



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102023026896-0 A2

(22) Data do Depósito: 19/12/2023

(43) Data da Publicação Nacional:
23/09/2025

(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE BIOCONJUGADOS PEPTÍDICOS, BIOCONJUGADOS PEPTÍDICOS E SEUS USOS COMO ANTITUMORAIS

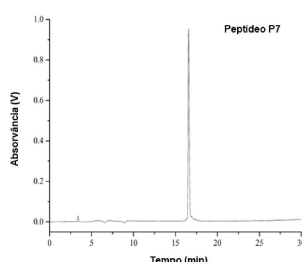
(51) Int. Cl.: A61K 47/64; C07K 7/08; A61P 35/00.

(52) CPC: A61K 47/64; C07K 7/08; A61P 35/00.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) Inventor(es): LETICIA OLIVEIRA CATARIN NUNES; NORIVAL ALVES SANTOS FILHO; MARIA CAROLINA OLIVEIRA DE ARRUDA BRASIL; GEOVANA NAVEGANTE; VALERIA VALENTE; EDUARDO MAFFUD CILLI.

(57) Resumo: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE BIOCONJUGADOS PEPTÍDICOS, BIOCONJUGADOS PEPTÍDICOS E SEUS USOS COMO ANTITUMORAIS. A presente invenção se refere a obtenção de bioconjugados entre Melitina (SEQ ID NO: 5) e o peptídeo aptâmero P7 (SEQ ID NO: 4), sendo esses: bioconjugado LO2121 (SEQ ID NO: 1), constituído de peptídeo P7 + Melitina; bioconjugado LO2122 (SEQ ID NO: 2), constituído de Melitina + peptídeo P7; e Bioconjugado LO2123 (SEQ ID NO: 3), constituído de Melitina + espaçador + peptídeo P7, com ligação de espaçador hidrofílico (Fmoc- AEEA-OH), a serem usados no tratamento de células cancerígenas apresentadoras do marcador tumoral CD44. Os bioconjugados apresentam alta especificidade para células cancerígenas, com citotoxicidade significativa em células tumorais e maior viabilidade celular em linhagens celulares não tumorais, além de estabilidade no soro em diferentes concentrações, representando um grande avanço tecnológico no tratamento quimioterápico contra células tumorais em diversos tipos de câncer devido à facilidade de síntese, seletividade, alta toxicidade em tumores e facilidade de penetração celular.



PROCESSO DE OBTENÇÃO DE BIOCONJUGADOS PEPTÍDICOS, BIOCONJUGADOS PEPTÍDICOS E SEUS USOS COMO ANTITUMORAIS

INTRODUÇÃO

[001] O presente pedido de patente descreve o processo de obtenção de bioconjugados peptídicos e de seu uso como no tratamento de células cancerígenas apresentadoras do marcador tumoral CD44, sendo uma terapia promissora contra diversos tipos de câncer devido à facilidade de síntese, sua seletividade, alta toxicidade em tumores e facilidade de penetração celular.

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] A presente invenção se insere no contexto de biotecnologia, ao campo de necessidades humanas, ao campo de ciências médica ou veterinária, mais especificamente ao campo de preparações para finalidades médicas contendo peptídeos, por se referir a obtenção de bioconjugados peptídicos, compreendidos de Melitina e do peptídeo aptâmero P7, e de seu uso como no tratamento de células cancerígenas apresentadoras do marcador tumoral CD44.

ESTADO DA TÉCNICA

[003] O câncer foi e continua sendo uma das patologias com maior abordagem científica, isso porque as pesquisas investigam meios de controle, de sensibilização das células tumorais e até mesmo meios mais aplicáveis ao tratamento em si. Dados da OMS apresentam que em 2018 houve uma incidência de 18,1 milhões de casos de câncer no mundo, e que até 2040 os números estarão próximos de 29,6 milhões. Quanto a mortalidade, em 2018 foram registrados cerca de 9,6 milhões de mortes por câncer, e a estimativa para 2040 chega a 16,4 milhões (WHO, 2018). Sobre a localização primária, a incidência dos casos é maior em câncer de pulmão, representando cerca de 2,1 milhões de casos, seguido de câncer de mama, com valores próximos de 2,1 milhões, seguido por câncer do cólon, apresentando cerca de 1,9 milhões de casos em ambos os gêneros. Considerando o gênero, o tipo de câncer mais incidente em mulheres é o câncer de mama, representando cerca de

24%, já em homens, a incidência maior é de câncer de pulmão, representando 14,5% e câncer de próstata, representando 13,5% dos casos (WHO, 2018).

[004] No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), para o ano biênio 2018-2019, o câncer com maior incidência em homens é o câncer de próstata, com estimativas de 68.220 mil casos novos, cerca de 31,7%, seguido pelo câncer de mama em mulheres, representando 59.700 mil novos casos, com representação de 29,5%. Câncer de pulmão apresenta-se como segundo câncer mais incidente em homens, representando cerca de 18.740 novos casos (8,7%), e em mulheres cólon e reto aparecem como segundo câncer mais incidente, com 18.980 novos casos (9,4%) (INCA, 2019).

[005] Em relação aos em tratamentos convencionais do câncer, várias são as reações adversas encontradas. É muito frequente a ocorrência de mielossupressão e trombocitopenia (diminuição da produção de células sanguíneas), mucosite (evento inflamatório no trato digestivo) e alopecia (perda de cabelo) (RIEDL *et al.*, 2011). Claramente, novas abordagens terapêuticas com redução do risco de desenvolvimento de resistência e maior seletividade câncer são urgentemente necessárias. Dentre essas alternativas os peptídeos antitumorais surgem como excelentes ferramentas de interesse na pesquisa, pois além dessas moléculas estarem entre os mais curtos peptídeos bioativos conhecidos, o que facilita sua síntese e diminui os custos, devido às suas baixas massas moleculares, eles apresentam elevada difusão para os tecidos, o que diminuiria sua imunogenicidade, evitando assim a indução de uma resposta por anticorpos.

