



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 025652 4

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 48031918000124

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Quirino de Andrade, 215

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 01049-010

País: Brasil

Telefone: 11 56270217

Fax: 11 56270103

Email: auin@unesp.br

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 45358058000140

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rod. Washington Luís, Km 235

Cidade: São Carlos

Estado: SP

CEP: 13565-905

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): MÉTODO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEO DIMÉRICO, PEPTÍDEOS DIMÉRICOS E USO DO PEPTÍDEO DIMÉRICO

Resumo: A presente invenção se enquadra no campo da biotecnologia, mais particularmente a um método de obtenção de um peptídeo dimérico, ao peptídeo dimérico e seu uso como agente bactericida, fungicida e antitumoral. Mais particularmente, a presente invenção refere-se ao método de obtenção de peptídeos diméricos pela síntese em fase sólida e pela dimerização em solução em que ocorre a formação de uma ligação dissulfeto intermolecular. O homodímero obtido apresenta a SEQ ID NO: 1 e atua na inibição de diferentes classes de DNA topoisomerasas, o que lhe confere grande capacidade bactericida/fungicida com amplo espectro antimicrobiano. Em adição, apresenta atividade contra células tumorais e baixa toxicidade para células humanas normais.

Figura a publicar: 1

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Renan Padron Almeida

Numero OAB:

Numero API:

CPF/CNPJ: 33778301896

Endereço: Rua Joaquim Antunes 819

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05415012

Telefone: 1156270570

Fax:

Email: renan.padron@unesp.br

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 7

Nome: REINALDO MARCHETTO

CPF: 04666528873

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Prof. Francisco Degni, 55

Cidade: Araraquara

Estado: SP

CEP: 14800-060

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 2 de 7

Nome: CAMILA AGUIAR ROCHA

CPF: 01609251695

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Prof. Francisco Degni, 55

Cidade: Araraquara

Estado: SP

CEP: 14800-060

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 3 de 7

Nome: JÚLIA MIRANDA RIBEIRO BAZZANO

CPF: 37655517835

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Graduação

Endereço: Rodovia Araraquara-Jaú, Km 1

Cidade: Araraquara

Estado: SP

CEP: 14801-902

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 4 de 7

Nome: ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS

CPF: 14957693803

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Rodovia Araraquara-Jaú, Km 1

Cidade: Araraquara

Estado: SP

CEP: 14801-902

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 5 de 7

Nome: ADERSON ZOTTIS

CPF: 00544942906

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: Rua Arcturus, 03

Cidade: São Bernardo do Campo

Estado: SP

CEP: 09606-070

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 6 de 7

Nome: CAMILA CRISTINA DE FOGGI

CPF: 34265455867

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Odontólogo

Endereço: Rod. Washington Luis, Km 235

Cidade: São Carlos

Estado: SP

CEP: 13565-905

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 7 de 7

Nome: ELSON LONGO DA SILVA

CPF: 20753896834

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rod. Washington Luis, Km 235

Cidade: São Carlos

Estado: SP

CEP: 13566-000

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Procuração	Proc e Posse 07-2018.pdf
Procuração	Procuracao_Ufscar-Unesp.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante GRU 5 428694.pdf
Relatório Descritivo	Relatório.pdf
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Desenho	Figuras.pdf
Resumo	Resumo.pdf

Sequências Biológicas

- Declaro que a informação contida na 'Listagem de Sequências' apresentada em formato eletrônico está limitada ao conteúdo da matéria revelada pelas sequências de aminoácidos e/ou de nucleotídeos divulgadas no pedido de patente, conforme depositado

Tipos de Sequências Biológicas	Nome
Listagem de Sequências Biológicas em formato TXT	Listagem de sequencia.txt

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

PROCURAÇÃO

Pelo presente instrumento,

a **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30.01.1976, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, CEP 01.049-010, São Paulo/SP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, doravante designada simplesmente UNESP, neste ato, representada por seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. **SANDRO ROBERTO VALENTINI**, de acordo com o Art. 34, I de seu Estatuto, ou quem legalmente o substitua,

nomeia e constitui seu procurador, **RENAN PADRON ALMEIDA**, brasileiro, portador do RG nº 43.746.608-5, SSP/SP, inscrito no CPF/MF sob o nº 337.783.018/96,

outorgando-lhe poderes para representá-la perante o Instituto Nacional da Propriedade Intelectual – INPI e outras instituições competentes, para o fim de requerer e processar direitos de propriedade intelectual, tais como patentes de

invenção, de modelos de utilidade, desenhos industriais, registros de marcas de produto, de serviço, coletivas ou de certificação, de indicações geográficas, cultivares, direitos de autor, de programas de computador e mantê-los em vigor com amplos e ilimitados poderes para assinar petições, autorizações para cópias, termos de cessão de direitos, termos de gestão e compartilhamento de propriedade intelectual, documentos diversos relacionados ao processo administrativo de proteção de direitos de propriedade intelectual, incluindo, mas não se limitando, aos documentos já utilizados pelo INPI, bem como àqueles que vierem a ser adotados e utilizados para instrução processual de patentes, modelos de utilidades, marcas, desenhos industriais e programas de computador, pagar taxas, retribuições, impostos, fazer prova de uso das invenções patenteadas ou das marcas registradas, efetuar pagamentos e receber restituições, dando as respectivas quitações, apresentar oposições, recursos, réplicas, desistir, renunciar, anotar, averbar contratos de licença e transferências de tecnologia, elaborar notificações extrajudiciais, requerer prorrogação dos prazos de proteção, fazer declarações, opor, protestar, impugnar, recorrer, pedir reconsideração, manifestar-se sobre oposições e recursos, obter vista de processos, cumprir exigências, apresentar defesas escritas ou orais, desistir, replicar, transigir, receber, juntar e retirar documentos, requerer caducidade e contestar pedido de caducidade, requerer e contestar nulidade administrativa e licença compulsória, preencher qualquer tipo de formalidade, requerer anotação e averbação de cessão, alterações de nome e sede, proceder à publicação de editais de chamamento para instruir, elaborar, firmar e acompanhar contratos de transferência de tecnologia e/ou de licenciamento com exclusividade ou não, e praticar para o fim mencionado

Agência UNESP de Inovação

Rua Quirino de Andrade, 215 – 9º andar - Centro

CEP. 01049-010, São Paulo/SP - Brasil

Fone: +55 11 5627 0696 - e-mail: auin@unesp.br

todos os atos necessários perante as autoridades administrativas competentes no Brasil em benefício da Outorgante.

São Paulo, 16 de julho de 2018.



Srg Roberto Nobre

UNESP

pl Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

Reitor

SERGIO ROBERTO NOBRE
VICE-REITOR NO EXERCÍCIO DA REITORIA

9.º TABELIÃO DE NOTAS

Rua Marconi, 12 - 9.º andar - CEP 01047-000 - São Paulo
Telefone: (11) 3258-2011 - Fax: (11) 2174-6858
www.nopcartorio.com.br

Reconheço a 1 firma com valor econômico por semelhança de SERGIO ROBERTO NOBRE, do que dou fé.

Em tesº da verdade. ANDREI BARRETO DA SILVA -
São Paulo/Capital, 24 de julho de 2018. Valor recebido R\$ 9,25
Válido somente com selo de autenticidade. Selos pagos por verba



Termo de Posse e Compromisso do Professor Doutor Sandro Roberto Valentini como Reitor da UNESP

Nos dezesseis dias do mês de janeiro de dois mil e dezessete, às catorze horas e trinta minutos, no Teatro Santander, São Paulo, em sessão pública e solene do Conselho Universitário, o Professor Doutor Sandro Roberto Valentini, por este ato, toma posse na função de Reitor da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", com mandato de quatro anos, a contar de 15 de janeiro de 2017, conforme Decreto de nomeação de 28.11.2016, do excelentíssimo senhor Geraldo Alckmin, Governador do Estado de São Paulo, publicado no Diário Oficial do Estado de 29 de novembro de 2016 e retificado conforme publicação de 22 de dezembro de 2016. Na oportunidade, o empossado assume o compromisso de cumprir e fazer cumprir o Estatuto, o Regimento Geral e a legislação da UNESP, bem como as leis maiores do ensino no país. Para constar, foi elaborado o presente termo, assinado pelo Professor Doutor Julio Cezar Durigan, magnífico Reitor da UNESP, e pelo Professor Doutor Sandro Roberto Valentini, ora empossado, São Paulo, 16 de janeiro de 2017.

