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

(11) BR 112013006088-3 B1

(22) Data do Depósito: 15/09/2011

(45) Data de Concessão: 14/06/2022

(54) Título: CONSTRUTO DE ENTREGA ISOLADO, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: A61K 9/00.

(30) Prioridade Unionista: 15/09/2010 US 61/403,394.

(73) Titular(es): RANDALL J MRSNY; TAHIR MAHMOOD.

(72) Inventor(es): RANDALL J MRSNY; TAHIR MAHMOOD.

(86) Pedido PCT: PCT US2011001602 de 15/09/2011

(87) Publicação PCT: WO 2012/036746 de 22/03/2012

(85) Data do Início da Fase Nacional: 14/03/2013

(57) Resumo: CONSTRUTO DE ENTREGA ISOLADO, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA Trata-se de uma forma de mutante não tóxico do gene Cholix de Vibrio cholerae (ntCholix), uma variante de Cholix truncada no aminoácido A386 (Cholix386) e o uso de outras várias sequências de polipeptídeos derivados de Cholix para intensificar a entrega intestinal de artigos terapêuticos farmacêuticos biologicamente ativos. Os sistemas e os métodos descritos no presente documento fornecem o seguinte: a capacidade de entregar doses de macromolécula sem injeções; a capacidade de entregar carga, tal como (mas sem limitações) siRNA ou moléculas antissenso em compartimentos intracelulares onde sua atividade é necessária; e a entrega de nanopartículas e carreadores à base de dendrímero através de membranas biológicas que, de outro modo, seriam impedidas devido às propriedades de barreira da maioria das membranas.

CONSTRUTO DE ENTREGA ISOLADO, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

PEDIDOS DE PATENTE RELACIONADOS

Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório nº U.S. 61/403.394, depositado em 15 de setembro de 2010, incorporado em sua totalidade a título de referência no presente documento.

CAMPO DA TÉCNICA

O campo da presente invenção refere-se, em parte, a uma estratégia para aplicações farmacêuticas inovadoras. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a uma forma mutante não tóxica do gene Cholix de *Vibrio cholerae* (ntCholix), um variante de Cholix truncado no aminoácido A^{386} ($Cholix^{386}$) e o uso de várias outras sequências de polipeptídeo derivadas de Cholix para intensificar a entrega intestinal de terapêutica biologicamente ativa. Com importância, os sistemas e métodos descritos no presente documento fornecem o seguinte: a capacidade de entregar doses de macromolécula sem injeções; a capacidade de entregar carga, tal como (porém, sem limitação) siRNA ou moléculas antissenso em compartimentos intracelulares em que sua atividade é exigida; e a entrega de nanopartículas e carreadores à base de dendrímero através de membranas biológicas que, de outro modo, teria sido impedida devido às propriedades de barreira de maioria de tais membranas.

TÉCNICA ANTECEDENTE

A maioria dos fármacos de molécula pequena aprovados atualmente é absorvida através da mucosa do intestino delgado para fornecer a entrega à circulação sistêmica. Aliás, os fármacos de molécula pequena são

selecionados com base em sua estabilidade e admissão eficaz através das mucosas intestinais. A entrega oral similar de polipeptídeos biologicamente ativos (referindo-se a um polímero composto de resíduos de aminoácido; tipicamente definido como uma proteína ou peptídeo) tem sido um objetivo antigo da indústria farmacêutica. Como o trato gastrointestinal (GI) é projetado para digerir proteínas e peptídeos dietéticos, há várias barreiras físicas, fisiológicas e biológicas que limitam a viabilidade da admissão de proteínas e peptídeos terapêuticos do intestino de uma maneira similar a essa alcançável com moléculas pequenas; Mahato, R.I., et al., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 20(2-3):páginas 153 a 214 (2003).

Várias tecnologias foram identificadas que podem ser usadas para proteger proteínas e peptídeos terapêuticos através do estomago, permitindo que os mesmos alcancem a superfície absortiva das células epiteliais no intestino pequeno e separando os mesmos dos ambientes gástrico e intestinal que funcionam para destruir as proteínas e peptídeos dietéticos. Infelizmente, entretanto, o transporte eficaz através dessa única camada simples de células permanece uma barreira substancial devido ao trânsito intracelular para compartimentos de lisossoma destrutivo após a admissão endossomal de polipeptídeos na superfície luminal; Woodley, J.F., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 11(2-3):páginas 61 a 95 (1994). De fato, essa barreira é projetada para inibir a admissão de proteínas e peptídeos até que essas macromoléculas possam ser suficientemente degradadas para a absorção através do aminoácido e transportadores de di- ou tri-peptídeo. A esse respeito, vários esforços foram examinados para superar as barreiras físicas, fisiológicas e biológicas das mucosas intestinais.

Há duas rotas básicas através do epitélio simples

que constitui a barreira celular das mucosas intestinais. Especificamente, uma através da camada mucosa de cobertura, uma molécula poderia se mover entre as células epiteliais adjacentes (rota paracelular) ou se mover através das células (rota transcelular) por meio de uma série de vesículas que trafegam dentro, mas não se misturam, dos conteúdos com o citoplasma; T. Jung et al., EurJPharm Biopharm, 50: 147 a 160 (2000). Em outras palavras, em ambas as rotas, uma proteína ou peptídeo de transporte terapêutico não entra na célula, mas ao invés disso permanece em um ambiente externo ao citoplasma da célula.

A barreira primária para o movimento casual do movimento de terapêutica de proteína ou peptídeo através da rota paracelular é um complexo de proteínas no pescoço apical dessas células conhecidas como a junção estreita (TJ). Embora a abertura e fechamento transiente das estruturas TJ possam facilitar o transporte de peptídeos através dos epitélios intestinais, essa abordagem tem limitações chave: por exemplo, não funciona bem para moléculas acima de ~5 kDa; tem o potencial para a entrada não seletiva de materiais no corpo do lúmen intestinal; e representa uma rota que envolve somente uma fração pequena da área de superfície do epitélio intestinal.

A barreira primária para a migração casual de terapêutica de proteína ou peptídeo através das células por meio da rota transcelular é um trânsito de vesícula padrão que entrega os conteúdos dessas vesículas para uma trajetória destrutiva (lisossomal). Em comparação à rota paracelular, o movimento através da rota transcelular vesicular pode acomodar materiais tão grandes quanto 100 nm em diâmetro envolve essencialmente a superfície celular epitelial inteira e pode ser altamente seletivo na admissão de materiais através do uso de interações de receptor-ligante para a

entrada de vesícula. Assim, a rota transcelular é muito atraente para o transporte epitelial de terapêutica de proteína ou peptídeo se a trajetória destrutiva puder ser evitada.

Alguns patógenos resolveram o problema de barreira de trânsito, conforme demonstrado pela transcitose eficaz de fatores de virulência de polipeptídeo secretado que funcionam para facilitar e/ou estabilizar a infecção de um hospedeiro. Exotoxinas representam uma classe de proteínas liberadas por uma variedade de micro-organismos que funcionam como fatores de virulência potentes. A função de exotoxinas em organismos multicelulares com a capacidade de agir como toxinas potentes nos homens; Roszak, D.B., e Colwell, R.R., Microbiol Rev 51 :365 a 379 (1987). Essas proteínas comumente matam ou inativam células hospedeiras através de mecanismos que envolvem a interrupção seletiva da síntese de proteína. Consequentemente, somente algumas moléculas são exigidas para matar consistente com a observação de que as exotoxinas bacterianas são alguns dos agentes mais tóxicos conhecidos. Um subconjunto dessas proteínas compreendidas da família de proteínas que consiste na toxina difteria (DT) da *Corynebacterium diphtheria*, exotoxina A da *Pseitdomonas aeruginosa* (PE) e uma proteína recentemente identificada chamada de Cholix da *Vibrio cholerae* funciona para intoxicar células hospedeiras por meio da ADP-ribosilação do fator de alongamento 2 (EF2); Yates, S.P., et al., Trends Biochem Sci, 31:123 a 133 (2006). Essas exotoxinas são sintetizadas como uma única cadeia de aminoácidos que se dobra em domínios distintos que foram identificados como tendo funções específicas no direcionamento, entrada e intoxicação de células hospedeiras.

