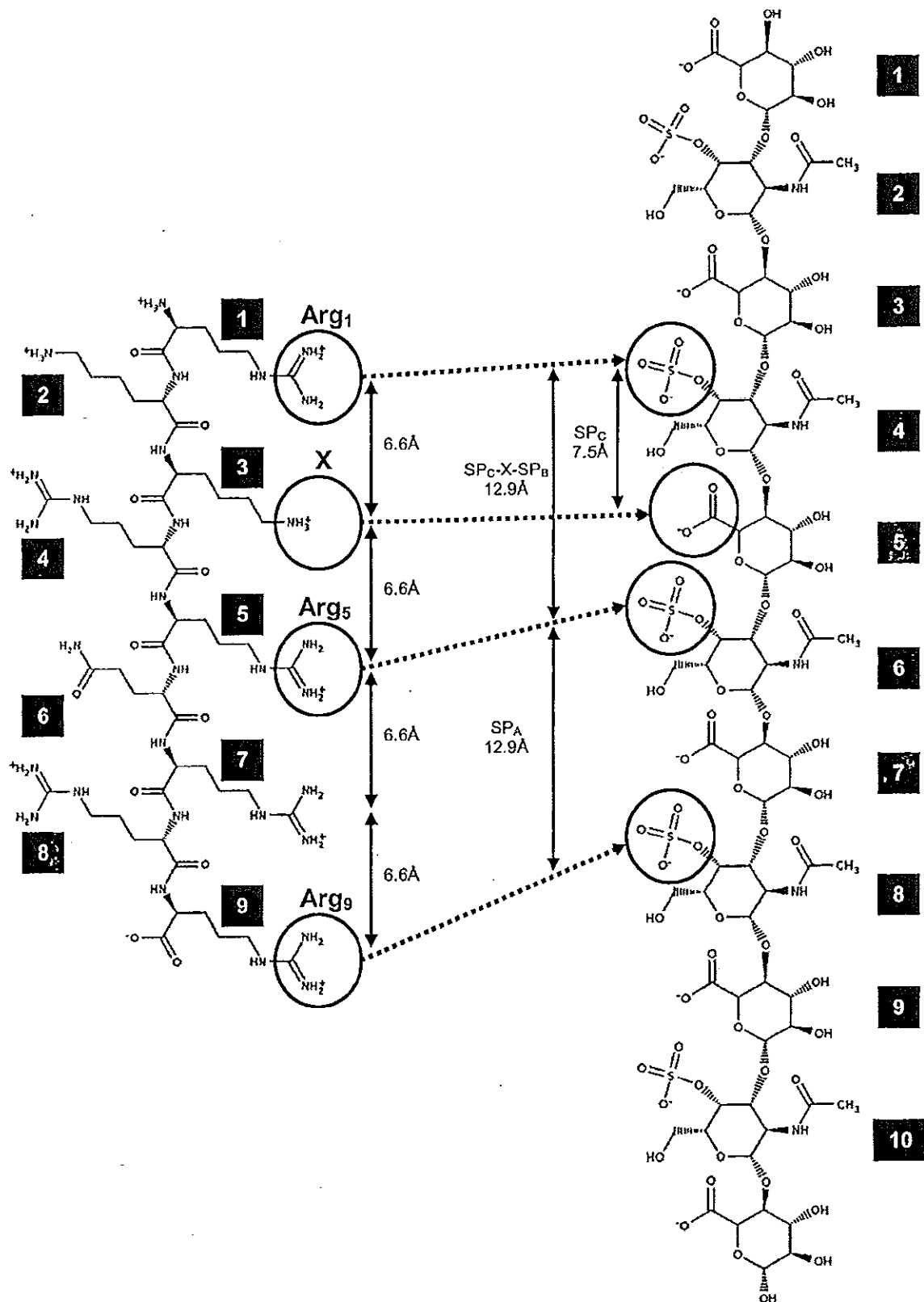


FIG. 15