[Handwritten signatures and scribbles]

9.º TFE
9.º TFE
9.º TFE

9.º TABELIÃO DE NOTAS
Rua Marconi, 124 - 1.º no 6.º andar - CEP 01047-000 - São Paulo
Telefone: (11) 3259-2611 - Fax: (11) 2174-6858
www.nonoartorio.com.br

Reconheço as 3 firmas sem valor econômico por semelhança de JULIO CEZAR DURIGAN, SANDRO ROBERTO VALENTINI, MARIA DALVA SILVA PAGOTTO. do que dou fé.

Em tes. da verdade. GUSTAVO FONTANA ANDOLPHO - São Paulo/Capital, 16 de janeiro de 2017. Valor recebido R\$ 17,10
"Válido somente com selo de autenticidade. Selos pagos por verba"

COLEGIO NOTARIAL DO BRASIL
113787
FIRMA 2
1020AA0191660

COLEGIO NOTARIAL DO BRASIL
113787
FIRMA 1
1020AA0622948

06 MAR 2017

COLEGIO NOTARIAL DO BRASIL
113787
AUTENTICACAO
1020A20395514

Artigo 1º - É declarada de utilidade pública a Associação Maestro Cuzábio Possidônio Martins, com sede em Apiaí...

Atos do Governador

DECRETOS(S)

DECRETOS DE 28-11-2016
Dispensando, a pedido e a partir de 25-11-2016, João Batista Moraes...

DESPACHOS DO GOVERNADOR

DESPACHOS DO GOVERNADOR, DE 28-11-2016
No processo SE-542-2016 (SG-118.809-16), sobre restabelecimento de débito...

Casa Civil

GABINETE DO SECRETÁRIO

Despacho do Secretário, de 23-11-2016
No processo CC 34660-2016, em que é interessada Casa Civil, sobre pagamento por indenização...

Governo

FUNDO SOCIAL DE SOLIDARIEDADE DO ESTADO DE SÃO PAULO

CHEFIA DE GABINETE

Extracto de 2º Termo de Aditamento ao Convênio Convênio FUSSESP 216/2014 - Processo: FUSSESP 37236/2014...

avença ora aditada, ficando restabelecido, assim, o número de turnos previsto no instrumento original de ajuste.
Parágrafo Primeiro - A origem do conteúdo no "caput" desta cláusula fica retificada a cláusula primeira do aludido 1º termo...

CASA MILITAR

Resolução CMIL 17-610 - Cedeec, de 28-11-2016
Edita o Plano Preventivo de Defesa Civil para erosão costeira, inundações costeiras e enchentes/alagamentos causados por eventos meteorológicos-oceanoográficos extremos como ressacas do mar e marés altas...

Artigo 2º - O Plano Preventivo de Defesa Civil (PPDC) para erosão costeira, inundações costeiras e enchentes/alagamentos causados por eventos meteorológicos-oceanoográficos extremos (ressacas do mar e marés altas) tem a seguinte composição:

Artigo 3º - Caberá às Coordenadorias Municipais de Defesa Civil envolvidas neste Plano, apoiadas pelas respectivas Coordenadorias Regionais de Defesa Civil, a edição de planos preventivos e de contingência específicos para cada município, em consonância com os pressupostos presentes nos anexos desta resolução.

ANEXO I
Normas e procedimentos do Plano Preventivo de Defesa Civil (PPDC) para erosão costeira, inundações costeiras e enchentes/alagamentos causados por eventos meteorológicos-oceanoográficos extremos (ressacas do mar e marés altas)

III - Erosão costeira
O resultado do conjunto de processos sedimentares que atuam na praia pode ser medido por meio do seu balanço sedimentar que, em outras palavras, a relação entre as perdas/saídas e os ganhos/entradas de sedimentos nessa praia...

Artigo 4º - O Plano Preventivo tem como base fundamental para erosão costeira:
1. Prevenção de condições meteorológicas associadas à elevação do nível do mar junto à costa;
2. Elevação do nível do mar prevista (altura das ondas, elevação do mar e maré astronômica);
3. Mapa de risco à erosão costeira.

Artigo 5º - O Plano Preventivo para os perigos costeiros tratados nesta resolução está estruturado em 3 (três) níveis, incluindo, progressivamente, a possibilidade de ocorrências de ressacas e marés altas, a saber:
I - Observação;
II - Atenção;
III - Alerta.

Artigo 6º - Os procedimentos operacionais de contingência previstos para os diferentes níveis, segundo o artigo 5º, são os seguintes:
I - Nível de Observação
1) Coordenadoria Estadual de Defesa Civil (CEDEC):
a) monitorar os critérios de vento e ondas do quadrante sul e elevação da maré;

a) proceder a totalidade dos itens definidos para o nível de atenção.
3) Coordenadorias Municipais de Defesa Civil (COMDEC) a) proceder a totalidade dos itens definidos para o nível de atenção e adotar as medidas previstas nos respectivos planos de contingência municipal.

Planejamento e Gestão

GABINETE DO SECRETÁRIO

Extracto do 3º Termo Aditivo PROCESSO SPDR 2274/2012 CONTRATO 032/2012 - GS LOCADOR: SECRETARIA DE PLANEJAMENTO E GESTÃO LOCADOR: YUNES - PARTICIPAÇÃO, ADMINISTRAÇÃO E NEGÓCIOS LTDA

UNIDADE CENTRAL DE RECURSOS HUMANOS
Instrução Conjunta UCRH/SPprev 04, de 25-11-2016
A Unidade Central de Recursos Humanos - UCRH, da Secretaria de Planejamento e Gestão e a São Paulo Previdência - SPPREV, em razão da edição da Lei Complementar 669, de 20-12-1991 que instituiu o Adicional de Local de Exercício para os servidores do Quadro do Magistério - OM, com alterações posteriores...

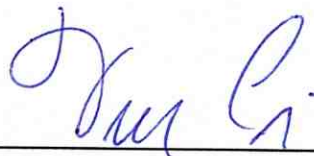
ANEXO II
Procedimentos para a elaboração do Plano de Contingência Municipal para erosão costeira, inundações costeiras e alagamentos causados por eventos meteorológicos-oceanoográficos extremos (ressacas do mar e marés altas).
Para a edição dos Planos de Contingência de erosão costeira, inundações costeiras e alagamentos causados por eventos meteorológicos-oceanoográficos extremos (ressacas do mar e marés altas), deverão ser consideradas as seguintes ações de forma a contemplar os aspectos locais/municipais e suas peculiaridades:
1. Mapear e monitorar as áreas sujeitas aos perigos costeiros citados nesta resolução;
2. Divulgar os alertas e boletins da CEDEC para a população municipal;
3. Deslocar agentes públicos para pontos estratégicos ou de interesse, suscetíveis aos eventos dessa resolução;
4. Mobilizar as equipes de serviços públicos para locais, reparos e desobstruções;
5. Determinar a evacuação de moradores dos imóveis;
6. Definir abrigos providos para a população afetada;
7. Determinar o isolamento de ruas e avenidas sujeitas a inundações costeiras e enchentes/alagamentos;
8. Atualizar os dados e informações dos órgãos que compõem o sistema de contingência municipal;
9. Solicitar o apoio suplementar da CEDEC.



PROCURAÇÃO

Pelo presente instrumento, a **FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar**, fundação pública federal de regime estatutário, criada pelo Decreto nº 62.758, de 22 de maio de 1968, com sede na Rod. Washington Luís, Km 235, em São Carlos, Estado de São Paulo, CEP 13565-905, Brasil, inscrita no CNPJ/MF sob o nº 45.358.058/0001-40, neste ato representada por sua Reitora, nos termos de seu Estatuto, art. 27, ou quem legalmente a substitua, confere poderes especiais à **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO” - UNESP**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30.01.1976, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, CEP 01.049-010, São Paulo/SP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, doravante designada simplesmente UNESP, neste ato, representada por seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. **SANDRO ROBERTO VALENTINI**, de acordo com o Art. 34, I de seu Estatuto, ou quem legalmente o substitua, para o fim de requerer e processar direitos de propriedade intelectual face ao pedido de patente intitulado “MÉTODO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEO DIMÉRICO, PEPTÍDEOS DIMÉRICOS E USO DO PEPTÍDEO DIMÉRICO”, a ser depositado junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para mantê-lo em vigor com amplos poderes para assinar petições e documentos, pagar taxas, anotar transferências, fazer prova de uso da invenção patenteada, apresentar oposições, recursos, réplicas, anotar, elaborar notificações extrajudiciais, e praticar para os fins mencionados todos os atos necessários perante as autoridades administrativas competentes no Brasil e no exterior, em benefício da Outorgante, ratificando os atos já praticados.

São Carlos, 03 de dezembro de 2019.