A biologia da exotoxina A da *Pseudomonas aeruginosa* (PE) foi recentemente descrita; Mrsny, R.J., et al.,

DrugDiscov Today, 7(4): páginas 247 a 58 (2002). PE é composta de uma única cadeia de 613 aminoácidos que tem um peso molecular teórico (MW) de 66828.11 Da, um ponto isoelétrico (pi) de 5,28 e que se dobra funcionalmente em três domínios distintos, denotado domínio I (Ala^{1}-Glu^{252}), domínio II (Gli^{253}-Asn^{364}), domínio III (Gli^{405}-Lis^{613} e que contém um sítio de atividade de ADP-ribosiltransferase) e um ciclo ligado por dissulfeto curto que liga os domínios II e III que é conhecido como o ciclo 1b (Ala^{365}-Gli^{404}). A organização desses domínios a pH 8,0 foi determinada a partir da difração de cristal a uma resolução de -1,5 Å; Wedekind, J.E. et al., JMol Biol, 314:823 a 837 (2001). O domínio I (Ia + Ib) tem um núcleo formado a partir de um rolo β com 13 fitas, o domínio II é composto de seis hélices α e o domínio III tem uma estrutura dobrada em α/β complexa. Os estudos sustentaram a ideia de que a natureza modular da PE permite as funções de domínio distintas: o domínio I liga-se a receptores de célula hospedeira, o domínio II é envolvido na translocação de membrana e o domínio III funciona como uma ADP-ribosiltransferase. Parece que a PE é secretada pela *P. aeruginosa* em proximidade estreita com a superfície apical de célula epitelial, possivelmente em resposta a sugestões ambientais e/ou sinais celulares; Deng, Q. e J.T. Barbieri, Annu Rev Microbiol, 62:páginas 271 a 288 (2008). Uma vez secretada, a internalização nas células ocorre após o domínio I de PE se ligar à proteína de membrana α2-macroglobulina, uma proteína que é também conhecida como a proteína relacionada a receptor de lipoproteína de densidade baixa 1 (LRP1) ou CD91; consulte, por exemplo, FitzGerald, D.J., et al., J Cell Biol, 129(6):páginas 1.533 a 1.541 (1995); Kounnas, M.Z., et al., J Biol Chem, 267(18): páginas 12.420 a 12.423 (1992). Seguindo a internalização, a PE evita o trânsito para o lisossoma e é ao invés disso entregue à

superfície basolateral da célula em que é liberada de uma forma biologicamente ativa; Mrsny, R.J., et al., Drug Discov Today, 7(4): páginas 247 a 258 (2002). Uma vez através do epitélio, a PE funciona como um fator de virulência entrando nas células positivas CD91 dentro do espaço submucosal (macrofago e células dendríticas) onde então intercepta com uma trajetória de desdobramento que leva à entrega citoplásmica do domínio III; consulte, por exemplo, Mattoo, S., Y.M. Lee e J.E. Dixon, Curr Opin Immunol, 19(4): páginas 392 a 401 (2007); Spooner, R.A., et al., Virol J, 3: página 26 (2006).

A bactéria *Vibrio cholerae* é melhor conhecida por seu agente de virulência epônimo, toxina da cólera (CT), que pode causar diarréia aquosa maciça com risco de vida aguda. CT é um complexo de proteína de uma única subunidade A organizada com um pentâmero de subunidades B que se liga a estruturas de gangliósido G_{M1} de superfície celular na superfície apical dos epitélios. CT é secretado pela *V. cholerae* seguindo a transferência de gene horizontal com as cepas virulentas de *V. cholerae* que carregam uma variante do bacteriófago lisogênico chamada de CTXf ou CTXφ. Surtos de cólera recentes, entretanto, sugeriram que as cepas de alguns sorogrupos (non-O1, non-O139) não expressam CT, mas ao invés disso usam outros fatores de virulência. A análise detalhada dos dados clínicos e ambientais de non-O1, non-O139 sugeriu a presença de uma exotoxina secretada putativa inovadora com alguma similaridade a PE.

Jorgensen, R. et al., J Biol Chem, 283(16):10671 a 10678 (2008) relatou que algumas cepas de *V. cholerae* continham, de fato, uma toxina de proteína que tem similaridade à PE e que foi chamada de toxina Cholix (Cholix). Em comparação à PE, Cholix tem um MW teórico levemente maior (70703,89 Da) e um pi teórico levemente mais

ácido (5.12). A estrutura de cristal da proteína Cholix de 634 aminoácido foi resolvida a ~2 Å. Revelou-se que a estrutura e a organização de domínio são de algum modo similares à PE: domínio I (Val^{1}-Lis^{265}), domínio II (Glu^{266}-Ala^{386}), domínio III (Arg^{426}-Lis^{634}) e um ciclo Ib (Ala^{387}-Asn^{425}). A similaridade estrutural adicional à PE inclui: um sítio de furina protease para a ativação celular; uma sequência de terminal C KDEL que pode conduzir a toxina para o retículo endoplasmático da célula hospedeira; e um sítio de atividade de ADP-ribosiltransferase dentro do domínio III.

Notavelmente, PE e Cholix não compartilham nenhuma similaridade genética e limitada significante pelo alinhamento de aminoácido. Procurar o genoma de *V. cholerae* para sequências de nucleotídeo do tipo PE falha em resultar em uma correspondência de qualquer tipo. É somente no nível de sequência de proteína que há a dica de que a proteína do tipo PE poderia ser produzida por essa bactéria. Mesmo aqui, há somente uma homologia de 32% entre as sequências de aminoácido de PE e Cholix com as similaridades (42% de homologia) sendo focadas nos elementos de ADP ribosilação do domínio III e com níveis baixos de homologia de aminoácido (~15 a 25%) para a maioria dos segmentos dos domínios I e II para as duas proteínas. Além disso, essa disposição geral da Cholix em relação à PE é ainda mais evidente já que essas duas proteínas com elementos similares foram derivadas de duas direções distintas: *P. aeruginosa* é uma bactéria rica em GC enquanto que a *V. cholerae* é rica em AT. Que essas duas toxinas envolvidas a partir de duas direções genéticas diferentes para chegar quase na mesma estrutura, mas com somente 32% de homologia de aminoácido sugere que as similaridades estruturais e funcionais da Cholix e PE provavelmente têm base nas pressões de sobrevida similares ao invés de através de antecedentes genéticos similares. A

homologia de aminoácido muito baixa dos domínios I e II para essas duas proteínas enfatiza a importância funcional das estruturas dobradas dessas duas proteínas e não suas sequências de aminoácido.

A porção de terminal C de Cholix e PE parece funcionar na intoxicação de células através da ADP-ribosilação de EF2 de modos comparáveis. Estudos recentes em que a ultima metade de Cholix (domínio I deletado) direcionada a células de câncer através da conjugação para um anticorpo direcionada para o receptor de transferrina sugere que as porções de terminal C da PE e Cholix emvolvidas na ADP-ribosilação de EF2 são de fato funcionalmente similares; Sarnovsky, R., et al., *Cancer Immunol Immunother* 59:737 a 746 (2010). Embora essa porção distal de Cholix seja 36% idêntica e 50% similar à PE, antissoros policlonais produzidos em animais assim como soros de pacientes que têm respostas imunes de neutralização a essa mesma porção distal de PE falharam na reação cruzada com essa ultima porção de Cholix. Similarmente, antissoros produzidos nessa Cholix falharam na reação cruzada com PE. Esses dados sugerem que embora tanto PE quanto Cholix compartilhem uma capacidade de intoxicar células através de um mecanismo similar e que essas duas proteínas compartilhem uma estrutura de núcleo comum, há diferenças evidentes em seus elementos que são expressas na superfície dessas proteínas.

Conforme os estudos anteriores que usam PE demonstraram que essa toxina transporta prontamente através de monocamadas polarizadas de células epiteliais *in vitro* e *in vivo* sem intoxicação; Mrsny, R.J., et al., Drug Discov Today, 7(4): páginas 247-58 (2002), os presente inventores iniciaram uma pesquisa para avaliar adicionalmente as propriedades e biologia da Cholix, com um foco particular nos aspectos funcionais das porções proximais da Cholix;

especificamente, o uso dos domínios I e II para facilitar o transporte através de monocamadas epiteliais intestinais. Como os domínios I e IIa parecem ser os únicos elementos essenciais de PE exigidos para a transcitose epitelial, foi particularmente importante examinar esses mesmos domínios no Cholix. Conforme declarado anteriormente, há somente ~15% a 25% de homologia de aminoácidos sobre a maioria das regiões que seriam consideradas parte dos domínios I e IIa. Os presentes inventores examinaram os domínios através de uma série de estudos: monitoramento da distribuição biológica de Cholix seguindo a aplicação a superfícies epiteliais *in vivo*, avaliação das características de transporte transcelular de Cholix através de monocamadas de célula epitelial polarizadas *in vitro* e entrega de uma carga biologicamente ativo geneticamente integradas na proteína Cholix em seu terminal C. Preliminarmente, os dados gerados fundindo geneticamente os dois primeiros domínios de Cholix (aminoácidos 1 a 386) à proteína fluorescente verde (GFP) ou acoplando quimicamente esses domínios expressos a esferas de látex de 100 nm de diâmetro demonstrou que a Cholix ligada a esferas de látex de 100 nm foi observada a transportar através de monocamadas epiteliais intestinais *in vitro* e *in vivo*. Que a carga de GFP manteve sua característica fluorescente durante e após o processo de transcitose também sustenta a contenção de que a Cholix utiliza uma trajetória de trânsito não destrutiva (ou privilegiada) através das células epiteliais polarizadas. Esse resultado é promissor para sua aplicação (repetida) como uma ferramenta para entregar cargas biologicamente ativas através de barreiras epiteliais do corpo, tal como essas nos tratos respiratório e gastrointestinal.

Também digno de nota a partir dos estudos preliminares é a observação que sugere uma diferença de interação de receptor de célula aparente entre PE e Cholix.

