



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

(21) BR 102019001518-7 A2



(22) Data do Depósito: 24/01/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 16/11/2021

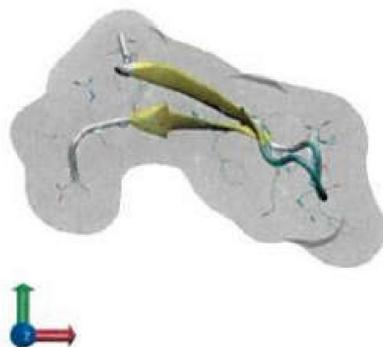
(54) **Título:** PEPTÍDEO SINTÉTICO, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DO PEPTÍDEO SINTÉTICO NA PREPARAÇÃO DE UM AGENTE CONTRA BACTÉRIAS E FUNGOS

(51) **Int. Cl.:** C07K 14/415; A61P 31/04; A61P 31/10.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** ANA MARIA BENKO ISEPPON; CARLOS ANDRÉ DOS SANTOS SILVA; LÍVIA MARIA BATISTA VILELA; SÉRGIO CROVELLA; MARX OLIVEIRA DE LIMA.

(57) **Resumo:** PEPTÍDEO SINTÉTICO, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DO PEPTÍDEO SINTÉTICO NA PREPARAÇÃO DE UM AGENTE CONTRA BACTÉRIAS E FUNGOS. A presente invenção descreve um peptídeo sintético obtido a partir de uma defensiva de *Manihot esculenta*. Especificamente, a presente invenção compreende um peptídeo sintético útil como um agente contra bactérias e fungos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*. A presente invenção se situa nos campos da bioquímica, química, biologia molecular, genética e farmácia.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

PEPTÍDEO SINTÉTICO, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DO PEPTÍDEO SINTÉTICO NA PREPARAÇÃO DE UM AGENTE CONTRA BACTÉRIAS E FUNGOS

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção descreve um peptídeo sintético obtido a partir de uma defensina de *Manihot esculenta* sendo útil para uso contra diversas bactérias e fungos. A presente invenção se situa nos campos da bioquímica, química, biologia molecular, genética e farmácia.

Antecedentes da Invenção

[0002] Desde que o primeiro antibiótico foi descoberto por Alexander Fleming em 1949, o uso inadequado de antibióticos se tornou um fator fundamental para desencadear uma enorme quantidade de cepas bacterianas resistentes, o que gerou um problema sério e oneroso de saúde pública mundial, reconhecido por organizações mundiais como a Organização Mundial da Saúde (OMS) e Organização das Nações Unidas (ONU), bem como o centro de controle e doenças dos EUA e o centro de controle de doenças europeu.

[0003] Neste contexto, os peptídeos antimicrobianos (AMPs) surgem como uma opção inovadora na luta contra infecções graves causadas por bactérias resistentes a inúmeros medicamentos já consolidados no mercado. Os AMPs são considerados menos susceptíveis aos processos de resistência bacteriana do que os antibióticos tradicionais, apresentando potencial para o desenvolvimento de uma nova classe de agentes terapêuticos (CÂNDIDO et al., 2014). Atualmente o Colistin figura como um ciclopeptídeo é considerado como a última linha de terapia antimicrobiana usada contra microrganismos resistentes a múltiplos fármacos (SIERRA et al, 2017).

[0004] Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o

tema:

[0005] O documento CN107022549 revela uma proteína recombinante defensina obtida a partir de um gene β -defensina recombinante de *Pelteobargrus fulvidraco*, com atividade bacteriostática em bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri* e *Flavobacterium columnare*. Sugerindo-se o uso como droga antibacteriana de amplo espectro na aquicultura.

[0006] O documento JP2017132755 revela um promotor de produção de defensina com propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais. Esses promotores foram obtidos a partir de extratos de *Panax ginseng*. O documento se diferencia da presente invenção por apresentar um promotor de produção de defensina obtido de uma fonte natural e com uma sequência diferente da presente invenção.

[0007] O documento KR20170023352 revela um peptídeo antibacteriano isolado de *Hermetia illucens* para uso na prevenção e tratamento de doenças bacterianas. A presente invenção se diferencia do documento por apresentar as sequências de diferentes de peptídeos.

[0008] O documento US2017049102 revela uma combinação de defensina de plantas ou um derivado funcional sintético ou natural ou variantes destes e um peptídeo não defensina, usada para inibir o crescimento ou infecção ou infestação de um patógeno. O documento se diferencia da presente invenção por apresentar um peptídeo não defensina com sequência distinta aos peptídeos relatados na invenção.

[0009] O documento US2017029842 revela uma molécula de defensina modificada com atividade antipatógena utilizada nos campos da horticultura, agricultura e medicamentos para humanos e animais. A presente invenção apresenta uma sequência diferente do documento.

[0010] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e

atividade inventiva frente ao estado da técnica.

[0011] Sendo que a solução aqui proposta resolve o problema de falta de substâncias alternativas contra a resistência bacteriana.

Sumário da Invenção

[0012] Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir de um peptídeo sintético obtido a partir de uma defensina de *Manihot esculenta* sendo útil como um agente contra bactérias e fungos, destacando-se contra linhagens ATCC e resistentes como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginos*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*.

[0013] A presente invenção tem como conceitos inventivos os seguintes objetos:

[0014] A presente invenção tem como primeiro objeto um peptídeo sintético que compreende pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID N°1 ou SEQ ID N° 2.

