



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

(21) **PI0620806-1 A2**

(22) Data de Depósito: 25/10/2006
(43) Data da Publicação: 22/11/2011
(RPI 2133)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/79
C07K 14/47

(54) Título: PEPTÍDEOS ÚTEIS COMO PEPTÍDEOS DE PENETRAÇÃO DE CÉLULA

(30) Prioridade Unionista: 30/12/2005 EP 05 028755.6

(73) Titular(es): Evonik Röhm GMBH

(72) Inventor(es): Hansjörg Hufnagel, Mariola Fotin-Mleczek, Norbert Windhab, Rainer Fischer, Roland Brock

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006010271 de 25/10/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/076904de 12/07/2007

(57) Resumo: PEPTÍDEOS ÚTEIS COMO PEPTÍDEOS DE PENETRAÇÃO DE CÉLULA. A presente invenção refere-se a um peptídeo tendo uma seqüência de aminoácidos compreendendo pelo menos 8 aminoácidos consecutivos da proteína lactoferrina humana ou a proteína lactoferrina bovina, pelo que o peptídeo é apropriado para atuar como um peptídeo de penetração de célula.



PI0620806 - 1

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PEPTÍDEOS ÚTEIS COMO PEPTÍDEOS DE PENETRAÇÃO DE CÉLULA**".

A presente invenção refere-se a um peptídeo que é apropriado para uso como um peptídeo de penetração de célula, complexos compreendendo o mesmo e seu uso.

Peptídeos de penetração de célula (CPPs) como penetratina derivada de antennapedia (Derossi et al., J. Biol. Chem., 269, 10444-10450, 1994) e o peptídeo Tat (Vives et al., J. Biol. Chem., 272, 16010-16017, 1997) são ferramentas amplamente usadas para a liberação de moléculas-carga como peptídeos, proteínas e oligonucleotídeos (Fischer et al., Bioconjug. Chem., 12, 825-841, 2001) em células. Áreas de aplicação variam de puramente biologia de célula a pesquisa biomédica (Dietz and Bähr, Mol. Cell., Neurosci, 27, 85-131, 2004). Inicialmente, tomada celular foi acreditada ocorrer através de permeação direta da membrana de plasma (Prochiantz, Curr. Opin. Cell Biol., 12,400-406, 2000). Nos anos passados, foi acumulada evidência de que para vários CPPs endocitose contribui pelo menos significativamente para a tomada celular para vários CPPs (para uma revisão, vide Fotin-Mleczek et al., Curr. Pharm. Design, 11, 3613-3628, 2005). Dados estes recentes resultados, a especificação de um peptídeo como um CPP por isso não implica um específico mecanismo de importação celular, mas antes refere-se a uma função como um peptídeo que, quando conjugado a uma carga, tanto covalentemente como não-covalentemente, aperfeiçoa a tomada celular da molécula-carga.

Embora estes CPPs tenham provado serem em princípio apropriados para a liberação de peptídeos, proteínas e oligonucleotídeos em células, ainda há uma necessidade de provimento de ainda CPPs permitindo a liberação de tais moléculas como moléculas-carga. Em particular, há uma necessidade de CPPs que (i) permitam rápida liberação de molécula-carga a partir do caminho endolisossomal e (ii) evitem reações imunológicas com aplicação no homem.

O problema básico da presente invenção é resolvido em um primeiro aspecto através de um peptídeo tendo uma seqüência de aminoácidos

compreendendo pelo menos 8 aminoácidos consecutivos da proteína lactoferrina humana ou da proteína lactoferrina bovina, pelo que o peptídeo é apropriado para atuar como um peptídeo de penetração de célula.

5 Em uma modalidade do primeiro aspecto o peptídeo compreende pelo menos quatro aminoácidos catiônicos.

Em uma modalidade do primeiro aspecto a proteína lactoferrina humana tem uma seqüência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 1 e a proteína lactoferrina bovina tem uma seqüência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 2.

10 Em uma modalidade do primeiro aspecto o peptídeo compreende pelo menos dois resíduos Cys ou seus análogos.

Em uma modalidade preferida do primeiro aspecto o peptídeo compreende uma ligação dissulfeto criada por dois resíduos Cys ou uma ligação análoga formada pelos análogos de cisteína.

15 Em uma modalidade do primeiro aspecto o peptídeo compreende uma porção tendo uma conformação de hélice-alfa de cerca de 12 a 20 aminoácidos em comprimento, e uma porção tendo uma conformação de folha-beta de cerca de 8 a 12 aminoácidos em comprimento.

20 Em uma modalidade do primeiro aspecto o peptídeo compreende de cerca de 8 a cerca de 60 resíduos de aminoácidos.

Em uma modalidade preferida do primeiro aspecto o peptídeo compreende de cerca de 20 a cerca de 45 resíduos de aminoácidos.

25 Em uma modalidade do primeiro aspecto o peptídeo tem uma seqüência de aminoácidos correspondendo a posições de aminoácidos 20 a 64 da seqüência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 1.

Em uma modalidade do primeiro aspecto o peptídeo tem uma seqüência de aminoácidos, pelo que a extremidade terminal-N do peptídeo é um aminoácido correspondendo a posições de aminoácidos 20 a 64 da seqüência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 1 ou 2.

30 Em uma modalidade do primeiro aspecto o peptídeo é selecionado do grupo compreendendo

um peptídeo tendo a seqüência de aminoácidos

KCFWQRNMRKVRGPPVSCIQR (SEQ.ID.No.3),

um peptídeo tendo a seqüência de aminoácidos

CFWQRNMRKVRGPPVSC (SEQ.ID.No.4),

um peptídeo tendo a seqüência de aminoácidos

5 FQWQRNMRKVRGPPVS (SEQ.ID.No.5),

um peptídeo tendo a seqüência de aminoácidos

FQWQRNMRKVR (SEQ.ID.No.6),

um peptídeo tendo a seqüência de aminoácidos

KCRRWQWRMKKLGAPSITCVR (SEQ ID No. 29), e

10 um peptídeo tendo a seqüência de aminoácidos

CRRWQWRMKKLGAPSITC (SEQ ID No. 30)

e seus derivados.

Em uma modalidade preferida da presente invenção os peptídeos de penetração de célula compreendem uma seqüência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 3, 4, 29 ou 30 ou uma seqüência com uma identidade de pelo menos 40%, preferida de pelo menos 50%, em particular preferida de pelo menos 75% ou pelo menos 90% às ditas seqüências.

Peptídeos compreendendo SEQ ID NOs: 3, 4, 29 ou 30 com pelo menos 40% de identidade são preferidos caracterizados pela substituição ou supressão de 1 a 13 aminoácidos de SEQ ID NO: 3 ou 29 respectivamente 1 a 10 aminoácidos de SEQ ID NO: 4 ou 30. Onde seqüências com uma substituição de um ou mais aminoácidos com aminoácidos homólogos são de interesse aumentado.

Os peptídeos compreendendo uma seqüência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 3, 4, 29 ou 30 ou uma seqüência com pelo menos 40% de identidade compreendem pelo menos 8 aminoácidos (peptídeos derivados de SEQ ID NO: 4 ou 30) respectivamente 9 aminoácidos (SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 29 derivada de peptídeos). Os ditos peptídeos têm preferivelmente entre 10 e 45 aminoácidos e preferido entre 14 e 25 aminoácidos.

Peptídeos preferidos compreendendo uma seqüência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NOs: 4, 29 ou 30 possuem uma carga catiô-

nica, em particular de pelo menos quatro aminoácidos catiônicos localizados em SEQ ID NOs: 3, 4, 29 ou 30. Ainda uma característica preferida dos ditos peptídeos é a presença de pelo menos duas cisteínas ou análogos de cisteína que podem formar uma ponte dissulfeto ou uma ponte análoga. Ambos, cisteínas ou seus análogos encerram pelo menos 6 aminoácidos, preferivelmente entre 12 e 43 aminoácidos.

Em uma modalidade preferida do primeiro aspecto o peptídeo é um derivado dos peptídeos de acordo com qualquer uma de SEQ ID NO: 2 a 5, pelo que o resíduo metionina é substituído por um aminoácido selecionado do grupo compreendendo valina, isoleucina, norvalina, leucina e norleucina.

Em uma modalidade mais preferida do primeiro aspecto o peptídeo é um peptídeo tendo uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo compreendendo

15 **KCFWQRNVRKVRGPPVSCIQR (SEQ.ID.No.7)**
 KCFWQRNIRKVRGPPVSCIQR (SEQ.ID.No.8)
 KCFWQRNXRKVRGPPVSCIQR (SEQ.ID.No.9), onde X é norvalina,
 KCFWQRNLRKVRGPPVSCIQR (SEQ.ID.No.10),
 KCFWQRNXRKVRGPPVSCIQR (SEQ.ID.No.28), onde X é norleucina,
 20 **CFWQRNVRKVRGPPVSC (SEQ.ID.No. 11)**,
 CFWQRNIRKVRGPPVSC (SEQ.ID.No. 12),
 CFWQRNXRKVRGPPVSC (SEQ.ID.No. 13), onde X é norvalina,
 CFWQRNLRKVRGPPVSC (SEQ.ID.No. 14),
 CFWQRNXRKVRGPPVSC (SEQ.ID.No. 15), onde X é norleucina,
 25 **FWQRNVRKVRGPPVS (SEQ.ID.No. 16)**,
 FWQRNIRKVRGPPVS (SEQ.ID.No.17),
 FWQRNXRKVRGPPVS (SEQ.ID.No.18), onde X é norvalina,
 FWQRNLRKVRGPPVS (SEQ.ID.No.19),
 FWQRNXRKVRGPPVS (SEQ.ID.No.20), onde X é norleucina,
 30 **FWQRNVRKVR (SEQ.ID.No.21)**,
 FWQRNIRKVR (SEQ.ID.No.22),
 FWQRNXRKVR (SEQ.ID.No.23), onde X é norvalina,

FQWQRNLRKVR (SEQ.ID.No.24), e

FQWQRNXRKVR (SEQ.ID.No.25), onde X é norleucina

em uma modalidade do primeiro aspecto os derivados têm um grupo de ligação preferivelmente selecionado do grupo compreendendo tioéteres, pelo que o grupo de ligação substitui a ligação dissulfeto formada por estes resíduos Cys.

Em uma modalidade do primeiro aspecto, o peptídeo é marcado radioativamente, preferivelmente tendo incorporado um aminoácido marcado radioativamente, pelo que mais preferivelmente o aminoácido marcado radioativamente é um aminoácido marcado com trítio.

Em uma modalidade do primeiro aspecto o peptídeo ainda compreende uma porção que é apropriada para detecção usando um processo para detecção, pelo que a dita porção é preferivelmente selecionada do grupo compreendendo fluoróforos, traçadores radioativos e haptenos, pelo que preferivelmente o hapteno é biotina.

O problema básico da presente invenção também é resolvido em um segundo aspecto através de um complexo compreendendo um peptídeo selecionado do grupo compreendendo um peptídeo de acordo com o primeiro aspecto, lactoferrina humana e lactoferrina bovina, e uma molécula-carga.

Em uma modalidade do segundo aspecto a molécula-carga está covalentemente ou não-covalentemente ligada ao peptídeo.

Em uma modalidade do segundo aspecto a molécula-carga é selecionada do grupo compreendendo ácidos nucleicos, aminoácidos, peptídeos, proteínas, carboidratos, lipídeos, e moléculas pequenas e misturas de quaisquer dos mesmos.

Em uma modalidade do segundo aspecto a molécula-carga está presente como ou parte ou uma estrutura, pelo que a estrutura é selecionada do grupo compreendendo nanopartículas, micropartículas, lipossomas e micelas.

Em uma modalidade preferida do segundo aspecto o ácido nucleico é um ácido nucleico selecionado do grupo compreendendo moléculas de DNA, moléculas de RNA, moléculas de PNA, moléculas de siRNA, molé-

culas anti-sentido, ribozimas, aptâmeros, "spiegelmeros" e moléculas-engodo.

Em uma modalidade alternativa do segundo aspecto o peptídeo é selecionado do grupo compreendendo peptídeos para vacinação.

5 Ainda em uma modalidade alternativa preferida do segundo aspecto o ácido nucléico é uma vacina baseada em ácido nucléico.

Ainda em uma modalidade alternativa preferida do segundo aspecto as nanopartículas e/ou as micropartículas compreendem ou consistem em um composto farmacologicamente ativo.

10 O problema básico da presente invenção é também resolvido em um terceiro aspecto através de uma composição compreendendo pelo menos um peptídeo selecionado do grupo compreendendo um peptídeo de acordo com o primeiro aspecto, lactoferrina humana e lactoferrina bovina, e uma molécula-carga.

15 O problema básico da presente invenção é também resolvido em um quarto aspecto por uma composição compreendendo um complexo de acordo com o segundo aspecto.

O problema básico da presente invenção é também resolvido em um quinto aspecto através de um ácido nucléico codificando um peptídeo de acordo com o primeiro aspecto, preferivelmente tendo uma seqüência de ácidos nucléicos de acordo com SEQ ID NO: 26 ou 27.

20

O problema básico da presente invenção é também resolvido em um sexto aspecto através de uma composição compreendendo um ácido nucléico de acordo com o quinto aspecto e uma molécula-carga.

25 Em uma modalidade preferida do sexto aspecto a molécula-carga é um ácido nucléico e mais particularmente um RNA apropriado para vacinação.

Em uma modalidade preferida do sexto aspecto a molécula-carga é um ácido nucléico codificando um peptídeo.

30 Em uma modalidade preferida do sexto aspecto o ácido nucléico de acordo com o quinto aspecto está operavelmente ligado ao ácido nucléico codificando um peptídeo.

Em uma modalidade mais preferida do sexto aspecto o ácido nucléico de acordo com o quinto aspecto e o ácido nucléico codificando um peptídeo são ligados em estrutura.

5 Em uma modalidade do sexto aspecto o peptídeo é um agente farmacêuticamente ativo.

O problema básico da presente invenção é também resolvido em um sétimo aspecto através do uso de um peptídeo de acordo com o primeiro aspecto como um peptídeo de penetração de célula.

10 O problema básico da presente invenção é também resolvido em um oitavo aspecto através de uso de lactoferrina humana ou um seu derivado funcional ou de lactoferrina bovina ou um seu derivado funcional como um peptídeo de penetração de célula.

15 Em uma modalidade do oitavo aspecto a lactoferrina humana tem uma seqüência de aminoácidos compreendendo posições de aminoácidos 20 a 711 da seqüência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 1 ou seu derivado funcional e/ou a lactoferrina bovina tem uma seqüência de aminoácidos compreendendo posições de aminoácidos 20 a 708 da seqüência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 2 ou um seu derivado funcional.

20 O problema básico da presente invenção é também resolvido em um nono aspecto através do uso de um peptídeo de acordo com o primeiro aspecto como um agente de transfecção.