Conforme declarado anteriormente, PE entra nas células epiteliais após o domínio I de PE se ligar à proteína de membrana α2-macroglobulina, uma proteína que é também conhecida como a proteína relacionada a receptor de lipoproteína de densidade baixa 1 (LRP1) ou CD91. Embora a identidade exata do receptor de superfície para o Cholix não tenha sido estabelecida, os estudos preliminares sugerem que a Cholix não intoxica algumas linhagens de célula que expressam CD91, mas intoxica algumas linhagens de célula que expressam CD91. atualmente não está claro quais outros receptores, além de CD91, podem estar envolvidos na transcitose epitelial de PE. No entanto, Cholix e PE parecem ter interações de receptor de célula distintas, demonstrando diferenças claras que são suficientes para sugerir aplicações muito diferentes e inesperadas para ambas as biologias orais e a entrega intracelular de agentes bioativos.

REVELAÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção tem base nas propriedades de trânsito de membrana da Cholix e na demonstração de que a Cholix transporta eficazmente através de células epiteliais polarizadas da rota aérea ou intestino, sugerindo que as sequências de polipeptídeo derivadas de Cholix (incluindo os elementos proximais da proteína) podem ser usadas para a transcitose eficaz de proteína e nanopartículas, representando uma estratégia para aplicações farmacêuticas inovadoras.

Como tal, um aspecto da presente invenção é fornecer construtos de entrega isolados (por exemplo, fusões genéticas ou construtos químicos) que compreendem um domínio transportador (por exemplo, uma sequência de polipeptídeo derivada de Cholix) e uma carga. Tanto o domínio de transporte quanto a carga podem ser expressos/ligados em razões estequiométricas variáveis e organização espacial.

Diferentes cargas podem também ser expressas/ligadas no mesmo construto. Nas modalidades preferenciais tal carga pode incluir um ou qualquer um dentre: proteínas, peptídeos, moléculas pequenas, siRNA, PNA, miRNA, DNA, plasmídeo e antissenso.

Outro aspecto da presente invenção é fornecer a capacidade de entregar carga, tal como macromoléculas, sem injeções.

Outro aspecto da presente invenção é fornecer a capacidade de entregar carga, tal como (porém, sem limitação) macromoléculas, moléculas pequenas, siRNA, PNA, miRNA, DNA, plasmídeo e moléculas antissenso, em compartimentos intracelulares em que sua atividade é exigida.

Outro aspecto da presente invenção é fornecer o transporte da carga por meio da entrega de nanopartículas e/ou carreadores à base de dendímero através das membranas biológicas.

Os métodos de administração/entrega contemplados para o uso na presente invenção incluem, por exemplo, administração oral, administração pulmonária, administração intranasal, administração bucal, administração sublingual, administração ocular (incluindo, porém sem limitação, a entrega para vítreo, córnea, conjuntiva, esclera e compartimentos posterior e anterior do olho), aplicação tópica, injeção (agulha ou livre de agulha), infusão intravenosa, aplicação de microagulhas, administração por meio de uma formulação de depósito de fármaco, administração por meio de aplicação intratecal, administração por meio de aplicação intraperitoneal, administração por meio de aplicação intra-articular, entrega intracelularmente, entrega através da barreira hematoencefálica, entrega através da barreira sanguínea da retina, administrado para entrega e ação local e/ou entrega para entrega sistêmica.

Em ainda outro aspecto, a invenção fornece uma composição farmacêutica que compreende construtos de entrega e um carreador farmaceuticamente aceitável.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 retrata uma visão geral da estratégia usada para a modificação de ntCholix [Terminal C] para facilitar a fusão com uma carga, nessa ocorrência, a carga sendo corante fluorescente Alexa488.

A Figura 2 retrata o transporte de ntCholix-Alexa488® através das células epiteliais intestinais polarizadas *in vitro*. Monocamadas de célula Caco-2 foram expostas a materiais de teste por 4 horas. A porcentagem de material transportado foi determinada pela análise de fluorescência de curva padrão presente nas amostras e apresentada como uma média (N=4). BSA-Alexa488 foi usado como um controle.

MODO(S) PARA EXECUTAR A INVENÇÃO

Conforme aqueles na técnica apreciarão, a descrição antecedente descreve certas modalidades preferenciais da invenção em detalhes e é assim somente representativa e não retrata o escopo real da invenção. Deve também ser entendido que a terminologia usada no presente documento é para o propósito de descrever as modalidades particulares somente e não se destina a limitar o escopo da invenção definido pelas reivindicações anexas.

A não ser que definido de outra maneira na presente invenção, todos os termos técnicos e científicos usados no presente documento têm o significado comumente entendido por um versado na técnica ao qual esta invenção pertence. Conforme usado no presente documento, os seguintes termos têm os significados atribuídos aos mesmos a não ser que especificado de outra maneira.

Os estudos subjacentes à presente invenção referem-

se ao uso de sequências de polipeptídeo derivadas de Cholix como o domínio transportador a ser usado para preparar construtos de entrega isolados para intensificar a entrega intestinal de terapêutica biologicamente ativa. Com importância, os sistemas e métodos descritos no presente documento fornecem o seguinte: a capacidade de entregar doses de macromolécula sem injeções; a capacidade de entregar carga em compartimentos intracelulares em que sua atividade é exigida; e a entrega de nanopartículas e carreadores à base de dendrímero através de membranas biológicas que de outro modo teria sido impedida devido às propriedades de barreira de maioria de tais membranas.

A toxina Cholix madura ("Cholix") é uma proteína monomélica extremamente ativa (peso molecular 70 kD) secretadas pela *Vibrio cholerae* e que é composta de três domínios globulares proeminentes (Ia, II, e III) e um subdomínio pequeno (Ib) que conecta os domínios II e III. A sequência de aminoácido da Cholix madura é fornecida em Jorgensen, R. et al., J Biol Chem, 283(16):10671 a 10678 (2008) e referências citadas no mesmo. As sequências de polipeptídeo derivadas de Cholix usadas na preparação dos construtos de entrega isolados da presente invenção serão derivadas da sequências de proteína de 634 aminoácidos reportada da Cholix madura.

Consequentemente, os construtos de entrega da presente invenção compreendem um domínio transportador. Um "domínio transportador" conforme usado no presente documento refere-se aos domínios estruturais que são capazes de realizar certas funções, por exemplo, reconhecimento de célula (isto é, compreendem um domínio de ligação de receptor) e transcitose (isto é, compreendem um domínio de transcitose). Geralmente, os domínios transportadores a serem usados na preparação dos construtos de entrega da presente

invenção são as sequências de polipeptídeo derivadas de Cholix que têm domínios estruturais correspondentes aos domínios funcionais, por exemplo, Ia e II, da Cholix.

Adicionalmente às porções da molécula que correspondem aos domínios funcionais de Cholix, os construtos de entrega desta invenção podem compreender adicionalmente uma macromolécula para a entrega a um compartimento biológico de um indivíduo. Em certas modalidades, a macromolécula é selecionada a partir do grupo de um ácido nucleico, um peptídeo, um polipeptídeo, uma proteína, um polissacarídeo e um lipídio. Em modalidades adicionais, o polipeptídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em hormônios de polipeptídeo, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e fatores de coagulação que são comumente administrados a indivíduos por injeção. As sequências de todas essas macromoléculas são bem conhecidas por aqueles versados na técnica e a fixação dessas macromoléculas aos construtos de entrega está bem dentro da habilidade daqueles versados na técnica com o uso de tecnologias padrão.

A macromolécula pode ser introduzida em qualquer porção do construto de entrega que não interrompe uma atividade de transcitose ou ligação de célula. A macromolécula é conectada ao restante do construto de entrega através de um ligante clivável. "Ligante" refere-se a uma molécula que une duas outras moléculas, ou covalente mente ou através de ligações iônicas, de van der Waals ou de hidrogênio, por exemplo, uma molécula de ácido nucleico que hibridiza a uma sequência complementar na extremidade 5' e a outra sequência complementar na extremidade 3', assim unindo duas sequências não complementares. Um "ligante clivável" refere-se a um ligante que pode ser degradado ou cortado de outra maneira para separar os dois componentes conectados pelo ligante clivável. Os ligantes cliváveis são geralmente

clivados por enzimas, tipicamente peptidases, proteases, nucleases, lipases e similares. Os ligantes cliváveis podem também ser clivados por sugestões ambientais, tal como, por exemplo, alterações na temperatura, pH, concentração de sal, etc. quando há tal alteração no ambiente seguindo a transcitose do construto de entrega através de uma membrana epitelial polarizada.

Em certas modalidades, os construtos de entrega compreendem adicionalmente uma segunda macromolécula que é selecionada a partir do grupo que consiste em um ácido nucleico, um peptídeo, um polipeptídeo, uma proteína, um lipídio e uma molécula orgânica pequena e um segundo ligante clivável em que a clivagem no dito segundo ligante clivável separa a dita segunda macromolécula do restante do dito construto. Em certas modalidades, a primeira macromolécula é um primeiro polipeptídeo e a dita segunda macromolécula é um segundo polipeptídeo. Em certas modalidades, o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo se associam para formar multímero. Em certas modalidades, o multímero é um dímero, tetrâmero ou octâmero. Em modalidades adicionais, o dímero é um anticorpo.

Em certas modalidades, a macromolécula pode ser selecionada para não ser clivável por uma enzima presente na membrana basal-lateral de uma célula epitelial. Por exemplo, os ensaios descritos nos exemplos podem ser usados para testar rotineiramente se tal enzima de clivagem pode clivar a macromolécula a ser entregue. Se sim, a macromolécula pode ser rotineiramente alterada para eliminar a sequência de aminoácido ofensiva reconhecida pela enzima de clivagem. A macromolécula alterada pode, então, ser testada para garantir que permaneça a atividade com o uso de rotina de métodos na técnica.

