



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

(21) BR 102020018367-2 A2



(22) Data do Depósito: 09/09/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 03/05/2022

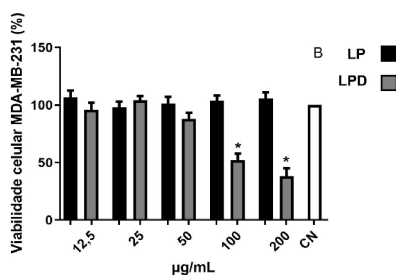
(54) **Título:** PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTITUMORAIS A PARTIR DE LEITE DE JUMENTA HIDROLISADO

(51) **Int. Cl.:** C07K 7/06; A61K 35/20; C07K 1/12; A61K 38/08; A61P 35/00.

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

(72) **Inventor(es):** KAROLINE MIRELLA SOARES DE SOUZA; MARIA TACIANA CAVALCANTI VIEIRA SOARES; ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO; MEIRE DOS SANTOS FALCAO DE LIMA; MARLLYN MARQUES DA SILVA; MARIANE CAJUBA DE BRITTO LIRA NOGUEIRA.

(57) **Resumo:** PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTITUMORAIS A PARTIR DE LEITE DE JUMENTA HIDROLISADO. O objetivo desta invenção é descrever um método para obtenção dos peptídeos a partir de leite de jumenta apresentando ação antitumoral, com potencialidade e resistência ao processo digestivo enzimático. Esta invenção está situada no campo da biotecnologia e da ciência e tecnologia de alimentos, especificamente ao setor técnico de extração de biomoléculas. Tendo como base o leite de jumenta, a presente invenção descreve um método de preparação e obtenção de peptídeos antitumorais através de mistura enzimática, a citada mistura enzimática é composta por pepsina e pancreatina como enzimas proteolíticas diluídas em água destilada. O processo de fluxo da presente invenção é simples, prático, caracterizado por um tipo mistura peptídica com ação antitumoral de amplo espectro sem apresentar toxicidade. Essa mistura de peptídeos apresenta funcionalidade, com boa solubilidade, digestibilidade, resistente a ácidos, resistente ao calor e tem função de regulação fisiológica múltipla.



## PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTITUMORAIS A PARTIR DE LEITE DE JUMENTA HIDROLISADO

### Campo da invenção

[001] Esta invenção está situada no campo da biotecnologia e da ciência e tecnologia de alimentos, especificamente ao setor técnico de extração de biomoléculas. A presente invenção estabelece o processo de obtenção de peptídeos do leite de jumenta hidrolisado através de enzimas, resistente a simulação do processo digestivo, oferecendo uma nova alternativa no controle do desenvolvimento de células tumorais.

### Fundamentos da invenção

[002] Peptídeos bioativos são fragmentos específicos de proteínas, compostos por sequências de aminoácidos conjugados, que além do seu valor nutricional básico, exercem diferentes efeitos benéficos ao organismo, auxiliando e regulando processos fisiológicos, influenciando no bem-estar e saúde.

[003] Os peptídeos bioativos, quando criptografados na proteína matriz, encontram-se inertes e não expressão sua bioatividade, tornando necessária à sua fragmentação para que ocorra a liberação das frações peptídicas. Quando liberados, esses peptídeos podem apresentar ações biológicas multifuncionais, tornando-se atrativa a sua exploração biotecnológica.

[004] A fragmentação peptídica pode ser exercida por diferentes métodos: físicos ou químicos (centrifugação, ultrafiltração e tratamentos ácido e/ou alcalinos) (NONGONIERMA, O'KEEFFE, FITZGERALD. In *Advanced Dairy Chemistry*, 417-482. Springer, New York, NY. 2016), fermentação microbiana através de bactérias ácido lácticas (BAL), hidrólise enzimática e/ou digestão gastrointestinal *in vitro* (DALIRI, LEE E OH. *Critical Reviews In Food Science and Nutrition*, 58(13), 2273-2284. 2018).

[005] Atualmente, as proteínas de origem alimentícia são consideradas fontes importante de peptídeos bioativos, por ser oriundo de fonte natural, são empregados como ingrediente adicional e/ou alternativo.

[006] O leite caracteriza-se como um alimento completo devido a sua riqueza nutricional,

e uma fonte abundante de diferentes biomoléculas, incluindo peptídeos bioativos (NONGONIERMA e FITZGERALD, *Peptides*, 73, 20-34, 2015) liberados pela proteólise da caseína ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\kappa$ -caseína) e proteínas do soro de leite ( $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbumina, albumina sérica, imunoglobulinas, frações de lactoferrina e protease-peptona).

[007] Peptídeos bioativos derivados do leite são relevantes e exibem diferentes funções, incluindo propriedades antioxidantes, anti-hipertensivas, antimicrobianas, anticâncer (BRUMINI, D. et al. *Dairy Science e Technology*, 96(1), 1-14, 2016).

[008] É importante enfatizar que, os peptídeos bioativos, quando ingeridos por via oral, devem ser metabolicamente estáveis e ativos, resistindo às condições diversas encontradas durante a passagem completa pelo trato gastrointestinal, e quando disponíveis, poder ser absorvidos através da membrana de borda em escova (SAADI et al. *Biotechnology Advances*, 33(1), 80-116, 2015). Peptídeos quando em formulações injetáveis, devem apresentar compatibilidade por transmissão física ou através dos agentes transportadores específicos de proteínas para ter seus efeitos benéficos no organismo.

[009] Devido a sua ampla aplicação biológica, a interação desses peptídeos como compostos essenciais à saúde, ressalta a importância dos estudos e avaliação das diferentes fontes e métodos de obtenção para aplicações específicas.

[0010] Diversos são os trabalhos encontrados sobre peptídeos bioativos de origem láctea. Dentre as publicações, estão relacionadas abaixo algumas diferentes fontes lácteas diferentes atividades biológicas.

[0011] Nos estudos de Aspri et al. (*Journal Food Chemistry*, 268, 476-484, 2018), os pesquisadores hidrolisaram o leite de jumenta cru. Avaliaram a resistência dos peptídeos após o processo digestivo, apresentando atividade antioxidante (46,41 mmoles de Trolox / 100 ml e anti-hipertensiva  $EC_{50}$  2,14  $\pm$  1,48 mg/mL).