[0015] A presente invenção tem como segundo objeto o processo de obtenção do peptídeo sintético que compreende as seguintes etapas:

- a) Seleção e caracterização das sequências;
- b) Realizar modificações nas sequências escolhidas;
- c) Testes *in silico*; e,
- d) Síntese do peptídeo em fase sólida.

[0016] A presente invenção tem como terceiro objeto o uso do peptídeo sintético para preparar uma formulação farmacêutica contra bactérias e fungos.

[0017] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0018] Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente, são apresentadas as seguintes figuras:

[0019] A figura 1 mostra o alinhamento das sequências caracterizadas representando-se em azul o peptídeo sinal, em verde a região do domínio conservado e, nas linhas fragmentadas, as quatro pontes dissulfeto conservadas entre os oito resíduos de cisteínas. Na base da figura pode-se observar a representação da estrutura secundária na qual as setas em amarelo representam as folhas-beta e a espiral em vermelho e amarelo representa a alfa-hélice.

[0020] A figura 2 mostra os modelos tridimensionais dos peptídeos reduzidos. Os modelos representam como as estruturas podem estar se dobrando. A – Estrutura 1, B – estrutura 2. Apesar dos modelos serem parecidos, a estrutura 1 se mostra com maior conteúdo de folhas-betas paralelas entre si (setas em amarelo), e um *coil* (um dobramento contorcido em azul claro) que separa a estrutura. Essa estrutura apresenta quatro resíduos de cisteínas que formam duas pontes dissulfeto, aumentando assim sua estabilidade.

[0021] A figura 3 mostra a variação do RMSD das duas estruturas modeladas (estrutura 1 em preto e estrutura 2 em vermelho) após a simulação computacional. Mostrando como os modelos tridimensionais procuram se manter estáveis em simulação em dinâmica molecular interagindo com o solvente (neste caso a água equilibrada com íons de cloro).

[0022] A figura 4 mostra a estrutura do peptídeo de SEQ ID N°1 com duas folhas betas paralelas entre si (setas amarelas) e um *coil* (um dobramento contorcido em azul claro) que separa a estrutura.

[0023] A figura 5 mostra o espectro de massa/carga do peptídeo sintético de SEQ ID N°1, revelando uma massa compatível com formação de pontes dissulfeto.

[0024] A figura 6 mostra o cromatograma do peptídeo sintético de SEQ ID N°1 em coluna de fase reversa, mostrando o grau de pureza do peptídeo.

[0025] A figura 7 mostra o gráfico da análise de toxicidade pela técnica de MTT em células do tipo macrófagos de rato. Demonstrando a baixa toxicidade do peptídeo sintético de SEQ ID N°1 contra este tipo de célula.

[0026] A figura 8 mostra o gráfico do teste de hemólise em células eritrocitárias humanas. Mostrando que em as concentrações testadas do peptídeo sintético de SEQ ID N°1 não apresentou citotoxicidade.

Descrição Detalhada da Invenção

[0027] Aqui, será relatado um peptídeo sintético obtido a partir de uma defensina de *Manihot esculenta* sendo útil para preparar uma formulação farmacêutica contra bactérias e fungos. Uso, este, identificado por testes de atividade antimicrobiana contra diversos patógenos de linhagens ATCC e resistente a antibióticos, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginos*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* e fungos como *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*.

[0028] A sequência de aminoácidos que constitui o peptídeo sintético não é igual á sequência encontrada na natureza, ou seja, não é igual a sequência de defensina da *Manihot esculenta*.

[0029] A sequência de defensina foi identificada pela análise da biblioteca contida no banco de dados PhyAMP, e a partir da identificação foram realizadas modificações. Inicialmente a sequência foi reduzida de 46 aminoácidos para 20 aminoácidos, preservando o máximo do domínio conservado presente na estrutura e observando se as sequências mantinham a mesma predição de atividade antimicrobiana por experimentos *in silico*.

[0030] A fim de obter uma estrutura anfipática, foram adicionados quatro resíduos de Glicina (G) e quatro resíduos de Arginina (R) na sequência obtendo-se a SEQ ID N°1, notando-se que estes potencializavam a atividade antimicrobiana do peptídeo e, portanto, a adição desses aminoácidos foi mantida na sequência. Posteriormente, confirmou-se *in vivo* o potencial antimicrobiano dessas sequências.

[0031] Em um primeiro objeto a presente invenção apresenta um

peptídeo sintético que compreende uma sequência com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID N°1 ou SEQ ID N° 2.

[0032] Em uma concretização, a presente invenção apresenta o peptídeo sintético consistindo em uma sequência com pelo menos 90 % de identidade com SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N° 2.

[0033] Em uma concretização, a presente invenção apresenta o peptídeo sintético compreendendo uma sequência da SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N° 2.

[0034] Em uma concretização, a presente invenção apresenta o peptídeo sintético consistindo de uma sequência da SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N° 2.

[0035] Em uma concretização, a presente invenção apresenta o peptídeo sintético compreendendo uma sequência da SEQ ID N°1.

[0036] Em uma concretização, a presente invenção apresenta o peptídeo sintético consistindo em uma sequência da SEQ ID N°1.

[0037] Em uma concretização, a presente invenção apresenta o peptídeo sintético compreendendo uma sequência da SEQ ID N°2.