[006] Os peptídeos anticâncer surgem como uma terapia promissora contra diversos tipos de câncer devido à facilidade de síntese, sua seletividade, alta toxicidade em tumores e facilidade de penetração celular. Os ACPs podem atuar por diferentes alvos moleculares, como membrana celular (necrose), membrana mitocondrial (apoptose), através de formação de poros ou lise total da membrana, e por atividade não membrana.

[007] O documento *Screening of Peptides Bound to Breast Cancer Stem Cell Specific Surface Marker CD44 by Phage Display* (PARK et al.; 2012), descrevem CD44, uma glicoproteína de membrana associada ao câncer envolvida na adesão celular e progressão tumoral, tem sido implicado como um antígeno de células-tronco cancerígenas em vários cânceres, incluindo câncer de mama. Se a sensibilidade de detecção do CD44 como um marcador de câncer pudesse ser melhorada, isso teria aplicações clínicas importantes. Em comparação com tratamentos em fase inicial de outros tipos de câncer, o tratamento do câncer de mama tem maior probabilidade de resultar em resultados positivos, portanto essa detecção precoce é crucial. Portanto, o CD44 é um potencial alvo diagnóstico para detecção da patologia. A anterioridade descreve o uso uma biblioteca de peptídeos para rastrear novos peptídeos diversos que se ligam ao CD44 com alta afinidade e caracterizou a ligação específica destes peptídeos. A presente invenção proporciona base para desenvolver novos peptídeos de diagnóstico que possam substituir anticorpos como CD44 sondas de detecção.

[008] O documento *Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy* (RADY, I. et al.; 2017) descreve a melitina (MEL), um importante componente peptídico do veneno de abelha, como um atrativo candidato à terapia do câncer. Esse agente mostrou uma variedade de efeitos anticancerígenos em cultura celular pré-clínica e sistemas de modelo animal. Apesar de uma eficácia convincente contra vários tipos de câncer, a sua aplicabilidade aos seres humanos tem enfrentado desafios, devido a vários problemas, incluindo sua citotoxicidade inespecífica, degradação e atividade hemolítica. Várias abordagens de otimização, incluindo a utilização de a entrega de MEL baseada em nanopartículas tem sido utilizada para contornar os problemas. A anterioridade apontada resume o entendimento atual dos efeitos anticancerígenos do componente peptídico do veneno de abelha em diferentes tipos de câncer. Além disso, apresenta as informações disponíveis para o possível mecanismo de ação da melitina (MEL).

[009] A anterioridade US20190015521, intitulada "*Topical delivery of therapeutic agents using cell-penetrating peptides for the treatment of age-related macular degeneration and other eye diseases*", revela um sistema do tipo *drug-delivery* compreendendo um agente terapêutico e um peptídeo de penetração celular (CPP), dentre os quais o P7 e um fragmento da Melitina são candidatos, para tratar um transtorno ocular. Ainda que a anterioridade revele a sequência do peptídeo P7 e de um derivado de Melitina, ambas as moléculas fazem parte de uma lista de peptídeos de penetração de membrana candidatos para uso em um sistema de *drug delivery* em ligação a um agente terapêutico, ou seja, apesar das conhecidas propriedades antitumorais de ambos os peptídeos, nenhum deles é tratado no documento como sendo o agente terapêutico em si. Ademais, o documento é direcionado ao tratamento de uma doença diferente da presente invenção, à saber, um transtorno ocular.

[010] A anterioridade EP3789041, intitulada "*Targeting m2-like tumor-associated macrophages by using melittin-based pro-apoptotic peptide*", revela um conjugado de fármaco anti-câncer de Melitina direcionado a macrófagos associados a tumores do tipo M2 e o método de preparação do mesmo, para uso em sistema de *drug-delivery*.

[011] A anterioridade KR20120094173, intitulada "*Peptides targeting the cd44 proteínas a biomarker for breast cancerstem cell and uses thereof*", revela o uso do polipeptídeo P7 para o diagnóstico e prevenção de cânceres relacionados à expressão de CD44 e sugere o uso de tal peptídeo em sistemas para a entrega de drogas.

[012] Em busca pelas sequências biológicas dos três bioconjugados pleiteados, os melhores resultados apresentam percentual de cobertura elevado, de até 94%, com similaridade de 100%. No entanto, não foi encontrada sequência idêntica para nenhum dos bioconjugados buscados. Os percentuais de cobertura e similaridade elevados podem ser atribuídos ao fato de que o peptídeo Melitina é amplamente conhecido e estudado no estado da técnica, de modo que o trecho relacionado ao

mesmo, é encontrado é muitas construções biotecnológicas e para as mais diversas finalidades.

[013] Assim, no contexto do tratamento de câncer, os peptídeos de penetração de membrana têm sido utilizados como veículos de entrega para transportar diferentes cargas terapêuticas. Isso pode incluir agentes quimioterápicos convencionais ou até mesmo moléculas terapêuticas inovadoras, como drogas anticâncer direcionadas a partir do uso de peptídeos, os quais podem também exibir propriedades bioativas diretas contra células cancerígenas, como é o caso da Melitina.

[014] Apesar das anterioridades presentes no atual estado da técnica, nenhuma delas antecipa a obtenção de bioconjugados entre Melitina e o peptídeo aptâmero P7, com características de alta especificidade para células cancerígenas, com citotoxicidade significativa em células tumorais, maior viabilidade celular em linhagens celulares não tumorais e estabilidade em soro em diferentes concentrações, o que corrobora com inventividade e contribuição da presente invenção ao campo técnico.