Em certas modalidades, o primeiro e/ou o segundo

ligante clivável é clivável por uma enzima que exibe uma atividade maior no lado basal-lateral de uma célula epitelial polarizada que exibe no lado apical da célula epitelial polarizada. Em certas modalidades, o primeiro e/ou o segundo ligante clivável é clivável por uma enzima que exibe uma atividade maior no plasma que exibe no lado apical de uma célula epitelial polarizada.

Em certas modalidades, o ligante clivável pode ser selecionado com base na sequência, no caso de macromoléculas de peptídeo, polipeptídeo ou proteína para a entrega, para evitar o uso de ligantes cliváveis use que compreendem sequências presentes na macromolécula a ser entregue. Por exemplo, se a macromolécula compreender AAL, o ligante clivável pode ser selecionado para ser clivado por uma enzima que não reconhece essa sequência.

Adicionalmente às porções da molécula que correspondem aos domínios funcionais de Cholix, os construtos de entrega desta invenção podem compreender adicionalmente uma "carga" para a entrega a compartimentos intrecelulares em que sua atividade é exigida. Uma "carga" conforme usada no presente documento inclui, porém sem limitação: macromoléculas, moléculas pequenas, siRNA, PNA, miRNA, DNA, plasmídeo e moléculas antissenso. Outros exemplos de carga que pode ser entregue de acordo com a presente invenção incluem, porém, sem limitação, compostos antineoplásicos, tal como nitrosoureias, por exemplo, carmustina, lomustina, semustina, estrepzotocina; metilidrazinas, por exemplo, procarbazina, dacarbazina; hormônios esteroides, por exemplo, glucocorticoides, estrogênios, progestinas, andrógenos, tetraidrodesoxicaricosterona; compostos imunoativos tal como imunosupressivos, por exemplo, pirimetamina, trimetopterina, penicilamina, ciclosporina, azatioprina; e imunoestimulantes, por exemplo, levamisol, dietil ditiocarbamato, encefalinas,

endorfinas; compostos antimicrobianos tal como antibióticos, por exemplo, .beta. -lactama, penicilina, cefalosporinas, carbapenims e monobactamas, inibidores de .beta.-lactamase, aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclinas, espectinomicina; antimalariais, amebicidas; antiprotazoais; antifúgicos, por exemplo, amfotericina .beta., antivirais, por exemplo, aciclovir, idoxuridina, ribavirina, trifluridina, vidarbina, ganciclovir; parasiticidas; anti-helmínticos; radiofarmacêuticos; fármacos gastrointestinais; compostos hematológicos; imunoglobulinas; proteínas de coagulação do sangue, por exemplo, fator anti-hemofílico, complexo de fator IX; anticoagulantes, por exemplo, dicumarol, heparina Na; inibidores de fibrolisina, por exemplo, ácido tranexâmico; fármacos cardiovasculares; fármacos antiadrenérgicos periféricos; fármacos anti-hipertensivo que agem centralmente, por exemplo, metildopa, metildopa HCl; vasodilatores diretos anti-hipertensivos, por exemplo, diazóxido, hidralazina HCl; fármacos que afetam o sistema de renina-angiotensina; vasodilatores periféricos, por exemplo, fentolamina; fármacos antianginosos; glicosídeos cardíacos; inodilatadores, por exemplo, amrinona, milrinona, enoximona, fenoximona, imazodano, sulmazol; antidisrítmicos; bloqueadores de entrada de cálcio; fármacos que afetam lipídios no sangue, por exemplo, ranitidina, bosentano, rezulina; fármacos respiratórios; fármacos simpatomiméticos, por exemplo, albuterol, mesilato de bitolterol, dobutamina HCl, dopamina HCl, efedrina So, epinefrina, fenfluramina HCl, isoproterenol HCl, metoxamina HCl, norepinefrina bitartrato, fenilefrina HCl, ritodrina HCl; fármacos colinomiméticos, por exemplo, acetilcolina Cl; anticolinasterases, por exemplo, edrofônio Cl; reativadores de colinesterase; fármacos bloqueadores de adrenérgicos, por exemplo, acebutolol HCl, atenolol, esmolol HCl, labetalol HCl, metoprolol, nadolol,

mesilato de fentolamina, propanolol HCl; fármacos antimuscarínicos, por exemplo, anisotropina metilbrometo, atropina SO.sub.4, clinídio Br, glicopirrolato, ipratrópio Br, escopolamina HBr; fármacos bloqueadores neuromusculares; fármacos despolarizantes, por exemplo, besilato de atracúrio, hexafluorênio Br, iodeto de metocurina, succinilcolina Cl, tubocurarina Cl, vecurônio Br; relaxantes musculares que agem centralmente, por exemplo, baclofeno; neurotransmissores e agentes neurotransmissores, por exemplo, acetilcolina, adenosina, trifosfato de adenosina; neurotransmissores de aminoácido, por exemplo, aminoácidos excitatórios, GABA, glicina; neurotransmissores de amina biogênicos, por exemplo, dopamina, epinefrina, histamina, norepinefrina, octopamina, serotonina, tiramina; neuropeptídeos, óxido nítrico, toxinas de canal K.sup.+; fármacos antiparkinsonianos, por exemplo, amaltidina HCl, mesilato de benztropina, carbidopa; fármacos diuréticos, por exemplo, diclorfenamida, metazolamida, bendroflumetiazida, politiazida; fármacos antienxaqueca, por exemplo, mesilato de trometamina carboprost, maleato de metisergida. Os domínios transportadores dos construtos de entrega da presente invenção compreendem geralmente um domínio de ligação de receptor. O domínio de ligação de receptor pode ser qualquer domínio de ligação de receptor conhecido por um versado na técnica sem limitação para se ligar a um receptor de superfície de célula que está presente na membrana apical de uma célula epitelial. Preferencialmente, o domínio de ligação de receptor se liga especificamente ao receptor de superfície de célula. O domínio de ligação de receptor deve se ligar ao receptor de superfície de célula com afinidade suficiente para permitir a endocitose do construto de entrega.

Em certas modalidades, o domínio de ligação de receptor pode compreender um peptídeo, um polipeptídeo, uma

proteína, um lipídio, um carboidrato ou uma molécula orgânica pequena ou uma combinação dos mesmos. Os exemplos de cada uma dessas moléculas que se ligam aos receptores de superfície de célula presentes na membrana apical das células epiteliais são bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Os peptídeos ou polipeptídeos adequados incluem, porém sem limitação, domínios de ligação de receptor de toxina bacteriana, tal como os domínios de ligação de receptor de PE, toxina da cólera, toxina Cholix, toxina botulínica, toxina da difteria, toxina shiga, toxina do tipo shiga, etc.; anticorpos, incluindo anticorpos monoclonais, policlonais e de cadeia única ou derivados dos mesmos, fatores de crescimento, tal como EGF, IGF-I, IGF-II, IGF-III etc.; citocinas, tal como IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, etc; quimiocinas, tal como MIP-1a, MIP-1b, MCAF, IL-8, etc.; e outros ligantes, tal como CD4, moléculas de adesão de célula da superfamília de imunoglobulina, integrinas, ligantes específicos para o receptor IgA, etc. o versado na técnica pode selecionar o domínio de ligação de receptor com base no padrão de expressão do receptor a qual o domínio de ligação de receptor se liga.

O domínio de ligação de receptor pode ser fixado ao restante do construto de entrega por um método ou meio conhecido por um versado na técnica a ser útil para a fixação de tais moléculas, sem limitação. Em certas modalidades, o domínio de ligação de receptor é expresso juntamente com o restante do construto de entrega como uma proteína de proteína. Tais modalidades são particularmente úteis quando o domínio de ligação de receptor e o restante do construto são formados a partir dos peptídeos ou polipeptídeos.

Os domínios transportadores dos construtos de entrega da presente invenção compreendem adicionalmente um domínio de transcitose. O domínio de transcitose pode ser

qualquer domínio de transcitose conhecidos por um versado na técnica para efetuar a transcitose de proteínas quiméricas que se ligaram a um receptor de superfície de célula presente na membrana apical de uma célula epitelial. Em modalidades preferenciais, o domínio de transcitose é o domínio II da Cholix.

Sem pretender limitar-se a qualquer teoria ou mecanismo de ação particular, acredita-se que o domínio de transcitose permita o trânsito do construto de entrega através de uma célula epitelial polarizada após o construto se ligar a um receptor presente na superfície apical da célula epitelial polarizada. Tal trânsito através de uma célula epitelial polarizada é referido no presente documento como "transcitose." O trânsito permite a liberação do construto de entrega da membrana lateral basal da célula epitelial polarizada.

Para a entrega de carga destinada à atividade intracelular, o construto de entrega compreende um domínio de endocitose para transitar a carga na célula e pode também compreende um ligante clivável. Isso inclui a entrega intracelular de carga com o uso de nanopartícula e/ou carreadores à base de dendrímero alvos para o receptor de superfície celular por decoração da superfície do carreador com uma ou mais cópias do domínio de endocitose, com ou sem o uso de ligantes.