REITORIA

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar

Prof. Dr. Walter Libardi
VICE-REITOR



Marcelo Luiz Quarteiro, na vaga 0340876, decorrente de aposentadoria de Joel de Freitas, Portaria nº 745, de 11/08/2015, publicada no DOU de 13/08/2015. Lotação: Faculdade de Medicina.

MARCELO AUGUSTO SANTOS TURINE

PORTARIA Nº 977, DE 10 DE NOVEMBRO DE 2016

O REITOR DA FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL, no uso de suas atribuições legais e tendo em vista o que consta do Processo nº 23104.005812/2016-51, resolve:

Conceder aposentadoria voluntária a Osvaldo Gonçalves de Souza, matrícula SIAPE nº 0432654, integrante da Carreira Técnico-Administrativa, do quadro de pessoal desta Universidade, ocupante do cargo de Professor, Classe B, Nível de Capacitação 4, Padrão 16, nos termos do artigo 3º, incisos I a III, da Emenda Constitucional nº 47/05, com proventos integrais e dezessete por cento de aumento.

MARCELO AUGUSTO SANTOS TURINE

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

PORTARIA DE 9 DE NOVEMBRO DE 2016

O VICE-REITOR DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA, no exercício da Reitoria, no uso de suas atribuições legais e estatutárias, resolve:

Nº 1.566 - DISPENSAR a servidora CAMILA GONCALVES DOS SANTOS DO CANTO, Professora do Magistério Superior, SIAPE 2142999, da função de Chefe da Divisão de Apoio Pedagógico e de Produção de Materiais Didáticos, da Coordenadoria de Educação à Distância, da Universidade Federal do Pampa, FG-3.

Nº 1.567 - DISPENSAR a servidora DENISE APARECIDA MOSER, Professora do Magistério Superior, SIAPE 1578489, da função de Assessora Técnica da Coordenadoria de Educação à Distância, da Universidade Federal do Pampa, FG-3.

CONSIDERANDO o disposto no artigo 95, da Lei 8.112 de 11 de dezembro de 1990, no art. 2º do Decreto nº 1387, de 07 de Fevereiro de 1995, na Portaria/MEC nº 404, de 23 de abril de 2009, que dispõe sobre afastamento do País de servidores civis da Administração Pública Federal, e os termos do Processo protocolado sob o nº 23100.003242/2016-06, resolve:

Nº 1.569 - AUTORIZAR o afastamento do País do servidor GUI-LHERME FREDERICO MARRANGHELLO, SIAPE 1451838, período de 22 a 26 de novembro de 2016, inclusive trânsito, com ônus limitado para esta Universidade e ônus CAPES processo nº 23038.002618/2013-13, para fins de participação e apresentação de trabalho no "IX Encontro de la Asociación de Planetarios de América del Sur - APAS, no Planetário de Montevideo, em Montevideo, Uruguai. Processo nº 23100.003254/2016-22, resolve:

Nº 1.570 - AUTORIZAR o afastamento do País da servidora LEONOR SIMIONI, SIAPE 2977310, período de 22 a 27 de novembro de 2016, inclusive trânsito, com ônus limitado para esta Universidade, para fins de participação e apresentação de trabalho no Evento Nova VIII, na Universidad de Buenos Aires, em Buenos Aires, Argentina. Processo nº 23100.003253/2016-88, resolve:

Nº 1.571 - AUTORIZAR o afastamento do País da Servidora VIVIAN DE CARVALHO BELOCHIO, SIAPE 1624194, período de 19 a 25 de novembro de 2016, inclusive trânsito, com ônus limitado para esta Universidade, para fins de participação e apresentação de trabalho no Congresso Internacional de Jornalismo e Dispositivos Móveis, na Universidade da Beira Interior, em Covilhã, Portugal.

Nº 1.572 - DESIGNAR a servidora CAMILA GONCALVES DOS SANTOS DO CANTO, Professora do Magistério Superior, SIAPE 2142999, para função de Coordenadora do Curso de Licenciatura em Letras - Português modalidade à distância, da Coordenadoria de Educação à Distância, da Universidade Federal do Pampa, percebendo FCC.

MAURÍCIO AIRES VIEIRA

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

ATO Nº 1.822, DE 8 DE NOVEMBRO DE 2016

A VICE REITORA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ, no exercício da Reitoria, usando de suas atribuições legais, resolve:

Designar VANECY MATIAS DA SILVA, matrícula SIAPE nº 1554592, para responder pela Função Gratificada FG-4, de Secretária Administrativa, da Biblioteca Comunitária "Jornalista Carlos Castello Branco", a partir de 09.08.2016. (considerando o Processo nº 23111.019458/2016-56 e apenso).

NADIR DO NASCIMENTO NOGUEIRA

JEFFERSON FERNANDES DO NASCIMENTO

Este documento pode ser verificado no endereço eletrônico <http://www.in.gov.br/sumarios/diario>, pelo código 0002201611106014

Documento assinado digitalmente conforme MP nº 2.200-2 de 24/08/2001, que institui a Infraestrutura de Chaves Públicas Brasileira - ICP-Brasil.

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

PORTARIAS DE 9 DE NOVEMBRO DE 2016

A REITORA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG, no uso das atribuições que lhe conferem o Estatuto e o Regimento Geral da Universidade, resolve:

Nº 2.421 - Dispensar, a pedido, o servidor BENTO DOS SANTOS BARROSO, matrícula SIAPE 408854, da Função Gratificada de SECRETÁRIO GERAL / ESCOLA DE ENFERMAGEM / EEnf - FG-4, a partir do dia 16/11/2016.

Nº 2.422 - Designar a servidora NIVIA CONCEIÇÃO LEAL TOMAZINI, matrícula SIAPE 409353, para a Função Gratificada de SECRETÁRIA GERAL PRO TEMPORE / ESCOLA DE ENFERMAGEM / EEnf - FG-4, a partir do dia 16/11/2016.

CLEUZA MARIA SOBRAL DIAS

DESPACHO DA REITORA
Em 10 de novembro de 2016

A Reitora da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, no uso da atribuição que lhe confere o Decreto de 03/01/2013, publicado no Diário Oficial da União em 04/01/2013, resolve autorizar o afastamento do país de:

Cristina Meinhardt, Professora da Carreira do Magistério Superior, afastamento para "ICECS 2016 - 23rd IEEE Int. Conf. On Electronics, Circuits, and Systems", no período de 05/12/2016 a 17/12/2016, no IEEI (Institute of Electrical and Electronics Engineers) em Monte Carlo / Monaco, com ônus FURG para diárias e inscrição, processo nº 23116.008901/2016-13.

CLEUZA MARIA SOBRAL DIAS

RETIFICAÇÃO

No afastamento do país de Mauricio Magalhães Mata, publicado no DOU do dia 10/11/2016, seção 2, página 16, onde se lê: "Magalhães Mata, Professor da Carreira do Magistério Superior", leia-se: "Maurício Magalhães Mata, Professor da Carreira do Magistério Superior".

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA

DESPACHO DO REITOR
Em 9 de novembro de 2016

O REITOR PRO TEMPORE DA FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA - UNIR, mediante atribuições que lhe são conferidas pelo artigo 11 do Estatuto da UNIR e pela Portaria nº 399/MEC, de 10/5/2016, publicada no DOU nº 90, de 12/5/2016, seção 2, p.24, e considerando o que consta no Processo nº 23118.003659/2016-15, RESOLVE:

Nº 59 - Autorizar o afastamento do País à servidora ROSANGELA DE FATIMA CAVALCANTE FRANÇA, SIAPE nº 0396679, ocupante do cargo de Professor Efetivo da Fundação Universidade Federal de Rondônia, no período de 13/11/2016 a 20/11/2016 (incluindo trânsito), para participar do XI Seminário Internacional da Rede Latino-Americana de Estudos sobre o Trabalho Docente - Rede ESTRADADO, com apresentação de trabalho, na Universidade Pedagógica Nacional (UPN), Campus Ajusco, na Cidade do México, México. Com ônus limitado.

ARI MIGUEL TEIXEIRA OTT

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA

PORTARIA Nº 969, DE 10 DE NOVEMBRO DE 2016

O REITOR DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA, nomeado pelo Decreto Presidencial, publicado na Seção 02, do D.O.U. de 03/03/2016, no uso de suas atribuições legais e estatutárias, Resolve:

Art. 1º Nomear o Sr. MARCOS ROBSON SACHET, portador da Cédula de Identidade nº 93651090, candidato aprovado em Concurso Público, objeto do Edital nº 188/2015-PROGESP, de 18 de maio de 2015, publicado no DOU em 19 de maio de 2015, Seção 3, e Edital de Homologação nº 417/PROGESP de 03 de outubro de 2016, publicado no DOU em 04 de outubro de 2016, Seção 3, reificando pelo Edital nº 426/2016-PROGESP de 17 de outubro de 2016, publicado no DOU em 18 de outubro de 2016, seção 3, para exercer o cargo de Professor da Carreira do Magistério do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico, Classe D I, com o título de Graduação, com carga horária de 40 (quarenta) horas semanais, em regime de dedicação exclusiva, na área de Agronomia, subárea de Fruticultura , sob o código de vaga nº 0946364, com lotação na Escola Agrícola, do Quadro de Pessoal Permanente da Universidade Federal de Roraima.