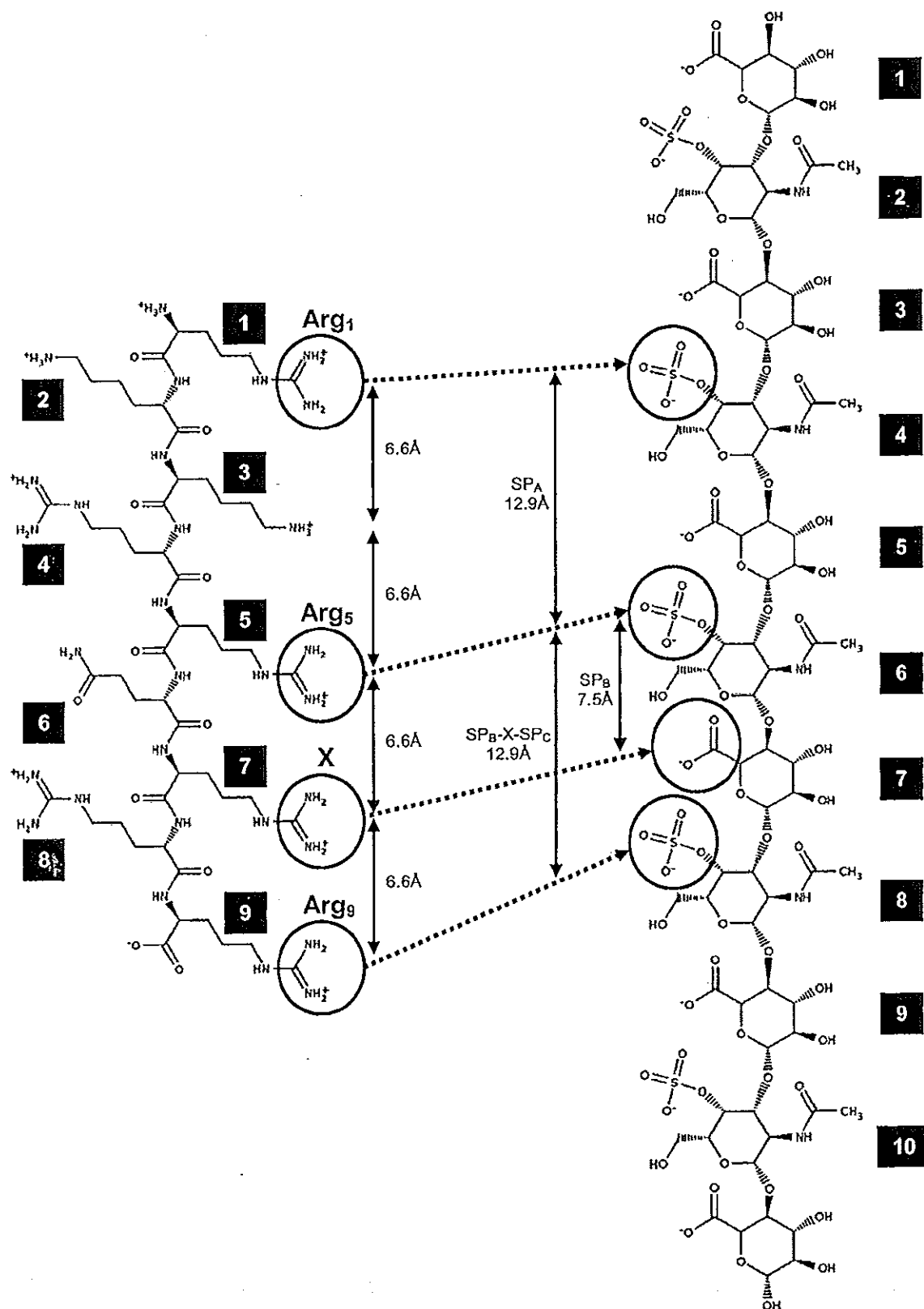


FIG. 16

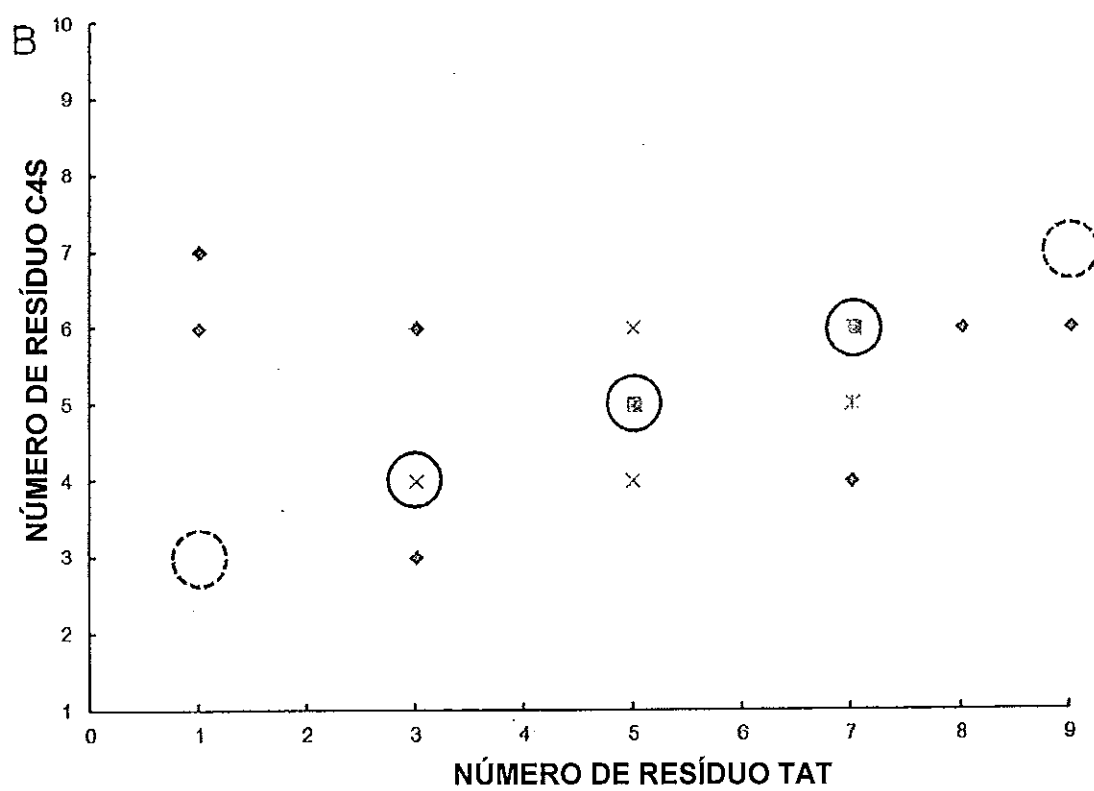