Sem pretender limitar-se a qualquer teoria ou mecanismo de ação particular, acredita-se que o domínio de endocitose permita o tráfego do construto de entrega em uma célula após o construto se ligar a um receptor presente na superfície da célula. Tal trânsito em uma célula é referido no presente documento como "endocitose". Esse trânsito permite a liberação do construto de entrega no compartimento intracelular relevante, incluindo (mas sem limitações) o

núcleo e envelope nuclear, vesículas ribossômicas, retículo endoplasmático, mitocôndria, complexo de Golgi e citosol.

Em certas modalidades da presente invenção, a identificação de proteases e peptidases que funcionam em processos biológicos que ocorrem na superfície basolateral dessas células será avaliada. Essas proteases e peptidases poderiam se encaixar em diversas categorias que podem ser definidas por seus substratos: 1) pré-pro-hormônios e enzimas que são secretados das superfícies basolaterais epiteliais e regulagem necessária para sua ativação, 2) enzimas ou hormônios ativos cuja atividade é neutralizada por um evento de clivagem a fim de regular sua atividade e 3) enzimas sistêmicas ou fatores de crescimento cujas ações na superfície basolateral são alteradas por modificação enzimática. Os exemplos de diversas atividades potenciais que se encaixam nessas várias categorias e que podem ser úteis para a clivagem basolateral de construtos de carreador-ligante-carga incluem os mesmos da subfamília de prolil oligopeptidase S9B, por exemplo, FAP e DDP IV, que foram descritas na técnica.

As sequências de ácidos nucleicos e polinucleotídeos da presente invenção podem ser preparadas por qualquer método adequado que inclui, por exemplo, clonagem de sequências apropriadas ou por síntese química direta por métodos tais como o método de fosfotriéster de Narang, et al., Meth. Enzymol, 68:90 a 99 (1979); o método de fosfodiéster de Brown, et al., Meth. Enzymol, 68:109 a 151 (1979); o método de dietilfosforamidita de Beaucage, et al., Tetra. Lett., 22:1.859 a 1.862 (1981); o método de triéster de fosforamidita de fase sólida descrito por Beaucage & Caruthers, Tetra. Letts., 22(20): 1.859 a 1.862 (1981), por exemplo, com o uso de um sintetizador automatizado conforme descrito em, por exemplo, Needham-VanDevanter, et al. Nucl.

Acids Res. 12:6.159 a 6.168 (1984); e o método de suporte sólido na Patente n° U.S.4.458.066. A síntese química produz um oligonucleotídeo de fita única. Esse pode ser convertido em DNA de fita dupla por hibridização com uma sequência complementar ou por polimerização com uma DNA polimerase com o suo da fita única como um modelo. Um versado reconhecerá que apesar de a síntese química de DNA ser limitada a sequências de cerca de 100 bases, sequências mais longas podem ser obtidas pela ligação de sequências mais curtas.

Em uma modalidade preferencial, as sequências de ácido nucleico desta invenção são preparadas por técnicas de clonagem. Os exemplos de técnicas de clonagem e sequenciamento e instruções suficientes para direcionar pessoas versadas através de muitos exercícios de clonagem são encontradas em Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2ª Edição), Volumes 1 a 3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)), Berger e Kimmel (eds.), GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES, Academic Press, Inc., San Diego Calif. (1987)), ou Ausubel, et al. (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing e Wiley-Interscience, NY (1987). As informações de produto dos fabricantes de reagentes biológicos e equipamento experimental também fornecem informações úteis. Tais fabricantes incluem a SIGMA chemical company (Saint Louis, Mo.), R&D systems (Minneapolis, Minn.), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, N.J.), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, Calif), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wis.), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersberg, Md.), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland), Invitrogen, San Diego, Calif e Applied Biosystems (Foster City, Calif.), assim como muitas outras fontes comerciais conhecidas por um versado.

As células adequadas para replicação e para suportar a expressão recombinante de proteína são bem conhecidas na técnica. Tais células podem ser transfectadas ou traduzidas conforme apropriado com o vetor de expressão particular e quantidades grandes de células que contêm vetor podem ser cultivadas para semear fermentadores de grande escala para obter quantidades suficientes da proteína para aplicações clínicas. Tais células podem incluir micro-organismos procarióticos, tal como *E. coli*; várias células eucarióticas, tais como células de ovário de hamster chinês (CHO), NSO, 292; levedura; células de insetos; e animais transgênicos e plantas transgênicas e similares. As tecnologias padrão são conhecidas na técnica para expressar genes estranhos nesses sistemas.

As composições farmacêuticas da presente invenção compreendem uma fusão genética ou construto químico da invenção e um carreador farmaceuticamente aceitável. Conforme usado no presente documento, "carreador farmaceuticamente aceitável" significa qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifungais, agentes de atraso de absorção e similares que são fisiologicamente compatíveis. Alguns exemplos, de carreadores farmaceuticamente aceitáveis são água, salina, salina tamponada por fosfato, dextrose, glicerol, etanol e similares, assim como combinações dos mesmos. Em muitos casos, será preferencial incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois tais como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio na composição. Os exemplos adicionais de substâncias farmaceuticamente aceitáveis são agentes umectantes ou quantidades menores de substâncias auxiliares tais como agentes umectantes e emulsificantes, conservantes ou tampões, que intensificam a vida útil ou eficácia do anticorpo. Exceto na medida em que qualquer excipiente,

carreador ou veículo convencional é incompatível com os construtos de entrega da presente invenção; seu uso nas preparações farmacêuticas da invenção é contemplado.

Em certas modalidades, as composições farmacêuticas de compostos ativos podem ser preparadas com um carreador que protegerá a composição contra a liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, emplastros transdérmicos e sistemas de entrega microencapsulada. Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis podem ser usados tais como vinil acetato de etileno, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido poliláctico. Muitos métodos para a preparação de tais formulações são patenteados ou em geral conhecidos por aqueles versados na técnica. Consulte, por exemplo, Sustained and Controlled Release Drug Entrega Systems (J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1978).

Em certas modalidades, os construtos de entrega da invenção podem ser oralmente administrados, por exemplo, com um diluente inerte ou um carreador comestível assimilável. O composto (e outros ingredientes, se desejados) pode estar também contido em uma cápsula de gelatina de invólucro duro ou mole, comprimido em tabletes ou incorporado diretamente na dieta do sujeito. Para a administração terapêutica oral, os construtos de entrega podem ser incorporados com excipientes e usados na forma de tabletes ingeríveis, tabletes bucais, trociscos, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, pastilhas e similares. Para administrar um composto da invenção por outra que a administração parenteral, pode ser necessário revestir o composto com, ou coadministrar o compostos com, um material para impedir a inativação.

Em geral, uma quantidade farmaceuticamente eficaz do construto de entrega da invenção é administrada a um sujeito. O versado pode facilmente determinar se a dosagem do

construto de entrega é suficiente para entregar uma quantidade eficaz da macromolécula, conforme descrito abaixo. Em certas modalidades, entre cerca de 1 .mu.g e cerca de 1 g de construto de entrega é administrado. Em outras modalidades, entre cerca de 10 .mu.g e cerca de 500 mg de construto de entrega são administrados. Em ainda outras modalidades, entre cerca de 10 .mu.g e cerca de 100 mg de construto de entrega são administrados. Já em outras modalidades, entre cerca de 10 .mu.g e cerca de 1.000 .mu.g de construto de entrega são administrados. Em ainda outras modalidades, entre cerca de 10 .mu.g e cerca de 250 .mu.g de construto de entrega são administrados. Já em outras modalidades, entre cerca de 10 .mu.g e cerca de 1.00 .mu.g de construto de entrega são administrados. Preferencialmente, entre cerca de 10 .mu.g e cerca de 50 .mu.g de construto de entrega são administrados.

Os construtos de entrega da invenção oferecem vantagens sobre as técnicas convencionais para a entrega local ou sistêmica de macromoléculas a um sujeito. Em primeiro lugar entre tais vantagens está a capacidade de entregar a macromolécula sem o uso de uma agulha para furar a pele do sujeito. Muitos sujeitos precisam de doses repetidas e regulares de macromoléculas. Por exemplo, diabéticos devem injetar insulina diversas vezes por dia para controlar as concentrações de açúcar no sangue. Tal qualidade de vida do sujeito seria grandemente aprimorada se a entrega de uma macromolécula poderia ser realizada sem injeção, evitando-se a dor e complicações potenciais associadas ao mesmo.

Além disso, muitas modalidades dos construtos de entrega podem ser construídas e expressas em sistemas recombinantes. A tecnologia recombinante permite que se produza um construto de entrega que tem um sítio de inserção projetado para a introdução de qualquer macromolécula

adequada. Tais sítios de inserção permitem que o versado na técnica produza rápida e facilmente os construtos de entrega para a entrega de novas macromoléculas, se a necessidade de fazê-lo surgir.

Adicionalmente, a conexão da macromolécula ao restante do construto de entrega com um ligante que é clivado por uma enzima presente em uma membrana lateral basal de uma célula epitelial permite que a macromolécula seja liberada do construto de entrega e liberada do restante do construto de entrega logo após a transcitose através da membrana epitelial. Tal liberação reduz a probabilidade de indução de uma resposta imunológica contra a macromolécula. .Isso também permite que a macromolécula interaja com seu alvo livre do restante do construto de entrega.