Art. 2º A posse deverá ocorrer no prazo de até 30 (trinta) dias, a contar da publicação deste ato no Diário Oficial da União.

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

PORTARIAS DE 9 DE NOVEMBRO DE 2016

A Reitora da Universidade Federal de São Carlos, no uso de suas atribuições legais e estatutárias, considerando os termos do Ofício CCTS 25/2016, de 07 de novembro de 2016, resolve:

Nº 1.981 - Exonerar, a pedido, o Prof. Dr. APARECIDO JUNIOR DE MENEZES da função de Vice-Diretor do Centro de Ciências e Tecnologias para a Sustentabilidade - CCTS, campus Sorocaba, a partir de 08/11/2016.

Nº 1.982 - Exonerar, a pedido, o Prof. Dr. APARECIDO JUNIOR DE MENEZES da função de Diretor de Planejamento do Centro de Ciências e Tecnologias para a Sustentabilidade - CCTS, campus Sorocaba, a partir de 08/11/2016.

A Reitora da Universidade Federal de São Carlos, no uso de suas atribuições legais e estatutárias, resolve:

Nº 1.983 - Exonerar, a pedido, o servidor LUCIANO MITIDIERI BENTO GARCIA da função de Coordenador da Coordenadoria de Infraestrutura para Pesquisa, da Pró-Reitoria de Pesquisa.

Nº 1.984 - Exonerar, a pedido, o Prof. Dr. MÁRCIO MERINO FERNANDES da função de Vice-Diretor do Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia - CCET.

Nº 1.985 - Exonerar, a pedido, o Prof. Dr. MÁRCIO MERINO FERNANDES da função de Diretor da Divisão de Planejamento do Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia - CCET.

WANDA APARECIDA MACHADO HOFFMANN

PORTARIAS DE 10 DE NOVEMBRO DE 2016

A Reitora da Universidade Federal de São Carlos, no uso de suas atribuições legais e estatutárias, CONSIDERANDO o disposto na Lei nº 9192, de 21/12/95, regulamentada pelo Decreto nº 1916, de 23/05/96; e CONSIDERANDO as disposições da Portaria MEC nº 1048, de 14/10/96, resolve:

Nº 1.986 - Art. 1º - Nomear o Prof. Dr. WALTER LIBARDI, ocupante da classe de Professor Titular da Universidade Federal de São Carlos, para exercer, por 04 (quatro) anos, o mandato de Vice-Reitor desta Universidade, com CD nível 2, a partir de 14/11/2016. Art. 2º - Esta Portaria entra em vigor nesta data.

Nº 1.987 - Art. 1º - Nomear o Prof. Dr. ADEMIR DONIZETI CALDEIRA, ocupante da classe de Professor Associado da Universidade Federal de São Carlos, para exercer, por 04 (quatro) anos, o mandato de Pró-Reitor de Graduação desta Universidade, com CD nível 2. Art. 2º - Esta Portaria entra em vigor nesta data.

Nº 1.988 - Art. 1º - Nomear o Prof. Dr. JOÃO BATISTA FERNANDES, ocupante da classe de Professor Titular da Universidade Federal de São Carlos, para exercer, por 04 (quatro) anos, o mandato de Pró-Reitor de Pesquisa desta Universidade, com CD nível 2. Art. 2º - Esta Portaria entra em vigor nesta data.

Nº 1.989 - Art. 1º - Nomear a Prof. Dra. AUDREY BORGHI E SILVA, ocupante da classe de Professor Associado da Universidade Federal de São Carlos, para exercer, por 04 (quatro) anos, o mandato de Pró-Reitor de Pós-Graduação desta Universidade, com CD nível 2. Art. 2º - Esta Portaria entra em vigor nesta data.

Nº 1.990 - Art. 1º - Nomear o Prof. Dr. LUIZ CARLOS DE FARIA, ocupante da classe de Professor Adjunto da Universidade Federal de São Carlos, para exercer, por 04 (quatro) anos, o mandato de Pró-Reitor de Extensão desta Universidade, com CD nível 2. Art. 2º - Esta Portaria entra em vigor nesta data.

Nº 1.991 - Art. 1º - Nomear o Prof. Dr. MÁRCIO MERINO FERNANDES, ocupante da classe de Professor Associado da Universidade Federal de São Carlos, para exercer, por 04 (quatro) anos, o mandato de Pró-Reitor de Administração desta Universidade, com CD nível 2. Art. 2º - Esta Portaria entra em vigor nesta data.

Nº 1.992 - Art. 1º - Nomear o Prof. Dr. ITAMAR APARECIDO LORENZON, ocupante da classe de Professor Associado da Universidade Federal de São Carlos, para exercer, por 04 (quatro) anos, o mandato de Pró-Reitor de Gestão de Pessoas desta Universidade, com CD nível 2. Art. 2º - Esta Portaria entra em vigor nesta data.

Nº 1.993 - Art. 1º - Nomear o Prof. Dr. LEONARDO ANTONIO DE ANDRADE, ocupante da classe de Professor Adjunto da Universidade Federal de São Carlos, para exercer, por 04 (quatro) anos, o mandato de Pró-Reitor de Assuntos Comunitários e Estudantes desta Universidade, com CD nível 2. Art. 2º - Esta Portaria entra em vigor nesta data.

No. compromisso banco 1032661000100005	No. compromisso cliente 428694/DS1 101009853	Data do Crédito 29/11/2019	Valor 70,00
Convênio 0033-0239-004900019792		Data da Solicitação 29/11/2019	Agência/Conta Corrente 0239 / 000430023105
Nome/Razão Social do Pagador Original UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE			CPF/CNPJ do Pagador Original 48.031.918/0001-24
Nome/Razão Social do Beneficiário Original INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST			CPF/CNPJ do Beneficiário Original 42.521.088/0001-37
Nome/Razão Social do Pagador Efetivo FUNDACAO PARA O DESENVOLVIMENT			CPF/CNPJ do Pagador Efetivo 57.394.652/0001-75
Instituição Financeira Favorecida 001 - BANCO DO BRASIL S.A.			
Código de Barras 00190.00009 02940.916196 12428.694173 1 80990000007000			
Valor Nominal 70,00	Desc. / Abat. 0,00	Juros 0,00	Valor a Pagar 70,00

Tipo de Serviço
Pagamento Fornecedor

Complemento do Tipo de Serviço

Autenticação Bancária
11CBC4ED225CB22DF5C51ED

Central de Atendimento Santander Empresarial
4004-2125 (Regiões Metropolitanas)
0800 726 2125 (Demais Localidades)
0800 723 5007 (Pessoas com deficiência auditiva ou de fala)

SAC - Atendimento 24h por dia, todos os dias.
0800 762 7777
0800 771 0401 (Pessoas com deficiência auditiva ou de fala)

Ouvidoria - Das 9h às 18h, de segunda a sexta-feira, exceto feriado.
0800 726 0322
0800 771 0301 (Pessoas com deficiência auditiva ou de fala)

**MÉTODO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEO DIMÉRICO, PEPTÍDEOS
DIMÉRICOS E USO DO PEPTÍDEO DIMÉRICO**

Campo da invenção:

[001] A presente invenção se enquadra no campo da biotecnologia, mais particularmente ela se refere a um método de obtenção de um peptídeo dimérico, ao peptídeo dimérico e seu uso como agente bactericida, fungicida e antitumoral.

[002] Mais particularmente, a presente invenção refere-se ao método de obtenção de peptídeos diméricos pela síntese em fase sólida e pela dimerização em solução em que ocorre a formação de uma ligação dissulfeto intermolecular. O homodímero obtido apresenta a SEQ ID NO: 1 e atua na inibição de diferentes classes de DNA topoisomerasas, o que lhe confere grande capacidade bactericida/fungicida com amplo espectro antimicrobiano. Em adição, apresenta atividade contra células tumorais e baixa toxicidade para células humanas normais.

Fundamentos da invenção:

[003] As doenças infecciosas estão entre as principais causas de morte da população humana, o que pode ser explicado, em grande parte, pelo surgimento de microrganismos multirresistentes aos medicamentos existentes no mercado.