25 O problema básico da presente invenção é também resolvido em um décimo aspecto através do uso de lactoferrina humana ou um seu derivado funcional ou de lactoferrina bovina ou um seu derivado funcional como um agente de transfecção.

30 Em uma modalidade do décimo aspecto a lactoferrina humana tem uma seqüência de aminoácidos compreendendo posições de aminoácidos 20 a 711 da seqüência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 1 e/ou a lactoferrina bovina tem uma seqüência de aminoácidos compreendendo as posições de aminoácidos 20 a 708 da seqüência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 2 ou um seu derivado funcional.

O problema básico da presente invenção também é resolvido em um décimo – primeiro aspecto através do uso de uma composição de acordo com o terceiro, o quarto, e o sexto aspecto para a fabricação de um medicamento.

5 Em uma modalidade do décimo – primeiro aspecto a molécula-carga é um agente farmacologicamente ativo.

O problema básico da presente invenção é também resolvido em um décimo - segundo aspecto através do uso de uma composição de acordo com o terceiro, o quarto, e o sexto aspecto para a fabricação de um agente
10 diagnóstico.

Em uma modalidade do décimo – segundo aspecto a molécula-carga é um marcador diagnóstico.

Os presentes inventores surpreendentemente verificaram que lactoferrina humana e bovina e mais especificamente seus peptídeos, que
15 são aqui referidos como os peptídeos de acordo com a presente invenção, são apropriados para atuarem como peptídeos de penetração de célula (CPP) e assim podem liberar moléculas-carga para o citoplasma de uma célula. Um CPP é preferivelmente qualquer peptídeo ou proteína que é apropriado para penetrar uma membrana celular, mais preferivelmente a
20 membrana de plasma de uma célula mamífera. Entretanto, é para ser entendido que preferivelmente o termo CPP não implica um específico mecanismo de importação celular. Mais especificamente, os presentes inventores perceberam que específicos peptídeos derivados de lactoferrina huma são liberados dos compartimentos endolisossomais em uma maneira altamente eficiente que por sua vez segue junto com uma liberação altamente eficiente de
25 qualquer molécula(s) de carga. Uma vez as moléculas-cargas estejam disponíveis no citoplasma elas podem exercer qualquer efeito associado com as mesmas. De tal modo, os polipeptídeos de acordo com a invenção provêm um meio eficiente para influenciar os mecanismos biológicos e caminhos de uma célula que podem ser usados para ambos, pesquisa assim
30 como aplicações terapêuticas e diagnósticas. Como aqui usado e se não indicado ao contrário, o termo peptídeos de acordo com a presente invenção

preferivelmente também compreendem lactoferrina humana e bovina como preferivelmente aqui definidas.

Os peptídeos de acordo com a presente invenção são, em princípio, fragmentos da lactoferrina humana ou bovina, ou um seu derivado.

5 Devido sua origem, os peptídeos de acordo com a presente invenção exibem, à parte de serem apropriados para liberação de moléculas-carga para o citoplasma, um perfil imunológico benéfico na medida em que os respectivos peptídeos não eliciarão uma resposta imune em um hospedeiro humano ou bovino exposto aos respectivos peptídeos de acordo com a presente invenção.

10 Lactoferrina humana (hLF) é uma glicoproteína de ligação de ferro de 77 kDa de 692 aminoácidos que constitui 15% da quantidade de proteína contida em leite materno humano e também pode ser encontrada em baixas concentrações em plasma de sangue (Nemet and Simonovits, Haematologia (Budap.) 18, 3-121985). O homólogo bovino (bLF) consiste em 688 aminoácidos e compartilha 68% de identidade de aminoácidos com hLF (Crichton, Adv. Protein Chem. 40, 281-363, 1990). Entretanto, somente 0,5-1,0% de proteína de leite bovino é bLF. Para ambas proteínas propriedades antimicrobiais (Orsi, Biometals 17, 189-196, 2004; Ward and Connely, Biometals 17, 203-208, 2004), anti-fungos, de ligação de LPS (Vogel et al., Biochem. Cell Biol. 80, 49-63, 2002) e antivirais (Berkhout et al., Biometals 17, 291-294, 2004) foram reportadas assim como várias atividades enzimáticas como atividade DNase, RNase, ATPase e fosfatase (Kanyshkova et al., Eur. J. Biochem. 270, 3353-3361, 2003). Proteínas lactoferrina (LF) também atuam como fatores de transcrição (He and Furmanski, Nature 373, 721-724, 1995) e têm um impacto sobre regulação imune através de indução de secreção de interleucinas (Sorimachi et al., Biochem. Mol. Biol. Int. 43, 79-87, 1997; Vogel et al., 2002).

Os peptídeos de acordo com a presente invenção são preferivelmente fragmentos da região terminal-N da lactoferrina humana ou bovina. Ainda características estruturais que tanto individualmente como em qualquer combinação podem ser realizadas pelos peptídeos de acordo com a

presente invenção são mostradas no que se segue.

Preferivelmente, tal fragmento e assim um peptídeo de acordo com a presente invenção contém pelo menos quatro resíduos de aminoácidos catiônicos. Mais preferivelmente, estes fragmentos são catiônicos, isto é, têm uma carga positiva total em valores de pH fisiológico.

Os peptídeos de acordo com a presente invenção podem compartilhar uma combinação de estruturas secundárias tal como uma hélice-alfa e uma folha-beta. Em particular tal hélice e tal folha formam porções individuais dos peptídeos. Mais preferivelmente, os peptídeos compreendem uma estrutura de hélice-volta-folha. O comprimento de tais porções tipicamente varia de 12-20 aminoácidos e 8 a 12 aminoácidos em comprimento para as porções com conformação de hélice-alfa e folha-beta, respectivamente.

Ainda uma característica inerente para modalidades preferidas dos peptídeos de acordo com a presente invenção é a presença de pelo menos dois resíduos Cys. Tais resíduos Cys são separados uns dos outros por um número de aminoácidos intermitentes. Preferivelmente o número de tais aminoácidos intermitentes varia de 8 a 20 aminoácidos, mais preferivelmente 14 a 18 e é mais preferivelmente 16. Ainda em uma modalidade os dois resíduos Cys estão localizados na extremidade terminal-N e na extremidade terminal-C do peptídeo de acordo com a presente invenção. Está dentro da presente invenção que os respectivos resíduos Cys, tanto individualmente como em combinação, estejam localizados nas ou perto das extremidades do peptídeo, isto é, da extremidade terminal-N e terminal-C do peptídeo. Alternativamente, uma ou ambas de tais extremidades Cys não formam a respectiva extremidade do peptídeo, mas o peptídeo compreende ainda aminoácidos à montante do respectivo resíduo Cys em caso da extremidade terminal-N, ou à jusante do respectivo resíduo Cys em caso da extremidade terminal-C. Ainda em uma modalidade mais preferida os dois resíduos Cys formam uma ligação dissulfeto intramolecular, pelo que tal ligação dissulfeto existe preferivelmente sob condições existindo quando aplicando ou usando os peptídeos de acordo com a presente invenção como CPPs.

É conhecido por aqueles versados na técnica como gerar tal ligação dissulfeto com ou durante síntese do respectivo peptídeo. Em uma modalidade alternativa, os dois resíduos Cys formam uma ligação dissulfeto intermolecular.

5 Ainda em uma modalidade, a ligação dissulfeto, se alguma, é substituída com uma porção que estruturalmente e funcionalmente substitui a ligação dissulfeto, entretanto, não é sujeita a clivagem redutora. Tal porção é exemplificada por, mas não limitada a, um grupo meileno (JACS, 1985, 107, 2986-2987, Bioorg. Med. Chem. Letter 1999, 9, 1767-1772, J. Med. Chem., 2002, 45, 1767-1777), uma ponte tioéter (Yu et al., Tetrahedron Lett. 10 1998, 39, 6633-6636), uma ponte carbonila (Pawlak et al., J. Pept. Sci. 2001, 7, 128-140), e uma cadeia alifática maior (Tetrahedron Lett 2001, 42, 5804-5804), pelo que cada uma de ditas porções substitui a ligação dissulfeto. Dependendo do específico protocolo e porção usados para conexão de dois 15 resíduos aminoácidos, a substituição de resíduos cisteína por outros blocos de construção, por exemplo, homoserina, pode ser requerida (Yu et al., Tetrahedron Lett. 1998, 39, 6633-6636) como será conhecido por aqueles versados na técnica. Preferivelmente o comprimento da cadeia alifática mais longa é de cerca de 2 a cerca de 10 átomos de C, pelo que esta faixa com- 20 preende qualquer comprimento inteiro no meio.

O comprimento dos peptídeos de acordo com a presente invenção preferivelmente varia de cerca de 8 resíduos de aminoácidos a cerca de 60 resíduos de aminoácidos. Mais preferivelmente, o comprimento varia de 15 a 45 resíduos de aminoácidos, mais preferível de 18 a 22 resíduos de 25 aminoácidos. Será, entretanto, conhecido por aqueles versados na técnica que o comprimento dos peptídeos não é necessariamente limitado aos mesmos e seus derivados podem ser criados por aqueles versados na técnica usando a orientação técnica aqui provida. Qualquer modificação de tal modo está dentro do escopo da presente invenção que ainda provê peptí- 30 deos que atuam ou podem atuar como CPPs.

Ainda em uma modalidade preferida os peptídeos de acordo com a presente invenção são fragmentos da lactoferrina humana ou bovina.

Preferivelmente, a lactoferrina humana tem o aminoácido de acordo com SEQ ID NO: 1, e a lactoferrina bovina a seqüência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 2. Mais preferivelmente, os peptídeos de acordo com a presente invenção correspondem em sua seqüência de aminoácidos a uma
5 seqüência de aminoácidos compreendida ou definida por posições de aminoácidos 20 a 64 da seqüência de acordo com SEQ ID NO: 1 ou da seqüência de acordo com SEQ ID NO: 2. Entretanto, também está dentro da presente invenção que somente parte dos peptídeos de acordo com a presente invenção esteja localizada dentro da faixa definida acima da seqüência de
10 aminoácidos de lactoferrina humana ou bovina.

Em uma modalidade mais preferida, os peptídeos de acordo com a presente invenção são derivados da lactoferrina humana ou bovina como especificado nos parágrafos anteriores e compartilham uma ou várias, preferivelmente ainda todas características estruturais aqui descritas.

15 Ainda em modalidades os peptídeos de acordo com a presente invenção são derivados de qualquer um dos peptídeos de acordo com a presente invenção aqui descritos e em particular como mostrados nos parágrafos anteriores. Será conhecido por aqueles versados na técnica que a seqüência de aminoácidos dos ditos peptídeos pode ser alterada sem que os
20 ditos peptídeos percam a característica de serem funcionais como CPP. Tais alterações preferíveis são feitas para a seqüência de aminoácidos. Mais preferivelmente tal mudança compreende a substituição de um aminoácido de uma categoria distinta por um outro aminoácido da mesma categoria. Tais categorias são preferivelmente aminoácidos neutros, aminoácidos hidrofóbicos (em particular incluindo aminoácidos alifáticos), aminoácidos catiônicos,
25 aminoácidos aniônicos, aminoácidos contendo tiol, aminoácidos aromáticos e aminoácidos heterocíclicos. Aminoácidos hidrofóbicos (incluindo aminoácidos alifáticos) são preferidos selecionados do grupo consistindo em glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina, aminoácidos aromáticos são preferidos
30 selecionados do grupo consistindo em fenil alanina, tirosina e triptofano, aminoácidos iônicos são preferidos selecionados do grupo de aminoácidos catiônicos como lisina, arginina, histidina, e aminoácidos aniônicos como

aspartato e glutamato, aminoácidos neutros são preferidos selecionados do grupo de serina, treonina, asparaginas, glutamina e metionina, aminoácidos contendo tiol são preferidos cisteína e metionina e aminoácidos heterocíclicos são preferidos prolina e histidina. Especialmente o resíduo metionina em
5 posição 46 pode ser trocado por um resíduo alifático tal como, por exemplo, mas não limitado a, valina, norvalina, leucina ou norvalina. Como peptídeos podem ser obtidos através de protocolos de síntese orgânica, substituições de aminoácidos não são limitadas àquelas de aminoácidos proteínogênicos. Qualquer bloco de construção incluindo, mas não limitado a, aminoácidos
10 não-proteínogênicos e beta aminoácidos, que podem ser incorporados através de apropriados procedimentos químicos podem ser incluídos no peptídeo.

Peptídeos particularmente preferidos de acordo com a presente invenção são aqueles tendo uma seqüência de aminoácidos de acordo com
15 SEQ ID NO: 3 e de acordo com SEQ ID NO: 4, e seus respectivos derivados.

Está dentro da presente invenção que se um peptídeo de acordo com a presente invenção é a lactoferrina humana ou bovina, tal peptídeo, em uma modalidade preferida, também compreende fragmentos da proteína
20 lactoferrina humana ou bovina de inteiro comprimento. Tais fragmentos são preferivelmente fragmentos funcionalmente ativos. Como aqui usado um fragmento funcionalmente ativo da lactoferrina humana ou bovina é ou compreende uma parte da seqüência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 1 ou 2 sob a condição de que tal fragmento ainda exibe uma atividade
25 CPP, preferivelmente uma atividade CPP como aqui definida. Preferivelmente a atividade do dito peptídeo como um CPP, ou atividade CPP, pode ser determinada por conjugação do respectivo peptídeo a um fluorocromo ou hapteno que neste caso serve como um grupo repórter e como uma molécula-carga e permite a detecção e quantificação de tomada celular através de
30 processos conhecidos por aqueles versados na técnica. Tais processos incluem mas não são limitados a (i) citometria de fluxo e microscopia fluorescente para fluoróforos servindo como grupo repórter ou (ii) fixação e perme-

abilização de células seguidas por incubação com um reagente apropriado para a detecção para haptenos servindo como um grupo repórter. Alternativamente, o CPP pode ser marcado radioativamente, por exemplo, através de incorporação de aminoácidos marcados radioativamente e a tomada celular determinada por radiografia. O último processo permite a determinação de tomada e distribuição para os peptídeos sozinhos, sem qualquer carga. É entendido que para o grau que o respectivo processo permita, a tomada e distribuição também podem ser determinados e quantificados para tecidos e organismos inteiros. Alternativamente, a tomada pode ser determinada indiretamente por meio da atividade biológica de uma molécula-carga conjugada ao CPP e com a molécula-carga exercendo sua atividade biológica somente se a molécula penetra a célula e atinge uma particular localização subcelular tal como o citoplasma ou núcleo.