Outras vantagens dos construtos de entrega da invenção serão aparentes àqueles versados na técnica.

Exemplo 1

Um construto de plasmídeo foi preparado que encodifica Cholix de *Vibrio cholerae* madura e usado para expressar a proteína Cholix madura em um sistema de expressão de *E. coli* conforme previamente descrito; consulte, por exemplo, Jorgensen, R. et al., J Biol Chem, 283(16):10.671 a 10.678 (2008). Uma forma de mutante não tóxico do gene Cholix (doravante referido como "ntCholix") foi também preparada por deleção genética de um ácido glutâmico na posição de aminoácido 581 (ΔE581) que é análoga a uma deleção (ΔE553) na proteína PE que torna a mesma não tóxica sem alteração significante de sua conformação; Killeen, K.P. e Collier, R.J., Biochim Biophys Acta, 1138:162 a 166 (1992). A expressão de proteína foi atingida com o uso de células DH5a de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA) após a transformação por choque térmico (1 min a 42 °C) com o plasmídeo apropriado. As células transformadas, selecionadas em meio

que contém antibiótico, foram isoladas e cultivadas em caldo de Luria-Bertani broth (Difco). A expressão de proteína foi induzida por adição de isopropil-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a 1 mM. Duas horas após a indução de IPTG, as células foram colhidas por centrifugação a 5.000 xg por 10 min a 4°C. Os corpos de inclusão forma isolados após a lise celular e as proteínas foram solubilizadas em HCl de guanidina a 6 M e EDTA a 2 mM (pH 8,0) mais ditiotreitol a 65 mM. Após o redobramento e purificação, as proteínas foram armazenadas a ~5 ml/ml em PBS (pH 7,4) sem Ca^{2+} e Mg^{2+} a -80°C. Todas as proteínas usadas nesses estudos foram confirmadas como estando a >90% de pureza com base na cromatografia de exclusão de tamanho.

A forma de ntCholix foi então modificada em seu C-terminal para permitir o acoplamento químico direto através de um resíduo de sulfidrila livre localizado próximo ao C-terminal da proteína. A estratégia para a modificação de C-terminal é representada na Figura 1. A modificação de C-terminal incluiu um laço restrito por cisteína que abriga a sequência de clivagem de consenso (ENLFQS) para a protease altamente seletiva do vírus etch do fumo (TEV), uma segunda cisteína e uma etiqueta de hexa-histadina (His_6). A segunda Cis foi incluída para formar uma ponte de dissulfeto com a Cis usada por último para acoplamento. Adicionar a sequência His_6 à proteína simplifica a purificação e a sequência de clivagem de TEV forneceu um mecanismo para remover seletivamente o resíduo de Cis terminar após a redução amena. A clivagem de TEV e redução amena com ditioteitol a 0,1 mM após a expressão e isolamento dos construtos de ntCholix permitiu o acoplamento químico direto de uma carga, corante fluorescente 488 Alexa Fluor®, por meio de uma reação à base de maleimida como um mecanismo genérico de fixação de carga. O construto resultante é referido no presente documento como

ntCholix-Alexa488. Após a clivagem de protease de TEV, redução e acoplamento de carga através de uma reação de maleimida com a sulfidrila livre, a remoção da sequência de C-terminal livre foi atingida por uma segunda etapa de cromatografia de coluna de Ni^{2+}.

Exemplo 2

O transporte transepitelial de ntCholix-Alexa488 foi avaliado com o uso de monocamadas de Caco-2 *in vitro*. Primeiramente, células Caco-2 (número de passagem 25 a 35) foram cultivadas para monocamadas confluentes conforme previamente descrito; Rubas, W. et al., Pharm Res, 10:113 a 118 (1993). Brevemente, as células foram a 37°C em DMEM/meios de crescimento alto com L-glutamina a 2 mM, soro bovino fetal a 10% e 100 unidades de penicilina/estreptomicina em uma atmosfera de 5% de CO_2 e 90% de umidade. As células foram cultivadas cada semana em uma razão de separação de 1:3 em frascos de 75cm^2 e semeadas em suportes de filtro de policarbonato (Transwell™) permeáveis revestidos com colágeno e pré-umidificados (tamanho de poro de 0,4 µm) da Corning Costar (Cambridge, MA) a uma densidade de 63.000 células/cm^2. Os meios de crescimento foram substituídos em dias alternados. As monocamadas confluentes, determinadas pela aquisição de resistência transepitelial (TEER) determinada com o uso de um medidor de volt e ohm (World Precision Instruments, Sarasota, FL), foram usadas 20 a 26 duas após a semeadura.

Dois materiais adicionais foram também preparados para serem usados como controles para avaliar o transporte *in vitro* de Cholix. Como um controle interno para dano de filtro, dextrano de 70 kDa identificado com isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) foi obtido de fonte comercial (Sigma). Como um controle para transporte mediado por corante não específico, reagiram-se algumas das aminas livres na

superfície da albumina de soro bovino (BSA; Sigma) com succinirnidil éster de ácido carboxílico Alexa488 (A488-CASE; Invitrogen). A reação de acoplamento foi executada por 4 horas à temperatura ambiente em pH neutro em uma razão molar de 10:1 A488-CASE:BSA em cujo ponto glicina em excesso foi adicionada para arrefecer bruscamente a reação. O produto purificado resultante continha ~3 moléculas Alexa488 por molécula de BSA. Dextrano de 70 kDa identificado com isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) (Sigma) foi usado como um controle interno para dano de filtro. Medições de fluorescência foram feitas com o uso de um instrumento BMG labtech FLUOstar Omega definido a excitação de 540 nm e emissão de 610 nm para Dextrano TRITC (ideal Ex=547 e Em = 572) e excitação de 480 nm e emissão de 520 nm para proteínas Alexa488 (ideal Ex = 496 e Em = 519).

As taxas de fluxo de transporte transepitelial foram medidas *in vitro* nas direções apical (Ap) a basolateral (Bl) e Bl a Ap com o uso de monocamadas polarizadas de células Caco-2 par descrever os eventos de fluxo mucosal a serosal e serosal a mucosal, respectivamente. Logo antes da iniciação de um estudo de transporte, a resistência transepitelial (TEER) de cada filtro foi medida; leituras de TEER de monocamadas de <200 $\Omega.cm^2$ foram excluídas do estudo. Os meios Ap e Bl foram removidos das monocamadas incluídas e essas superfícies foram lavadas uma vez com salina tamponada por fosfato (PBS). Um conjunto de monocamadas então recebeu uma aplicação Ap (doador) de 100 µl de PBS contendo 10 µg de ntCholix-A488 e 10 µg de TRITC-Dextrano ou 10 µg de BSA-A488 e 10 µg TRITC-Dextrano. Os compartimentos receptores (Bl) então receberam 500 µl de PBS para definir o T_0 para o estudo de transporte. Tanto os compartimentos doadores quanto receptores foram amostrados após 4 horas de incubação a 37°C para determinar a quantidade de material transportado através

da monocamada e a quantidade retida na superfície apical, respectivamente.

Após 4 horas de exposição, observou-se ~5 % do material adicionado à superfície apical dessas monocamadas a serem transportadas (consulte a Figura 2). Quaisquer filtros que mostraram níveis de TRITC- Dextrano de 75kDa no compartimento basal foram excluídos da análise. Uma proteína de controle de BSA-Alexa488 falhou em mostrar quaisquer níveis significantes no compartimento basal por esse mesmo período de 4 horas (consulte a Figura 2). As médias de transporte foram 5,025 $\pm$ 1,13 % para Cholix e 0,56 $\pm$ 0,33 para BSA (N=4). Esses dados estabelecem que uma forma geneticamente desintoxicada de Cholix pode transportar de modo eficaz *in vitro* através de monocamadas polarizadas de uma linhagem celular de câncer intestinal, Caco-2.

Exemplo 3

Foi também preparada e expressa em *E. coli* uma variante de Cholix truncada no aminoácido A^{386} ($Cholix^{386}$) assim como uma ligação genética de proteína fluorescente verde (GFP) no C-terminal de $Cholix^{386}$ ($Cholix^{386}GFP$). A expressão de proteína foi atingida com o uso de células DH5α de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA) após a transformação por choque térmico (1 minuto a 42°C) com o plasmídeo apropriado. As células transformadas, selecionadas em meio que contém antibiótico, foram isoladas e cultivadas em caldo de Luria-Bertani broth (Difco). A expressão de proteína foi induzida por adição de isopropil-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a 1 mM. Duas horas após a indução de IPTG, as células foram colhidas por centrifugação a 5.000 xg por 10 min a 4°C. Os corpos de inclusão forma isolados após a lise celular e as proteínas foram solubilizadas em HCl de guanidina a 6 M e EDTA a 2 mM (pH 8,0) mais ditiotreitol a 65 mM. Após o redobramento e purificação, as proteínas foram armazenadas a

~5 ml/ml em PBS (pH 7,4) sem Ca^{2+} e Mg^{2+} a -80°C. O redobramento Cholix^{386}GFP foi monitorado por aquisição e retenção da assinatura de fluorescência com essa proteína fluorescente; Sample et al., Chem Soc Rev, 38(10): páginas 2.852 a 64 (2009). A proteína fluorescente verde (GFP) foi comprada junto à Upstate (Charlottesville, VA). Todas as proteínas usadas nesses estudos foram confirmadas como estando a >90% de pureza com base na cromatografia de exclusão de tamanho.