[004] A velocidade com que ocorre a disseminação de cepas bacterianas patogênicas resistentes aos agentes antimicrobianos atualmente disponíveis representa o principal problema de saúde pública mundial. Em adição, estudos mostram que até 2050 haverá um aumento significativo no número de mortes causadas pela infecção microbiana e pelo câncer (O'NEILL, 2014). Estudos mostram que o número de novos

antibióticos no mercado diminuiu significativamente nos últimos anos (Infectious Diseases Society of America, 2011; Fernandes; Martes, 2017), sendo que na década de 2000, somente dez novas entidades químicas foram aprovadas, o que fez com que a Organização Mundial de Saúde (OMS) incluísse os agentes antibacterianos na lista de medicamentos prioritários para o mundo (KAPLAN et al., 2013). Por outro lado, embora um considerável número de novos medicamentos anticâncer tenha sido aprovados no decorrer dos últimos anos, a toxicidade e a resistência quimioterápica ainda representam sérios entraves a serem superados.

[005] Diante da gravidade desse cenário, é de extrema importância a pesquisa e o desenvolvimento de novas classes de antimicrobianos e de antitumorais que possam atuar em diferentes alvos e que sejam menos suscetíveis aos diversos mecanismos de resistência medicamentosa.

[006] Neste sentido, as DNA topoisomerasas, enzimas essenciais ao metabolismo celular, têm se tornado alvos atrativos para a ação de diferentes fármacos, o que representa uma estratégia promissora no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (REECE; MAXWELL, 1991; POMMIER, 2010). Peptídeos sintéticos têm sido descritos como os inibidores ideais da atividade de topoisomerasas, isoladamente ou em combinação com pequenas moléculas de medicamentos (SINGH et al., 2001; POND; MARSHALL; BARROWS; 2006; TROVATTI, et al., 2008; BARBOSA, et al. 2012). De relevância para o desenvolvimento de novos compostos peptídicos tendo como alvo as enzimas DNA topoisomerasas, estudos de triagens de bibliotecas combinatórias resultaram na identificação do peptídeo WRWYCRCK, como um forte inibidor

da topoisomerase IB de vaccinia vírus (KLEMM, et al., 2000; FUJIMOTO; PINILLA; SEGALL, 2006).

[007] A presente invenção se fundamenta no método de obtenção de um novo peptídeo inibidor de DNA topoisomerasas, o qual apresenta grande atividade antimicrobiana e antitumoral. A sequência peptídica de SEQ ID NO: 1 foi obtida a partir de estudos envolvendo a dimerização do octapeptídeo WRWYCRAK de SEQ ID NO: 2. A substituição de um resíduo de cisteína da posição 7 (C7) por alanina (A) na SEQ ID NO: 2 e a posterior dimerização, envolvendo o resíduo de cisteína C5, resultou na obtenção do peptídeo homodimérico da presente invenção (Figura 1), um potente agente bactericida/fungicida e adicionalmente um agente antitumoral.

Estado da técnica:

[008] Os documentos intitulados "*Peptide inhibitors of DNA cleavage by tyrosine recombinases and topoisomerases*" de Klemm M et al., (2000) e "*Reversible inhibitors of lambda integrase-mediated recombination efficiently trap Holiday junction intermediates and form the basis of a novel assay for junction resolution*", de Boldt JL et al., (2004), descrevem hexapeptídeos inibidores de DNA topoisomerasas, assim como a presente invenção, identificados a partir das triagens de bibliotecas combinatórias tendo como resultado o peptídeo WRWYCR. No entanto, estes não revelam o peptídeo de SEQ ID NO: 1 da presente invenção.

[009] Já os documentos intitulados "*DNA repair, a novel antibacterial target: Holliday junction-trapping peptides induce DNA damage and chromosome segregation defects*" de Gunderson CW et al., (2006), "*Peptide wrwycr inhibits the excision of the several prophages and traps Hollidays*

junctions inside Bacteria" de Gunderson, Carl et al., (2009) e "*wrwytggrw is a single-chain functional analog of the Holliday junction-binding homodimer, (wrwycr)₂*" de Rideout, Marc et al., (2013) descrevem outros peptídeos com mecanismo de ação similares, em particular o peptídeo WRWYCR, que apresenta um amplo espectro de ação contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. No entanto, não revelam o peptídeo de SEQ ID NO: 1 da presente invenção.

[010] Por fim, o documento intitulado "*New peptide inhibitors of type IB topoisomerases: similarities and differences vis a vis inhibitors of tyrosine recombinases*" de Fujimoto DF, et al., (2006) descreve uma retriagem de bibliotecas combinatórias resultando na identificação do octapeptídeo WYWYCRCK, até então considerando o inibidor mais potente da DNA topoisomerase. No entanto, não é revelado o peptídeo da SEQ ID NO:1 da presente invenção.

[011] Diferente do estado da técnica, a presente invenção emprega a dimerização como estratégia para a obtenção do peptídeo de SEQ ID NO: 1. A substituição de um resíduo de cisteína da posição 7 (C7) por alanina (A) e a posterior dimerização, envolvendo o resíduo de cisteína C5 tornou esse peptídeo um inibidor ainda mais potente da DNA topoisomerase, mais particularmente um inibidor da topoisomerase do tipo I e do tipo II e com grande atividade bactericida/fungicida/antitumoral.

[012] Em vista destes documentos, a matéria desta invenção é considerada nova e inventiva.

Breve descrição da invenção:

[013] A presente invenção se enquadra no campo da biotecnologia, mais particularmente a um método de obtenção

de um peptídeo dimérico, ao peptídeo dimérico e seu uso como agente bactericida, fungicida e antitumoral.

[014] Mais particularmente, a presente invenção refere-se ao método de obtenção de peptídeos diméricos pela síntese em fase sólida e pela dimerização em solução em que ocorre a formação de uma ligação dissulfeto intermolecular.

[015] A substituição de um resíduo de cisteína da posição 7 (C7) por alanina (A) na SEQ ID NO: 2 e a posterior dimerização, envolvendo o resíduo de cisteína C5 resultou na obtenção do peptídeo dimérico de SEQ ID NO: 1 da presente invenção com grande capacidade bactericida/fungicida e antitumoral.

Breve descrição das figuras:

[016] Para obter uma total e completa visualização do objeto desta invenção, são apresentadas as figuras as quais se faz referências, conforme se segue:

Figura 1. Estrutura primária do peptídeo de SEQ ID NO: 1 obtido após a reação de dimerização. O referido peptídeo é constituído por duas sequências de SEQ ID NO: 2 ligadas por uma ponte dissulfeto entre as cisteínas na posição C5.

Figura 2. Esquema ilustrativo da síntese em fase sólida. Os círculos coloridos e as estrelas azuis representam, respectivamente, os resíduos dos aminoácidos utilizados na síntese e os protetores permanentes das cadeias laterais reativas dos mesmos.

Figura 3. Monitoramento da reação de dimerização do peptídeo linear bruto de SEQ ID NO: 2 por cromatografia CLAE para obtenção do peptídeo sintético de SEQ ID NO: 1. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica, em que

A) monômero em condições iniciais de oxidação e B) após 48 horas de reação. Condições da análise: gradiente linear 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1 mL/min e detecção a 220 nm.

Figura 4. Perfis cromatográficos obtidos para o peptídeo da presente invenção, em que A) antes e B) após purificação. Condições da análise: gradiente linear 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1 mL/min e detecção a 220 nm.

Figura 5. Análise de espectrometria de massas do peptídeo da presente invenção.

Figura 6. Estrutura 3D representativa do "cluster" mais prevalente da trajetória da simulação de DM obtida para o peptídeo da presente invenção em meio aquoso. As cores verde, azul, vermelho e amarelo representam a cadeia carbônica, átomos de nitrogênio, átomos de oxigênio e resíduos de cisteína, respectivamente. Átomos de hidrogênio foram omitidos para uma melhor visualização.

Figura 7. Espectro de DC obtido para o peptídeo da presente invenção em solução aquosa.