Ainda em modalidades os peptídeos de acordo com a presente invenção ainda compreendem uma porção que é apropriada para detecção. Mais especificamente, tal porção permite a detecção do peptídeo. A porção pode ser qualquer grupo apropriado para tal propósito. Respektivas porções são conhecidas por aqueles versados na técnica e compreendem, entretanto, não são limitadas a, fluoróforos, tais como, por exemplo, carbóxi fluoresceína, ou biotina. Preferivelmente a detecção ocorre por meio de fluorescência. Alternativamente, a detecção também pode ocorrer por meio de radioatividade, por exemplo, após incorporação de 125 Iodo através de protocolos conhecidos por aqueles versados na técnica. Detecção pode ocorrer no nível de uma célula individual, um tecido, um órgão ou um animal. Preferivelmente o animal é um mamífero e mais preferivelmente selecionado do grupo compreendendo um cão, um gato, um carneiro, uma cabra, um rato, um camundongo, uma vaca, um cavalo e um ser humano.

Ainda em um aspecto da presente invenção os peptídeos de acordo com a presente invenção formam um complexo junto com uma molécula-carga. Tal molécula-carga pode ser qualquer molécula-carga como aqui definida. O complexo pode ser um complexo covalente ou não-covalente compreendendo pelo menos um peptídeo de acordo com a presente inven-

ção e pelo menos uma molécula-carga. Também está dentro da presente invenção que o complexo compreenda mais de um peptídeo de acordo com a presente invenção, isto é, uma pluralidade de tais peptídeos, pelo que a pluralidade dos peptídeos pode compreender uma pluralidade dos mesmos ou de diferentes peptídeos. Também, o complexo de acordo com a presente invenção também pode compreender mais de uma molécula-carga, pelo que a pluralidade de moléculas-cargas pode compreender uma pluralidade das mesmas ou diferentes moléculas-cargas.

Em uma modalidade, o complexo entre o peptídeo(s) de acordo com a presente invenção e a molécula(s) carga é formado por ligações covalentes. Tais ligações covalentes são preferivelmente formadas entre apropriado grupo reativo do peptídeo e a carga e mais preferível entre um término do peptídeo de acordo com a presente invenção e a molécula(s) carga. Dependendo da natureza química ou as moléculas-cargas, a porção, grupo ou radical com o qual tal ligação covalente é formada varia e está dentro do conhecimento de uma pessoa da técnica criar uma tal ligação. Em uma modalidade, a ligação covalente pode ser uma ligação amida formada entre o grupo carbóxi do aminoácido terminal-C de um peptídeo de acordo com a presente invenção e o grupo amino alfa do aminoácido terminal-N de um peptídeo constituindo em uma molécula-carga. Alternativamente, o complexo pode ser formado baseado em ligação(ões) não-covalente. Tais ligações não-covalentes podem ser ligações iônicas, ligações de hidrogênio ou interação hidrofóbica ou uma combinação de tais ligações. Em uma modalidade tais ligações não-covalentes podem ser formadas através de um estiramento de resíduos lisina, ligado por ligações covalentes a um peptídeo de acordo com presente invenção e a cadeia principal fosfato de um oligonucleotídeo. Preferivelmente o estiramento de lisina consiste em cerca de 5 a 15 resíduos lisina.

As moléculas-cargas em princípio, não são limitadas com relação a tamanho, natureza química e/ou função. De acordo com o mesmo a molécula-carga pode ser selecionada do grupo compreendendo ácidos nucleicos, peptídeos, moléculas, lipídeos, carboidratos, nano- e micropartículas

e suas combinações. Em uma modalidade preferida, as moléculas-cargas estão dentro de ligações fixadas através de aplicações em biologia celular ou aplicações terapêuticas.

5 Em uma modalidade o ácido nucléico é qualquer polímero consistindo em pelo menos dois nucleotídeos que estão covalentemente ligados. Em uma modalidade um ácido nucléico pode ser uma molécula de DNA ou uma molécula de RNA ou uma mistura das mesmas. Também está dentro da presente invenção que o ácido nucléico consista em L-nucleotídeos, D-nucleotídeos ou misturas. Ainda em uma modalidade, a porção base, a
10 porção açúcar e/ou a porção fosfato do nucleotídeo individual pode ser individualmente e independentemente modificada para cada e qualquer um dos nucleotídeos formando o ácido nucléico ou o respectivo análogo. Porções açúcar modificadas particularmente preferidas são aquelas tendo um grupo metila, metóxi, etila ou etóxi no átomo 2' da porção açúcar. Porções fosfato
15 modificadas particularmente preferidas são fosfotioatos. Em uma outra modalidade preferida, ácidos nucléicos peptídeos são empregados.

Em uma outra modalidade preferida a molécula-carga é um aminoácido originando do grupo de L- ou D-aminoácidos. O aminoácido pode ser qualquer aminoácido, se ocorrendo naturalmente ou não-natural.

20 Em uma outra modalidade preferida a molécula-carga é um peptídeo, consistindo em pelo menos dois aminoácidos que são ligados covalentemente, preferivelmente através de uma ligação peptídica. Em uma modalidade o peptídeo consiste em L-aminoácidos, D-aminoácidos ou uma mistura dos mesmos. Os aminoácidos podem ser quaisquer aminoácidos, se ocorrendo naturalmente ou não-natural. Em uma modalidade preferida o termo
25 peptídeo assim também compreende peptídeos e proteínas como genericamente entendidos na técnica. Os peptídeos ou proteínas podem ser purificados a partir de fontes naturais, obtidos através de síntese orgânica ou obtidos através de conjugação de aminoácidos sintéticos ou peptídeos a peptídeos ou proteínas obtidos de fontes naturais através de protocolos familiares
30 para aqueles versados na técnica e exemplificados mas não limitados a ligação química nativa. Preferivelmente, peptídeos terão um comprimento de 2 a

40 aminoácidos, mais preferivelmente de 2 a 20 aminoácidos e mais preferivelmente de 4 a 15 aminoácidos. Como aqui usado, o termo proteína preferivelmente refere-se a um polipeptídeo contendo uma estrutura secundária e mais preferivelmente estrutura terciária.

5 Em uma outra modalidade preferida, a molécula-carga é uma molécula pequena, pelo que uma molécula pequena é preferivelmente uma molécula tendo um peso molecular de 1000 D ou menos e mais preferivelmente representando um fármaco ou um candidato a fármaco. Uma classe particularmente preferida de moléculas pequenas são moléculas pequenas
10 heterocíclicas.

 Em uma outra modalidade preferida a molécula-carga é um lipídeo ou uma subestrutura de um lipídeo tal como uma sua porção. Preferivelmente, a molécula desta classe exercerá uma particular função uma vez atuando sobre a célula tanto dentro como na membrana de plasma. Um exemplo para o anterior é diacil glicerol. Este exemplo ilustra que um lipídeo exercendo tal particular função é preferivelmente selecionado do grupo compreendendo mensageiros intracelulares. Um exemplo para o último e assim representando uma possível molécula-carga é um lipopeptídeo, preferivelmente um lipopeptídeo com uma porção S-[2,3-bis(palmitoilóxi)-(2RS)-propil]-N-palmitoil-(R)-cisteinil-(S)-seril-tetra-(S)-lisina e mais preferivelmente
15 um peptídeo com uma S-[2,3-bis(palmitoilóxi)-(2RS)-propil]-N-palmitoil-(R)-cisteinil-(S)-seril-tetra-(S)-lisina atuando como um agonista ou antagonista de um receptor semelhante a Toll.
20

 Em uma outra modalidade preferida a molécula-carga é um carboidrato.
25

 Em uma outra modalidade preferida a carga é um agente de contraste usado para formação de imagem de ressonância magnética. Tais agentes de contraste são, por exemplo, mas não limitados a gadolínio (III)-DTPA (ácido dietileno triamina penta acético) ou gadolínio(III)-DOTA (ácido
30 1,4,7,10-tetra aza ciclo dodecano-1,4,7,10-tetraacético).

 Em uma outra modalidade preferida, a molécula-carga é uma partícula. Uma partícula pode ser uma partícula de polímero, consistindo, por

exemplo, em poliestireno reticulado, N-(2-hidróxi propil) metacrilamida reticulada, dextrano reticulado, uma lipossoma, ou uma micela. Preferivelmente, a partícula serve como um veículo ou recipiente para uma molécula funcional. A molécula funcional pode ser qualquer molécula exercendo uma função dentro de células, por exemplo, quimioterapêuticos e oligonucleotídeos e preferivelmente aqueles que também podem servir como moléculas-cargas para os peptídeos de acordo com a presente invenção. Em geral acoplamento da molécula funcional à partícula, respectivamente carga das moléculas funcionais na partícula, é pretendido aperfeiçoar as propriedades farmacocinéticas da molécula funcional, por exemplo, através de prolongamento de sua circulação no organismo enquanto acoplamento do peptídeo(s) de acordo com a presente invenção media a liberação destas moléculas funcionais em células. Em adição ao peptídeo(s) de acordo com a presente invenção, as partículas ainda podem ser modificadas por uma porção ou uma molécula que media um alvejamento das partículas para específicas células. Um exemplo para tal alvejamento são anticorpos direcionados contra proteínas enriquecidas sobre a superfície de células de câncer. Em uma modalidade a partícula pode ter um núcleo ferro-magnético. Tais partículas podem ser usadas em aplicações tais como hipertermia de fluido magnético (Jordan et al., Int J Hyperthermia, 12, 705-722, 1996).

Em uma outra modalidade preferida a molécula cargo é um ponto quantum. Acoplamento do peptídeo(s) de acordo com a presente invenção ao ponto quantum pode ser obtido através de acoplamento covalente, por exemplo, através de formação de ligação amida entre funcionalidades apropriadas sobre o peptídeo e o ponto quantum ou através de interações não-covalentes, por exemplo, entre uma porção biotina e uma molécula de estreptavidina acoplada ao ponto quantum. Em um exemplo um peptídeo de penetração de célula foi ligado covalentemente a um ponto quantum através de alongação do peptídeo de penetração de célula com um resíduo cisteína e acoplamento a pontos quantum funcionalizados com amino usando um ligador hetero bifuncional (S. Santra et al., ChemComm, 2005, 3144-3146).

Ainda em uma modalidade, as moléculas-cargas podem ser de-

finidas em termos funcionais.

Em uma modalidade particular a molécula-carga é uma molécula de siRNA.

Moléculas de siRNA são RNAs interferentes pequenos direcio-
5 nados a um ácido nucléico-alvo, preferivelmente RNAm, codificando a molé-
cula-alvo. siRNA é um RNA de fita dupla tendo tipicamente um comprimento
de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos. A seqüência de uma das duas
fitas de RNA corresponde à seqüência do ácido nucléico-alvo a ser degra-
10 dado. Em outras palavras, conhecendo a seqüência de ácidos nucléicos da
molécula-alvo, preferivelmente a seqüência de RNAm, um RNA de fita dupla
pode ser desenhado com uma das duas fitas sendo complementar ao dito
RNAm da molécula-alvo e, com aplicação do dito siRNA a um sistema con-
tendo o gene, DNA genômico, hnRNA ou RNAm codificando a molécula-
15 alvo, o respectivo correspondente ácido nucléico-alvo será degradado e as-
sim o nível da respectiva proteína será reduzido. Os princípios básicos de
desenho, construção e uso do dito siRNA como medicamento e agente di-
agnóstico, respectivamente, são, entre outros, descritos em pedidos de pa-
tente internacionais WO 00/44895 e WO 01/75164.

Em uma modalidade particular a molécula-carga é uma ribozima.

20 Ribozimas são ácidos nucléicos cataliticamente ativos que con-
sistem preferivelmente em RNA que basicamente compreende duas por-
ções. A primeira porção mostra uma atividade catalítica enquanto a segunda
porção é responsável pela específica interação com o ácido nucléico-alvo.
Com interação entre o ácido nucléico-alvo e a segunda porção da ribozima,
25 tipicamente através de hibridização e emparelhamento de bases de Watson-
Crick de estiramentos essencialmente complementares de bases sobre as
duas fitas hibridizando, a porção cataliticamente ativa pode tornar-se ativa o
que significa que ela catalisa, tanto intramolecularmente como intermolecu-
larmente, o ácido nucléico-alvo no caso de a atividade catalítica da ribozima
30 ser uma atividade fosfodiesterase. Subseqüentemente, ali ainda pode haver
uma degradação do ácido nucléico-alvo que no final resulta na degradação
do ácido nucléico-alvo assim como a proteína derivada do dito ácido nucléi-

co-alvo devido a uma falta de proteína recentemente sintetizada correspondendo ao ácido nucléico-alvo e uma quantidade metabolizada de respectiva proteína existindo anteriormente. Ribozimas, seu uso e princípios de desenho são conhecidas por aqueles versados na técnica, e, por exemplo, descritas em Doherty and Doudna (Ribozym structures and mechanism. Annu ref. Biophys. Biomolstruct. 2001; 30:457-75) e Lewin and Hauswirth (Ribozyme Gene Therapy: Applications for molecular medicine. 2001 7:221-8).

Em uma modalidade particular a molécula cargo é uma molécula anti-sentido.

10 O uso de oligonucleotídeos anti-sentido para a fabricação de um medicamento e como um agente diagnóstico, respectivamente, é baseado em um similar modo de ação como o das moléculas de siRNA e ribozimas. Basicamente, oligonucleotídeos anti-sentido hibridizam baseado em complementaridade de base, com um RNA-alvo, preferivelmente com um RNAm, 15 pelo que ativa RNase H. RNase H é ativada por ambos, DNA acoplado a fósforotioato e fosfodiéster. DNA acoplado a fosfodiéster, entretanto, é rapidamente degradado por nucleases celulares com a exceção de DNA acoplado com fósforotioato. Estes derivados de DNA ocorrendo não-naturalmente, resistentes, não inibem RNase H com hibridização com RNA. 20 Em outras palavras, polinucleotídeos anti-sentido são somente efetivos como complexos híbridos RNA DNA. Exemplos deste tipo de oligonucleotídeos anti-sentido são descritos, entre outros, em patente US 5 849 902 e US 5 989 912. Em outras palavras, baseado na seqüência de ácidos nucléicos da respectiva molécula-alvo, tanto a partir da proteína alvo da qual a respectiva 25 seqüência de ácidos nucléicos pode em princípio ser deduzida, ou através de conhecimento de seqüência de aminoácidos como tal, particularmente RNAm, apropriados oligonucleotídeos anti-sentido podem ser desenhados baseado no princípio de complementaridade de base.

Particularmente preferidos são oligonucleotídeos anti-sentido 30 que têm um estiramento curto de fósforotioato DNA (3 a 9 bases). Um mínimo de 3 bases DNA é requerido para ativação de RNase H bacteriana e um mínimo de 5 bases é requerido para ativação de RNase H mamífera. Nestes

oligonucleotídeos quiméricos há uma região central que forma um substrato para RNase H que é flanqueado através de hibridização de "braços" compreendidos por nucleotídeos modificados que não formam substratos para RNase H. Os braços hibridizantes dos oligonucleotídeos quiméricos podem ser modificados tal como através de 2'-O-metila ou 2'-flúor. Abordagens alternativas usaram ligações metil fosfonato ou fósforoamidato nos ditos braços. Ainda modalidades do oligonucleotídeo anti-sentido útil na prática da presente invenção são P-metóxi oligonucleotídeos, P-metóxi oligodesóxi ribonucleotídeos parciais ou P-metóxi oligonucleotídeos.