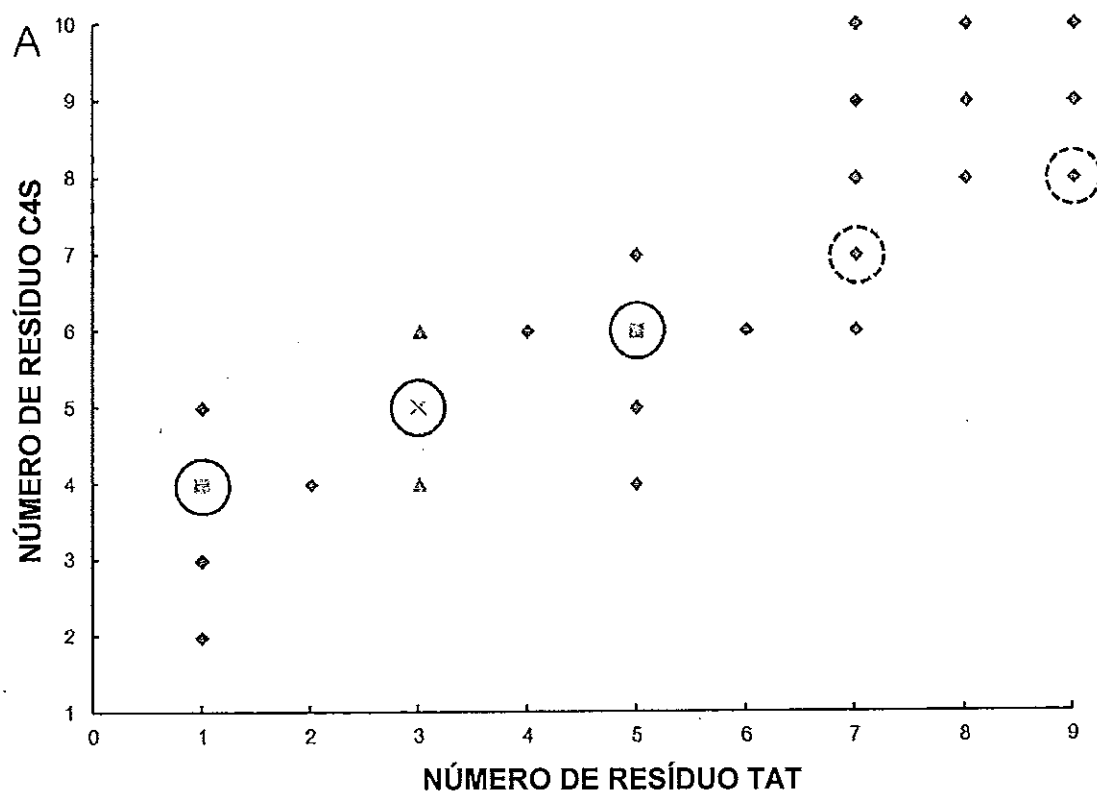