Figura 8. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do peptídeo da presente invenção sobre a atividade da DNA girase de *E. coli*, em que C-: controle negativo (plasmídeo relaxado), C+: controle positivo (relaxado + 1U de girase). Os números em cada aplicação no gel representam a concentração do peptídeo em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Figura 9. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do peptídeo da presente invenção sobre a atividade da Topo IV de *E. coli*, em que C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo

superenrolado + 1U de Topo IV). Os números em cada aplicação no gel representam a concentração do peptídeo em $\mu\text{mol.L}^{-1}$

Figura 10. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do peptídeo da presente invenção sobre a atividade da Topo IA de *E. coli*, em que C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de Topo IA). Os números em cada aplicação no gel representam a concentração do peptídeo em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Figura 11. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do peptídeo da presente invenção sobre a atividade da Topo IB humana, em que C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de topo IB). Os números indicados em cada aplicação no gel representam a concentração do peptídeo em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Figura 12. Microscopia confocal a laser dos microrganismos MRSA, *E. coli* e *C. albicans* submetidas ao tratamento com o peptídeo da presente invenção, em dose subletal, em que grupo controle (A) e grupo tratado (B).

Figura 13. Efeito do peptídeo de SEQ ID NO: 1 na morfologia de MRSA, *E. coli* e *C. albicans*, em que (A) é o Grupo Controle e (B) é o Grupo tratado.

Figura 14. Tempo de morte dos microrganismos MRSA, *E. coli* e *C. albicans* submetidos ao tratamento com o peptídeo de SEQ ID NO: 1, em que (A) é o Grupo controle e (B) é o Grupo tratado.

Figura 15. Permeabilidade dos microrganismos MRSA, *E. coli* e *C. albicans* submetidos ao tratamento com o peptídeo de SEQ ID NO: 1, em (A) é o Grupo controle: células vivas em tampão PBS e (B) é o Grupo tratado.

Figura 16 Atividade antitumoral do peptídeo da presente invenção em células de câncer do epitélio escamoso de colo uterino (SiHa), após tratamento com diferentes concentrações do peptídeo da presente invenção.

Figura 17. Efeito do peptídeo da presente invenção ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) na morfologia das células de carcinoma epidermóide de colo uterino (SiHa), em que grupo controle (A) e Grupo tratado (B). As imagens mostradas foram obtidas utilizando aumento de 20X em microscópio invertido, após 24 h de incubação com o peptídeo.

Figura 18. Atividade antitumoral do peptídeo da presente invenção em células de queratinócitos não tumorais (HaCat), após tratamento com diferentes concentrações do peptídeo.

Figura 19. Atividade hemolítica do peptídeo da presente invenção após tratamento com diferentes concentrações do peptídeo.

Descrição detalhada da invenção:

[017] A presente invenção refere-se a um método de obtenção de um peptídeo dimérico, ao peptídeo dimérico obtido de SEQ ID NO: 1 e ao seu uso na preparação de uma formulação para tratamento de doenças fúngicas, bacterianas e tumorais.

[018] Dito método foi realizado com base na metodologia da fase sólida, empregando a estratégia Fmoc e na dimerização por oxidação. A metodologia da fase sólida é baseada no crescimento, resíduo por resíduo, da cadeia peptídica presa covalentemente pelo seu aminoácido carboxiterminal a sítios reativos existentes em um suporte sólido. O referido suporte sólido é um polímero insolúvel e deve ser permeável e solvatado pelos solventes orgânicos selecionados para a

síntese.

[019] Nesse sentido, como suporte polimérico utilizado no presente processo, pode ser selecionado qualquer resina utilizada para a síntese em fase sólida, preferivelmente, a resina de partida aqui utilizada foi a base de poliestireno funcionalizada especificamente a resina Rink amida AM Resina, com substituição inicial de $0,52 \text{ mmol.g}^{-1}$, que, ao final, resulta em um peptídeo carboxi-amida terminal.

[020] Como grupo protetor, foi utilizado o grupo Fmoc como protetor de todos os L- α -aminogrupos utilizados e grupos t-butílicos (t-Bu) ou derivados para a proteção das cadeias laterais dos resíduos dos aminoácidos trifuncionais.

[021] A próxima etapa da síntese envolve a remoção do grupo Fmoc em meio básico, empregando uma solução que é selecionada de piperidina a 20% em DMF ou morfolina a 50% em DMF, porém, mais preferivelmente 4-metil-piperidina a 20% (v/v) em DMF, o que permite o acoplamento do segundo aminoácido derivado.

[022] São utilizados os seguintes solventes e agentes de condensação os quais são selecionados a partir do grupo que compreende dimetilformamida, diclorometano, N-diisopropilcarbodiimida e N-hidroxibenzotriazol, preferivelmente N,N'-diisopropilcarbodiimida/N-hidroxibenzotriazol (DIC/HOBt) em dimetilformamida (DMF): diclorometano (DCM) (1:1).

[023] O monitoramento das etapas de desproteção e acoplamento foram realizados pelo teste de ninidrina (KAISER et al., 1970).

[024] Por fim, a clivagem final dos peptídeos das respectivas resinas e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais foram efetuadas pelo tratamento da

respectiva peptidil-resina com uma solução contendo ácido trifluoracético (TFA) a 94%, água deionizada a 2,5%, etanoditiol (EDT) a 2,5% e triisopropilsilano (TIS) a 1%, em temperatura a 25°C por 2 horas. Posteriormente, foi realizada a precipitação dos peptídeos em éter etílico gelado e extraído da resina com uma solução aquosa de TFA a 0,045%, e o sobrenadante contendo o peptídeo foi liofilizado para obtenção do peptídeo bruto.

[025] As etapas da síntese em fase sólida estão representadas no esquema geral da síntese na Figura 2.

[026] Após a etapa de síntese em fase sólida, o peptídeo de SEQ ID NO: 2, na sua forma não purificada, foi dimerizado por oxidação por aeração controlada por um período de 2 a 50 horas, em um sistema constituído de um compressor de ar, sendo preferivelmente por 48 horas, em temperatura que varia de 15°C a 35°C, preferivelmente a 25°C, em meio levemente alcalino, sendo seu pH ajustado para 8,0, com o uso de hidróxido de amônio para formação de ligações dissulfeto inter-cadeias, tendo sido obtido o dímero de SEQ ID NO: 1. As reações dessa etapa foram acompanhadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) realizada em sistema Shimadzu (Figura 3). Os solventes utilizados foram todos de grau cromatográfico os quais foram selecionados do grupo que compreende metanol, tetrahidrofurano e acetonitrila, mais preferivelmente água ultrapura e acetonitrila.

[027] Em seguida, o peptídeo foi purificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala semi-preparativa e a análise das frações obtidas em escala analítica (Figura 4).

[028] Já a identificação dos peptídeos foi realizada por determinação da massa molecular, utilizando um sistema LC/MS constituído por UFLC Shimadzu acoplado a um espectrômetro de massas Bruker Amazon SL empregando o modo de ionização por *eletrospray* (ESI-MS positivo), sendo os valores 1.167,8, 778,8 e 584,5, os valores de massas dos íons +2, +3 e +4, que são utilizados para encontrar a massa molecular de 2.333,16 (Figura 5).

[029] O peptídeo de SEQ ID NO: 1 revelou-se um potente inibidor de diferentes DNA topoisomerasas, com atividade específica contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e fungos (leveduras) e adicionalmente com atividade contra células tumorais, não mostrando toxicidade contra as células humanas normais.

[030] Mais especificamente, o peptídeo de SEQ ID NO:1 foi capaz de inibir o crescimento das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e do fungo *Candida albicans*. Para *Escherichia coli*, foi observado uma concentração mínima inibitória (CIM) de 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para *Staphylococcus aureus*, observou-se um CIM de 2,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para MRSA e para *Candida albicans*, um CIM de 0,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade antimicrobiana do peptídeo de SEQ ID NO: 1

CIM ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)		
MRSA	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
2,5	0,1	0,2

[031] Por outro lado, peptídeo da presente invenção foi capaz de diminuir a atividade tumoral, mais especificamente

das células de carcinoma epidermóide do colo uterino (SiHa), em que foi observada tanto a diminuição das células tumorais em cerca de 19% ao aplicar a concentração de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ da solução contendo o peptídeo (Figura 16) assim como foram observadas alterações morfológicas caracterizadas pela diminuição do volume celular, formação de núcleos picnóticos e corpos apoptóticos (Figura 17).

[032] Assim, o peptídeo de SEQ ID NO:1 da presente invenção pode ser utilizado como princípio ativo de formulações para o tratamento de infecções causadas por bactérias, fungos assim como no tratamento de células tumorais.

[033] Nesse sentido, as doenças causadas por bactérias podem ser selecionadas do grupo que compreende infecções urinárias, ósseas e de pele, pneumonia, meningite, endocardite e até mesmo septicemia; já as doenças causadas por fungos são as dermatofitoses, esporotricoses, candidíases superficiais e invasivas, entre outras e as doenças causadas por células tumorais são os carcinomas e melanomas, preferivelmente carcinoma epidermóide de colo uterino (SiHa).