[015] Cabe destacar que, para se alcançar a combinação da sequência dos bioconjugados, são necessários inúmeros testes experimentais não triviais e, portanto, de caráter não rotineiro para um técnico no assunto, o que corrobora com a inventividade da presente invenção.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[016] A presente invenção possui como objetivos disponibilizar: bioconjugados entre Melitina e o peptídeo aptâmero P7 (LO2121 (SEQ ID NO: 1), LO2122 (SEQ ID NO: 2) e LO2123 (SEQ ID NO: 3)) para o tratamento de células cancerígenas apresentadoras do marcador tumoral CD44; seu processo de obtenção e o uso desses bioconjugados para tratamento de câncer.

VANTAGENS DA INVENÇÃO

[017] A vantagem da presente invenção consiste na obtenção de bioconjugados entre Melitina e o peptídeo aptâmero P7 (LO2121 (SEQ ID NO: 1), LO2122 (SEQ ID NO: 2) e LO2123 (SEQ ID NO: 3)), que apresentam alta especificidade para células

cancerígenas, com citotoxicidade significativa em células tumorais e maior viabilidade celular em linhagens celulares não tumorais, além de apresentarem estabilidade no soro em diferentes concentrações, resolvendo dessa maneira, o problema técnico de os peptídeos anticâncer serem pouco seletivos aos seus alvos específicos. Dessa maneira, a presente invenção visa solucionar a baixa seletividade dos peptídeos anticâncer, por meio de sua bioconjugação ao peptídeo aptâmero P7.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FIGURAS

[018] A Figura 1 é um gráfico que mostra o perfil cromatográfico do peptídeo aptâmero P7 puro em uma coluna de fase reversa C18 em um gradiente de solvente B de 5-95%, durante 30 minutos.

[019] A Figura 2 são gráficos que ilustram a análise de citometria de fluxo para quantificação da marcação do peptídeo LO1904 em linhas celulares MCF-7 (Figura 2A), A549 (Figura 2B) e MRC-5 (Figura 2C) em concentrações de 128 µg/mL, 32 µg/mL, 8 µg/mL, 1 µg /mL.

[020] A Figura 3 mostra a estratégia de síntese dos bioconjugados LO2121 (SEQ ID NO: 1), LO2122 (SEQ ID NO: 2) e LO2123 (SEQ ID NO: 3), obtidos a partir de síntese em fase sólida entre o peptídeo aptâmero P7 e o peptídeo antitumoral Melitina.

[021] A Figura 4 mostra o perfil cromatográfico de bioconjugados de peptídeos puros LO2121 (Figura 4^a - SEQ ID NO: 1), LO2122 (Figura 4B - SEQ ID NO: 2) e LO2123 (Figura 4C - SEQ ID NO: 3) em uma coluna de fase reversa C18 em um gradiente de solvente B de 5-95%, durante 30 minutos.

[022] A Figura 5 são gráficos que ilustram o ensaio de viabilidade celular de linhas celulares MRC-5 (Figura 5A), MCF-7 (Figura 5B) e A549 (Figura 5C) tratadas com peptídeos LO1903, Melitina, bioconjugado LO2121 (SEQ ID NO: 1), LO2122 (SEQ ID NO: 2) e LO2123 (SEQ ID NO: 3) em concentrações de 128 µg/mL a 1 µg/mL. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo (*significância em relação à Melitina e aos bioconjugados, **significância entre os bioconjugados).

DESCRIÇÃO DA LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[023] A seguir é descrita a listagem das sequências importantes para a reprodução da presente invenção:

- ✓ SEQ ID NO: 1 – Bioconjugado LO2121, constituído de Peptídeo P7 + Melitina;
- ✓ SEQ ID NO: 2 – Bioconjugado LO2122, constituído de Melitina + Peptídeo P7;
- ✓ SEQ ID NO: 3 – Bioconjugado LO2123, constituído de Melitina + espaçador + Peptídeo P7;
- ✓ SEQ ID NO: 4 – Peptídeo aptâmero P7;
- ✓ SEQ ID NO: 5 – Melitina.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[024] O presente pedido de patente inicialmente sintetizou o peptídeo aptâmero P7 (SEQ ID NO: 4) para confirmar suas propriedades de ligação às células tumorais por citometria de fluxo, para tanto, uma sonda fluorescente foi acoplada à região N-terminal desta molécula. O peptídeo ligado à sonda fluorescente foi denominado LO1904. Após a síntese previamente descrita de LO1904, o grau de pureza foi analisado por cromatografia analítica em coluna C18 de fase reversa em um gradiente B de solvente de 5-95%, ao longo de 30 min a uma taxa de fluxo de 1 mL/min (conforme Figura 1).