[0012] Nongonierma et al. (Food Chemistry, 244, 340-348, 2018) extraíram peptídeos inibidores da dipeptidil peptidase IV (DPP-IV) de proteínas do leite de camelo hidrolisada por pepsina e coralase. Com inibição de peptídeos específicos: AMPVQAVLP  $3,8 \pm 2,8$  à YPVEPF  $95,0 \pm 3,0$  inibição de DPP-IV a  $1000 \mu\text{M}$  (%).

[0013] Tagliacruzchi et al. (International Dairy Journal, 71, 6-16, 2017) em estudos com leite de cabra submetido a digestão gastrointestinal *in vitro*, obtiveram frações < 3 kDa das amostras após completa simulação gastrointestinal, recuperando  $22,79 \pm 0,83$  mg/mL de peptídeos com  $\text{IC}_{50}$  para a atividade da anti-hipertensiva de  $1156,3 \pm 10,5$   $\mu\text{g}$  de peptídeos/mL.

[0014] Tagliacruzchi et al. (International Dairy Journal, 56, 119-128, 2016) utilizando leite de camela avaliaram peptídeos com ação anti-hipertensiva após digestão *in vitro*. Frações < 3 kDa das amostras obtidas no final do procedimento de digestão simulado continham  $21,74 \pm 0,49$  mg/mL de peptídeos e apresentou  $\text{IC}_{50}$  para a atividade da anti-hipertensiva de  $1171,4 \pm 3,1$   $\mu\text{g}$  de peptídeos/mL.

[0015] Tidona et al. (International Dairy Journal, 21(3), 158-165, 2011) observaram elevada inibição do desenvolvimento microbiano frente *E. coli* 10208355, *B. cereus* RT INF01 e *L. monocytogenes* 2230/92 utilizando frações peptídicas obtidas do leite de jumenta após digestão *in vitro* utilizando enzimas gastrointestinal humana.

[0016] Mao et al (International Dairy Journal, 19(11), 703-708, 2009) utilizaram o soro do leite de jumenta frente a células tumorais A549 (células epiteliais basais alveolares humanas do adenocarcinoma) por modulação das vias de proliferação, apoptose e angiogênese com diferentes concentrações do soro de leite pH 4.6 obtido após centrifugação. O estudo apresentou a diminuição da viabilidade e o efeito antiproliferativo das células de maneira dependente da concentração e do tempo, com melhor atividade utilizando  $800 \mu\text{g/mL}$  entre 48 e 72 h. O diferencial da presente invenção é a obtenção de peptídeos em pó, contendo elevada concentração proteica, pois apresenta melhor eficiência em menor concentração e tempo de ação, além de reduzir o custo do processo com perdas de material bioativo.

[0017] Em relação aos artigos de pesquisa apresentado acima, numa relação de 20 anos de literatura, até o momento, poucos são os estudos sobre peptídeos de fonte láctea que envolvam alternativas frente à células cancerígenas, assim, a invenção aqui descrita apresenta-se com vantagem, pois além de poucos relatos na literatura para o referido tema, apresenta um processo de obtenção pela técnica enzimática, com a utilização de baixa quantidade de enzimas, atingindo alta eficiência na liberação dos peptídeos, em fragmentos com tamanho reduzido, pois o tamanho do peptídeo influencia na sua bioatividade, - quanto menor a sua massa molecular mais fácil seu transporte e absorção -, além de elevada concentração proteica, obtendo um composto peptídico com maior eficiência, viabilidade e estabilidade frente as condições gastrointestinais avaliadas, condições de uso, podendo ser aplicado como aditivo alimentar em preparações líquidas ou em pó.

[0018] Câncer representa o desenvolvimento descontrolado de células em incursão no tecido ou difusão para outras partes do corpo de modo a comprometer o funcionamento saudável do organismo. Embora tenha ocorrido numerosos avanços no tratamento do câncer, ele ainda é um problema de saúde com 18,078,957 milhões total de casos de câncer no mundo, seguido de alta taxa de mortalidade 9,6 milhões de mortes em 2018. Atualmente é a segunda principal causa de morte após as doenças cardíacas em todo o mundo e uma fonte de graves repercussões sociais. No Brasil, apresentou 559,371 casos e 243,588 com todas as neoplasias (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020), e estima-se que 623,03 mil casos em 2020, entre homens e mulheres com todos os tipos de tumores (INSTITUTO NACIONAL DO CANCER, 2020).

[0019] Os principais tipos de câncer em todo o mundo, em termos de número de novos casos, são os cânceres de pulmão e mama feminina; entre os homens, o maior número de mortes anualmente é por câncer de pulmão (16.371 mil de mortes, 13,9%), atribuído ao mau prognóstico desse câncer, seguido por câncer próstata (15.576 mil mortes, 13,3%), câncer de colo e reto (9.608 mil mortes, 8,2%), câncer de estômago (9.387 mil mortes, 8,0 %) (Instituto Nacional do Câncer, 2020).

Em mulheres o câncer de mama (17.572 mil mortes, 16,4 %), câncer de pulmão (12.346 mil mortes, 11,5%), câncer de colo e reto (9.995 mil mortes, 9,3 %), câncer do colo do útero (6.526, 6,1 %) (Instituto Nacional do Câncer, 2020).

[0020] A prevalência de câncer aumenta ininterruptamente, e resulta na utilização crescente de agentes quimioterápicos nocivos ao organismo (SAKAT et al. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 85(6), 766-773, 2019). As complicações em longo prazo associadas a quimioterápicos tem crescido à medida que as taxas de sobrevivência em pacientes com câncer melhoram. Dentre os fármacos, a cisplatina é um dos medicamentos utilizados no tratamento de tumores sólidos em terapias clínicas iniciais (WHEATE, N. J. et al. *Dalton transactions*, 39(35), 8113-8127, 2010), contudo, não é adequado por apresentar falta de seletividade tumoral e resistência facilmente adquirida, o que dificulta a eficácia (XUE, X. et al. *ACS nano*, 7(12), 10452-10464, 2013). Além disso, a cisplatina é contraindicada pois o acúmulo de platina no tecido saudável leva a efeitos colaterais indesejados, incluindo ototoxicidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade são observados após a quimioterapia com cisplatina (KILIC et al. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 85(3), 267-274, 2019).