[0038] Em uma concretização, a presente invenção apresenta o peptídeo sintético consistindo em uma sequência da SEQ ID N°2.

[0039] Em um segundo objeto a presente invenção apresenta o processo de obtenção do peptídeo sintético que compreende as seguintes etapas:

- a) Seleção e caracterização das sequências;
- b) Realizar modificações nas sequências escolhidas;
- c) Testes *in silico*; e,
- d) Síntese do peptídeo em fase sólida.

[0040] Em uma concretização, a etapa (a) compreende a seleção das sequências a partir de uma base de dados e a caracterização é realizada pelo domínio conservado, presença ou ausência de peptídeo sinal e verificação da conservação de pontes dissulfeto.

[0041] Em uma concretização, a etapa (b) compreende redução das sequências para 20 aminoácidos e adição de aminoácidos selecionados do grupo consistindo de arginina, glicina, histidina e isoleucina.

[0042] Em uma concretização, a etapa (b) compreende redução das sequências para 20 aminoácidos e adição de 4 argininas e 4 glicinas na SEQ ID N°1 ou 3 histidinas, 1 arginina e 1 isoleucina na SEQ ID N° 2.

[0043] Em uma concretização, a etapa (c) compreender testes de dinâmica molecular.

[0044] Em um terceiro objeto a presente invenção apresenta o uso do peptídeo sintético para preparar uma formulação farmacêutica contra bactérias e fungos.

[0045] Em uma concretização, a presente invenção apresenta o uso do peptídeo em que as ditas bactérias são *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginos*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*,

Em que as cepas são resistentes ou não resistentes a antibióticos.

[0046] Em uma concretização, a presente invenção apresenta o uso do peptídeo em que os ditos fungos são leveduras.

[0047] Em uma concretização a presente invenção apresenta o uso do peptídeo em que as leveduras são *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*.

[0048] A presente invenção traz como vantagem o fato do peptídeo sintético não apresentar atividade hemolítica contra células eritrocitárias humanas, sendo que a hemólise é um problema recorrente em fármacos derivados de peptídeos. Além disso, o peptídeo é capaz de manter sua seletividade de membrana (equilíbrio de cargas em estrutura anfipática) contra os patógenos, e assim minimizar os efeitos citotóxicos. Ainda, a síntese desse peptídeo tem custo e complexidade diminuídos por se tratar de uma molécula com uma quantidade pequena de aminoácidos (20 aminoácidos).

Exemplos

[0049] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de

exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

Exemplo 1. Obtenção e caracterização das sequências de defensinas

[0050] Inicialmente, foram pesquisadas sequências de defensinas com atividade predita através do banco de dados PhyAMP. Em seguida, foi realizado um alinhamento de sequências, pela ferramenta BLASTp, contra o genoma de *Manihot esculenta* disponível no banco de dados NCBI. O alinhamento foi realizado com o objetivo de verificar se existiam sequências similares com as sequências obtidas no PhyAMP.

[0051] Após a retirada das sequências repetidas, encontradas pelo alinhamento, obteve-se os genes candidatos (cinco sequências). Essas sequências de genes foram caracterizadas com ferramentas *on-line* a fim de constatar que se tratava de sequências de defensinas como mostra a Figura 1. As ferramentas online utilizadas foram: *CD-Search para observar* o domínio conservado; *SignalP* para verificação da presença ou ausência de peptídeo sinal e *Disulfite* e *DIANNA* para observação da conservação das pontes dissulfeto.

Exemplo 2. Predição de atividade antimicrobiana das sequências caracterizadas anteriormente

[0052] A predição das sequências anteriormente caracterizadas foi realizada através da ferramenta *on-line* CAMP_{R3} (*AMP Prediction*). Escolheu-se uma defensina de 46 aminoácidos e utilizando a ferramenta *Predict Antimicrobial region within Peptid*, adicionou-se a sequência *FASTA* e colocou-se o tamanho desejado da sequência na sessão *Peptide Length* adicionando os algoritmos desejados para as análises. Na presente invenção os algoritmos utilizados foram: *SVM, Random Forest, Artificial Neural Network e Discriminant Analysis*. Os resultados foram analisados, avaliando-se quais os maiores valores para cada algoritmo.

[0053] A Tabela 1 mostra os resultados obtidos da predição, com os valores obtidos de cada algoritmo para as sequências SEQ ID N°1 e SEQ ID

Nº2.

Tabela 1. Resultado da predição de atividade antimicrobiana para SEQ ID Nº1 e SEQ ID Nº2

Sequência	SVM	RFC	ANN	DA
SEQ ID Nº1	0.912	0.9855	AMP*	1.000
SEQ ID Nº2	0.945	0.8005	AMP*	1.000

*AMP: Peptídeo Antimicrobiano, do inglês *Antimicrobial Peptide*

[0054] Em seguida, com as mesmas sequências, foram desenhados *primers*, com a ferramenta *on-line* Primer3plus, para que fosse verificado se aquelas sequências estavam presentes no DNA (extraído previamente) de *Manihot esculenta* através da técnica de PCR.

[0055] As sequências amplificadas pela técnica de PCR foram enviadas para sequenciamento a fim de obter toda a sequência e compará-la com a sequência obtida no banco de dados. Confirmou-se, então, que se tratavam de sequências defensina de *Manihot esculenta* com 46 aminoácidos no seu domínio conservado.