[025] Em seguida, foram realizadas análises para confirmar a ligação do peptídeo aptâmero às células tumorais de interesse. No experimento de citometria de fluxo foi possível avaliar a marcação do peptídeo aptâmero LO1904 em proteínas de membrana na linhagem celular de câncer de mama (MCF-7), onde o peptídeo LO1904 apresentou marcação significativa nas concentrações de 128 µg/mL (60 % de marcação de peptídeo) e 32 µg/mL (25% de marcação de peptídeo). Corroborando os resultados da citometria de fluxo, foi possível observar por microscopia marcação evidente para o peptídeo LO1904 na linha celular MCF-7 (conforme Figura 2A). Para a linha celular de adenocarcinoma de pulmão humano (A549), foi observada marcação evidente nas concentrações de 128 µg/mL (27,5% de marcação de peptídeo) e 32 µg/mL (4,7% de marcação de peptídeo), enquanto

nas outras concentrações não houve rotulagem evidente. Em relação à microscopia, a análise da linha celular A549 tratada com o peptídeo aptâmero LO1904 mostrou células marcadas em concentrações superiores a 32 µg/mL (conforme Figura 2B). Para a linha celular não tumoral MRC5, o peptídeo aptâmero LO1904 apresentou apenas baixa marcação na concentração de 128 µg/mL (16,5% marcação de peptídeo), enquanto nas demais concentrações testadas a marcação foi irrelevante. Corroborando com os resultados da citometria, nas imagens de microscopia de fluorescência não foi possível observar sinal evidente (Figura 2C). Com os resultados da citometria de fluxo para as linhagens A549, MRC-5 e MCF-7 tratadas com o peptídeo LO1904, foi possível observar que há ligação evidente, principalmente para a linhagem tumoral MCF-7. Além disso, apenas uma marcação fraca desse peptídeo foi observada no MRC-5, mostrando maior afinidade por células tumorais, como esperado.

[026] Após a confirmação de que o peptídeo aptâmero P7 (SEQ ID NO: 4) (LO1904) foi capaz de se ligar especificamente a proteínas de membrana superexpressas na superfície tumoral, incluindo a linha celular de tumor de mama MCF -7, foram sintetizados os bioconjugados entre Melitina (SEQ ID NO: 5), um peptídeo antitumoral bem estabelecido, e o peptídeo aptâmero P7 (SEQ ID NO: 4). Para isso, foram utilizadas três estratégias diferentes (Figura 3).

[027] Os bioconjugados LO2121 (SEQ ID NO:1), LO2122 (SEQ ID NO:2) e LO2123 (SEQ ID NO:3), sendo o último com a ligação de espaçador hidrofílico (Fmoc-AEEA-OH) entre o peptídeo antitumoral e o peptídeo aptâmero; pleiteados na presente invenção são sintetizados por síntese de peptídeos em fase sólida. Os bioconjugados LO2121 (SEQ ID NO:1) e LO2122 (SEQ ID NO:2) foram sintetizados e a posição (N- ou C-terminal) do peptídeo aptâmero foi analisada de modo a definir se ela interferiria na capacidade de se ligar ao receptor e/ou na atividade antitumoral. O LO2123 (SEQ ID NO:3) foi sintetizado com um espaçador hidrofílico (Fmoc- AEEA-OH) entre o peptídeo antitumoral e o peptídeo aptâmero, com a intenção de proporcionar melhor solubilidade e mobilidade às moléculas e,

consequentemente, melhorar a atividade antitumoral e a capacidade de ligação do bioconjugado.

[028] Após a síntese e purificação dos bioconjugados, foi realizado o ensaio MTT para avaliar a viabilidade celular após os tratamentos e comparar a citotoxicidade em relação à Melitina e peptídeo aptâmero P7 isoladamente.

[029] Para tanto, com o objetivo de comparação, inicialmente foi realizado o ensaio de viabilidade celular em células não tumorais. Para este propósito, foi utilizada a linhagem de células pulmonares, MRC-5. Na linhagem celular MRC-5, nas concentrações de 128 µg/mL, 64 µg/mL e 32 µg/mL a atividade de todos os bioconjugados foi semelhante à atividade da Melitina. Porém, na concentração de 16 µg/mL os bioconjugados LO2122 (SEQ ID NO:2) e LO2123 (SEQ ID NO:3) mostraram-se menos citotóxicos que a Melitina, com destaque para o LO2123 (SEQ ID NO:3), uma vez que a viabilidade foi superior a 50%, enquanto a viabilidade apresentada pela Melitina foi de 1%. Na concentração de 8 µg/mL a viabilidade celular e a baixa citotoxicidade do LO2123 foi muito significativa, demonstrando assim uma menor citotoxicidade contra células não tumorais, em comparação com a Melitina. Nas outras concentrações (4 µg/mL, 2 µg/mL e 1 µg/mL) a atividade citotóxica de todos os bioconjugados e da melitina diminuiu (conforme ilustrado na Figura 5A).

[030] Em relação à linha celular de câncer de mama, MCF-7, a linha celular à qual o peptídeo aptâmero apresentou maior capacidade de ligação, conforme mostrado acima, e a linha celular à qual *Park et al.* (2012) validaram a ligação do peptídeo, em todas as concentrações testadas, os bioconjugados (exceto LO2121 (SEQ ID NO:1) em 16 µg/mL), apresentaram atividade citotóxica semelhante à Melitina (conforme apresentado na Figura 5B). É importante ressaltar que esses resultados são extremamente promissores, pois confirmam a hipótese de que os bioconjugados entre aptâmeros e peptídeos antitumorais podem manter a citotoxicidade para células tumorais e apresentam efeito mínimo contra células não tumorais (conforme apresentados nas Figuras 5A e 5B), principalmente no

concentrações de 16 µg/mL e 8 µg/mL para os peptídeos LO2122 (SEQ ID NO:2) e LO2123 (SEQ ID NO:3) (ênfatizando a baixa toxicidade de LO2123 (SEQ ID NO:3) em linhas celulares não tumorais nessas concentrações).

[031] Para A549, linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão humano, nas concentrações de 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL e 16 µg/mL, os bioconjugados apresentaram níveis semelhantes de atividade da Melitina. Entretanto, na concentração de 8 µg/mL, embora a Melitina tenha apresentado maior citotoxicidade, os bioconjugados LO2122 (SEQ ID NO:2) e LO2123 (SEQ ID NO:3) também apresentaram atividade significativa (conforme ilustrado na Figura 5C). Esses resultados indicam que a concentração mais promissora testada foi de 16 µg/mL para o peptídeo LO2123 (SEQ ID NO:3), que apresentou a maior potência contra células tumorais e o menor impacto contra células não tumorais (melhor especificidade).