[0021] Apesar dos grandes esforços dedicados à busca por novos tratamentos contra os diferentes tipos de câncer, essa doença continua sendo uma das principais preocupações em todo o mundo. A ênfase da medicina moderna está optando pela prevenção e tratamento do câncer utilizando componentes nutricionais de fontes naturais.

[0022] A utilização de medicamentos e/ou suplementação de compostos à base de proteínas e peptídeos apresentam vantagens quando comparados às drogas sintéticas, pois, elas podem apresentar fortes atividades biológicas com melhor biocompatibilidade, alta especificidade, capacidade de penetração nas células tumorais e baixa toxicidade (THUNDIMADATHIL, *Journal of Amino Acids*, 1-13, 2012).

[0023] Peptídeos bioativos podem ser considerados como uma nova alternativa em terapia contra células cancerígenas por exercer ação rápida na inibição do

desenvolvimento do tumor (DISSANAYAKE et al. *Journal of Controlled Release*, 250, 62-76, 2016). São candidatos à imunoterapia, pois são capazes de se ligar e induzir respostas das células / receptores alvo em um nível altamente específico (TRAC e CHUNG, *Bioactive Materials*, 5(1), 92-101, 2020). Seus mecanismos de ação consistem no controle da angiogênese, interações e modulação especificamente entre interação proteica de interesse, como a proteína oncogênica (HAYASHI, DUCANCEL e KONNO, *International Journal of Peptide*, 2, 1-2, 2012), vias de transmissão de sinal ou expressão gênica (BECUCCI et al. *Membranes*, 5(4), 576-596, 2015).

[0024] As fontes principais para obtenção de peptídeos incluem: I- peptídeos naturais (plantas, alimentos, animais ou seres humanos); II - bibliotecas gênicas recombinantes e químicas (SATO et al. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(6), 638-642, 2006).

[0025] Em seus estudos, Obara et al (2017) utilizaram a formulação de vacinas peptídicas exploradas em modelos pré-clínicos e em ensaios clínicos (OBARA et al. *Cancer Scienc*, 108(7), 1452 – 1457, 2017). O objetivo das vacinas peptídicas é obter a síntese de uma sequência peptídica idêntica aos antígenos associados a tumores (TAAs) apresentados nas células cancerígenas e entregá-las à resposta imune mediada por linfócitos T citotóxicos (CTLs) para aumentar sua ativação contra células cancerígenas que expressam esses antígenos. Entretanto, as vacinas peptídicas são limitadas por apresentar fraca imunogenicidade e instabilidade, pois são propensas à degradação por proteases presentes no soro e nos tecidos (SLINGLUFF e CRAIG. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 17(5), 343, 2011).

[0026] Diversos são os pedidos de patentes envolvendo composições e reformulações peptídicas de diferentes fontes frente a células tumorais. Dentre os pedidos, estão relacionados abaixo alguns documentos que mais se assemelham a invenção aqui descrita – Extração de peptídeos do leite de jumenta hidrolisado – incluindo seu processo de obtenção e uso.

[0027] O documento CN101687017A (2010) refere-se a uma composição que compreende cerca de 210 gramas de gordura do leite ou um análogo da gordura do

leite acrescido de lactoferrina bovina ou variantes. A invenção propõe a utilização do produto gorduroso com lactoferrina para estimular o sistema imunológico e suprimir a formação ou crescimento de tumores, além da possibilidade de tratamento ou prevenção do câncer e de seus sintomas, diminuindo os efeitos colaterais das terapias convencionais contra o câncer, através do emprego de composições dietéticas, nutracêuticos ou farmacêuticos. O diferencial da presente invenção em relação a descrita acima, é a obtenção de um composto totalmente peptídico, que exerça função biológica frente ao retardo, diminuição e auxílio eficaz frente às células tumorais, sem aditivos em sua composição em auxílio a sua efetividade, além de baixa concentração 0,200 µg/mL com melhor estabilidade e viabilidade em diferentes condições de uso.

[0028] No documento CA2587727A1(2006), trata da administração de lactoferrina bovina saturada com íons metálicos, ou uma variante, para inibir a formação ou crescimento de tumores, estimular o sistema imunológico ou hematológico, inibindo a formação ou crescimento de tumores e tratando ou prevenindo câncer através do estímulo do sistema imunológico. Quanto ao diferencial da presente invenção, em relação a descrita no documento CA2587727A1, o nosso produto trata de peptídeos com eficácia frente a células cancerígenas, resistentes ao trato gastrointestinal simulado podendo ser absorvido e assim seletivamente influenciar a ação em células cancerígenas com alvo específico, diminuindo possíveis efeitos colaterais. Além disso, a presença de íons metálicos em quantidade elevadas podem comprometer o funcionamento das células normais e assim prejudicar o organismo como um todo.

[0029] No documento US8105615B2(2012) compreende um método de tratamento de câncer, em administrar a um indivíduo uma imunoterapia ou combinação com a vacinação ECD-TM e um adjuvante, em que o adjuvante consiste na composição de lactoferrina que é administrada com variante de 1 mg - 100 g por dia, preferencialmente, 10 mg - 100 g por dia. Quanto ao diferencial da presente invenção, em relação a descrita no documento, trata de uma composição mínima contendo a concentração mínima de 200 µg/mL de peptídeos do leite de jumenta hidrolisado para inibir o desenvolvimento tumoral.



[0030] A invenção US8278278B2(2012) descreve uma composição terapêutica formulada a partir de uma sequência peptídica sintética obtida por aminoácidos selecionados: LAIPEQEY, LGIAEQEY, LGIPAQEY, LGIPEAEY, LGIPEQAY, LGIAEAEY, LGIPEAAAY, LGIAEQAY, LGIAEAAAY, para reduzir a proliferação celular de câncer de mama e também aumentar os efeitos citotóxicos da terapia contra células cancerígenas existente. O referido produto fabricado é administrado por via intravenosa agindo como adjuvante auxiliando um agente quimioterápico prejudicial ao DNA, tais como: fluorouracil, capecitabina, cisplatina, carboplatina, oxaliplatina e uma combinação dos mesmos. O diferencial da presente invenção é a obtenção e administração de um composto peptídico de fonte natura em menor tempo e custo de operação, que exerça função biológica frente ao retardo, diminuição e auxílio eficaz exercendo efeito diretamente na célula tumoral em baixa concentração com melhor estabilidade e viabilidade em diferentes condições de uso, sem recombinantes em sua composição com ação adjuvante que ocasionem efeitos ao DNA ou citotoxicidade ao organismo.