Testes realizados

Dinâmica molecular (DM):

[034] Estudos estruturais por DM foram realizados para a sequência peptídica de SEQ ID NO:1 em meio aquoso. A estrutura 3D inicial do peptídeo foi construída computacionalmente usando o servidor PEP-FOLD3 (LAMIABLE et al., 2016). O melhor modelo previsto para a sequência peptídica, foi utilizado para a simulação de dinâmica molecular usando o pacote GROMACS versão 5.1 (PRONK et al.,

2013). As condições, padronizadas através de estudos anteriores, foram: campo de força OPLS-AA (*all-atom optimized potentials for liquid simulations*) (JORGENSEN, et al., 1996); modelo de água tipo SPC/E, que acrescenta uma correção da polarização média à função de energia potencial em relação ao modelo SPC (*simple point charge*), apresentando melhor densidade e constante de difusão; distância do complexo à parede da caixa de simulação mantida em 100 Å; Lennard-Jones e Coulomb foram aplicados como termos de repulsão e dispersão, com um *cutoff* de 9 Å de interação eletrostática, utilizando o método PME (*Particle Mesh Ewald*) (ESSMANN et al., 1995) com um raio de corte para a distância de van der Waals de 1,4 nm e o algoritmo LINCS (HESS, et al., 1997) para a restrição do comprimento das ligações.

[035] A estrutura representativa do “*cluster*” predominante, obtida para o peptídeo de SEQ ID NO: 1 em meio aquoso está representada na Figura 6, e mostra a predominância de uma estrutura desordenada.

Dicroísmo circular (DC):

[036] A estrutura secundária do peptídeo de SEQ ID NO: 1 foi analisada por dicroísmo circular (DC) utilizando um espectropolarímetro JASCO J-815. O peptídeo foi estudado na concentração de 60 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em solução aquosa. Foi utilizada uma cela de 1 mm de caminho óptico, acúmulo de 8 varreduras por espectro e temperatura de 25°C. O tempo de integração foi de 3 segundos por ponto e a leitura foi feita a cada 0,2 nm. O espectro (Figura 7) foi obtido em millidegrees e convertidos a elipticidade molar $[\theta]$ ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$).

[037] O peptídeo da presente invenção não apresenta estrutura secundária definida, sendo observado uma banda

negativa com um máximo em torno de 200 nm, característica de randomização. Em adição, observa-se uma intensa banda positiva em ~225-230 nm, que é atribuída à presença de ligações dissulfeto (HIDER et al., 1998; TETENBAUM; MILLER, 2001) e cadeias laterais aromáticas de aminoácidos como o triptofano (WOODY, 1994).

Ensaio de inibição de DNA Topoisomerases:

[038] Todas as enzimas DNA topoisomerases utilizadas foram adquiridas comercialmente (Inspiralis Ltd) e fornecidas com seus respectivos tampões e substratos.

Inibição da atividade da DNA girase (*Escherichia coli*):

[039] Os ensaios de inibição do superenovelamento do DNA (inibição da atividade da girase) foram realizados incubando-se 1 unidade (U) da enzima com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 relaxado (DNA) e concentrações decrescentes do peptídeo de SEQ ID NO: 1 em um volume de reação de 30 µL, conforme protocolo do fornecedor. A reação foi incubada a 37°C por 1 hora em tampão de ensaio (Tris.HCl 35 mmol.L⁻¹; KCl 24 mmol.L⁻¹; MgCl₂, 4 mmol.L⁻¹; Ditiotreitól, 2 mmol.L⁻¹; Espermidina 1,8 mmol.L⁻¹; ATP 1 mmol.L⁻¹; glicerol 6,5% (m/v); Albumina 0,1 µg.mL⁻¹; pH = 7,5; diluídos 5 vezes). A reação foi interrompida pela adição de 3 µL de SDS, 15 µL de STEB (sacarose 20%; Tris.HCl 0,05 mol.L⁻¹; pH 7,5; EDTA 0,05 mol.L⁻¹; azul de bromofenol 0,5 mg.mL⁻¹) e 60 µL da mistura clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Posteriormente as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes das mesmas foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris.HCl 89 mmol.L⁻¹; ácido bórico 89 mmol.L⁻¹; EDTA 2 mmol.L⁻¹; pH 8,2). Após a corrida, o gel foi corado durante 30 minutos com uma solução de brometo de etídio (1

mg.mL⁻¹) e analisado em um fotodocumentador Alpha Imager EP System da Alpha Innotech (Figura 8).

Inibição da atividade da Topoisomerase IV (Escherichia coli):

[040] Os ensaios de inibição do relaxamento do DNA superenovelado (inibição da atividade da Topo IV) foram realizados incubando-se 1 unidade (U) da enzima com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 superenovelado (DNA) e concentrações decrescentes do peptídeo da presente invenção em um volume de reação de 30 µL. A reação foi incubada a 37°C por 1 hora em tampão de ensaio (HEPES-KOH 40 mmol.L⁻¹; glutamato de potássio 100 mmol.L⁻¹; acetato de magnésio 10 mmol.L⁻¹; Ditiotreitól 10 mmol.L⁻¹; ATP 1 mmol.L⁻¹; Albumina 50 µg.mL⁻¹; pH = 7,6; diluído 5 vezes). Posteriormente as amostras foram tratadas e submetidas à análise de eletroforese em gel de agarose, o qual foi analisado em fotodocumentador (Figura 9), como descrito no item anterior.

Inibição da atividade da Topoisomerase IA de Escherichia coli:

[041] Os ensaios de inibição do relaxamento do DNA superenovelado (inibição da atividade da Topo IA) foram realizados incubando-se 1 unidade (U) da enzima com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 superenovelado (DNA) e concentrações decrescentes do peptídeo da presente invenção em um volume de reação de 25 µL. A reação foi incubada a 37°C por 30 min em tampão de ensaio (Tris.acetato 20 mmol.L⁻¹; acetato de potássio 50 mmol.L⁻¹; acetato de magnésio 10 mmol.L⁻¹; BSA 100 µg.mL⁻¹; pH = 7,9). Posteriormente as amostras foram tratadas, submetidas à análise de eletroforese em gel de

agarose e analisadas em fotodocumentador, conforme descrito para DNA girase (Figura 10).

Inibição da atividade da Topoisomerase IB humana:

[042] Os ensaios de inibição do relaxamento do DNA superenovelado (inibição da atividade da topoisomerase IB humana) foram realizados incubando-se 1 unidade (U) da enzima com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 superenovelado (DNA) e concentrações decrescentes do peptídeo de SEQ ID NO: 1 em um volume de reação de 30 µL. A reação foi incubada a 37°C durante 1 hora em tampão de ensaio (Tris.HCl 20 mmol.L⁻¹; NaCl 200 mmol.L⁻¹; EDTA 0,25 mmol.L⁻¹; glicerol 5%; Albumina 50 µg.mL⁻¹; pH = 7,5; diluído 10 vezes). Posteriormente as amostras foram tratadas, submetidas à análise de eletroforese em gel de agarose e analisadas em fotodocumentador (Figura 11), conforme descrito anteriormente.

Inibição da atividade da Topoisomerase tipo II humana (alfa e Beta):

[043] Os ensaios de inibição do relaxamento do DNA superenovelado (inibição da atividade das topoisomerasas II humanas - alfa e beta) foram realizados incubando-se 1 unidade (U) da enzima com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 superenovelado (DNA) e concentrações decrescentes do peptídeo da presente invenção em um volume de reação de 30 µL. A reação foi incubada a 37°C durante 1 hora em tampão de ensaio (Tris.HCl 50 mmol.L⁻¹; NaCl 125 mmol.L⁻¹; MgCl₂, 10 mmol.L⁻¹; Ditiotreitól 5 mmol.L⁻¹; Albumina 100 µg.mL⁻¹; pH = 7,5; diluído 5 vezes). Posteriormente as amostras foram tratadas, submetidas à análise de eletroforese em gel de agarose e analisadas em fotodocumentador como descrito para

as demais topoisomerases, porém não foi observado nenhuma inibição da ação da Topo II humana, em nenhuma de suas isoformas (α e β) mesmo em concentrações superiores a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

[044] Os valores de IC_{100} (concentração de peptídeo necessária para produzir 100% de inibição da reação catalisada por uma topoisomerase) estão detalhados na Tabela 2, e mostram que o peptídeo da presente invenção possui maior potencial inibitório frente às topoisomerases do tipo I, tanto de origem bacteriana como humana. As porcentagens de inibição foram estimadas pelo software AlphaView (AlphaImager®EP).

Tabela 2. Comparação da atividade inibitória do peptídeo da presente invenção em diferentes topoisomerases (bacterianas e humanas).