[032] Considerando as análises de viabilidade das linhagens celulares A549, MRC-5 e MCF-7 em relação ao peptídeo aptâmero P7, foi possível concluir que o peptídeo aptâmero não apresentou citotoxicidade para as linhagens celulares testadas. Por outro lado, a Melitina, por ser um peptídeo lítico de membrana contra uma variedade de linhagens celulares (*JAMASBI, MULARSKI, SEPAROVIC*, 2016), apresentou potencial citotóxico para todas as células testadas, tanto de linhagens celulares tumorais quanto não tumorais, o que justifica a síntese de bioconjugados na busca de especificidade para células tumorais.

[033] Conforme exposto, a presente invenção refere-se a obtenção dos bioconjugados peptídicos LO2121 (SEQ ID NO: 1), LO2122 (SEQ ID NO: 2) e LO2123 (SEQ ID NO: 3), a partir de síntese de peptídeos em fase sólida entre o peptídeo antitumoral Melitina (SEQ ID NO: 5) e o peptídeo aptâmero P7 (SEQ ID NO: 4), a serem empregados para a preparação de composições antitumorais para o tratamento de células cancerígenas apresentadoras do marcador tumoral CD44, em concentrações de 128 µg/mL a 1 µg/mL. Mais especificamente, o bioconjugado peptídico LO2121 é compreendido pela SEQ ID NO: 1, resultante da síntese em

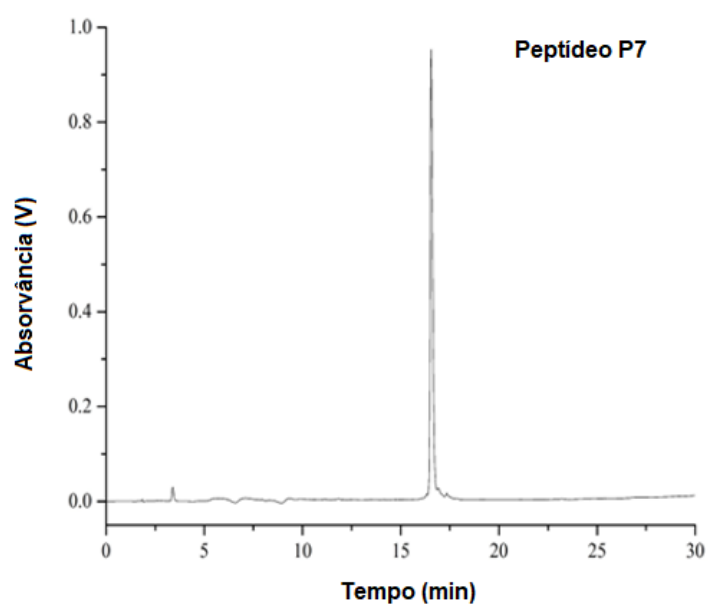
fase sólida de Peptídeo P7 (SEQ ID NO: 4) + Melitina (SEQ ID NO: 5); o bioconjugado peptídico LO2122 é compreendido pela SEQ ID NO: 2, resultante da síntese em fase sólida de Melitina (SEQ ID NO: 5) + Peptídeo P7 (SEQ ID NO: 4); e o bioconjugado peptídico LO2123 é compreendido pela SEQ ID NO: 3, resultante da síntese em fase sólida de Melitina (SEQ ID NO: 5) + espaçador hidrofílico (Fmoc- AEEA-OH) + Peptídeo P7 (SEQ ID NO: 4).