[0056] Essas sequências sofreram modificações dentre as quais:

- a redução das sequências de 46 aminoácidos para 20 aminoácidos pela ferramenta CAMP_{R3} (*Predict Antimicrobial region within Peptides*), preservando o máximo do domínio conservado presente na estrutura, e assim, facilitando a síntese em fase sólida. O domínio conservado é definido como aquele que possui aminoácidos importantes que são conservados em todas as sequências, uma vez que se mutados a atividade antimicrobiana é reduzida;

- adição de resíduos de aminoácidos sendo quatro resíduos de Glicina (G) e quatro resíduos de Arginina (R) na SEQ ID Nº 1 e três histidinas, uma arginina e uma isoleucina na SEQ ID Nº2, para manter a estrutura anfipática, com superfície de carga predominantemente catiônica e hidrofóbica.

- preservar resíduos de cisteínas da estrutura nativa para manter estabilidade da molécula.

[0057] Em seguida, observando se as sequências mantinham a mesma predição de atividade antimicrobiana nos testes *in silico*, apresentando valores acima do ponto de corte para os quatro algoritmos analisados *in silico* na predição de atividade antimicrobiana com a ferramenta *Predict Antimicrobial Peptides*. Dessa forma foram obtidas as SEQ ID N°1 e SEQ ID N°2.

Estabilidade da molécula e interação com solvente

[0058] Para determinar a estabilidade das sequências de peptídeo modificadas foi realizado um teste de simulação em computador em dinâmica molecular. Inicialmente, as estruturas das duas sequências modificadas (SEQ ID N°1 e SEQ ID N°2) foram modeladas (representadas de forma tridimensional) através do programa Rosetta, conforme Figura 2.

[0059] Em seguida, a estrutura 3D foi colocada em uma caixa desenhada no programa GROMACS, em um ambiente virtual contendo o solvente (água e íons de cloreto), sendo a estrutura do peptídeo observada por um determinado tempo sob temperatura e pressão constantes. O resultado da simulação está apresentado na Figura 3.

[0060] Com o gráfico da RMSD (Desvio da raiz quadrada média) (Figura 3), no qual é possível observar que a estrutura 1 (em preto – SEQ ID N°1) obteve menor variação de sua estrutura em contato com a água em relação a estrutura 2 (em vermelho – SEQ ID N°2).

[0061] Pelo modelo tridimensional do peptídeo de SEQ ID N°1 foi possível observar que a estrutura se mostra com duas folhas betas paralelas entre si e um *coil* que separa a estrutura. A estrutura também apresenta pontes dissulfeto formadas pelos resíduos de cisteína promovendo uma estabilidade na estrutura (Figura 4).

[0062] Esses resultados da variação estrutural do peptídeo de SEQ ID N°1 mostram que, apesar da conformação inicial ter sido alterada, a estrutura se manteve estável durante todo o processo, e assim, pode-se concluir que mesmo que a proteína mude sua estrutura para interagir com as moléculas, ela mantém preservada sua estrutura secundária.

Exemplo 3. Síntese do peptídeo sintético

[0063] A síntese do peptídeo sintético de uma SEQ ID N°1 foi realizada em fase sólida.

[0064] O peptídeo foi sintetizado quimicamente por um método de fase sólida utilizando a metodologia Fmoc num sintetizador de peptídeos *Applied Biosystems* 433A. As resinas Fmoc-Asp (o-tBu) ou Fmoc-Leu (o-tBu) foram utilizadas para proporcionar um carboxilo livre no C-terminal do peptídeo.

[0065] A clivagem e a desproteção de peptídeos, de resinas e de grupos protetores da cadeia lateral, foram realizadas utilizando uma mistura química composta por 1 g de fenol cristalino, 0,2 g de imidazol, 1 mL de tioanisol, 0,5 mL de 1,2-etanoditiol em 20 mL de ácido trifluoroacético (TFA). A resina foi removida por filtração e os peptídeos desprotegidos em solução foram precipitados utilizando éter frio.

[0066] O peptídeo precipitado foi lavado duas vezes com éter dietílico frio para remover os sequestrantes e grupos protetores remanescentes. A pureza da pureza do peptídeo (> 95%) foi confirmada por RP-HPLC e espectrometria de massa. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Phenomenex Gemini-NX de fase reversa (C18, 5 µm, 110 Å, 4,6 mm × 250 mm) usando um gradiente de 25-50% de acetonitrila / TFA 0,1% em 25 min a 1 mL / min vazão. Soluções estoques foram preparadas dissolvendo com precisão alíquotas de peptídeo em água destilada.

[0067] O espectro de massa/carga do peptídeo de SEQ ID N°1 mostra uma massa compatível com a formação de pontes dissulfeto (Figura 5). O cromatograma do peptídeo de SEQ ID N°1 em coluna de fase reversa (Figura 6) mostra um grau de pureza de 95% do peptídeo sintético.

Exemplo 4. Atividade antimicrobiana

Metodologia

[0068] A atividade antimicrobiana foi realizada pelo método padrão recomendado pelo CLSI (*Clinical and laboratory standards institute - Gold Standard in Antimicrobial Susceptibility Testing* (AST)) em microdiluição em

caldo.

[0069] A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) contra o peptídeo sintético de SEQ ID N°1 foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo seguindo as recomendações do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2015) com modificações.