10 Em uma particular modalidade a molécula-carga é um aptâmero ou um "spiegelmero".

Aptâmeros são D-ácidos nucléicos que são de fita simples ou fita dupla e que interagem especificamente com uma molécula-alvo. A fabricação ou seleção de aptâmeros é, por exemplo, descrita na patente Européia EP 0 533 838. Basicamente as seguintes etapas são realizadas. Primeiro, uma mistura de ácidos nucléicos, isto é, potenciais aptâmeros, é provida pelo que cada ácido nucléico tipicamente compreende um segmento de vários, preferivelmente pelo menos oito subseqüentes nucleotídeos randomizados. Esta mistura é subseqüentemente contatada com a molécula-alvo pelo que o ácido(s) nucléico(s) se liga à molécula-alvo, tal como baseado em uma aumentada afinidade na direção de alvo ou com uma maior força para o mesmo, comparado à mistura candidata. O ácido(s) nucléico ligante é/são subseqüentemente separado do restante da mistura. Opcionalmente, o ácido(s) nucléico assim obtido é amplificado usando, por exemplo, reação de cadeia polimerase. Estas etapas podem ser repetidas várias vezes rendendo no final uma mistura tendo uma aumentada razão de ácidos nucléicos especificamente ligando ao alvo a partir da qual o ácido nucléico ligante final é então opcionalmente selecionado. Este ácido(s) nucléico ligando especificamente é referido como aptâmero. É óbvio que em qualquer estágio do processo para a geração ou identificação dos aptâmeros amostras da mistura de ácidos nucléicos individuais podem ser tomadas para determinar a sua seqüência usando técnicas-padrão. Está dentro da presente invenção que os aptâ-

meros possam ser estabilizados tal como, por exemplo, através de introdução de definidos grupos químicos que são conhecidos por aqueles versados na técnica de geração de aptâmeros. Tal modificação pode por exemplo residir na introdução de um grupo amino na posição-2' da porção açúcar dos nucleotídeos. Aptâmeros são correntemente usados como agentes terapêuticos. Entretanto, também está dentro da presente invenção que os aptâmeros assim selecionados ou gerados possam ser usados para validação de alvo.

A geração ou fabricação de "spiegelmeros" que podem ser usados ou gerados de acordo com a presente invenção direcionados contra uma molécula-alvo, é baseada em um princípio similar. A fabricação de "spiegelmeros" é descrita no pedido de patente internacional WO 98/08856. "spiegelmeros" são L-ácidos nucléicos, o que significa que eles são compostos por L-nucleotídeos antes que aptâmeros que são compostos por D-nucleotídeos como são aptâmeros. "spiegelmeros" são caracterizados pelo fato de que eles têm uma estabilidade muito alta em sistema biológico e, comparáveis a aptâmeros, interagem especificamente com a molécula-alvo contra a qual eles são direcionados. No propósito de geração de "spiegelmeros", uma população heteróloga de D-ácidos nucléicos é criada e esta população é contatada com o antípoda ótico da molécula-alvo, isto é, com o enantiômero-D do enantiômero-L ocorrendo naturalmente da molécula-alvo., Subseqüentemente, aqueles ácidos D-nucléicos são separados os quais não interagem com o antípoda ótico da molécula-alvo. Entretanto, aqueles ácidos D-nucléicos interagindo com o antípoda ótico da molécula-alvo são separados, opcionalmente determinados e/ou seqüenciados e subseqüentemente os correspondentes ácidos L-nucléicos são sintetizados baseados na informação de ácido nucléico obtida dos ácidos D-nucléicos. Estes ácidos L-nucléicos que são idênticos em termos de seqüência com os ácidos D-nucléicos mencionados anteriormente interagindo com o antípoda ótico da molécula-alvo, especificamente interagirão com a molécula-alvo ocorrendo naturalmente antes que com o seu antípoda ótico. Similar ao processo para a geração de aptâmeros também é possível repetir as várias etapas várias

vezes e assim enriquecer aqueles ácidos nucléicos especificamente interagindo com o antípoda ótico da molécula-alvo.

5 Em uma modalidade particular a molécula-carga é um oligo desoxinucleotídeo de fita dupla atuando como uma molécula-engodo através de ligação específica a fatores de transcrição dentro da célula. Estas moléculas-engodo são ditas serem tomadas eficientemente por células sem a necessidade de específicos veículos. É esperado que a eficiência e liberação citoplásmica ainda possam ser aperfeiçoadas através de conjugação a um CPP de acordo com a presente invenção.

10 Em uma particular modalidade a molécula-carga é um anticorpo.

A fabricação de um anticorpo é conhecida por aqueles versados na técnica e, por exemplo, descrita em Harlow, E., e Lane, D., "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988). Preferivelmente, anticorpos monoclonais podem ser usados em conexão com a presente invenção os quais podem ser fabricados de acordo com o protocolo de Köhler e Milstein e ainda desenvolvimentos baseados no mesmo. Anticorpos como aqui usados, incluem, mas não são limitados a, anticorpos completos, fragmentos de anticorpos ou derivados tais como fragmentos Fab, fragmentos Fc, e anticorpos de fita simples, tanto quanto eles sejam apropriados e capazes de ligação a proteína cinase N beta. À parte de anticorpos monoclonais também anticorpos policlonais podem ser usados e/ou gerados. A geração de anticorpos policlonais também é conhecida por aqueles versados na técnica e, por exemplo, descrita em Harlow, E., and Lane, D., "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1988). Preferivelmente, os anticorpos usados para propósitos terapêuticos são anticorpos humanizados ou humanos como definidos acima.

Os anticorpos que podem ser usados de acordo com a presente invenção podem ter um ou vários marcadores ou etiquetas. Tais marcadores ou etiquetas podem ser úteis para detecção de anticorpo tanto em sua aplicação diagnóstica como sua aplicação terapêutica. Preferivelmente os marcadores e etiquetas são selecionados do grupo compreendendo avidina, s-

treptavidina, biotina, ouro e fluoresceína e usados, por exemplo, em processos ELISA. Estes e outros marcadores assim como processos são, por exemplo, descritos em Harlow, E., e Lane, D., "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988).

5 Também está dentro da presente invenção que o marcador ou etiqueta exiba uma adicional função à parte de detecção, tal como interação com outras moléculas. Tal interação pode ser, por exemplo, interação específica com outros compostos. Estes outros compostos tanto podem ser aqueles inerentes para o sistema onde o anticorpo é usado tal como o corpo humano ou animal ou a amostra que é analisada através de uso de respectivo
10 anticorpo. Apropriados marcadores podem ser, por exemplo, biotina ou fluoresceína com os seus ligantes de interação específica como avidina e streptavidina e semelhantes estando presentes sobre o respectivo composto ou estrutura para interagir com o anticorpo assim marcado ou etiquetado.

15 Em uma modalidade particular a molécula-carga é um peptídeo ligante específico alvo.

Tais peptídeos podem ser gerados através de uso de processos de acordo com o estado da técnica tal como mostra de fago. Basicamente, uma biblioteca de peptídeo é gerada, tal como em forma de fagos, e este
20 tipo de bibliotecas é contactado com a respectiva molécula-alvo. Aqueles peptídeos ligando-se à molécula-alvo são subsequentelemente removidos, preferivelmente como um complexo com a molécula-alvo, a partir da respectiva reação. É conhecido por aqueles versados na técnica que as características ligantes, pelo menos em uma certa extensão, dependem da montagem experimental particularmente realizada tal como a concentração de sal e semelhantes.
25 Após separação daqueles peptídeos se ligando à molécula-alvo com uma maior afinidade ou uma maior força, a partir de membros não-ligantes da biblioteca, e opcionalmente também após remoção da molécula-alvo do complexo de molécula-alvo e peptídeo, o respectivo peptídeo(s) pode ser subsequentelemente caracterizado. Antes da caracterização opcionalmente uma etapa de amplificação é realizada tal como, por exemplo, através
30 de propagação de fagos codificando peptídeo. A caracterização preferível-

mente compreende o seqüenciamento dos peptídeos de ligação alvos. Basicamente, os peptídeos não são limitados em seus comprimentos, entretanto, preferivelmente peptídeos tendo comprimentos de cerca de 8 a 20 aminoácidos são preferivelmente obtidos nos respectivos processos. O tamanho das bibliotecas pode ser de cerca de 10^2 a 10^{18} , preferivelmente 10^8 a 10^{15} peptídeos diferentes, entretanto, não é limitado aos mesmos.

Uma particular forma de alvejar peptídeos ligantes são os assim chamados "anticalines" que são, entre outros, descritos em pedido de patente DE 197 42 706.

10 Ainda em um aspecto a invenção é relacionada a um ácido nucléico codificando um peptídeo de acordo com a presente invenção. Um tal ácido nucléico pode ser facilmente derivado por aqueles versados na técnica baseado na seqüência de aminoácidos do peptídeo e o código genético. Será conhecido que dependendo do organismo hospedeiro a particular seqüência pode ser adaptada à utilização de códon do respectivo organismo hospedeiro. A seqüência de ácidos nucléicos para os peptídeos mais preferidos de acordo com a presente invenção pode ser tomada de SEQ ID NOs: 15 26 e 27.

20 Ainda em um aspecto a invenção é relacionada a um ácido nucléico codificando um peptídeo, pelo que o dito peptídeo consiste em um peptídeo de acordo com a presente invenção e ainda um peptídeo ou proteína, e pelo que a dita proteína é geralmente referida como peptídeos / proteínas de fusão. De acordo com protocolos conhecidos por aqueles versados na técnica este ácido nucléico pode tanto servir para expressão e purificação de proteínas recombinantes, que como uma parte compreende o peptídeo(s) 25 de acordo com a presente invenção, como pode ser usado em combinação com apropriados veículos em estratégias terapêuticas geralmente referidas como terapia de gene. Em uma modalidade preferida o ácido nucléico codificando ainda o peptídeo fundido ao ácido nucléico codificando o peptídeo de 30 acordo com a presente invenção, codifica um peptídeo servindo como um peptídeo para vacinação. Em uma outra modalidade preferida o ácido nucléico codifica um peptídeo, pelo que o peptídeo preferivelmente atua como

um inibidor competitivo de interações moleculares dentro da célula. Em uma outra modalidade preferida o ácido nucléico codifica um peptídeo, pelo que o peptídeo preferivelmente atua como um substrato para uma reação enzimática dentro da célula. Em uma outra modalidade preferida o ácido nucléico codifica um domínio de uma proteína, pelo que o domínio preferivelmente atua como um inibidor competitivo de interações moleculares dentro da célula. Em uma outra modalidade preferida o ácido nucléico codifica uma enzima, pelo que a enzima é preferivelmente do grupo de hidrolases.

Ainda em um aspecto a invenção é relacionada a uma proteína de fusão como aqui definida e mais particularmente a uma proteína de fusão codificada por um ácido nucléico codificando uma proteína de fusão de acordo com a presente invenção.

Ainda em um aspecto a presente invenção é relacionada a uma composição compreendendo tanto um complexo de acordo com a presente invenção, uma composição compreendendo um peptídeo de acordo com a presente invenção, uma composição compreendendo um ácido nucléico codificando um peptídeo de acordo com a presente invenção e uma molécula-carga, uma composição compreendendo uma proteína de fusão de acordo com a presente invenção, uma composição compreendendo um ácido nucléico codificando tal proteína de fusão e uma composição compreendendo lactoferrina humana e uma molécula-carga. Está dentro dos conhecimentos daquele versado na técnica que tais composições de acordo com a presente invenção podem compreender um ou vários dos peptídeos de acordo com a presente invenção, um ou vários dos ácidos nucléicos da presente invenção, e/ou um ou vários das moléculas-cargas. Em conexão com a mesma é preferido que o termo "várias" significa várias diferentes espécies dos respectivos compostos ou moléculas. Será conhecido por aqueles versados na técnica que a composição tipicamente compreende uma multiplicidade das espécies individuais do peptídeo da presente invenção, do ácido nucléico codificando tal peptídeo e/ou da molécula-carga. Em conexão com a mesma é para ser entendido que qualquer uma das moléculas-cargas aqui descritas pode ser usada.

Ainda em um aspecto a presente invenção é relacionada ao uso de qualquer uma das composições ou seus constituintes aqui descritos como agente de transfecção, como um medicamento, como um agente diagnóstico. No caso de a composição ser usada como um medicamento ou como uma composição farmacêutica, preferivelmente a molécula-carga é um agente farmacologicamente ativo. Tais agentes farmacologicamente ativos podem ser quimioterapêuticos tal como, por exemplo, daunorubicina ou peptídeos interferindo com interações moleculares dentro da célula, ou qualquer uma das moléculas aqui descritas como moléculas-carga, pelo que preferivelmente as ditas moléculas-cargas são farmacologicamente ativas ou pré-formas de tais moléculas farmacologicamente ativas. No caso da composição ser usada como um agente diagnóstico, preferivelmente a molécula-carga é um marcador diagnóstico. Tal marcador diagnóstico pode ser um substrato fluorogênico para detectar a atividade de uma protease patologicamente relevante, por exemplo, uma caspase envolvida na iniciação e execução de apoptose, dentro da célula.

Está dentro da presente invenção que os peptídeos de acordo com a presente invenção sejam preferivelmente liberados para um específico tipo de células ou tecido ou órgão compreendendo tal específico tipo de células. Em uma modalidade preferida tal liberação específica é mediada através de uma porção-alvo ou molécula alvejando que são, em sua totalidade, também aqui referidas como a entidade-alvo.

Em uma modalidade mais preferida, tal porção-alvo é tanto parte do peptídeo de acordo com a presente invenção como parte da molécula-carga. Alternativamente ou adicionalmente, tal porção-alvo é parte do complexo ou composição de acordo com a presente invenção.

A entidade-alvo é preferivelmente selecionada do grupo compreendendo peptídeos, proteínas, incluindo anticorpos, fragmentos de anticorpos, anticorpos de cadeia simples, aptâmeros, "spiegelmeros" e receptores de superfície de célula de ligação de ligantes. Será conhecido por aqueles versados na técnica que em princípio uma porção ligante ou molécula de qualquer combinação de ligantes de interação pode ser usada que propor-

cione direcionamento a um alvo, como uma entidade-alvo. Isto inclui o uso de ligantes para receptores que são expressos e mais particularmente superexpressos sobre um tipo distinto de célula ou ligantes ou moléculas que são expressas e mais particularmente superexpressas sobre um tipo de célula distinto. No último caso um seu ligante de interação particularmente proeminente que atua como uma entidade-alvo é selecionado do grupo compreendendo anticorpos, aptâmeros, "spiegelmeros", peptídeos de ligação altamente específica e anticalina. Este tipo de ligantes de interação e sua especificidade para um particular tipo de célula é conhecido por aqueles versados na técnica. Entre outros, a proteína ErbB2 é específica para células de câncer de mama. Da mesma maneira, um anticorpo direcionado contra a mesma é uma entidade-alvo apropriada.