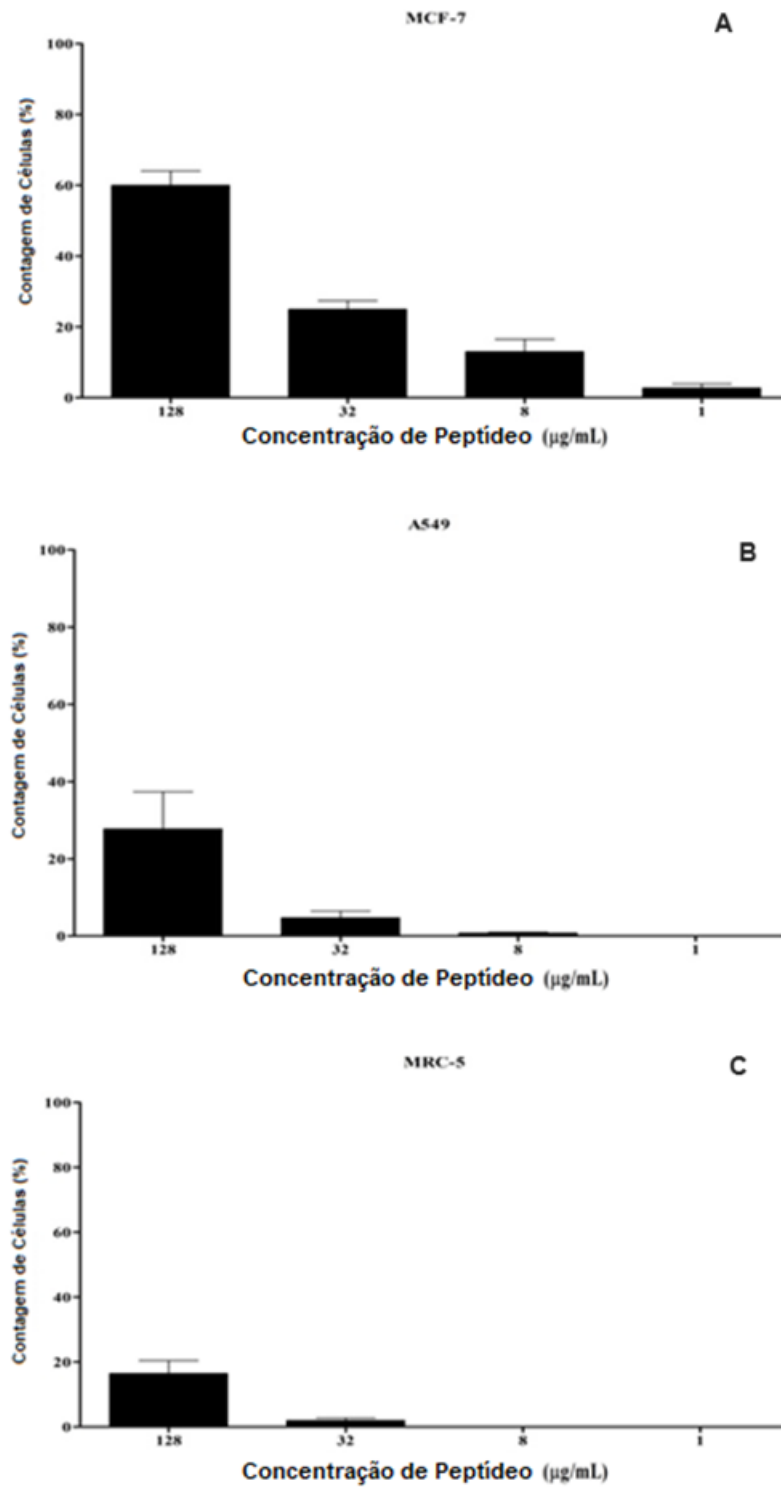
[034] Dessa maneira, a presente invenção disponibiliza bioconjugados de alta especificidade para células cancerígenas, com citotoxicidade significativa em células tumorais e maior viabilidade celular em linhagens celulares não tumorais, além de apresentarem estabilidade no soro em diferentes concentrações, resolvendo o problema técnico de os peptídeos anticâncer serem pouco seletivos aos seus alvos específicos.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção de bioconjugados peptídicos **caracterizado por** compreender a síntese de peptídeos em fase sólida entre o peptídeo antitumoral Melitina (SEQ ID NO: 5) e o peptídeo aptâmero P7 (SEQ ID NO: 4), para obtenção dos bioconjugados LO2121 (SEQ ID NO: 1), LO2122 (SEQ ID NO: 2) e LO2123 (SEQ ID NO: 3).
2. Bioconjugados peptídicos, obtidos conforme descrito na reivindicação 1, **caracterizados por** compreenderem a associação do peptídeo antitumoral Melitina (SEQ ID NO: 5) e o peptídeo aptâmero P7 (SEQ ID NO: 4).
3. Bioconjugado peptídico LO2121, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado por** ser compreendido pela SEQ ID NO: 1, resultante da síntese em fase sólida de Peptídeo P7 (SEQ ID NO: 4) + Melitina (SEQ ID NO: 5).
4. Bioconjugado peptídico LO2122, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado por** ser compreendido pela SEQ ID NO: 2, resultante da síntese em fase sólida de Melitina (SEQ ID NO: 5) + Peptídeo P7 (SEQ ID NO: 4).
5. Bioconjugado peptídico LO2123, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado por** ser compreendido pela SEQ ID NO: 3, resultante da síntese em fase sólida de Melitina (SEQ ID NO: 5) + espaçador hidrofílico (Fmoc- AEEA-OH) + Peptídeo P7 (SEQ ID NO: 4).
6. Uso dos bioconjugados peptídicos, definido de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 5, **caracterizado por** ser para a preparação de composições antitumorais a serem empregadas no tratamento de células cancerígenas apresentadoras do marcador tumoral CD44.
7. Uso dos bioconjugados peptídicos, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelos** bioconjugados serem empregados em concentrações de 128 µg/mL a 1 µg/mL.

8. Uso dos bioconjugados peptídicos, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelos** bioconjugados LO2122 (SEQ ID NO:2) e LO2123 (SEQ ID NO:3) serem, preferencialmente, empregados na concentração de 16 µg/mL.
9. Uso dos bioconjugados peptídicos, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo** bioconjugado LO2123 (SEQ ID NO:3) ser empregado, preferencialmente, na concentração de 8 µg/mL.