Microesferas de poliestireno (diâmetro de 10 nm) contendo um corante fluorescente integrado de modo covalente com proteínas de excitação/emissão de 468/508 nm e tendo grupos funcionais superficiais de aldeído (XPR-582) foram obtidos junto à Duke Scientific (Palo Alto, CA). Cem µl de microesferas de XPR-582 (em 2% de sólidos) foram misturados com aproximadamente 2,5 nmoles de GFP ou Cholix^{386}GFP em um volume final de 200 µl de salina tamponada por fosfato neutra (pH 7,0) (PBS). Após 2 horas de agitação suave à temperatura ambiente, 20 µl de uma solução a 2 mg/ml de albumina de soro bovino (BSA; Sigma, St. Louis, MO) em PBS foram adicionados. As preparações foram sofreram então diálise por três ciclos de diluição com PBS e concentração com o uso de um dispositivo de filtro Microcon de corte de peso molecular de 100.000 da (Bedford, MA). As preparações finais de microesferas revestidas estavam a 1% de sólidos.

Exemplo 4

Células A549 (ATCC CCL-185™), L929 (ATCC CRL-2148™) e Caco-2 (ATCC HTB-37™) foram mantidas em 5% de CO_2 a 37°C em meio completo: Meio de Eagle modificado por Dulbecco F12 (DMEM F12) suplementado com 10% de soro bovino fetal, glutamina a 2,5 mM, 100 U de penicilina/ml e 100 µg de estreptomicina/ml (Gibco BRL, Grand Island, N.Y.). As células foram alimentadas a cada 2 a 3 dias com esse meio (designado

meio completo) e cultivadas a cada 5 a 7 dias. Para ensaios, as células foram semeadas em placas com 24 a 96 poços e cultivadas até confluência.

As células Caco-2 foram cultivadas como monocamadas cofluentes em suportes de transpoço de membrana de policarbonato de tamanho de poro de 0,4µm revestidas por colágeno (Corning-Costar, Cambridge, MA) e usadas 18 a 25 dias após obtendo uma resistência elétrica transepitelial (TEER) de >250 Ω cm^2 conforme medido com o uso de um voltímetro chopstick Millicell-ERS® (Millipore). Transporte apical para basolateral (A→B) e basolateral para apical (B→A) de Cholix ou Cholix^{386}GFP através dessas monocamadas foi determinado por medição da quantidade de proteína transportada 4 horas após uma aplicação de 20 µg a 37°C. As medições de TEER e a extensão de dextrano fluorescente de 10 kDa (medida com o uso de um protocolo de exclusão de tamanho HPLC) foram usadas para verificar as propriedades de barreira de monocamada durante o curso do estudo. A extensão de transporte de Cholix foi determinada por titulação de meio coletado no ensaio de citotoxicidade à base de célula. A Cholix^{386}GFP transportada foi medida por ensaio imunoabsorvente ligado por enzima (ELISA) com o uso de anticorpo anti-GFP para a captura e o soro policlonal a Cholix para detecção.

As taxas de transporte através de monocamadas de células Caco-2 polarizadas *in vitro* foram comparáveis para Cholix, ntCholix e Cholix^{386}GFP conforme avaliado pela análise de formato ELISA. No caso de Cholix, as células Caco-2 polarizadas não foram intoxicadas pela proteína quando examinadas para detecção TUNEL de apoptose ou liberação de lactato desidrogenase (LDH). De modo importante, foi revelado que quimeras de proteína Cholix e à base de Cholix transportam de modo eficaz da superfície apical para

basolateral de monocamadas de Caco-2, mas não na direção basolateral para apical. Essas taxas de transporte e direcionalidade foram comparáveis àquelas previamente observadas para PE testado nesse mesmo formato. Adicionalmente, observou-se que a adição de antissoro anti-Cholix de coelho falhou em bloquear o transporte eficaz de proteínas Cholix ou relacionadas a Cholix através das monocamadas de Caco-2 *in vitro*.

Microscópio fluorescente cofocal foi usado para examinar a natureza de transcitose de Cholix^{386}GFP através de monocamadas de Caco-2 *in vitro*. Um estudo de curso de tempo mostrou a Cholix^{386}GFP entrando nas células epiteliais dentro de 5 minutos de sua aplicação apical e transportando através de células para a região basolateral da célula dentro de 15 minutos. Nas amostras exposta a Cholix^{386}GFP por 15 minutos com subsequente remoção de Cholix^{386}GFP em excesso da câmara apical, foi observada que a fluorescência de GFP continuou na direção da superfície basolateral da célula e não de volta em direção à superfície apical. Esse movimento unidirecional de Cholix^{386}GFP foi confirmado por medição de teor de Cholix^{386}GFP nos compartimentos apical e basolateral por esse curso de tempo. A aplicação de Cholix^{386}GFP na superfície basolateral de monocamadas de Caco-2 não mostrou qualquer fluorescência significante entrando nas células, consistente com os estudos de transporte. A análise Western blot de Cholix, ntCholix e Cholix^{386}GFP transportada sugeriu que essas proteínas são transportadas sem maiores alterações.

Estudos *in vitro* também mostraram microesferas de látex fluorescente de diâmetro de 100 nm quimicamente acopladas à Cholix^{386}GFP transportadas com eficácia através de monocamadas de Caco-2 após uma aplicação apical. A seleção de microesferas de látex com um diâmetro de 100 nm forneceu um material que poderia facilmente se encaixar dentro do lúmen

de um endossomo de diâmetro de 125 nm derivado de uma vesícula revestida por clatrina. Assim, estudos sugerem que microesferas de látex de Cholix^{386}GFP se movem através das células de Caco-2 polarizadas por um mecanismo consistente com admissão de endossomo na superfície celular apical por trânsito intracelular à base de endossomo. A pré-incubação de microesferas de látex fluorescente de diâmetro de 100 nm acopladas a Cholix^{386}GFP com antissoro anti-Cholix falhou em alterar o transporte dessas microesferas. Uma quantidade similar de GFP quimicamente acoplado a microesferas de látex fluorescente de diâmetro de 100 nm não facilitaram o transporte *in vitro* dessas partículas através de monocamadas de Caco-2. Estudos com microscópio de fluorescência cofocal foram consistentes com as diferenças observadas para microesferas de látex em transcitose com Cholix^{386}GFP versus GFP.

O resultado de que Cholix pode transportar através de barreiras epiteliais polarizadas similarmente a PE não é antecipada. Apesar de essas estruturas serem similares conforme sugerido por análise cristalográfica, sua composição de aminoácido de superfície é bem diferente, de fato, métodos de alinhamento baseados em similaridade de aminoácido não poderiam facilmente correlacionar essas duas proteínas. Isso é importante pelo fato de que a capacidade de uma proteína derivada de patógeno, tal como esses dois fatores de virulência, para interagir com os receptores de célula hospedeira é presumida que envolva componentes de aminoácido expressos na superfície. Como ambas essas proteínas (com suas sequências de aminoácido substancialmente diferentes) transportam de modo eficaz através de epitélio polarizado, é altamente provável que algum outro mecanismo forme essa base para essa capacidade de transporte. Acredita-se que as relações estruturais compartilhadas por PE e Cholix formem a

base da capacidade inerente para sua transcitose eficaz. Apesar de ambas as proteínas PE e Cholix poderem ter a capacidade de se ligar a um receptor de superfície apical para ganhar acesso aos compartimentos do endossomo, é mais provável que essa interação e o potencial para outros receptores envolvidos no trânsito intracelular dessas proteínas estejam baseados em estruturas conformacionais ao invés de aminoácidos específicos na superfície da proteína.

Todos os artigos e métodos revelados e reivindicados no presente documento podem ser produzidos e executados sem experimentação desfeita à luz da presente revelação. Embora os artigos e métodos desta invenção tenham sido descritos em termos de modalidades preferenciais, será aparente àqueles versados na técnica que variações podem ser aplicadas aos artigos e métodos sem afastamento do espírito e escopo da invenção. Todas tais variações e equivalentes aparentes àqueles versados na técnica, sejam agora existentes ou posteriormente desenvolvidos, são considerados como estando dentro do espírito e escopo da invenção definidos pelas reivindicações anexas. Todas as patentes, pedidos de patente e publicações mencionados no relatório descritivo são indicativos dos níveis daqueles versados na técnica aos quais esta invenção se dirige. Todas as patentes, pedidos de patente e publicações são incorporados ao presente a título de referência em sua totalidade para todos os propósitos e na mesma extensão como se cada publicação individual fosse específica e individualmente indicada como sendo incorporada a título de referência em sua totalidade e para qualquer e todos os propósitos. A invenção ilustrativamente descrita no presente documento pode ser praticada na ausência de qualquer elemento(s) não especificamente revelado(s) no presente documento. Assim, por exemplo, em cada ocorrência no pressente documento, qualquer dos termos "que compreende",

"que consiste essencialmente em" e "que consiste em" pode ser substituídos por qualquer um dos outros dois termos. Os termos e expressões que foram empregados são usados como termos de descrição e não de limitação e não há intenção no uso desses termos e expressões de excluir quaisquer equivalentes dos recursos mostrados e descritos ou porções dos mesmos, mas reconhece-se que várias modificações são possíveis dentro do escopo da invenção reivindicada. Assim, deve-se entender que, embora a presente invenção tenha sido especificamente repelada pelas modalidades preferenciais e recursos opcionais, modificações e variações dos conceitos revelados no presente documento podem ser recorridos por aqueles versados na técnica e que tais modificações e variações são consideradas como estando dentro do escopo desta invenção conforme definido pelas reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. CONSTRUTO DE ENTREGA ISOLADO, não tóxico, caracterizado por compreender uma toxina Cholix modificada que compreende:

– resíduos de aminoácidos Val^{1}–Ala^{386}; e

– que é truncada no resíduo Ala^{386} ou suprimida no resíduo Glu^{581}; e

uma carga terapêutica acoplada à toxina Cholix modificada, em que o construto de entrega isolado é capaz de entregar a carga terapêutica.