FIG. 17

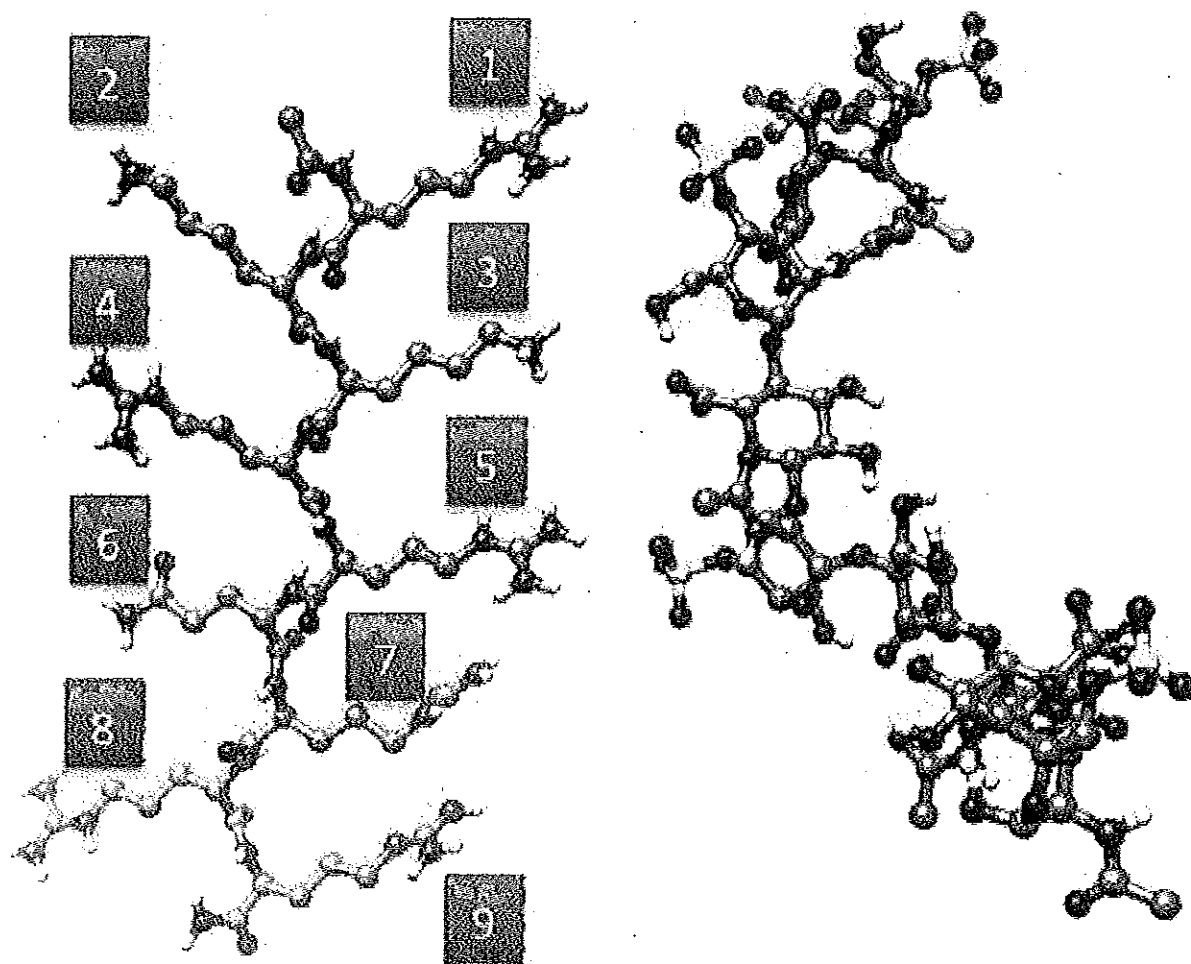