[0031] A invenção US20090062785A1 (2009) apresenta um método e a composição de um produto para detectar e destruir tumores de câncer ou células cancerígenas, ou outras células com receptores específicos. O processo descrito é baseado na administração de um composto compreendendo uma proteína ou peptídeo de ligação ligada ou fisicamente associada a um nanotubo de carbono, preferencialmente um nanotubo de carbono de parede única (SWNT), para formar um complexo proteína-SWNT ou complexo peptídeo-SWNT. Tornando-se necessário expor o paciente a radiação eletromagnética compreendendo um comprimento de onda absorvível pelo nanotubo de carbono, causando elevação da temperatura do nanotubo de carbono do complexo proteína ou peptídeo-nanotubo de carbono a uma temperatura que induz dano ou morte da célula endotelial da vasculatura do tumor ou da célula cancerígena à qual o complexo proteína ou peptídeo-nanotubo de carbono está ligado; além disso administrar ao paciente um imunostimulante para melhorar a resposta imune dele ao

antígenos liberados pelas células cancerígenas ou células endoteliais da vasculatura tumoral. O diferencial da presente invenção é a obtenção e aplicação de um composto peptídico de fonte natural em menor tempo e custo de operação, como aditivo alimentar, ou preferencialmente com diluente simples composto por água potável ou solução salina, que quando disponível exerça função biológica frente ao retardo, diminuição e auxílio eficaz exercendo efeito diretamente na célula tumoral em baixa concentração com melhor estabilidade e viabilidade em diferentes condições de uso, sem recombinantes em sua composição ou auxílio radioativo para sua ativação ou execução, baseado na aplicação ou ingestão do composto peptídico.

[0032] A invenção WO2009033680A2(2009) apresenta o uso direcionado de um composto peptídico formado por: Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gli-Arg-Gli-Gli-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Val-Leu-His-Leu-Pro-Gln-Met-Gly-Asp-Gln-Asp-Gly-Lys-Arg-Glu-Thr-Ala-Leu-Glu-Ile-Leu-Asp-Leu Trp-Lys-Ala-Ile-Asp-Gly-Leu-Pro-Tyr-Ser-His-Pro-Gln-Pro-Ser-OH (Peptídeo do tipo Galanina; GALP) como agente terapêutico para a profilaxia e / ou tratamento de câncer. Além disso, explica que as composições farmacêuticas estão preferencialmente na forma de uma solução tampão de liofilizado ou líquido ou formulação artificial de leite materno ou substituto de leite materno contendo o peptídeo para a sua administração oral em recém-nascidos, crianças pequenas e / ou bebês. O diferencial da presente invenção é a obtenção e aplicação de um composto peptídico de fonte natural em menor tempo e custo de operação, resistente a enzimas digestivas, que exerça função biológica frente ao retardo, diminuição e auxílio eficaz, exercendo efeito diretamente na célula tumoral em baixa concentração com melhor estabilidade e viabilidade em diferentes condições de uso, sem recombinantes em sua composição.

[0033] A invenção US8211857B2 (2012) inclui um peptídeo isolado da soricina ou análogos, compreendendo toda ou parte da sequência de aminoácidos: EGKLSSNDTE GGLCKEFLHP SKVDLPR (SEQ ID NO: 1), em que o peptídeo inibe a atividade do canal de cálcio (atividade de inibição da TRPV6) sem atividade parálitica. Os peptídeos

da invenção são úteis para o uso na redução da proliferação celular e tratamento de câncer, incluindo câncer metastático. Os peptídeos da invenção são prontamente preparados por síntese química usando técnicas bem conhecidas na química de proteínas, como síntese em fase sólida ou síntese em solução homogênea, ou análogos opcionalmente preparados através da introdução de mutações em uma sequência nucleotídica que codifica o peptídeo. O diferencial da presente invenção é a obtenção e aplicação de um composto peptídico de fonte natural em menor tempo e custo de operação, como aditivo alimentar, ou preferencialmente com diluente simples composto por água potável ou solução salina, que quando disponível exerça função biológica frente ao retardo, diminuição e auxílio eficaz exercendo efeito diretamente na célula tumoral em baixa concentração com melhor estabilidade e viabilidade em diferentes condições de uso, sem recombinantes em sua composição.

[0034] A invenção EP2698376A1 (2016) é baseada na descoberta de diferentes peptídeos, incluindo QNIYAGVPMISF (SEQ ID NO: 1), EATNSHGSRTMG (SEQ ID NO: 2), TVSWSTTGRIPL (SEQ ID NO: 3), QLEFYTQLAHLI (SEQ ID NO: 4) e SMDPFLFQLLQL (SEQ ID NO: 5), visam especificamente as células de câncer de mama, facilitando assim a entrega de drogas aos locais de tumor de mama. Qualquer um desses peptídeos pode ser conjugado com um medicamento para tratamento do câncer de mama. Em um exemplo, o medicamento anticâncer de mama é encapsulado em um carreador (por exemplo lipossomas). Drogas anticâncer exemplares incluem, mas não estão limitadas a doxorrubicina, tamoxifeno, vinorelbina, vincristina, paclitaxel, lurtotecano, docetaxel, adriamicina, epirubicina, mitoxantrona, mitomicina, gencitabina, cisplatina, oxaliplatina, vinblastz, letrozol e exemestano. Esses peptídeos podem ser preparados por métodos convencionais, isto é, síntese química ou tecnologia recombinante. O diferencial da presente invenção é a obtenção e aplicação de um composto peptídico de fonte láctea natural em menor tempo e custo de operação, que exerça função biológica frente ao retardo, diminuição e auxílio eficaz exercendo efeito diretamente na célula tumoral em baixa concentração com melhor estabilidade e viabilidade em diferentes condições de uso, sem recombinantes em sua composição

com ação adjuvante que ocasionem citotoxicidade ao organismo. Diante do exposto acima, há uma demanda por processos para obtenção dos peptídeos, buscando principalmente economia, melhor eficiência da viabilidade e segurança dos peptídeos de fonte láctea frente a condições de uso, como fármaco, aditivo alimentar em preparações líquidas, e/ou como suplemento nutracêuticos.