2. CONSTRUTO DE ENTREGA ISOLADO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela entrega ser sem injeções.

3. CONSTRUTO DE ENTREGA ISOLADO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado por compreender adicionalmente um ligante clivável.

4. CONSTRUTO DE ENTREGA ISOLADO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela carga ser selecionada do grupo que consiste em: macromoléculas, moléculas pequenas, siRNA, PNA, miRNA, DNA, plasmídeo e moléculas antissenso.

5. CONSTRUTO DE ENTREGA ISOLADO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela toxina Cholix modificada ser não tóxica.

6. CONSTRUTO DE ENTREGA ISOLADO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela carga terapêutica ser uma citocina.

7. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, caracterizada por compreender um construto de entrega isolado, conforme definido na reivindicação 1, e um carreador farmaceuticamente aceitável.

8. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada por ser para administração oral, administração tópica, administração pulmonar, administração intra-nasal, administração bucal, administração

sublingual ou administração ocular.

9. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada por ser para administração oral.

10. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada por ser formulada em uma cápsula ou comprimido.

11. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada por compreender de 1 µg a 1 g do construto de entrega isolado.

12. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada por compreender de 10 µg a 100 mg do construto de entrega isolado não tóxico.

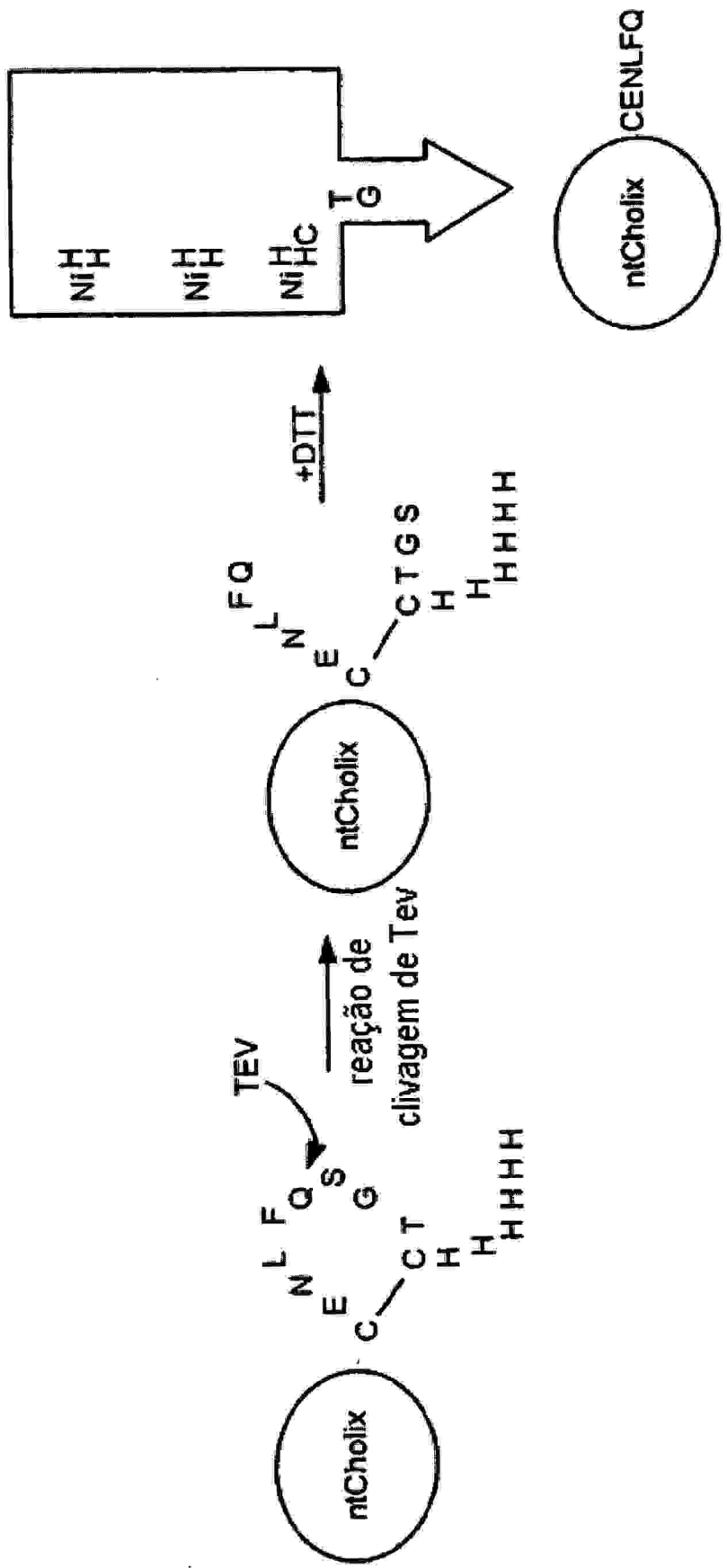
ntCholix
TEV
reação de
clivagem de Tev
ntCholix
+DTT
ntCholix
CENLFQ

FIG. 1

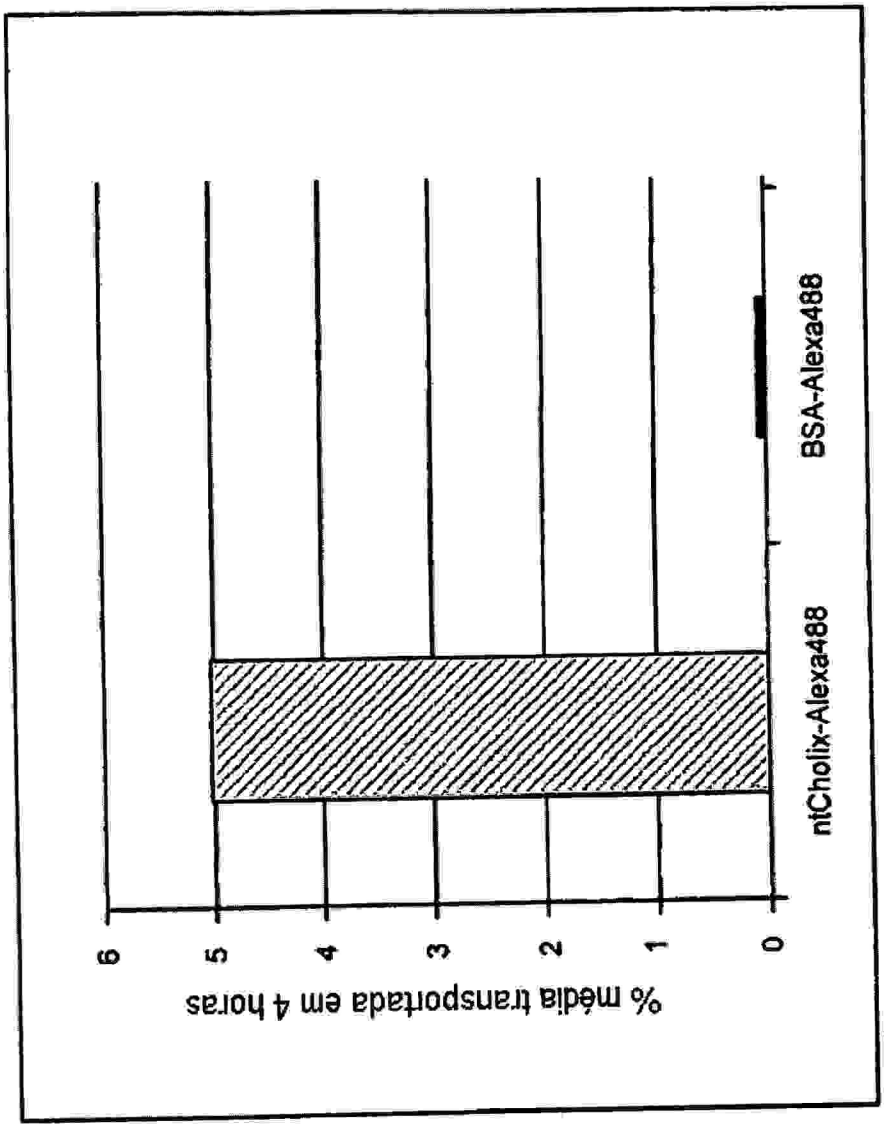
% média transportada em 4 horas
0
1
2
3
4
5
6
nitCholix-Alexa488
BSA-Alexa488

FIG. 2