Em uma modalidade preferida, a porção de alvejamento é incluída em ou sobre as partículas aqui descritas que podem ser usadas como moléculas-cargas. Devido ao tamanho de tais partículas, o uso de uma entidade-alvo mais volumosa tal como um anticorpo é preferível em conexão com tal modalidade.

Em uma outra modalidade preferida, o CPP, isto é um peptídeo de acordo com a presente invenção, é acoplado a uma porção que mascara intramolecularmente o CPP e previne o CPP de atuação como um CPP. Uma ligação enzimaticamente clivável é incorporada entre o CPP e a porção de mascaramento. Uma tal abordagem de mascaramento intramolecular foi descrita para o alvejamento de um fluoróforo conjugado à nona arginina CPP. O CPP nonaarginina foi ligado a um estiramento de ácido hexa glutâmico via um ligador peptídeo correspondendo ao sítio de clivagem para metaloproteinases matrizes 2 e 9. Estas proteases são secretadas por células de tumor em altas concentrações. Secreção de proteases cliva seletivamente a construção de máscara de CPP na vizinhança de células de tumor, pelo que permitindo a eficiente tomada da construção CPP-carga nas células de tumor (T. Jiang et al., Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 101, 17867-17872, 2004). De tal modo, esta modalidade representa um efetivo meio de liberação ou alvejamento para específico alvejamento e/ou liberação para tumor.

Composições farmacêuticas da presente invenção podem ser fabricadas através de processos bem-conhecidos na técnica, por exemplo, por meio de convencionais processos de mistura, dissolução, granulação, fabricação de drágea, levigação, emulsificação, encapsulação, arraste ou

5 liofilização.

Composições farmacológicas para uso de acordo com a presente invenção assim podem ser formuladas em maneira convencional usando um ou mais veículos fisiologicamente aceitáveis compreendendo excipientes e auxiliares que facilitam processamento dos compostos ativos em prepara-

10 ções que podem ser usadas farmaceuticamente. Própria formulação é dependente da rota de administração escolhida.

Para injeção, os compostos da invenção podem ser formulados em soluções aquosas, preferivelmente em tampões fisiologicamente compatíveis como solução de Hank, solução de Ringer, ou tampão de solução salina fisiológica. Para administração transmucosa, penetrantes apropriados

15 para a barreira a ser permeada são usados na formulação.

Formulação que promove penetração da epiderme é conhecida em farmacologia, e encontra uso no tratamento de muitas condições de pele, tal como, mas não limitado a, psoríase e infecções de fungos. Formulações

20 que promovem penetração da epiderme e camadas subjacentes de pele também são conhecidas, e podem ser usadas para aplicação de composições da presente invenção a, por exemplo, músculo ou juntas subjacentes. Em algumas modalidades terapêuticas preferidas, formulação compreendendo composições da presente invenção que liberam compostos para alívio

25 de artrite reumatóide ou osteoartrite pode ser administrada através de aplicação de um creme, pomada ou gel à pele se sobrepondo à junta afetada.

Administração parenteral ou oral pode ser usada onde o peptídeo e/ou complexo é feito estável o suficiente para suportar o áspero ambiente proteolítico do intestino. Se assim, a composição de acordo com presente invenção pode ser facilmente formulada através de combinação de

30 compostos ativos com veículos farmaceuticamente aceitáveis bem-conhecidos na técnica. Tais veículos permitem que os compostos da inven-

ção sejam formulados como comprimidos, pílulas, drágeas, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, pastas fluidas, suspensões e similares, para ingestão oral por um paciente a ser tratado. Preparações farmacológicas para uso oral podem ser fabricadas com o uso de um excipiente sólido, opcionalmente

5 trituração de resultante mistura, e processamento de mistura de grânulos, após adição de apropriados auxiliares, se desejado, para obter comprimidos de núcleos de drágeas. Apropriados excipientes são, em particular, materiais de enchimento como açúcares, incluindo lactose, manitol, ou sorbitol; prepara-

10 ções de celulose tais como, por exemplo, amido de milho, amido de trigo, amido de batata, amido de arroz, gelatina, goma tragacanto, metil celulose, hidróxi propil metil celulose, sódio carbóxi metil celulose, e/ou polivinil pirrolidona (PVP). Se desejado, agentes desintegrantes podem ser adicionados, tais como polivinil pirrolidona reticulada, ágar, ou ácido algínico ou um seu sal tal como alginato de sódio.

15 Núcleos de drágeas são providos com apropriados revestimentos. Para este propósito, soluções concentradas de açúcar podem ser usadas, que podem opcionalmente conter goma arábica, talco, polivinil pirrolidona, gel de carbopol, polietileno glicol, e/ou dióxido de titânio, solução de laca, e apropriados solventes orgânicos ou misturas de solventes. Corantes ou

20 pigmentos podem ser adicionados aos comprimidos ou revestimentos de drágeas para identificação ou para caracterização de diferentes combinações de doses de composto ativo.

Composições farmacêuticas que podem ser usadas oralmente incluem cápsulas de empurrar – adaptar fabricadas de gelatina, assim como

25 cápsulas seladas, macias fabricadas de gelatina e um plastificante, tal como glicerol ou sorbitol. As cápsulas de empurrar – adaptar podem conter os ingredientes ativos em mistura com um material de enchimento tal como lactose, ligantes como amidos e/ou lubrificantes como talco ou estearato de magnésio e, opcionalmente, estabilizadores. Em cápsulas macias, os compostos

30 ativos podem ser dissolvidos ou suspensos em apropriados líquidos, tais como óleos graxos, parafina líquida, ou polietileno glicóis líquidos. Em adição, estabilizadores podem ser adicionados. Todas as formulações para

administração oral devem estar em dosagens apropriadas para tal administração.

Para administração bucal, as composições podem ser tomadas na forma de comprimidos ou losangos formulados em maneira convencional.

5 Para os peptídeos pequenos e complexos da invenção, isto pode provar utilidade.

Para administração através de inalação, a composição de acordo com a presente invenção é convenientemente liberada na forma de uma apresentação de spray aerossol a partir de embalagens pressurizadas ou um nebulizador, com o uso de um apropriado propelente, por exemplo, dicloro diflúor metano, tricloro flúor metano, dicloro tetraflúor etano, dióxido de carbono ou outro gás apropriado. No caso de um aerossol pressurizado a dosagem unitária pode ser determinada através de provimento de uma válvula para liberar uma quantidade medida. Cápsulas e cartuchos de, por exemplo, gelatina para uso em um inalador ou insuflador podem ser formula-
10 das contendo uma mistura pulverizada do composto e uma apropriada base pulverizada tal como lactose ou amido.
15

A composição de acordo com a presente invenção pode ser formulada para administração parenteral através de injeção, por exemplo, através de injeção de quantidade relativamente grande ou infusão contínua. Desta maneira também é possível alvejar um particular órgão, tecido, sítio de tumor, sítio de inflamação, etc. Formulações para infecção podem ser apresentadas em forma de dosagem unitária, por exemplo, em ampolas, ou em recipiente multi-doses, com um preservativo adicionado. As composições
20 podem tomar formas tais como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos, e podem conter agentes de formulação como agentes de suspensão, estabilização e/ou dispersão.
25

Composições farmacêuticas para administração parenteral incluem soluções aquosas das composições em forma solúvel em água. Adicionalmente, suspensões das composições podem ser preparadas como
30 apropriadas suspensões de injeção oleosas. Apropriados solventes ou veículos lipofílicos incluem óleos graxos como óleo de sésamo, ou ésteres de

ácido graxo sintético, como oleato de etila ou triglicerídeos, ou lipossomas. Suspensões de injeção aquosas podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, tais como sódio carbóxi metil celulose, sorbitol, ou dextrano. Opcionalmente, a suspensão também pode conter apropriados estabilizadores ou agentes que aumentam a solubilidade das composições para permitir a preparação de soluções altamente concentradas.

Alternativamente, um ou mais componentes da composição podem estar em forma pulverizada para constituição com um apropriado veículo, por exemplo, água livre de pirogênio estéril, antes de uso.

As composições também podem ser formuladas em composições retais tais como supositórios ou enemas de retenção, por exemplo, contendo convencionais bases de supositório tais como manteiga de cacau ou outros glicerídeos.

Em adição às formulações descritas anteriormente, a composição de acordo com a presente invenção também pode ser formulada como uma preparação depósito. Tais formulações de longa atuação podem ser administradas por implantação (por exemplo subcutaneamente ou intramuscularmente) ou através de injeção intramuscular. Assim, por exemplo, as composições podem ser formuladas com apropriados materiais poliméricos ou hidrofóbicos (por exemplo, como uma emulsão em um óleo aceitável), ou como parte de um implante sólido ou semi-sólido que pode ou não ser auto-degradante no corpo, ou resinas de troca de íons, ou um ou mais componentes da composição podem ser formulados como derivados moderadamente solúveis, por exemplo, como um sal moderadamente solúvel.

As composições farmacêuticas também podem compreender apropriados veículos ou excipientes de fase sólida ou gel. Exemplos de tais veículos ou excipientes incluem mas não são limitados a carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, vários açúcares, amidos, derivados de celulose, gelatina, e polímeros tais como polietileno glicóis.

Composições farmacêuticas apropriadas para uso na presente invenção incluem composições onde os ingredientes ativos estão contidos em uma quantidade efetiva para obtenção de seu propósito pretendido. Mais

especificamente, uma quantidade terapeuticamente efetiva significa uma quantidade de composto efetiva para prevenir, aliviar, ou melhorar sintomas de doença ou prolongar a sobrevivência do sujeito sendo tratado.

5 Determinação de uma quantidade terapeuticamente efetiva está dentro da capacidade daqueles versados na técnica, especialmente à luz da detalhada exposição aqui provida.

Para qualquer composto usado nos processos da invenção, a quantidade ou dose terapeuticamente efetiva pode ser inicialmente estimada a partir de ensaios de cultura de células. Por exemplo, uma dose pode ser
10 formulada em modelos animais para obter uma faixa de concentração circulante que inclui a IC_{50} como determinada em cultura de células (onde moléculas inibidoras estão relacionadas). Tal informação pode ser usada para determinar mais precisamente doses úteis em humanos.

Toxidez e eficácia terapêutica de uma composição da presente
15 invenção podem ser determinadas através de procedimentos farmacêuticos-padrão em culturas de células ou animais experimentais, por exemplo, para determinação de LD_{50} (a dose letal para 50% da população) e a ED_{50} (a dose terapeuticamente efetiva em 50% da população). A razão de dose entre efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico e pode ser expresso co-
20 mo a razão entre LD_{50} e ED_{50} . Compostos que exibem altos índices terapêuticos são preferidos. Os dados obtidos destes ensaios de cultura de células e estudos animais podem ser usados em formulação de uma faixa de dosagem para uso em seres humanos. A dosagem pode variar dentro desta faixa dependendo da forma de dosagem empregada e a rota de administração
25 utilizada. A exata formulação, rota de administração e dosagem podem ser escolhidas pelo médico individual em vista da condição do paciente. (Vide, por exemplo, Fingl, et al., 1975, em "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1p. 1).

A quantidade de composição administrada é claro, será dependente do sujeito sendo tratado, do peso de sujeito, a severidade da doença. A maneira de administração e o julgamento do médico prescrevendo.

Uma composição farmacêutica que compreende um peptídeo de

uma composição de acordo com a presente invenção pode ser suprido de modo que o peptídeo e uma ou mais das moléculas-cargas estejam no mesmo recipiente, em solução, em suspensão, ou em forma pulverizada. O peptídeo de acordo com a presente invenção também pode ser provido se-

5 paradamente de uma ou mais moléculas-cargas, e pode ser misturado com uma ou mais das moléculas-cargas antes de administração. Várias opções de embalagens são possíveis e conhecidas por aqueles versados na técnica, dependendo, entre outros, da rota e mecanismo de administração. Por exemplo, onde o peptídeo de acordo com a presente invenção é suprido se-

10 paradamente de uma ou mais das moléculas-cargas, as composições podem, se desejado, ser apresentadas em uma embalagem tendo mais de uma câmara, e onde uma barreira pode ser rompida, rasgada, ou fundida para prover mistura do peptídeo de acordo com a presente invenção com a molécula-carga. Alternativamente, dois elementos providos separadamente

15 podem ser misturados em um recipiente separado, opcionalmente com a adição de um ou mais veículos, soluções, etc. Uma ou mais formas de dosagem unitária contendo a molécula-carga podem ser providas em uma embalagem. A embalagem ou dispositivo dispensador pode ser acompanhado por instruções para administração. Composições compreendendo um com-

20 posto da invenção formulado em um veículo farmacêutico compatível também podem ser preparadas, colocadas em um apropriado recipiente, e marcadas para tratamento de uma indicada condição. Apropriadas condições indicadas na marcação podem incluir qualquer doença que possa ser tratada ou prevenida ou diagnosticada usando as composições de acordo com a

25 presente invenção. Em particular, a invenção é idealmente apropriada para terapia de gene.

Ainda em um aspecto a presente invenção é relacionada a um processo para o tratamento ou prevenção de um paciente compreendendo a administração de uma composição de acordo com a presente invenção.

30 Ainda em um aspecto a presente invenção é relacionada a um processo para diagnóstico de um paciente compreendendo a administração ou uso de uma composição de acordo com a presente invenção.

Está dentro da presente invenção que o ácido nucléico codificando um peptídeo de acordo com a presente invenção pode ser usado como uma vacina ou parte de uma vacina. Preferivelmente, a vacina compreende um ácido nucléico, mais preferivelmente um RNA, codificando um antígeno que é apropriado para elicitar uma resposta imune em um organismo hospedeiro, pelo que o ácido nucléico codificando um peptídeo de acordo com a presente invenção e o ácido nucléico codificando tal antígeno são administrados ao dito organismo hospedeiro. Tal administração pode ser feita separadamente ou em uma maneira combinada. Ainda em uma modalidade, o respectivo ácido nucléico pode estar contido ou compreendido em um vetor, mais preferivelmente um vetor de expressão que permite a expressão do ácido(s) nucléico no dito organismo hospedeiro. Ainda elementos de tal vetor e em particular de tal vetor de expressão são conhecidos por aqueles versados na técnica e compreendem, entre outros um ou vários dos seguintes elementos: um promotor, um aperfeiçoador, e um terminador. O antígeno é preferivelmente um antígeno que está relacionado à doença que é para ser tratada ou prevenida pela vacina de acordo com a presente invenção. Em adição, a vacina também pode conter constituintes exercendo um assim chamado efeito adjuvante e aqueles atuando como iniciadores de respostas de célula auxiliar T.