[0035] Enfatiza-se que, os documentos citados no relatório descritivo, incluindo artigos e patentes, são apresentados como documentos de inventos parecidos, com intuito único de relacionar com as diferenças e vantagens da presente invenção.

### **Breve descrição dos desenhos**

[0036] A Figura 1 apresenta o gráfico da análise dos peptídeos do leite de jumenta pasteurizado (LP) e do leite de jumenta pasteurizado e digerido (LPD) pela hidrólise de enzimas digestivas em diferentes concentrações (12,5-200 µg/mL) frente a sua toxicidade na viabilidade celular de macrófagos (J774.A1).

[0037] A Figura 2 apresenta o gráfico da análise dos peptídeos do leite de jumenta pasteurizado (LP) e do leite de jumenta pasteurizado e digerido (LPD) pela hidrólise de enzimas digestivas em diferentes concentrações (200-12,5 µg/mL) frente a sua capacidade de inibição do desenvolvimento das células de adenocarcinoma humano da glândula mamária (MDA-MB-231).

[0038] A Figura 3 apresenta o gráfico da análise dos peptídeos do leite de jumenta pasteurizado (LP) e do leite de jumenta pasteurizado e digerido (LPD) pela hidrólise de enzimas digestivas, em diferentes concentrações (200-12,5 µg/mL) frente a sua capacidade de inibição do desenvolvimento das células de linhagem heterogênea de células de tumor de camundongos de origem mesodérmica (S-180).

### **Descrição da invenção**

[0039] A presente invenção refere-se ao método de obtenção de várias sequências de peptídeos agrupados em sinergia e suas variantes derivadas de moléculas proteicas, pela técnica de proteólise enzimática, que podem ser usadas em composições de alimentos simbióticos e/ ou nutracêuticos, ou como alvos para o desenvolvimento de compostos farmacêuticos.

[0040] O termo "peptídeo" no documento estende-se a polímeros composto de até 3 a 10 monômeros de aminoácidos com sequenciais iguais ou diferentes, podendo ser composto por repetições de aminoácidos em sua composição, interligados por meio de ligação peptídica. Cada uma das sequencias peptídicas direcionados ao tumor descritos pode incluir até 10 aminoácidos.

[0041] Esses peptídeos podem ser obtidos seguindo a sequência exata com hidrólise sucessiva utilizando enzimas sintéticas industriais ou naturais obtidas diretamente do sistema gastrointestinal de mamíferos, ou liberadas durante a digestão do leite de jumenta no trato gastrointestinal de mamíferos. De acordo com sua composição, esses peptídeos podem ser obtidos e/ ou preparados por métodos convencionais, isto é, síntese química ou biotecnológica.

**[0042]** Esses peptídeos são direcionados a inibir o desenvolvimento de tumores, metástase de tumores no organismo, auxiliando na inibição e tratamento ou prevenção de câncer, isto é, um peptídeo incluindo sequências de aminoácidos o referido método compreendendo separadamente, simultaneamente ou sequencialmente a um paciente com necessidade de administrar um quantidade eficaz de peptídeos do leite de jumenta ou análogo de proteínas do leite de jumenta e um ou mais agentes terapêuticos, como um ou mais peptídeos antitumorais, de preferência um ou mais sequencias peptídicas antineoplásicos selecionados. Seleção a partir de diferentes fatores que propiciem a obtenção dos peptídeos, seja de origem farmacêutica por isolamento com métodos químicos e biotecnológicos, e/ ou alimentar através da ingestão do composto lácteo com ação antitumoral, potencial quimioterapêutico, sem danos maléficis ao organismo tal como toxicidade a depender da concentração empregada, mais preferencialmente com um ou mais sequencias peptídicas terapêuticas.

### **Sumario da invenção**

[0043] O objetivo desta invenção é descrever um método para obtenção dos peptídeos do leite de jumenta apresentando ação antitumoral, com potencialidade e resistência ao processo digestivo enzimático.

[0044] O leite de jumenta foi acondicionado em recipiente isotérmico, preservando sua integridade.

[0045] Esquema técnico da presente invenção descreve um método de preparação e obtenção de peptídeos antitumorais através de mistura enzimática tendo como matéria-prima o leite de jumenta, a citada mistura enzimática é composta de pepsina (0,2-2%) e pancreatina (0,1-1%) como enzimas proteolíticas diluídas em água destilada.

[0046] Para preparação dos extratos peptídicos, os mesmos foram diluídos em água ultrapura nas concentrações de 12,5-200 µg/mL.

[0047] Efeito benéfico da presente invenção: o processo de fluxo da presente invenção é simples, prático, caracterizado por um tipo mistura peptídica com ação antitumoral de amplo espectro sem apresentar toxicidade. Essa mistura de peptídeos apresenta funcionalidade, com boa solvabilidade, digestibilidade, resistente a ácidos, resistente ao calor e tem função de regulação fisiológica múltipla.

[0048] A presente invenção pode auxiliar no melhoramento do nível de saúde, pelo processamento de produtos lácteos e pela possibilidade de utilização de forma abrangente do composto em adição a diferentes alimentos ou fármacos reformulados.

[0049] Conseqüentemente, em um segundo aspecto, a presente invenção se refere a um produto caracterizado como peptídeo bioativo em pó.

### **Exemplos de concretizações da invenção**

#### **Exemplo 1. Processo de obtenção do peptídeo por hidrólise enzimática e atividade antitumoral**

[0050] O leite cru de jumenta foi cedido por um criador local localizado em Vitória de Santo Antão-PE/Brasil. O material foi coletado e transportado sob condições de temperatura controlada para o Laboratório de Tecnologia de Bioativos – LABTECBIO, localizado no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal–DMFA–UFRPE/SEDE. Alíquotas do leite cru foram avaliadas quanto à composição química dos conteúdos de (gordura, proteína total, caseína, lactose e sólidos totais), realizado no Laboratório PROGENE- UFRPE. Não apresentado irregularidades na sua composição.

[0051] O leite de jumenta foi pasteurização sob agitação lenta a 65°C durante 30 min, posteriormente foi submetido a centrifugação a 3500 rpm por 20 min a 4°C, como descrito por Gallina et al. (2016), e filtrado em papel Whatman no. 40. Os sobrenadantes das amostras foram armazenados a -20 °C.