[0070] Para isso, o peptídeo sintético de SEQ ID N°1 em caldo Müller-Hinton com ajuste catiônico (CA-MHB) (Sigma) foi adicionado à placa sob diluição serial (50 µL). As células bacterianas foram cultivadas em Müller Hinton (Himedia) com 1 mL de CA-MHB durante a noite a 37 °C e foi determinada pela densidade de oxigênio dissolvido (OD625nm de 0,08-0,13 AU) correspondente a 0,5 da escala de McFarland (1×10^8 CFU.mL⁻¹). A solução foi diluída (1: 1000) em CA-MHB e inoculada nos poços da placa de microdiluição (50 µL) para que a concentração final de densidade bacteriana fosse de aproximadamente $1-5 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹. Determinaram-se as MIC como a menor concentração de peptídeo que inibiu o crescimento bacteriano após incubação a 37 °C durante 18 a 20 h, sendo utilizado o meio CA-MHB não inoculado como controle negativo e as culturas sem adição de peptídeo serviram como controle positivo.

[0071] Para o MBC, foi realizado o plaqueamento de 10 µL de cada poço que não apresentou crescimento visível na placa de Müller-Hinton e incubado por 24 horas a 37 °C, sendo considerado MBC a concentração em que não apresentou crescimento bacteriano. As cepas bacterianas utilizadas no experimento foram fornecidas pelo laboratório de microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães (Fiocruz / PE). O peptídeo sintético de SEQ ID N°1 foi testado contra estirpes Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e resistentes *S. aureus* MRSA04673 e Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* resistente Pa_39, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e *K. pneumoniae* resistentes a Carbapenemase L016, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 e *A. baumannii* resistente a Acb

45, respectivamente. Os experimentos foram realizados em duplicatas em diferentes intervalos de tempo.

[0072] A MIC antifúngica foi realizada seguindo as diretrizes do CLSI M27-A3 (2008). O peptídeo sintético de SEQ ID N°1 foi diluído em água destilada. O antifúngico comercial Fluconazol® e a cepa de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 como levedura padrão de controle foram utilizados como referência. As leveduras foram cultivadas em Dextrose Agar Sabouraud (SDA; Difco) e incubadas durante 48 h a 37 °C. Para as leveduras, foram realizadas duas diluições seriadas de 1: 100 e 1:20 para obtenção do inoculo final contendo 1,0 a 5,0 x 10⁶ UFC.mL⁻¹. Esta solução foi inoculada em toda a placa de 96 poços contendo meio de cultura padrão RPMI 1640, tamponado a pH 7,0 com 0,1 M de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS), para obter a concentração final de 512 µg.mL⁻¹ para cada levedura testada. As leveduras foram incubadas a 37 °C e visualizadas 24 e 48h depois. Os fungos utilizados no experimento vieram do microclimpo localizado no Departamento de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco, sendo *Candida albicans* 4986, *Candida parapsilosis* 4970 e *Cryptococcus neoformans* 5980 resistentes a múltiplas drogas, incluindo cepas de origem clínica. As MICs corresponderam às menores concentrações de fármaco que apresentaram inibição do crescimento em comparação com fungos não tratados.

Resultados

[0073] Os resultados dos testes antimicrobianos do peptídeo de SEQ ID N°1 contra bactérias e fungos são apresentados na Tabela 2. Em geral, o peptídeo de SEQ ID N°1 apresentou melhor atividade contra *S. aureus* (único teste de Gram-positivo) com MIC 16 µg.mL⁻¹ para a cepa ATCC (25923) e 256 µg.mL⁻¹ para *S. aureus* resistente à metilina (MRSA04673). Considerando as cepas Gram-negativas, o peptídeo de SEQ ID N°1 apresentou melhores resultados contra *A. baumannii* com MIC de 64 µg.mL⁻¹, enquanto para *K. pneumoniae* (ATCC 13883) e *P. aeruginosa* (Pa_39) com MIC de 128 µg.mL⁻¹ para ambos. No entanto, na concentração bactericida mínima (MBC), o

peptídeo de SEQ ID N°1 apresentou 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S. aureus* ATCC (25923), enquanto para a linhagem resistente a *S. aureus* (MRSA04673) apresentou MBC $>1024 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e resultados semelhantes para *K. pneumoniae resistant* (L016) e *A. baumannii* ATCC (19606).

[0074] A atividade antifúngica do peptídeo de SEQ ID N°1 apresentou melhores resultados contra *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans* na concentração de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para ambas as leveduras, enquanto para *Candida albicans* foi de 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana do peptídeo de SEQ ID N°1 ($\mu\text{g/mL}$) contra diversos patógenos.

Cepas	Microrganismos	Resultados em ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
		MIC	MBC
ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i>	16	64
Resistant MRSA04673	<i>S. aureus</i>	256	>1024
ATCC 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	256	256
Resistant Pa_39	<i>P. aeruginosa</i>	128	512
ATCC 13883	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	128	512
Carbapenemase L016	<i>K. pneumoniae</i>	1024	>1024
ATCC 19606	<i>Acinetobacter baumannii</i>	64	1024
Resistant Acb 45	<i>A. baumannii</i>	128	512
4986	<i>Candida albicans</i>	128	-
4970	<i>Candida parapsilosis</i>	64	-
5980	<i>Cryptococcus neoformans</i>	64	-

MIC = Concentração Inibitória Mínima;

MBC – Concentração Bactericida Mínima

Exemplo 5. Teste de citotoxicidade e hemólise

Metodologia

[0075] A avaliação da citotoxicidade do peptídeo de SEQ ID N°1 foi realizada a partir do teste de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) com células do tipo macrófagos de rato, determinando-se do número de células usando leitores de

absorbância de microplacas padrão. O ensaio MTT envolve a redução do MTT solúvel em água (brometo de 3-(4,5-dimethyliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) em formazano insolúvel que tem uma cor púrpura em células vivas. O Formazan é então solubilizado (com auxílio de dimetilsulfóxido) e a concentração é determinada pela densidade óptica a 500 - 600 nm. O resultado é um ensaio sensível com excelente linearidade até aproximadamente 10^6 células por poço.