Ainda em uma modalidade, a presente invenção é relacionada a um kit para transfecção, para o tratamento e/ou prevenção de uma doença compreendendo uma composição de acordo com a presente invenção e, opcionalmente um ou vários elementos selecionados do grupo compreendendo:

A presente invenção será agora ainda ilustrada através de referência às seguintes figuras e exemplos a partir dos quais ainda características, modalidades e vantagens podem ser tomadas. Em particular,

Figura 1 - mostra um diagrama mostrando a tomada dependente de concentração de vários CPPs marcados com carbóxi fluoresceína em seus termini-N, expressa como extensão de fluorescência associada com célula; hLF-peptídeo refere-se a um peptídeo consistindo em aminoácidos

38 a 59 de acordo com SEQ ID NO: 1, bLF-peptídeo refere-se a um peptídeo consistindo em aminoácidos 33 a 50 de acordo com SEQ ID NO: 2; fluorescência associada com célula foi determinada por citometria de fluxo;

5 Figura 2 - mostra uma série de micro-fotografias obtidas por microscopia de exploração laser confocal indicando a dependência de concentração da distribuição intracelular do peptídeo derivado de lactoferrina humana e o peptídeo derivado de lactoferrina bovina (vide Figura 1) em várias concentrações;

10 Figura 3A - é um diagrama mostrando o impacto de vários inibidores de endocitose sobre a tomada de um hLF-peptídeo marcado com fluoresceína (seqüência de peptídeo de acordo com a Figura 1) com a concentração de fluoresceína-hLF sendo 5 μ M (EIPA, 5-(N-etil-N-isopropil) amilorida; M β CD, metil- β -ciclo dextrina; CPZ, (Clorpromazina); a tomada foi determinada por citometria de fluxo. Barras de erro representam o desvio médio de triplicatas;

15 Figura 3B - é um diagrama mostrando o impacto de vários inibidores de endocitose sobre a tomada de um hLF-peptídeo marcado com fluoresceína (seqüência de peptídeos de acordo com a Figura 1) com a concentração de hLF sendo 20 μ M;

20 Figura 4 - mostra quadros obtidos por microscopia de exploração laser confocal indicando as influências de inibidores de endocitose sobre a tomada de hLF-peptídeo marcado com fluoresceína em uma concentração de peptídeo de 2 ou 20 μ M em células HeLa;

25 Figura 5 - é um diagrama mostrando a extensão da tomada da hLF-peptídeo marcada com fluoresceína correspondendo a aminoácidos 38 a 59 de acordo com SEQ ID NO: 1 compara a suas formas truncadas ilustrando a relação estrutura - atividade correspondendo a aminoácidos 40 a 55 de acordo com SEQ ID NO: 1 (LF1-peptídeo) e aminoácidos 40 a 50 de acordo com SEQ ID NO: 1 (LF2-peptídeo); e

30 Figura 6 - é um diagrama mostrando a citotoxidez do peptídeo hLF expresso como viabilidade de célula em porcentagem em várias concentrações do peptídeo hLF marcado com fluoresceína para células HeLa

incubadas para diferentes tempos de incubação; para cada par de colunas, a primeira coluna refere-se a células incubadas com peptídeo por 6 horas e a segunda coluna a células incubadas com peptídeo por 0,5 hora.

Exemplo 1. Procedimentos Experimentais

5 Células e Reagentes.

A linha de células de carcinoma cervical humano HeLa foi obtida do American Type Culture Collection (Manassas, VA). Células HeLa foram mantidas em meio RPMI 1640 com glutamina estabilizada e 2,0 g/L de NaHCO₃ (PAN Biotech, Aidenbach, Germany) suplementado com soro fetal de bezerro 10% (PAN Biotech). Clorpromazina foi de Calbiochem (Bad So-
10 den, Germany). 5-(N-etil-N-isopropil) amilorida (EIPA), metil-β-ciclo dextrina (MβCD) e MTT brometo de [3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium] foram obtidos de Sigma (Deisenhofen, Germany).

Síntese de peptídeo.

15 Peptídeos foram adquiridos de EMC microcollections (Tübingen, Germany). A pureza de todos os peptídeos foi determinada através de HPLC analítica. A identidade dos peptídeos foi confirmada por espectrometria de massa MALDI-TOF. Peptídeos com uma pureza de menos que 85% foram purificados por HPLC preparativa. Pureza de todos os peptídeos usados foi
20 >95% (HPLC 214 nm). Os peptídeos foram marcados terminalmente-N com carbóxi fluoresceína como descrito (Fischer et al., Bioconjugate Chem. 14, 653-660, 2003).

Soluções Estoques de Peptídeo.

Peptídeos foram dissolvidos em DMSO para concentrações de
25 10 mM. Estas soluções estoques foram ainda diluídas em PBS ou meio. Concentrações de peptídeos de soluções estoques de DMSO foram determinadas baseado na absorção de carbóxi fluoresceína através de espectroscopia UV/VIS de uma diluição 1:100 em tampão Tris/HCl 0,1 M (pH 8,8) com absorções medidas em 492 nm e assumindo um coeficiente de extinção
30 molar de carbóxi fluoresceína de 75 000 L/(mol.cm).

Citometria de Fluxo.

Para determinar a eficiência de carga de peptídeo, células HeLa

foram semeadas em uma densidade de 50 000 por cavidade em placas de 24 cavidades (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) em RPMI 1640 contendo soro. Um dia depois, as células foram lavadas com meio e incubadas em 300 μ L de RPMI 1640, contendo peptídeos nas apropriadas concentrações por 5 30 minutos. Cada condição foi testada em triplicata. Após incubação, células foram lavadas com meio, destacadas por tripsinização por 5 minutos, suspensas em PBS resfriado com gelo contendo 0,1% (peso / volume) BSA, e medidas imediatamente através de citometria de fluxo (BD FACS Calibur System, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Em cada caso, a fluorescência de 7000 células vitais foi adquirida. Células vitais foram reunidas baseado em dispersão para o lado e para frente.

Exemplo 2. Eficiência de tomada de peptídeos derivados de lactoferrina humana e bovina

Os peptídeos derivados de lactoferrina humana e bovina foram sintetizados por síntese de peptídeo de fase sólida. Para detectar tomada e a distribuição subcelular em células vivas, ambos peptídeos foram marcados com carbóxi fluoresceína no término-N. De modo a determinar se os peptídeos derivados de lactoferrina possuíam atividade como peptídeos de penetração de célula, a fluorescência associada com célula em células HeLa incubadas com bLF-peptídeo ou hLF-peptídeo foi determinada através de citometria de fluxo. Antp e o Tat-peptídeo foram selecionados como CPPs bem-estabelecidos para comparação.

Para todos os quatro peptídeos, a fluorescência celular, medida por citometria de fluxo, aumentou com concentração de peptídeo como mostrado na Figura 1.

Exemplo 3. Relação de estrutura – atividade

Com 22 aminoácidos, hLF-peptídeo é um CPP de comprimento intermediário. Nonaarginina tem somente nove aminoácidos, o popular CPP transportano 27. Quatro dos sete aminoácidos catiônicos, e os aminoácidos aromáticos estão localizados na seqüência aninhada dentro de resíduos cisteína. Na proteína de inteiro comprimento, este resíduo de cisteína forma uma ponte dissulfeto que restringe o domínio em uma conformação de loop.

Em adição, a tomada celular de peptídeos truncados (LF1 e LF2, tabela 1) carecendo de resíduos cisteína terminais foi testada e comparada àqueles contendo os resíduos cisteína.

Tabela 1. Estruturas primárias dos peptídeos usados neste estudo.

- 5 Todos os peptídeos foram sintetizados como peptídeo amidas. Fluo representa 5(6)-carbóxi fluoresceína, CONH₂ o término-C amidado do peptídeo.

Entrada	Peptídeo	Seqüência
1	Peptídeo Tat	Fluo-YGRKKRRQRRR-CONH ₂
2	Peptídeo Antp	Fluo-RQIKIWFQNRRMKWKK-CONH ₂
10 3	Peptídeo hLF	Fluo-KCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKR-CONH ₂
4	Peptídeo bLF	Fluo-PEWFKCRRWQWRMICKLGA-CONH ₂
5	Peptídeo LF1	Fluo-FQWQRNMRKVRGPPVS-CONH ₂
6	Peptídeo LF2	Fluo-FQWQRNMRKVR-CONH ₂

Os resultados são mostrados na Figura 5.

- 15 Tomada de ambos peptídeos carecendo de cisteínas foi somente cerca de um décimo da tomada do hLF-peptídeo contendo os dois resíduos de cisteína.

Exemplo 4: Citotoxicidez de hLF-peptídeo

- 20 Nos experimentos descritos acima, usando uma faixa de concentração do hLF-peptídeo de até 40 µM, nenhum efeito citotóxico pode ser observado. Entretanto, para microscopia de célula viva de tomada de peptídeo principalmente antes que curtos tempos de incubação de menos que uma hora foram empregados. Por isso também foi testado se para tempos de incubação mais longos e maiores concentrações, o peptídeo afetou viabilidade de célula.
- 25 Células HeLa foram incubadas com o hLF-peptídeo em concentrações variando de 1,25 µM a até 160 µM por 6 ou 0,5 hora. A seguir viabilidade de célula foi determinada usando um teste MTT. Seus resultados são mostrados na Figura 6.

- 30 Quando células foram incubadas com peptídeo por somente 30 minutos, nenhuma citotoxicidez foi observada para concentrações de até 40 µM. Após 6 horas, a viabilidade de célula foi levemente reduzida para concentrações de peptídeos maiores que 5 µM. Em concentrações maiores que

40 μM todas as células foram mortas.

As características da presente invenção mostradas no relatório descritivo, a listagem de seqüências, as reivindicações e/ou os desenhos podem ambas, separadamente e em qualquer sua combinação serem material para modalidade da invenção em suas várias formas.

5

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Eberhard Karl Universität Tübingen

 <120> PEPTÍDEOS ÚTEIS COMO PEPTÍDEOS DE PENETRAÇÃO DE CÉLULA
 5 <130> 205ut01.wo

 <150> EP 05028755.6

 <151> 2005-12-30
 10 -----
 <160> 30

 <170> PatentIn versão 3.1

 15 <210> 1

 <211> 711

 <212> PRT
 20
 <213> Homo sapiens

 <220>

 25 <221> PEPTÍDEO

 <222> (1)..(711)

 <223> lactoferrina humana
 30 <220>

 <221> SIGNAL

<222> (1)..(19)

<223>

5 <400> 1

Met Lys Leu Val Phe Leu Val Leu Leu Phe Leu Gly Ala Leu Gly Leu
 1 5 10 15

Cys Leu Ala Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala Val Ser
 20 25 30

10 Gln Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys
 35 40 45

Val Arg Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro Ile Gln
 50 55 60

Cys Ile Gln Ala Ile Ala Glu Asn Arg Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp
 15 65 70 75 80

Gly Gly Phe Ile Tyr Glu Ala Gly Leu Ala Pro Tyr Lys Leu Arg Pro
 85 90 95

Val Ala Ala Glu Val Tyr Gly Thr Glu Arg Gln Pro Arg Thr His Tyr
 100 105 110

20 Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Gly Gly Ser Phe Gln Leu Asn Glu
 115 120 125

Leu Gln Gly Leu Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Arg Arg Thr Ala Gly
 130 135 140

Trp Asn Val Pro Ile Gly Thr Leu Arg Pro Phe Leu Asn Trp Thr Gly
 145 150 155 160

25 Pro Pro Glu Pro Ile Glu Ala Ala Val Ala Arg Phe Phe Ser Ala Ser
 165 170 175

Cys Val Pro Gly Ala Asp Lys Gly Gln Phe Pro Asn Leu Cys Arg Leu
 180 185 190

30 Cys Ala Gly Thr Gly Glu Asn Lys Cys Ala Phe Ser Ser Gln Glu Pro
 195 200 205

Tyr Phe Ser Tyr Ser Gly Ala Phe Lys Cys Leu Arg Asp Gly Ala Gly

<210> 2
 <211> 708
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10 <220>
 <221> PEPTÍDEO
 <222> (1)..(108)
 15 <223> lactoferrina bovina
 <220>
 20 <221> SIGNAL
 <222> (1)..(19)
 <223>
 25 <400> 2
 Met Lys Leu Phe Val Pro Ala Leu Leu Ser Leu Gly Ala Leu Gly Leu
 1 5 10 15
 Cys Leu Ala Ala Pro Arg Lys Asn Val Arg Trp Cys Thr Ile Ser Gln
 20 25 30
 30 Pro Glu Trp Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu
 35 40 45
 Gly Ala Pro Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg Ala Phe Ala Leu Glu Cys

<223> Sintética
 <400> 3
 Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro
 5 1 5 10 15
 Val Ser Cys Ile Lys Arg
 20
 <210> 4
 10 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <223> Sintética
 <400> 4
 Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val
 1 5 10 15
 Ser Cys
 25 <210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Sequência Artificial

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <223> Sintética

<400> 5

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser

1 5 10 15

<210> 6

10

<211> 13

<212> PRT

15 <213> Sequência Artificial

<220>

<221> MISC_FEATURE

20

<223> Sintética

<400> 6

Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg

1 5 10

25 <210> 7

<211> 22

<212> PRT

30

<213> Artificial

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <223> Sintética

<400> 7

Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Val Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro

1 5 10 15

Val Ser Cys Ile Lys Arg

10 20

<210> 8

<211> 22

15 <212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

20 <221> MISC_FEATURE

<223> Sintética

<400> 8

Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Ile Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro

25 1 5 10 15

Val Ser Cys Ile Lys Arg

20

<210> 9

30 <211> 22

<212> PRT

<213> Sequência Artificial
 <220>

5 <221> MISC_FEATURE

 <223> Sintética
 <220>

10 <221> MISC_FEATURE

 <222> (9)..(9)

 <223> norvalina

15 <400> 9
 Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Xaa Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro
 1 5 10 15
 Val Ser Cys Ile Lys Arg
 20

20 <210> 10

 <211> 22

 <212> PRT

25

 <213> Sequência Artificial

 <220>

30 <221> MISC_FEATURE

 <223> Sintética

<400> 10
 Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Leu Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro
 1 5 10 15
 Val Ser Cys Ile Lys Arg
 5 20
 <210> 11
 <211> 18
 10 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 15 <221> MISC_FEATURE
 <223> Sintética
 <400> 11
 20 Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Val Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val
 1 5 10 15
 Ser Cys
 <210> 12
 25 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 30 <220>

<221> MISC_FEATURE

 <223> Sintética
 <400> 12
5 Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Ile Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val
 1 5 10 15
 Ser Cys
 <210> 13

10 <211> 18

 <212> PRT

 <213> Sequência Artificial

15 <220>

 <221> MISC_FEATURE

20 <223> Sintética
 <220>

 <221> MISC_FEATURE

25 <222> (8)..(8)

 <223> norvalina
 <400> 13
 Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Xaa Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val
30 1 5 10 15
 Ser Cys
 <210> 14