**Exemplo 2. Processo de obtenção de peptídeos hidrolisado por enzimas gastrointestinais e ultrafiltração**

[0052] A digestão enzimática *in vitro* foi iniciada pela adição do leite de jumenta pasteurizado (3 mL) em uma solução salivar sintética contendo sais diversos (pH 6,8) durante 5 min à 37°C. Foi acrescentada solução gástrica sintética contendo sais diversos (pH 2) e a pepsina comercial (0,2 - 2%) meio ajustado para o pH 2, durante 120 minutos. Seguida por solução pancreática sintética e sucessiva hidrólise adicional de pancreatina comercial (0,1-1%) em meio ajustado para o pH 8, durante 60 min. Foi adicionada uma solução de sais de biliar sintético (0,1 %; pH 8,2) e a incubação foi realizada por 60 min. Cada processo de incubação foi realizado à 37 ° C sob agitação a 100 rpm.

[0053] As amostras foram coletadas após hidrólise com pepsina + pancreatina + bile, representando as etapas da digestão gastrointestinal. Posteriormente as amostras foram fracionadas utilizando uma membrana de ultrafiltração com pontos de corte de peso molecular (MWCO) de 3000 Da (Millipore Co., Bedford, MA), apresentado um a solução final contendo proteínas e peptídeos hidrolisados.

**Exemplo 3. Formulação e preparo do extrato peptídico em pó do leite de jumenta hidrolisado dissolvido em solução aquosa**

[0054] Na composição, o extrato peptídico é obtido em solução. Assim, a composição do presente método compreende preferencialmente peptídeos que possam ser prontamente isolados e redissolvidos numa solução exata antes da administração. As etapas de preparação incluem o método que envolve a liofilização do extrato peptídico após ultrafiltração, para obtenção de concentração final calculada em mg/mL.

[0055] Como solvente é utilizada a solução salina ou uma solução aquosa pura de clorada para dissolução dos peptídeos. A quantidade de solução salina ou a solução aquosa de clorada pura para dissolver os peptídeos não é particularmente limitada desde que seja uma quantidade que permita a dissolução uniforme do peptídeo com concentração mínima de 200ug/mL.

[0056] A formulação é preferencialmente realizada dispensando o peptídeo liofilizado dissolvido em solvente. O solvente aqui é adequadamente água ultrapura; no entanto, para o peptídeo é facilmente dissolvido em solução salina. Os peptídeos assim formulados podem ser administrados por dissolução em água com uma pureza aceitável a não interferir na composição do formulado, ou acrescido em diferentes alimentos e com uma quantidade tal que seja proporcional a concentração final desejada.

#### **Exemplo 4. Caracterização dos peptídeos do leite de jumenta hidrolisado quanto a atividade antitumoral**

[0057] Para realização da atividade antitumoral, as linhagens celulares MDA-MB-231 (adenocarcinoma humano da glândula mamária) e S-180 (uma linhagem heterogênea de células de tumor de camundongos de origem mesodérmica) foram utilizadas para avaliação da viabilidade celular (DEBNATH et al. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP, 18(8), 2255, 2017).

[0058] As células foram cultivadas em meio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com soro fetal bovino (10%) e penicilina-estreptomicina (1%) a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>; e a cultura MDA-MB-231 foi mantida em meio de cultura L-15 de Leibovitz e F-12 (proporção de 50% de cada meio) com L- glutamina 2 mM, sem bicarbonato de sódio e soro bovino fetal a uma concentração final de 10% com ausência de CO<sub>2</sub>. As células foram contabilizadas em câmara de Neubauer para o teste de viabilidade celular. Para determinar a citotoxicidade frente aos extratos peptídicos obtidos dos peptídeos hidrolisados de frações proteicas do leite de jumenta, um ensaio de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide) foi utilizado segundo MOSSMAN (Journal of immunological methods, 65(1-2), 55-63,1983).

[0059] As células foram inoculadas em placas de 96 poços: S-180 a  $1 \times 10^6$  células/mL e MDA a  $1 \times 10^4$  células/mL. Após 24h de crescimento celular, as células foram tratadas com os extratos peptídicos solubilizados em salina ao cultivo celular nas concentrações finais de 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL, durante mais 24 h de crescimento.



Após período de tratamento, 20 µL de solução de MTT (4mg/mL) foi adicionado em cada poço, e as placas foram incubadas durante 2:30 h. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e adicionados 100 µL de DMSO (Dimethylsulfoxide). A leitura da absorbância foi realizada em leitor de Microplaca (Biotek Elx808) 630 nm. A citotoxicidade foi expressa em viabilidade celular segundo Santos et al. (Journal of drug delivery science and technology, 15(5), 355-361. 2005).

[0060] No teste biológico utilizando células de macrófagos (J774.A1), os peptídeos do leite bruto e dos peptídeos hidrolisados não apresentaram toxicidade nas menos concentrações (Fig. 1).

[0061] No teste biológico utilizando células tumorais de adenocarcinoma humano da glândula mamária (MDA-MB-231) exerceram melhor inibição utilizando peptídeos hidrolisados após completa ação enzimática a partir de 100-200 µg/mL (Fig. 2). Utilizando uma linhagem heterogênea de células de tumor de camundongos de origem mesodérmica (S-180) exibiram o mesmo comportamento, utilizando 200 µg/mL de peptídeos hidrolisados, apresentando aproximadamente 80% de inibição tumoral (Fig. 3).

[0062] Os resultados assim obtidos mostram que as porcentagens das células tumorais ligadas a peptídeos após digestão *in vitro* foi gradual com melhor atividade com 200 µg/mL de acordo com a concentração dos peptídeos em todas as células avaliadas.