**FIGURA 1**

**FIGURA 2**

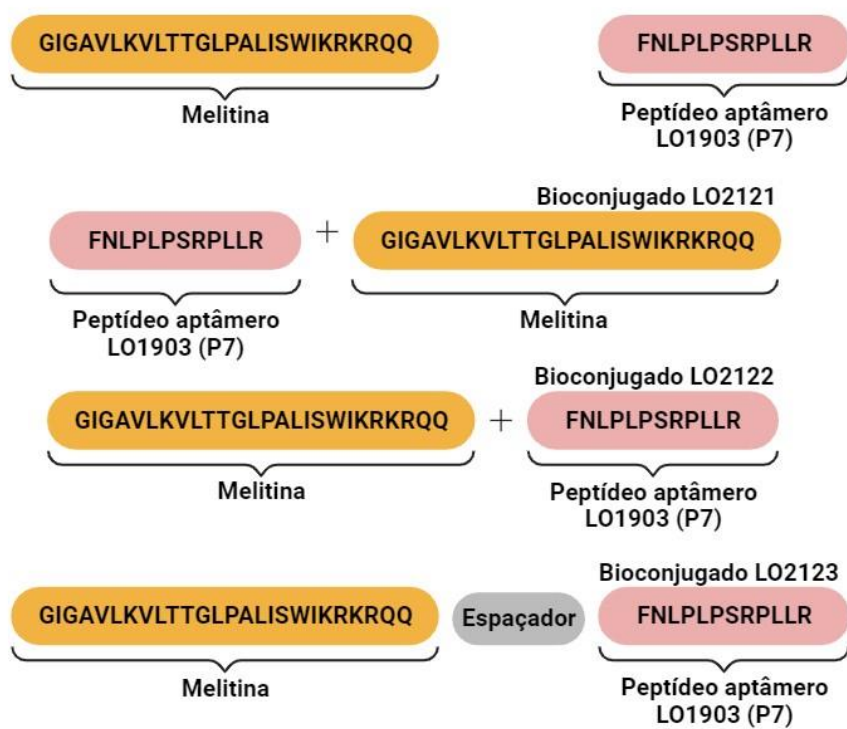


FIGURA 3

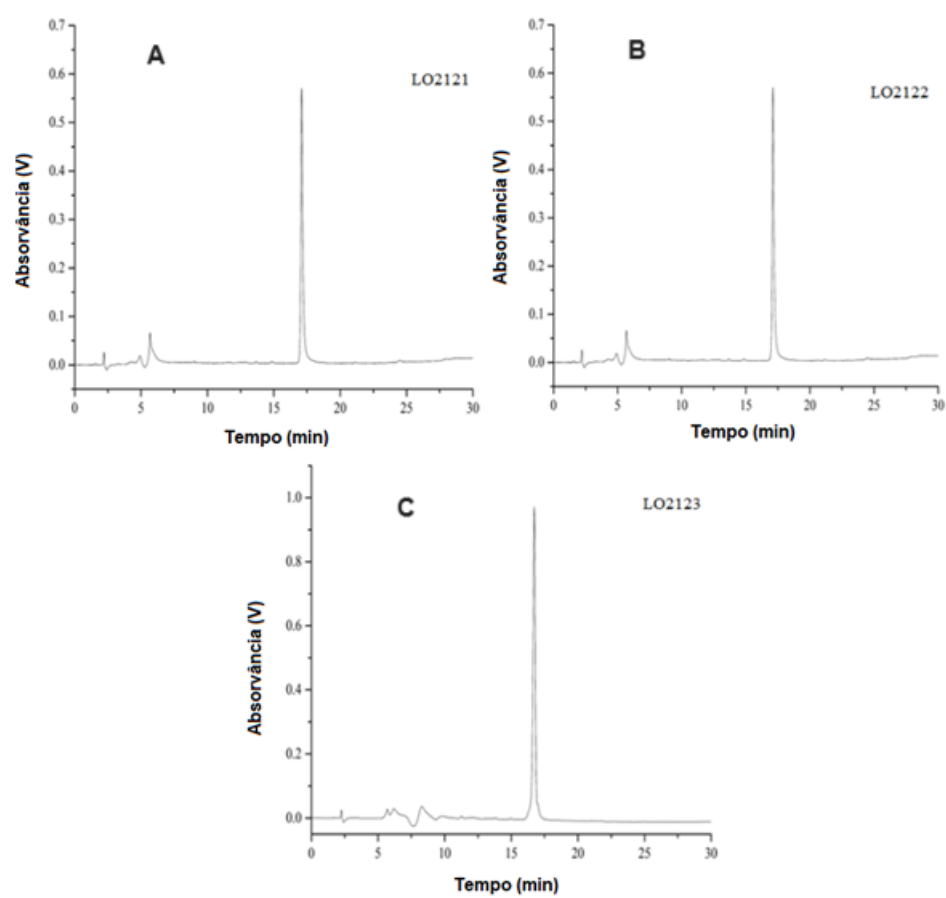


FIGURA 4

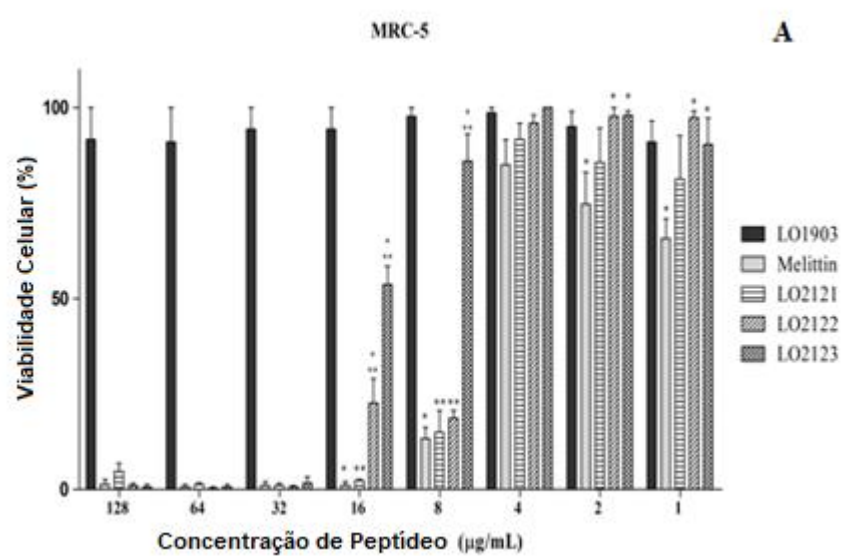
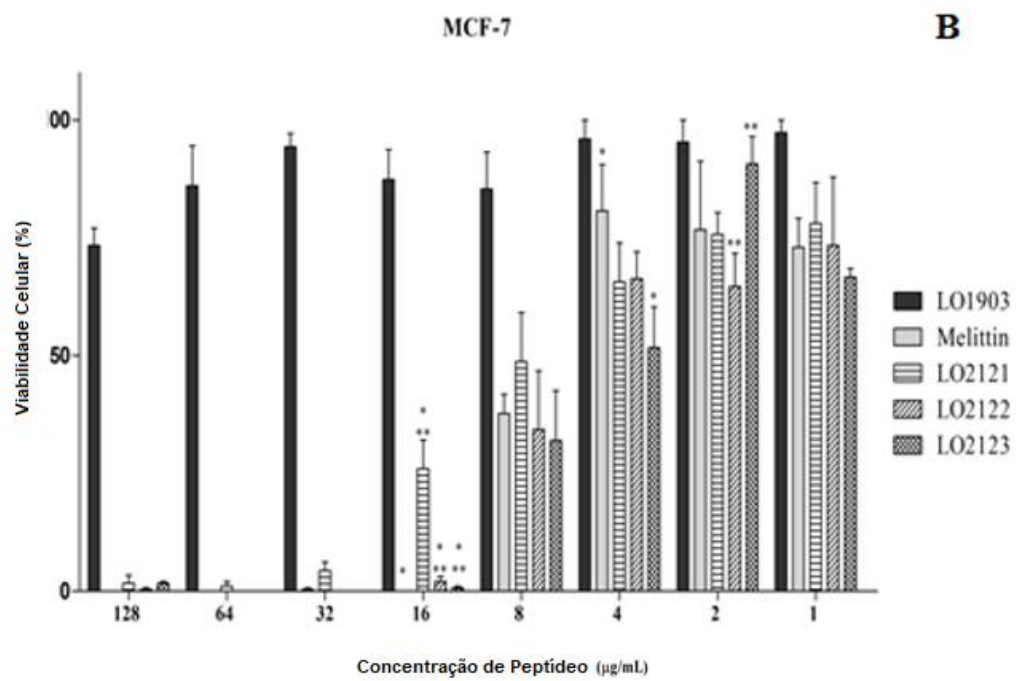


FIGURA 5A

**FIGURA 5B**

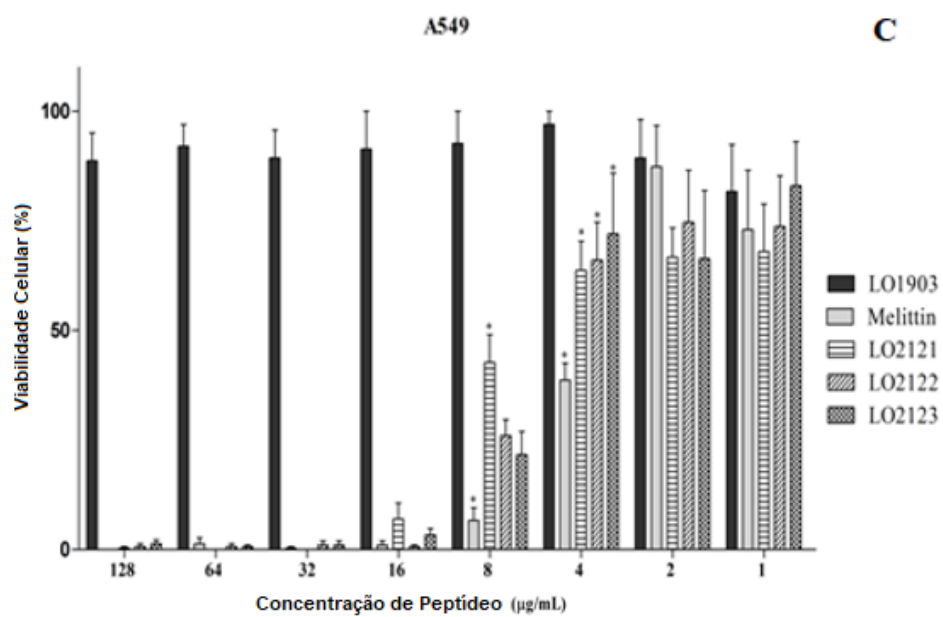


FIGURA 5C

RESUMO

**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE BIOCONJUGADOS PEPTÍDICOS,
BIOCONJUGADOS PEPTÍDICOS E SEUS USOS COMO ANTITUMORAIS**

A presente invenção se refere a obtenção de bioconjugados entre Melitina (SEQ ID NO: 5) e o peptídeo aptâmero P7 (SEQ ID NO: 4), sendo esses: bioconjugado LO2121 (SEQ ID NO: 1), constituído de peptídeo P7 + Melitina; bioconjugado LO2122 (SEQ ID NO: 2), constituído de Melitina + peptídeo P7; e Bioconjugado LO2123 (SEQ ID NO: 3), constituído de Melitina + espaçador + peptídeo P7, com ligação de espaçador hidrofílico (Fmoc- AEEA-OH), a serem usados no tratamento de células cancerígenas apresentadoras do marcador tumoral CD44. Os bioconjugados apresentam alta especificidade para células cancerígenas, com citotoxicidade significativa em células tumorais e maior viabilidade celular em linhagens celulares não tumorais, além de estabilidade no soro em diferentes concentrações, representando um grande avanço tecnológico no tratamento quimioterápico contra células tumorais em diversos tipos de câncer devido à facilidade de síntese, seletividade, alta toxicidade em tumores e facilidade de penetração celular.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de
- Data de Geração do Código: 19/12/2023
- Hora de Geração do Código: 19:05:38
- Código de Controle:
 - Campo 1: 7928AF2A3F9674C1
 - Campo 2: 076097B8B67EAE01