[0076] O teste de hemólise consiste em avaliar a atividade hemolítica incubando suspensões de eritrócitos humanos com diluições em série do peptídeo (16 – 1024 $\mu\text{g/mL}$).

[0077] Os glóbulos vermelhos foram lavados várias vezes em PBS e centrifugado até a densidade óptica do sobrenadante atingir a do controle (contendo apenas PBS). As hemácias foram contadas por um hemocítmetro e os eritrócitos foram então incubados à temperatura ambiente por 1 h em Triton X-100 a 10% (controle de hemólise positivo), em PBS (que serviu de controle negativo de hemólise) e com o peptídeo em diferentes concentrações de 16, 32, 64, 128, 256, 512 e 1024 $\mu\text{g/mL}$. As amostras foram então centrifugadas e o sobrenadante foi separado do sedimento e a sua absorbância medida a 570 nm foi verificada. A densidade óptica relativa comparada com a da suspensão tratada com Triton X-100 a 10% foi definida como a percentagem de hemólise.

[0078] Os resultados de ambos os testes são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Toxicidade do peptídeo de SEQ ID N°1 e Teste de hemólise

Resultado em ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
MTT	<256
Hemólise	>1064

[0079] No teste MTT observa-se que a dose do peptídeo sintético que pode ser inicialmente considerada tóxica para as células testadas está maior ou igual a 256 $\mu\text{g/mL}$. Já no teste de hemólise, para as células eritrocitárias

humanas, a maior dose testada foi 1024 µg/mL e essa não causou hemólise suficiente para ser considerado tóxica, como mostram as Figuras 7 e 8 referentes ao gráfico de MTT e teste de hemólise, respectivamente.

[0080] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. Peptídeo sintético **caracterizado** por compreender uma sequência de pelo menos 90 % de identidade com SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N° 2.

2. Peptídeo sintético, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por consistir em uma sequência com pelo menos 90 % de identidade com SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N° 2.

3. Peptídeo sintético, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por compreender uma sequência da SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N° 2.

4. Peptídeo sintético, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** por consistir em uma sequência da SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N° 2.

5. Peptídeo sintético de acordo com reivindicação 1, **caracterizado** pela SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2 ser obtida a partir da defensina modificada de *Manihot esculenta*.

6. Processo de obtenção do peptídeo sintético, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** por compreender as seguintes etapas:

- a) Seleção e caracterização das sequências;
- b) Realizar modificações nas sequências escolhidas;
- c) Testes *in silico*; e,
- d) Síntese do peptídeo em fase sólida

7. Processo, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pela etapa (a) compreender a seleção das sequências a partir de uma base de dados e a caracterização ser realizada pelo domínio conservado, presença ou ausência de peptídeo sinal e verificação da conservação de pontes dissulfeto.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pela etapa (b) compreender redução das sequências para 20 aminoácidos e adição de aminoácidos selecionados do grupo consistindo de arginina, glicina, histidina e isoleucina.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pela etapa (c) compreender testes de dinâmica molecular.

10. Uso do peptídeo sintético, conforme definido na reivindicação 1, **caracterizado** por ser para preparar uma formulação farmacêutica contra bactérias e fungos.

11. Uso, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelas ditas bactérias serem *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginos*, *Klebisiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*,

em que as cepas são resistentes ou não resistentes à antibióticos.

12. Uso, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelos ditos fungos serem leveduras.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelas leveduras serem *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*.