## REIVINDICAÇÕES

1. “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTITUMORAIS A PARTIR DE LEITE DE JUMENTA HIDROLISADO”, **caracterizados pela** hidrólise sucessiva do leite asinino pasteurizado, utilizando simulação digestiva contendo as respectivas enzimas pepsina e pancreatina.
2. “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTITUMORAIS A PARTIR DE LEITE DE JUMENTA HIDROLISADO”, de acordo com a reivindicação 1, direcionados ao tratamento de tumores, **caracterizado por** compreender diferentes sequências peptídicas < 3 kDa, composta por polímeros de aminoácidos (3-10 aminoácidos) em sua composição.
3. “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTITUMORAIS A PARTIR DE LEITE DE JUMENTA HIDROLISADO”, de acordo com a reivindicação 1-2, **caracterizado pelo** fato de que as diferentes sequências peptídicas < 3 kDa podem ser isoladas e liofilizadas, apresentando um composto peptídico antitumoral em pó.
4. “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTITUMORAIS A PARTIR DE LEITE DE JUMENTA HIDROLISADO”, de acordo com as reivindicações 1-3, **caracterizado pelo** fato de que o agente antitumoral é selecionado a partir de diferentes grupos que consistem diferentes sequências peptídicas em pó.
5. “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTITUMORAIS A PARTIR DE LEITE DE JUMENTA HIDROLISADO”, de acordo com a reivindicação 1-3, **caracterizado por** conter um grupo de sequências peptídicas em pó, podendo ser preparado por formulação convencional, reconstituído em água pura, numa concentração mínima de 200 µg/ml, pronto para consumo oral.
6. “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTITUMORAIS A PARTIR DE LEITE DE JUMENTA HIDROLISADO”, de acordo com a reivindicação 2-3, **caracterizado por** conter um grupo de sequências peptídicas em pó, podendo estar associada a um composto alimentício que exerçam proteção e transporte do composto antitumoral.

7. “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTITUMORAIS A PARTIR DE LEITE DE JUMENTA HIDROLISADO”, de acordo com a reivindicação 3-5, **caracterizado por** ser adicionado a diferentes alimentos, que pode conter diferentes compostos que exerçam a proteção do conteúdo peptídico, preferencialmente compostos lipídicos/anfipáticos.

8. “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTITUMORAIS A PARTIR DE LEITE DE JUMENTA HIDROLISADO”, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado por** administração preferencial sob formulação convencional, compostos alimentícios, ou pode ser incorporada a nanossistemas, ou com aplicação local.

9. “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTITUMORAIS A PARTIR DE LEITE DE JUMENTA HIDROLISADO”, de acordo com a reivindicação 1-8, **caracterizado pela** utilização no fabrico de um medicamento para tratamento de tumor.