<211> 18

 <212> PRT
 5
 <213> Sequência Artificial
 <220>

 <221> MISC_FEATURE
 10
 <223> Sintética
 <400> 14
 Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Leu Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val
 1 5 10 15
 15 Ser Cys
 <210> 15

 <211> 18
 20 <212> PRT

 <213> Sequência Artificial

 <220>
 25
 <221> MISC_FEATURE

 <223> Sintética
 <220>
 30
 <221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> norleucina

<400> 15

5 Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Xaa Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val
 1 5 10 15
 Ser Cys

<210> 16

10 <211> 16

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

15 <220>

<221> MISC_FEATURE

20 <223> Sintética

<400> 16

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Val Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser
 1 5 10 15

<210> 17

25 <211> 16

<212> PRT

30 <213> Sequência Artificial

<220>

<221> MISC_FEATURE

 <223> Sintética
 5 <400> 17
 Phe Gln Trp Gln Arg Asn Ile Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser
 1 5 10 15
 <210> 18

 10 <211> 16
 <212> PRT

 <213> Sequência Artificial
 15
 <220>

 <221> MISC_FEATURE

 20 <223> Sintética
 <220>

 <221> MISC_FEATURE

 25 <222> (7)..(7)

 <223> norvalina
 <400> 18
 Phe Gln Trp Gln Arg Asn Xaa Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser
 30 1 5 10 15
 <210> 19

<211> 16
 <212> PRT
 5 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <223> Sintética
 <400> 19
 Phe Gln Trp Gln Arg Asn Leu Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser
 1 5 10 15
 15 <210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 20 <213> Sequência Artificial
 <220>
 25 <221> MISC_FEATURE
 <223> Sintética
 <220>
 30 <221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> norleucina

<400> 20

5 Phe Gln Trp Gln Arg Asn Xaa Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser
 1 5 10 15

<210> 21

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Seqüência Artificial

15 <220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Sintética

20 <400> 21
 Phe Gln Trp Gln Arg Asn Val Arg Lys Val Arg
 1 5 10

<210> 22

25 <211> 11

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

30 <220>

<221> MISC_FEATURE

 <223> Sintética
 <400> 22
5 Phe Gln Trp Gln Arg Asn Ile Arg Lys Val Arg
 1 5 10
 <210> 23

 <211> 11
10 <212> PRT

 <213> Sequência Artificial

15 <220>

 <221> MISC_FEATURE

 <223> Sintética
20 <220>

 <221> MISC_FEATURE

 <222> (7)..(7)
25
 <223> norvalina
 <400> 23
 Phe Gln Trp Gln Arg Asn Xaa Arg Lys Val Arg
 1 5 10
30 <210> 24

 <211> 11

<212> PRT

 <213> Sequência Artificial
 5
 <220>

 <221> MISC_FEATURE

 10 <223> Sintética
 <400> 24
 Phe Gln Trp Gln Arg Asn Leu Arg Lys Val Arg
 1 5 10

 <210> 25
 15
 <211> 11

 <212> PRT
 20
 <213> Sequência Artificial

 <220>

 25 <221> MISC_FEATURE

 <223> Sintética
 <220>

 30 <221> MISC_FEATURE

 <222> (7)..(7)

<223> norleucina
 <400> 25
 Phe Gln Trp Gln Arg Asn Xaa Arg Lys Val Arg
 5 1 5 10
 <210> 26
 <211> 66
 10 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <223> Sintética
 <400> 26
 20 aaatgcttcc aatggcaaag gaatatgaga aaagtgcgtg gccctcctgt cagctgcata 60
 aagaga 66
 <210> 27
 <211> 2136
 25 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 30 <220>
 <221> misc_feature

<223> lactoferrina humana
 <400> 27

	atgaaacttg	tcttctcgt	ctgctgttc	ctcggggccc	tggactgtg	tctggctggc	60
5	cgtaggagaa	ggagtgttca	gtggtgcgcc	gtatcccaac	ccgaggccac	aaaatgcttc	120
	caatggcaaa	ggaatatgag	aaaagtgcgt	ggcctcctg	tcagctgcat	aaagagagac	180
	tccccatcc	agtgtatcca	ggccattgcg	gaaaacaggg	ccgatgctgt	gacccttgat	240
	ggtggtttca	tatacgaggc	aggcctggcc	ccctacaaac	tgcgacctgt	agcggcggaa	300
	gtctacggga	ccgaaagaca	gccacgaact	cactattatg	ccgtggctgt	ggtgaagaag	360
10	ggcggcagct	ttcagctgaa	cgaactgcaa	ggtctgaagt	cctgccacac	aggccttcgc	420
	aggaccgctg	gatggaatgt	ccctacaggg	acacttcgtc	cattcttgaa	ttggacgggt	480
	ccacctgagc	ccattgaggc	agctgtggcc	aggttcttct	cagccagctg	tgttcccggc	540
	gcagataaaag	gacagttccc	caacctgtgt	cgctgtgtg	cggggacagg	ggaaaacaaa	600
	tgtgccttct	cctcccagga	accgtacttc	agctactctg	gtgccttcaa	gtgtctgaga	660
15	gacggggctg	gagacgtggc	ttttatcaga	gagagcacag	tgtttgagga	cctgtcagac	720
	gaggctgaaa	gggacgagta	tgagttactc	tgcccagaca	acactcggaa	gccagtggac	780
	aagttcaaag	actgccatct	ggcccgggtc	ccttctcatg	ccgttggtggc	acgaagtgtg	840
	aatggcaagg	aggatgccat	ctggaatctt	ctccgccagg	cacaggaaaa	gtttggaaag	900
	gacaagtcaac	cgaaattcca	gctctttggc	tcccctagtg	ggcagaaaaga	tctgctgttc	960
20	aaggactctg	ccattggggt	ttcgagggtg	ccccgagga	tagattctgg	gctgtacctt	1020
	ggctccggct	acttcaactg	catccagaac	ttgaggaaaa	gtgaggagga	agtggctgcc	1080
	cggcgtgctg	gggtcgtgtg	gtgtgcggtg	ggcgagcagg	agctgcgcaa	gtgtaaccag	1140
	tggagtggct	tgagcgaagg	cagcgtgacc	tgctcctcgg	cctccaccac	agaggactgc	1200
	atcgccctgg	tgctgaaagg	agaagctgat	gccatgagtt	tggatggagg	atatgtgtac	1260
25	actgcatgca	aatgtgggtt	ggtgcctgtc	ctggcagaga	actacaaatc	ccaacaaagc	1320
	agtgaccctg	atcctaactg	tgtggataga	cctgtggaag	gatatcttgc	tgtggcgggtg	1380
	gttaggagat	cagacactag	ccttacctgg	aactctgtga	aaggcaagaa	gtcctgccac	1440
	accgccgtgg	acaggactgc	aggctggaat	atccccatgg	gcctgctctt	caaccagacg	1500
	ggctcctgca	aatttgatga	atatttcagt	caaagctgtg	cccctgggtc	tgacccgaga	1560
30	tctaactctct	gtgctctgtg	tattggcgac	gagcaggggtg	agaataagtg	cgtgcccaac	1620
	agcaacgaga	gatactacgg	ctacactggg	gctttccggt	gcctggctga	gaatgctgga	1680
	gacgttgcac	ttgtgaaaga	tgtaactgtc	ttgcagaaca	ctgatggaaa	taacaatgag	1740

gcatgggcta aggatttgaa gctggcagac tttgcgctgc tgtgcctcga tggcaaacgg 1800
 aagcctgtga ctgaggctag aagctgccat cttgccatgg ccccgaatca tgccgtggtg 1860
 tctcggatgg ataaggtgga acgcctgaaa caggtgctgc tccaccaaca ggctaaattt 1920
 gggagaaatg gatctgactg cccggacaag ttttgcttat tccagtctga aacaaaaaac 1980
 5 cttctgttca atgacaacac tgagtgtctg gccagactcc atggcaaac aacatatgaa 2040
 aaatatttgg gaccacagta tgtcgcaggc attactaatc tgaaaaagtg ctcaacctcc 2100
 ccctcctgg aagcctgtga attcctcagg aagtaa 2136
 <210> 28
 10 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <223> Sintética
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 25 <222> (9)..(9)
 <223> norleucina
 <400> 28
 Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Xaa Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro
 30 1 5 10 15
 Val Ser Cys Ile Lys Arg
 20

<210> 29
 <211> 22
 5 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 10 <221> MISC_FEATURE
 <223> Sintética
 <400> 29
 15 Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro Ser
 1 5 10 15
 Ile Thr Cys Val Arg Arg
 20 20
 <210> 30
 <211> 18
 <212> PRT
 25 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 30 <223> Sintética
 <400> 30

Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro Ser Ile

1

5

10

15

Thr Cys

REIVINDICAÇÕES

1. Peptídeo tendo uma seqüência de aminoácidos compreendendo pelo menos 8 aminoácidos consecutivos da proteína lactoferrina humana ou da proteína lactoferrina bovina, pelo que o peptídeo é apropriado para atuar como um peptídeo de penetração de célula.
5
2. Peptídeo de acordo com a reivindicação 1, pelo que o peptídeo compreende pelo menos quatro aminoácidos catiônicos.
3. Peptídeo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, pelo que a proteína lactoferrina humana tem uma seqüência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 1 e a proteína lactoferrina bovina tem uma seqüência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 2.
10
4. Peptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, pelo que o peptídeo compreende pelo menos dois resíduos Cys ou seus análogos.
5. Peptídeo de acordo com a reivindicação 4, pelo que o peptídeo compreende uma ligação dissulfeto criada por dois resíduos Cys ou uma ligação análoga formada pelos análogos de cisteína.
15
6. Peptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, pelo que o peptídeo compreende uma porção tendo uma conformação de hélice-alfa de cerca de 12 a 20 aminoácidos de comprimento, e uma porção tendo uma conformação de folha-beta de cerca de 8 a 12 aminoácidos de comprimento.
20
7. Peptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, pelo que o peptídeo compreende de cerca de 8 a cerca de 60 resíduos de aminoácidos.
25
8. Peptídeo de acordo com a reivindicação 7, pelo que o peptídeo compreende de cerca de 20 a cerca de 45 resíduos de aminoácidos.
9. Peptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, pelo que o peptídeo tem uma seqüência de aminoácidos correspondendo às posições de aminoácidos 20 a 64 da seqüência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 1.
30
10. Peptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de

1 a 9, pelo que o peptídeo tem uma seqüência de aminoácidos, pelo que a extremidade terminal-N do peptídeo é um aminoácido correspondendo a posições de aminoácidos 20 a 64 da seqüência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO 1 ou SEQ ID NO: 2.

5 11. Peptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, pelo que o peptídeo é selecionado do grupo compreendendo

um peptídeo tendo a seqüência de aminoácidos

KCFWQRNMRKVRGPPVSCIQR (SEQ.ID.No.3),

um peptídeo tendo a seqüência de aminoácidos

10 **CFWQRNMRKVRGPPVSC (SEQ.ID.No.4),**

um peptídeo tendo a seqüência de aminoácidos

FQWQRNMRKVRGPPVS (SEQ.ID.No.5),

um peptídeo tendo a seqüência de aminoácidos

FQWQRNMRKVR (SEQ.ID.No.6),

15 um peptídeo tendo a seqüência de aminoácidos

KCRRWQWRMKKLGAPSITCVRR (SEQ ID No. 29), e

um peptídeo tendo a seqüência de aminoácidos

CRRWQWRMKKLGAPSITC (SEQ ID No. 30)

e seus derivados.

20 12. Peptídeo de acordo com a reivindicação 11, pelo que o peptídeo compreende uma seqüência de acordo com SEQ ID NOs: 3, 4, 29, 30 ou um derivado das ditas seqüências com uma identidade de seqüência de pelo menos 40%.

25 13. Peptídeo de acordo com a reivindicação 11 ou 12, pelo que o peptídeo é um derivado dos peptídeos de acordo com qualquer uma de SEQ ID NOs 2 a 5, pelo que os resíduos metionina são substituídos por um aminoácido selecionado do grupo compreendendo valina, isoleucina, norvalina, leucina e norleucina.

30 14. Peptídeo de acordo com a reivindicação 13, pelo que o peptídeo é um peptídeo tendo uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo compreendendo

KCFWQRNVRKVRGPPVSCIQR (SEQ.ID.No.7)

KCFQWQRNIRKVRGPPVSCIQR (SEQ.ID.No.8)
 KCFQWQRNXRKVRGPPVSCIQR (SEQ.ID.No.9), onde X é norvalina,
 KCFQWQRNLRKVRGPPVSCIQR (SEQ.ID.No.10),
 KCFQWQRNXRKVRGPPVSCIQR (SEQ.ID.No.28), onde X é norleucina,
 5 CFQWQRNVRKVRGPPVSC (SEQ.ID.No. 11),
 CFQWQRNIRKVRGPPVSC (SEQ.ID.No. 12),
 CFQWQRNXRKVRGPPVSC (SEQ.ID.No. 13), onde X é norvalina,
 CFQWQRNLRKVRGPPVSC (SEQ.ID.No. 14),
 CFQWQRNXRKVRGPPVSC (SEQ.ID.No. 15), onde X é norleucina,
 10 FQWQRNVRKVRGPPVS (SEQ.ID.No. 16),
 FQWQRNIRKVRGPPVS (SEQ.ID.No.17),
 FQWQRNXRKVRGPPVS (SEQ.ID.No.18), onde X é norvalina,
 FQWQRNLRKVRGPPVS (SEQ.ID.No.19),
 FQWQRNXRKVRGPPVS (SEQ.ID.No.20), onde X é norleucina,
 15 FQWQRNVRKVR (SEQ.ID.No.21),
 FQWQRNIRKVR (SEQ.ID.No.22),
 FQWQRNXRKVR (SEQ.ID.No.23), onde X é norvalina,
 FQWQRNLRKVR (SEQ.ID.No.24), e
 FQWQRNXRKVR (SEQ.ID.No.25), onde X é norleucina.

20 15. Peptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 11 a 14, pelo que os derivados têm um grupo de ligação preferivelmente selecionado do grupo compreendendo tioéteres, pelo que o grupo de ligação substitui a ligação dissulfeto formada por estes resíduos Cys.

25 16. Peptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 15, pelo que o peptídeo é marcado radioativamente, preferivelmente tendo incorporado um aminoácido marcado radioativamente, pelo que mais preferivelmente o aminoácido marcado radioativamente é um aminoácido marcado com trítio.

30 17. Peptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, pelo que o peptídeo ainda compreende uma porção que é apropriada para detecção usando um processo para detecção, pelo que tal porção é preferivelmente selecionada do grupo compreendendo fluoróforos, traçado-

res e haptenos radioativos, pelo que preferivelmente o hapteno é biotina.

18. Complexo compreendendo um peptídeo selecionado do grupo compreendendo um peptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 17, lactoferrina humana e lactoferrina bovina, e uma molécula-carga.