FIG. 18A

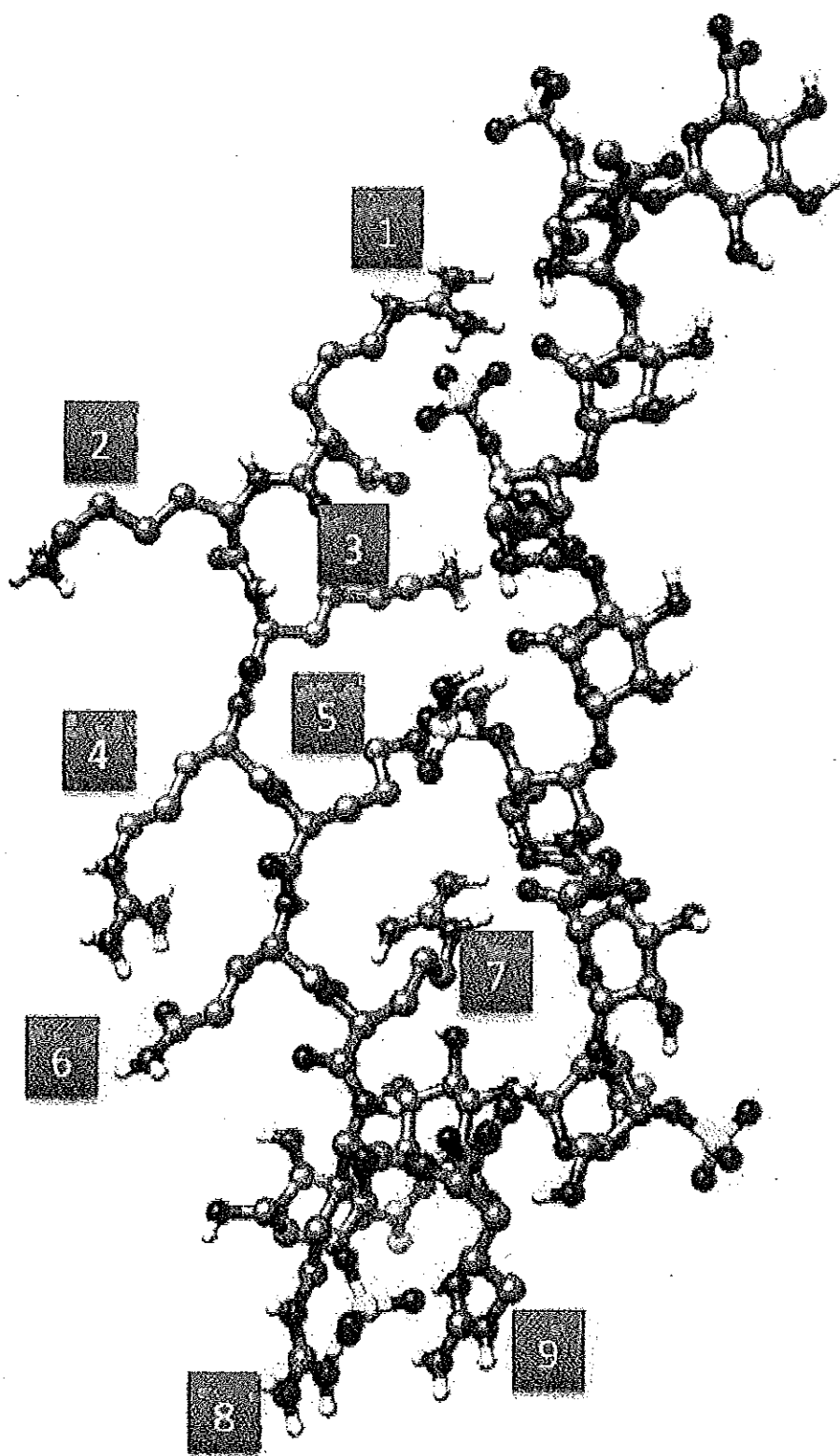


FIG. 18B