Figuras

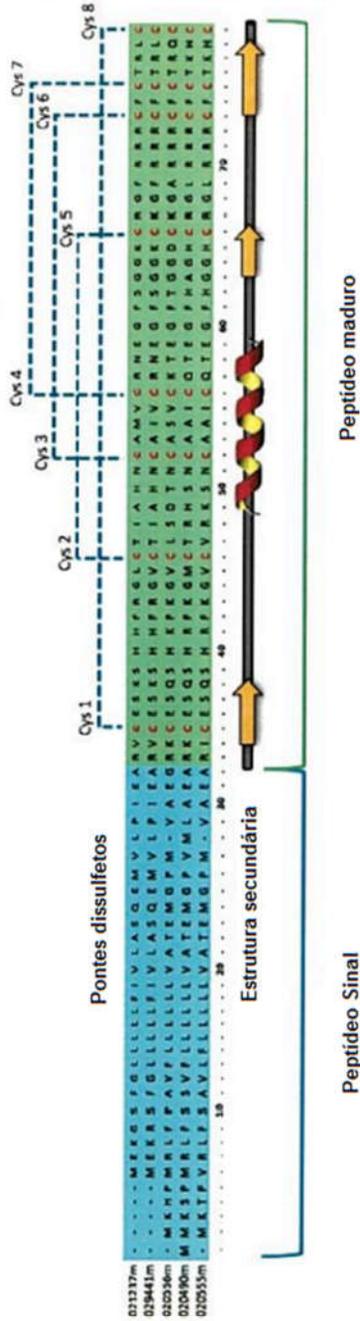


Figura 1

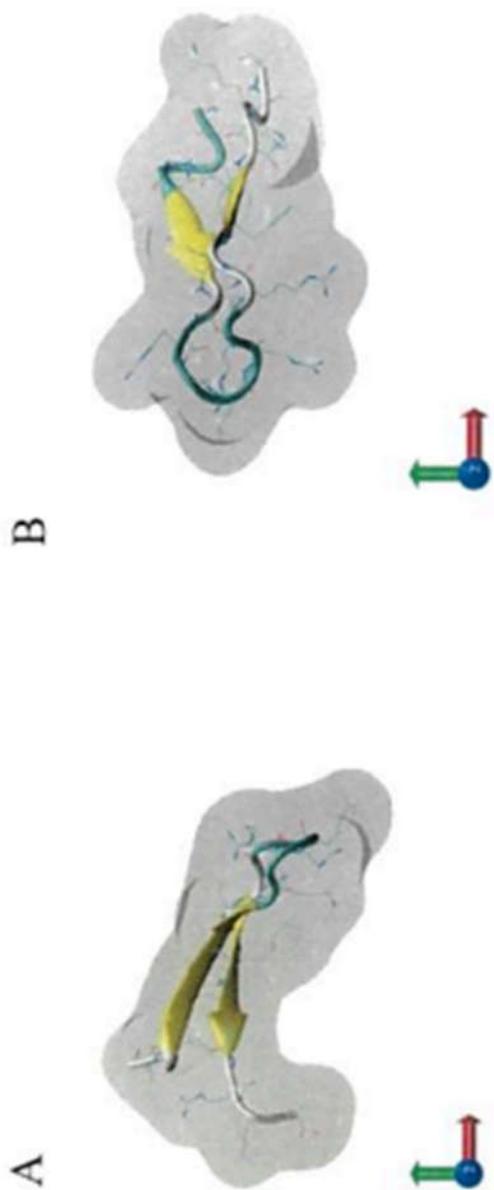


Figura 2

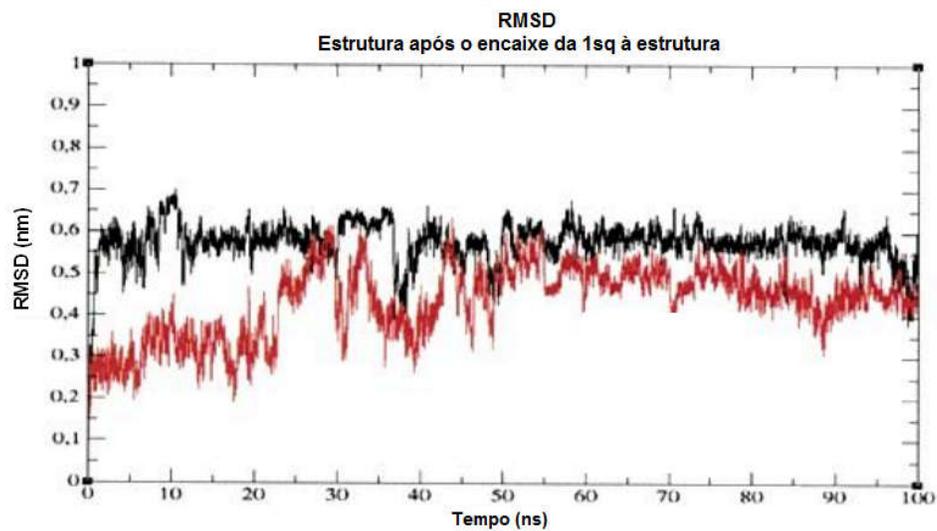


Figura 3

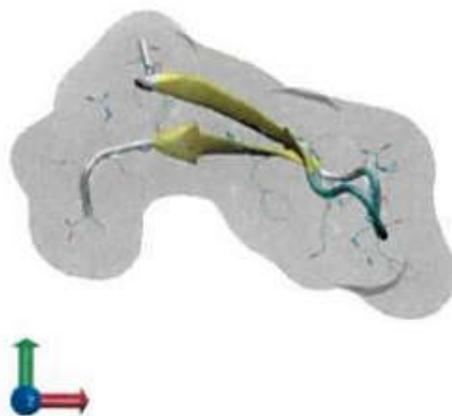


Figura 4

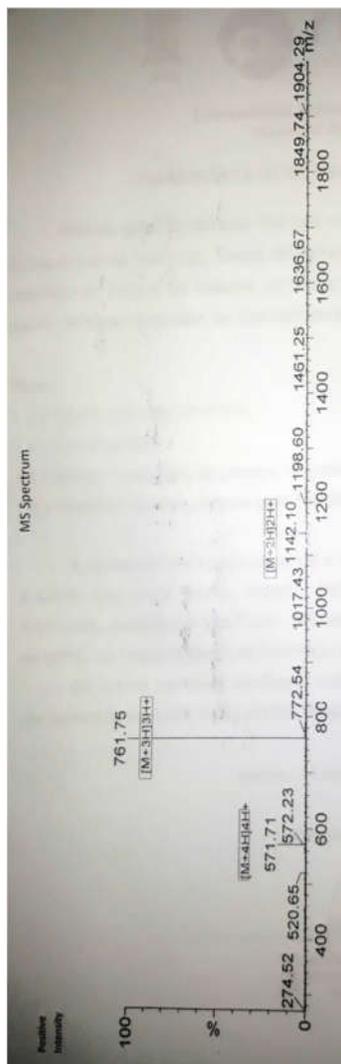


Figura 5

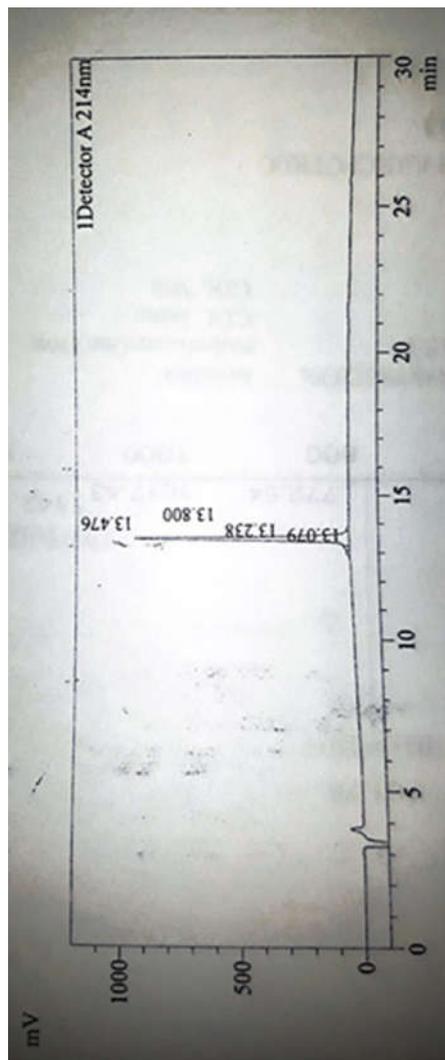


Figura 6

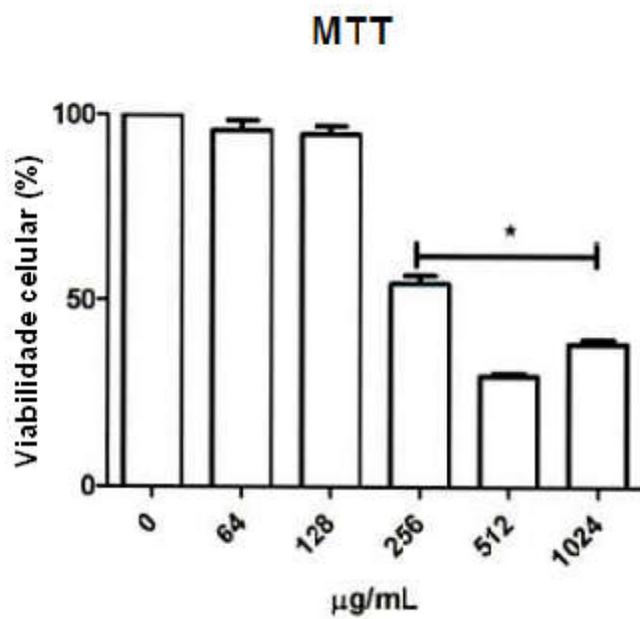


Figura 7

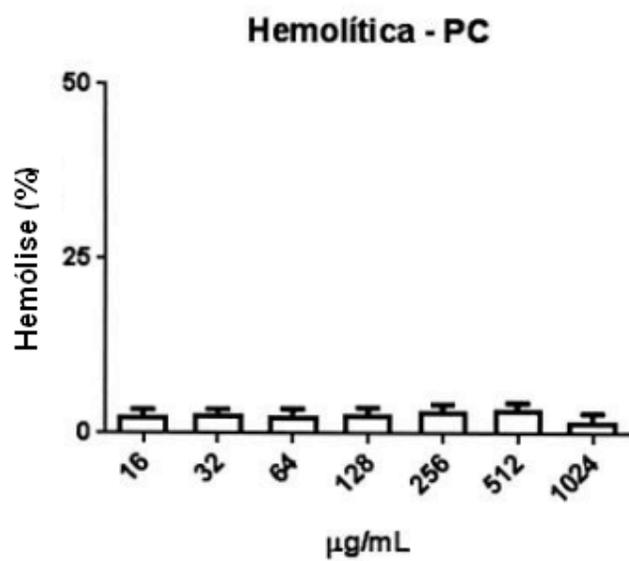


Figura 8

Resumo**PEPTÍDEO SINTÉTICO, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DO PEPTÍDEO
SINTÉTICO NA PREPARAÇÃO DE UM AGENTE CONTRA BACTÉRIAS E
FUNGOS**

A presente invenção descreve um peptídeo sintético obtido a partir de uma defensina de *Manihot esculenta*. Especificamente, a presente invenção compreende um peptídeo sintético útil como um agente contra bactérias e fungos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginos*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*. A presente invenção se situa nos campos da bioquímica, química, biologia molecular, genética e farmácia.

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 sequências - COA 207.txt
- Data de Geração do Código: 24/01/2019
- Hora de Geração do Código: 19:28:33
- Código de Controle:
 - Campo 1: BD2CDBFA5308FC7C
 - Campo 2: 60929FB210C7FDC9