19. Complexo de acordo com a reivindicação 18, pelo que a molécula-carga está covalentemente ou não-covalentemente ligada ao peptídeo.

20. Complexo de acordo com a reivindicação 18 ou 19, pelo que a molécula-carga é selecionada do grupo compreendendo ácidos nucleicos, aminoácidos, peptídeos, proteínas, carboidratos, lipídeos e moléculas pequenas e misturas de quaisquer dos mesmos.

21. Complexo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 18 a 20, pelo que a molécula-carga está presente como ou parte ou uma estrutura, pelo que a estrutura é selecionada do grupo compreendendo nanopartículas, micropartículas, lipossomas e micelas.

22. Complexo de acordo com a reivindicação 20, pelo que o ácido nucleico é um ácido nucleico selecionado do grupo compreendendo moléculas de DNA, moléculas de RNA, moléculas de PNA, moléculas de siRNA, moléculas anti-sentido, ribozimas, aptâmeros, "spiegelmeros", e moléculas-engodo.

23. Complexo de acordo com a reivindicação 20, pelo que o peptídeo é selecionado do grupo compreendendo peptídeos para vacinação.

24. Complexo de acordo com a reivindicação 20, pelo que o ácido nucleico é uma vacina baseada em ácido nucleico.

25. Complexo de acordo com a reivindicação 20, pelo que as nanopartículas e/ou as micropartículas compreendem ou consistem em um composto farmacologicamente ativo.

26. Composição compreendendo pelo menos um peptídeo selecionado do grupo compreendendo um peptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 17, lactoferrina humana e lactoferrina bovina, e uma molécula-carga.

27. Composição compreendendo um complexo como definido em qualquer uma das reivindicações 18 a 25.

28. Ácido nucléico codificando um peptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 17, preferivelmente tendo uma seqüência de ácidos nucléicos de acordo com SEQ ID NO: 26 ou SEQ ID NO: 27.

29. Composição compreendendo um ácido nucléico como definido na reivindicação 28 e uma molécula-carga.

30. Composição de acordo com a reivindicação 29, pelo que a molécula-carga é um ácido nucléico e mais particularmente um RNA apropriado para vacinação.

31. Composição de acordo com a reivindicação 29, pelo que a molécula-carga é um ácido nucléico codificando um peptídeo.

32. Composição de acordo com a reivindicação 31, pelo que o ácido nucléico de acordo com a reivindicação 28 está operavelmente ligado ao ácido nucléico codificando um peptídeo.

33. Composição de acordo com a reivindicação 31, pelo que o ácido nucléico como definido na reivindicação 28 e o ácido nucléico codificando um peptídeo estão ligados em-estrutura.

34. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 31 a 33, pelo que o peptídeo é um agente farmacologicamente ativo.

35. Uso de um peptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 17 como um peptídeo de penetração de célula.

36. Uso de lactoferrina humana ou um derivado do mesmo funcional ou de lactoferrina bovina ou um derivado do mesmo funcional como um peptídeo de penetração de célula.

37. Uso de acordo com a reivindicação 36, pelo que a lactoferrina humana tem uma seqüência de aminoácidos compreendendo posições de aminoácidos 20 a 711 da seqüência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 1 ou um derivado do mesmo funcional e/ou a lactoferrina bovina tem uma seqüência de aminoácidos compreendendo posições de aminoácidos 20 a 708 da seqüência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 2 ou um derivado do mesmo funcional.

38. Uso de um peptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 17 como um agente de transfecção.

5 39. Uso de lactoferrina humana ou um derivado do mesmo funcional ou de lactoferrina bovina ou um seu derivado do mesmo funcional como um agente de transfecção.

10 40. Uso de acordo com a reivindicação 39, pelo que a lactoferrina humana tem uma seqüência de aminoácidos compreendendo posições de aminoácidos 20 a 711 da seqüência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 1 e/ou a lactoferrina bovina tem uma seqüência de aminoácidos compreendendo posições de aminoácidos 20 a 708 da seqüência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 2 ou um derivado do mesmo funcional.

41. Uso de uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações de 26 a 34 para a fabricação de um medicamento.

15 42. Uso de acordo com a reivindicação 41, pelo que a molécula-carga é um agente farmacologicamente ativo.

43. Uso de uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações de 26 a 34 para a fabricação de um agente diagnóstico.

44. Uso de acordo com a reivindicação 43, pelo que a molécula-carga é um marcador diagnóstico.

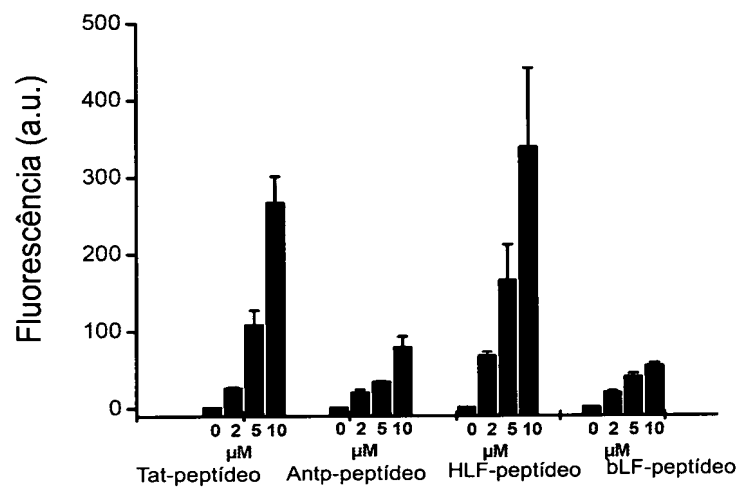


FIG. 1

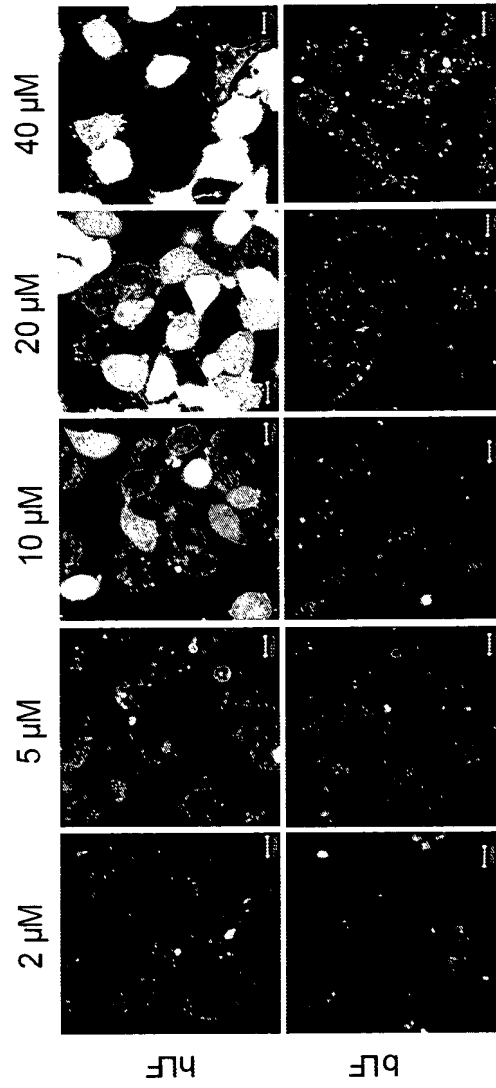
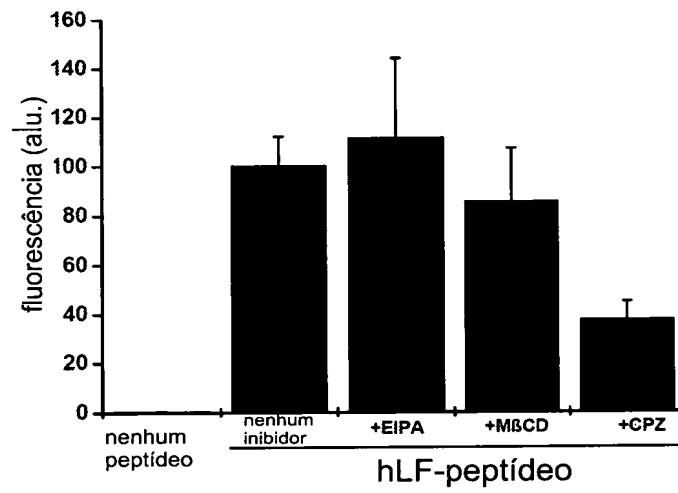
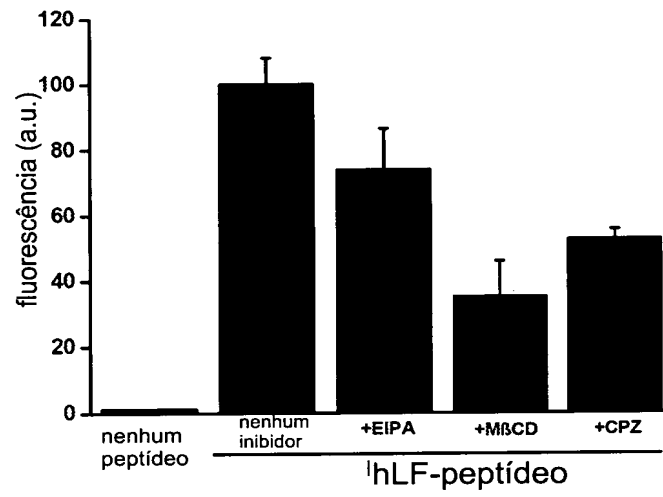


FIG. 2

FIG. 3



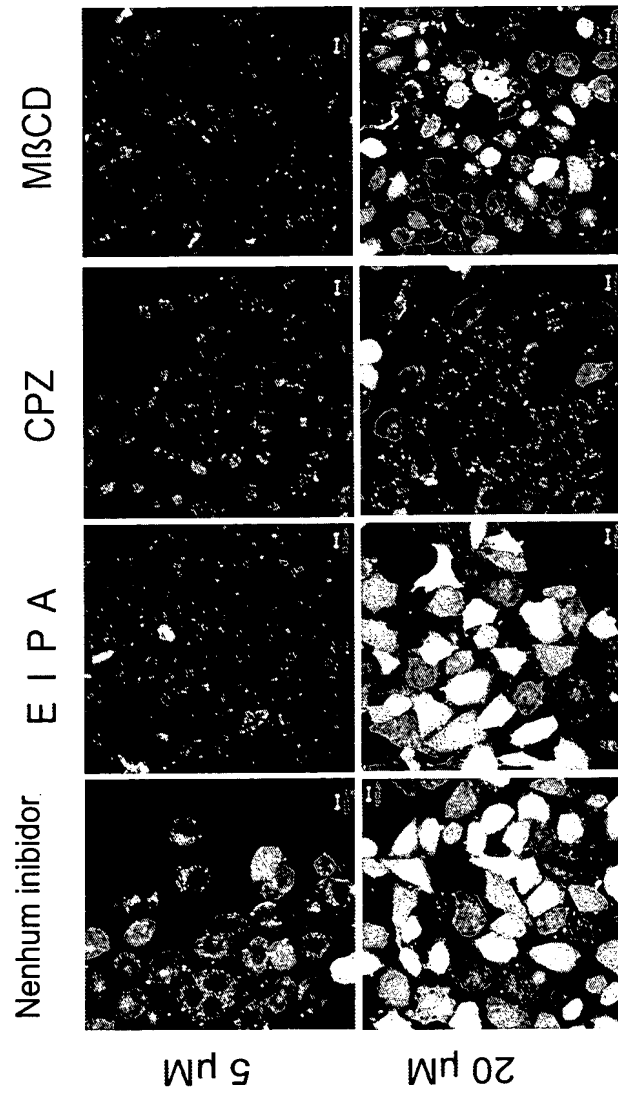
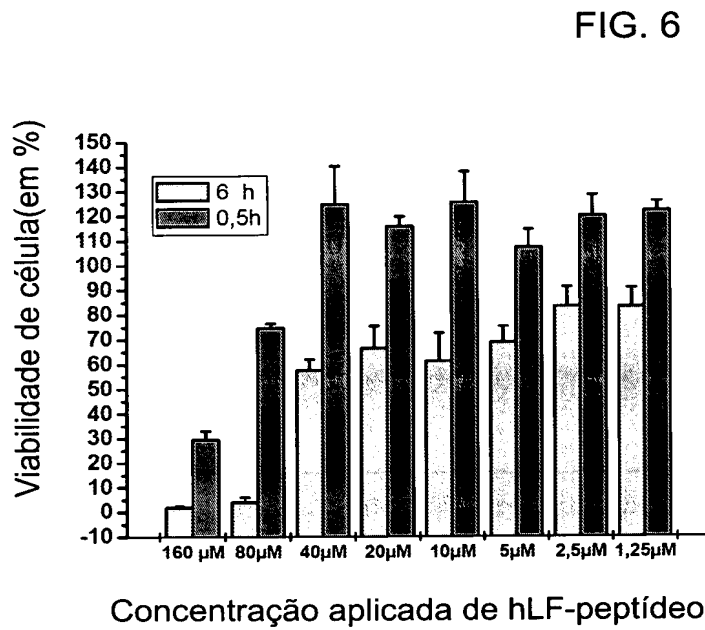
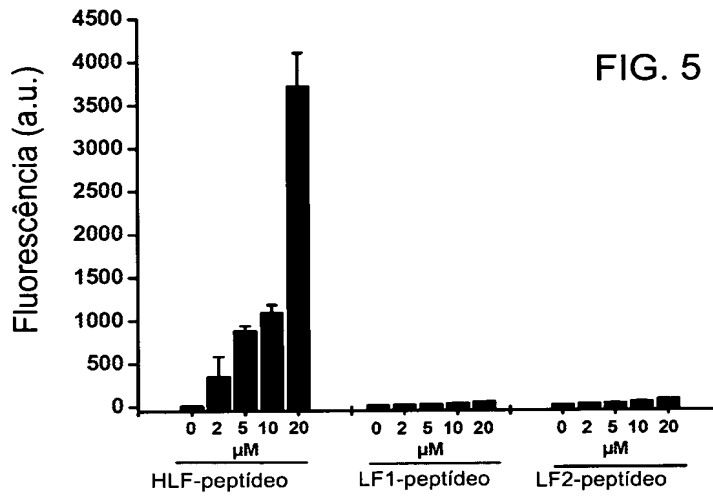


FIG. 4



RESUMO

Patente de Invenção: "**PEPTÍDEOS ÚTEIS COMO PEPTÍDEOS DE PENETRAÇÃO DE CÉLULA**".

5 A presente invenção refere-se a um peptídeo tendo uma sequência de aminoácidos compreendendo pelo menos 8 aminoácidos consecutivos da proteína lactoferrina humana ou a proteína lactoferrina bovina, pelo que o peptídeo é apropriado para atuar como um peptídeo de penetração de célula.