## DESENHOS

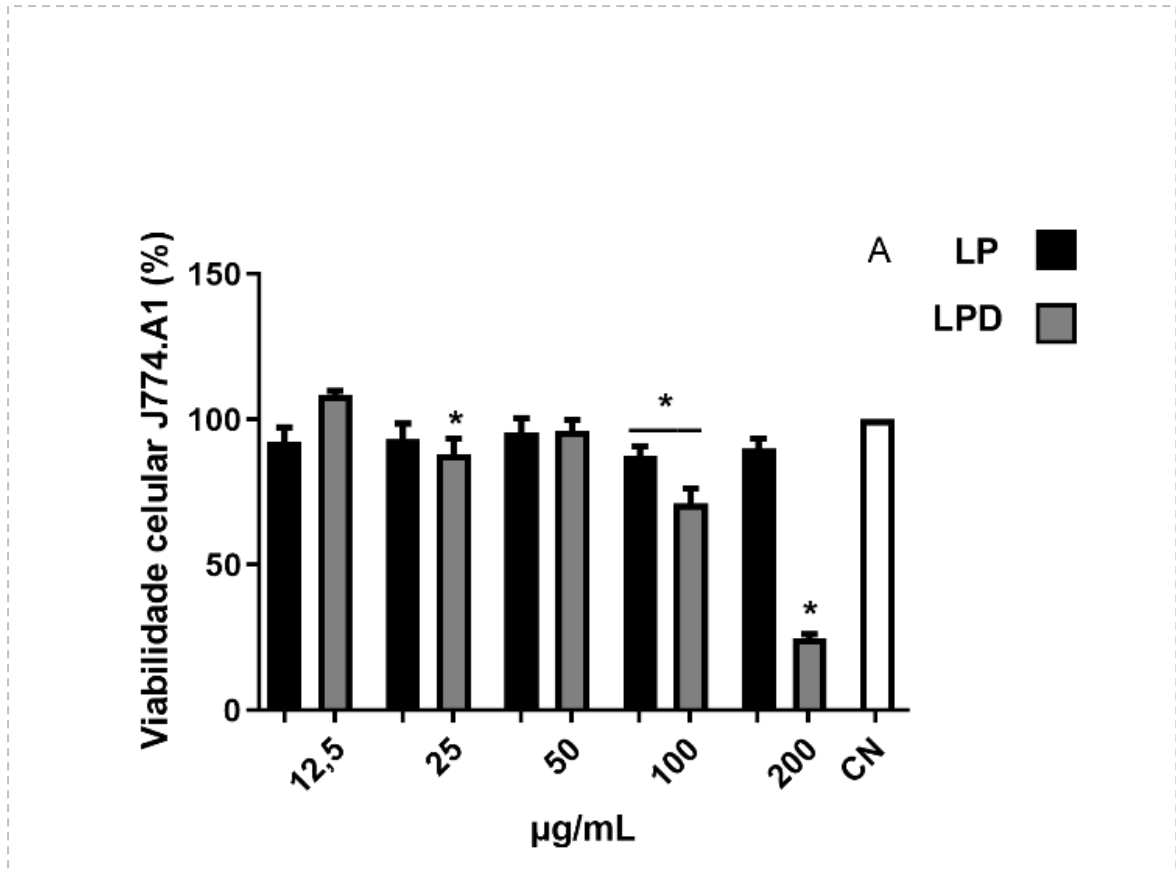


Figura 1

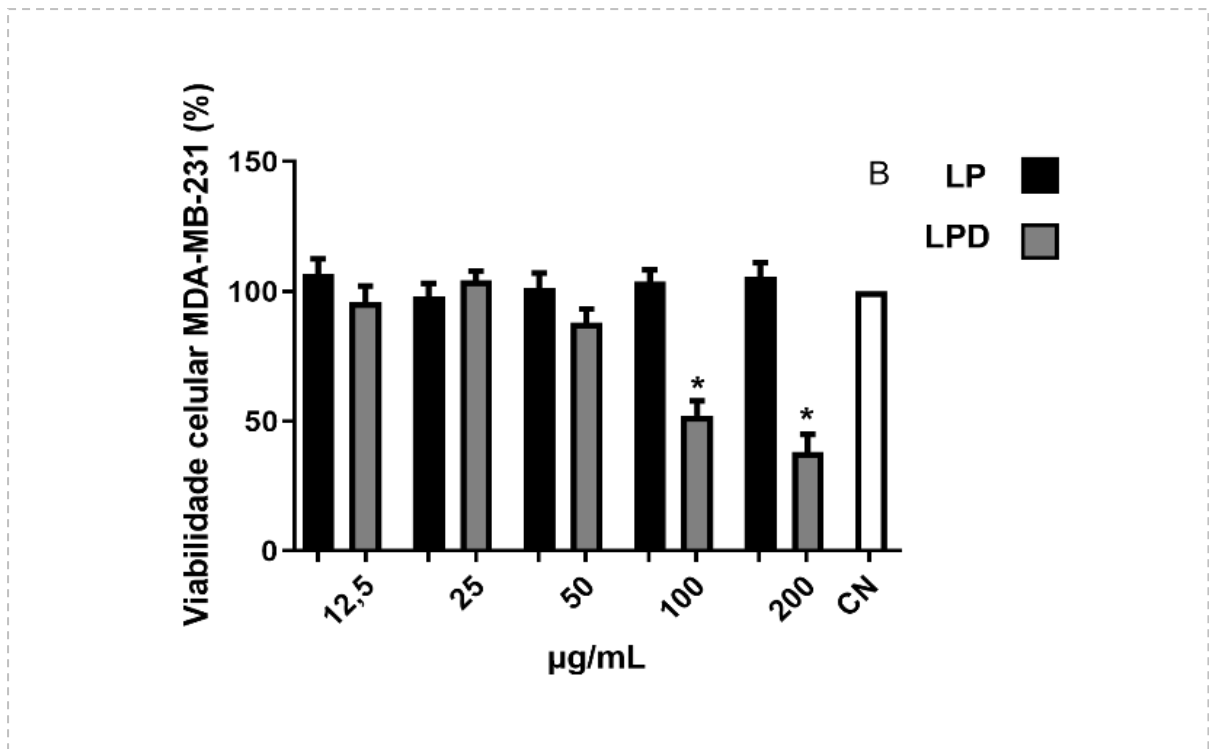


Figura 2

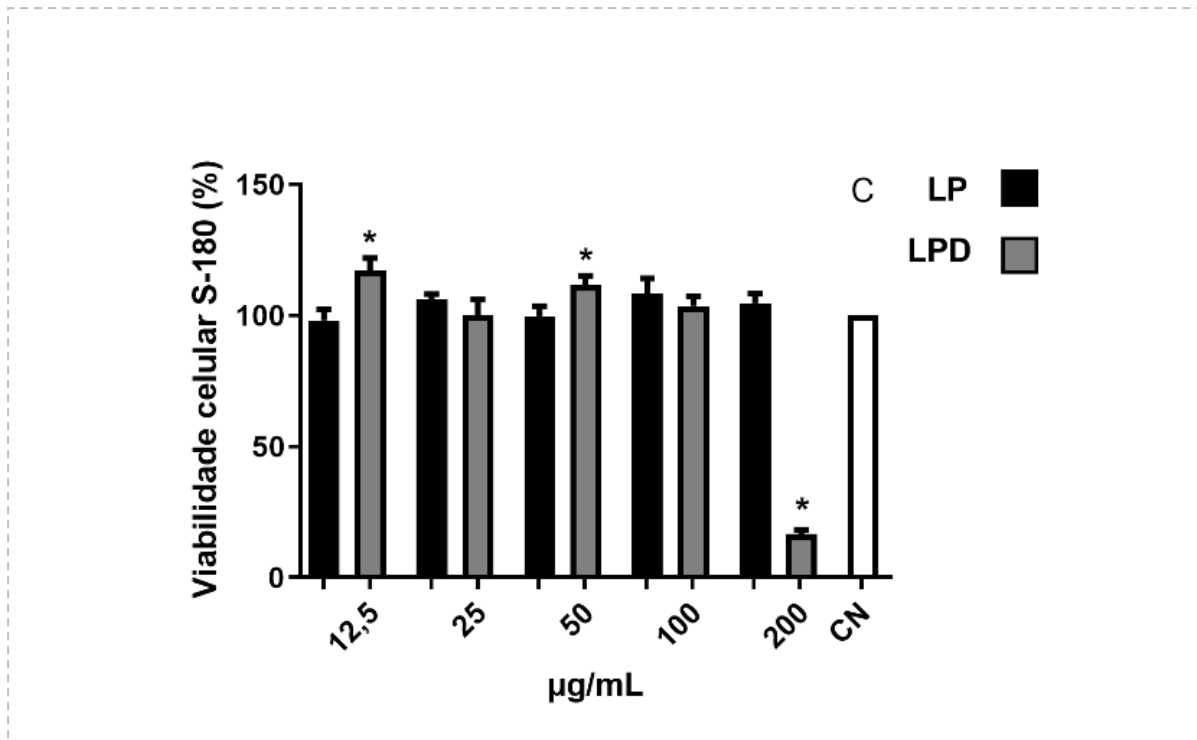


Figura 3

**RESUMO****PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTITUMORAIS A PARTIR DE LEITE DE JUMENTA HIDROLISADO**

O objetivo desta invenção é descrever um método para obtenção dos peptídeos a partir de leite de jumenta apresentando ação antitumoral, com potencialidade e resistência ao processo digestivo enzimático. Esta invenção está situada no campo da biotecnologia e da ciência e tecnologia de alimentos, especificamente ao setor técnico de extração de biomoléculas. Tendo como base o leite de jumenta, a presente invenção descreve um método de preparação e obtenção de peptídeos antitumorais através de mistura enzimática, a citada mistura enzimática é composta por pepsina e pancreatina como enzimas proteolíticas diluídas em água destilada. O processo de fluxo da presente invenção é simples, prático, caracterizado por um tipo mistura peptídica com ação antitumoral de amplo espectro sem apresentar toxicidade. Essa mistura de peptídeos apresenta funcionalidade, com boa solvabilidade, digestibilidade, resistente a ácidos, resistente ao calor e tem função de regulação fisiológica múltipla.