IC_{100} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)				
<i>Escherichia coli</i>			Humana	
DNA girase	Topo IV	Topo IA	Topo IB	Topo II alfa e beta
>50*	75	1,2	2,5	não inibe

*83% de inibição da DNA girase de *E. coli* na concentração de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$

Determinação da concentração mínima inibitória (CIM):

[045] Para a avaliação da atividade antimicrobiana do peptídeo da presente invenção, visando a determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações bactericidas/fungicidas mínimas (CBMs/CFMs), foi utilizado o método de microdiluição em caldo, de acordo com as normas descritas pelo "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI - documentos M7-A10, 2015 e M27-A3, 2017), com

modificações. Cepas padrão de *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA - ATCC 33591), *Escherichia coli* (*E. coli* - ATCC 8737) e *Candida albicans* (*C. albicans* - ATCC 90028) foram utilizadas, como representantes das bactérias Gram positivas, Gram negativas e leveduras, respectivamente.

[046] Uma alíquota de cada microrganismo foi descongelada e plaqueada em meio de cultura ágar específico, sendo o Mueller Hinton para as bactérias e o SDA (Sabouraud Dextrose Agar) para o fungo. A placa de Petri foi incubada em estufa de crescimento a 37°C durante 24-48 horas. Após a incubação, uma alçada da cultura fresca de cada microrganismo foi transferida para 10 mL de meio de cultura líquido específico, sendo o *Tryptic Soy Broth* para bactérias e YNB (*Yeast Nitrogen Base*) para o fungo, e incubada em estufa de crescimento com agitação orbital de 75 rpm, à 37°C "overnight". Após esse período, as células foram centrifugadas a 5000 g durante 5 minutos e lavadas duas vezes com PBS (*Phosphate Buffered Saline*, pH 7,2). Após lavagem, as células foram ressuspensas em meio de cultura líquido. A concentração do inóculo foi determinada através de espectrofotometria UV-vis com comprimento de onda de 540 nm para o fungo e 600 nm para as bactérias, e a densidade ótica (DO) foi ajustada em valor correspondente a 1×10^7 células/mL, para posterior diluição conforme as normas do CLSI. As CIMs e CBMs/CFMs foram determinadas após incubação dos microrganismos submetidos a diluições seriadas do peptídeo de SEQ ID NO: 1, em placas de cultura de 96 poços de fundo redondo, durante 24 h a 37°C. Como controles positivo e negativo do crescimento microbiano foram empregados,

respectivamente, meio de cultura com os microrganismos e meio de cultura estéril. A CIM foi definida como a menor concentração do peptídeo que inibiu o crescimento dos microrganismos, determinada por inspeção visual. Para determinação da CBM/CFM, alíquotas de 100 µL provenientes de cada poço foram removidas e diluídas em microtubos contendo 900 µL de PBS (diluições de 10^{-1} a 10^{-8}). Posteriormente, foram plaqueados 25 µL de cada diluição em placas contendo meio de cultura ágar. Os plaqueamentos foram realizados em duplicata, e após 24-48 h de incubação das placas a 37°C, unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) foram calculadas e o resultado transformado em \log_{10} . A CBM/CFM foi determinada como a menor concentração do peptídeo que resultou em inviabilidade dos microrganismos, observada através de contagem de UFC/mL.

[047] Todos os resultados obtidos de CIM (Tabela 3) foram coincidentes com os valores de concentração bactericida mínima (CBM) e de concentração fungicida mínima (CFM).

Tabela 3. Atividade antimicrobiana do peptídeo da presente invenção.

CIM ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)		
MRSA	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
2,5	0,1	0,2

Análise qualitativa da viabilidade celular:

[048] A análise qualitativa de viabilidade celular foi realizada por microscopia confocal de varredura a laser (Figura 12). Os microrganismos tratados com o peptídeo de SEQ ID NO: 1 nas concentrações subletais predeterminadas (conforme descrito na seção anterior) foram incubados em

placa de 24 poços, durante 24 horas, em estufa estática a 37°C. Em seguida, foram corados com o kit fluorimétrico (*Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit*) na concentração indicada pelo fabricante: 1µL de SYTO 9 e 1µL de iodeto de propídio (PI) em 1 mL de PBS. Após o preparo do corante, este foi adicionado às amostras, que foram incubadas à temperatura ambiente, na ausência de luz, durante 30 minutos. Após esse período, foram realizadas lavagens das amostras para remoção do excesso de corante, e em seguida, analisadas utilizando o microscópio confocal Zeiss (modelo LSM 780 invertido).

[049] A Figura 12 mostra que, para os três microrganismos, os grupos tratados com o peptídeo da presente invenção apresentaram significativa diminuição na quantidade de células vivas (marcadas com SYTO 9 - fluorescência verde) e aumento da concentração de células mortas (marcadas com PI - fluorescência vermelha). A sobreposição das fluorescências verde e vermelha (SYTO 9/PI) aparece com o sinal amarelo e representa a permeabilização gradual da membrana da bactéria. Os grupos controles, que não foram tratados com o peptídeo da presente invenção, apresentam grande quantidade de células coradas em verde (vivas); já as células coradas em vermelho (mortas) são praticamente inexistentes.

Análise da morfologia celular das células microbianas:

[050] Para a investigação das alterações morfológicas e de distribuição dos microrganismos submetidos ao tratamento com o peptídeo em estudo, imagens provenientes de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas (Figura 13).

[051] As eletromicrografias da Figura 13 foram obtidas por microscópio eletrônico de varredura de alta resolução do

tipo *field emission* (MEV- FEG JEOL modelo 7500F). Os microrganismos foram cultivados sobre discos de poliestireno cortados, esterilizados em micro-ondas, e tratados com peptídeo de SEQ ID NO: 1 nas concentrações subletais predeterminadas. Após o período de incubação, a amostra foi fixada em uma solução de paraformaldeído 4% durante uma hora, e desidratada em séries de etanol com concentrações crescentes (70%, 80%, 90% e 95% por 10 minutos, e 100% por 20 minutos), secos em temperatura ambiente e mantidos em dessecador a vácuo. Para a análise, as amostras foram montadas em stubs metálicos e metalizadas com ouro.

[052] Em relação ao grupo controle, o tratamento com o peptídeo de SEQ ID NO: 1 (coluna B) causou diminuição da quantidade de células das culturas, além de discretas alterações morfológicas.

Determinação do tempo de morte dos microrganismos (Time-Kill):

[053] Os microrganismos foram mantidos incubados com o peptídeo de SEQ ID NO: 1 nas concentrações letais predeterminadas no ensaio de determinação da CIM. Aliquotas foram retiradas e plaqueadas nos seguintes tempos: 0, 15, 30, 60, 120, 480 e 960 min; em seguida as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. Após esse período, foram realizadas as contagens das colônias formadas. O ensaio foi realizado em triplicata. Na Figura 14, pode-se observar o tempo de morte de cada microrganismo, após exposição à concentração fungicida/bactericida mínima do peptídeo testado.

Capacidade de permeabilização de células microbianas:

[054] Foi realizado o teste de permeabilização de células microbianas, onde cada microrganismo foi exposto às concentrações fungicida/bactericidas mínimas do peptídeo de SEQ ID NO: 1, durante o tempo de morte encontrado. A análise foi realizada através de citometria de fluxo, empregando-se o iodeto de propídio (PI) como sonda fluorescente. O ensaio foi realizado conforme descrito por HU et al. (2013), com algumas modificações. Os microrganismos foram cultivados nas condições previamente relatadas. As células microbianas foram então centrifugadas a 5000 g durante 10 min. Depois de lavar duas vezes com PBS, as células foram ressuspensas em PBS e a DO ajustada para 1×10^8 células/mL. Posteriormente as células microbianas foram incubadas com o peptídeo nas concentrações letais ($1 \times \text{CIM}$), durante período predeterminado de tempo de morte. Como controle negativo foram utilizadas amostras dos microrganismos em PBS, e como controle positivo, microrganismos tratados com solução de Triton 10%. Após adição do PI ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$), as amostras foram imediatamente examinadas usando o citômetro de fluxo BD FACSCanto (BD Biosciences - EUA). Foram registrados 10000 eventos para cada amostra, sendo o ensaio realizado em triplicata. Os dados foram analisados usando o software BD FACSDiva.

[055] O iodeto de propídio é um fluoróforo que se intercala em qualquer DNA, desde que a membrana celular esteja permeável. Tal propriedade deve-se ao fato de que marcadores de DNA de elevada massa molecular, como o PI, não são passíveis de penetrar na célula intacta, em decorrência do seu tamanho. Com isso, após o tratamento com o peptídeo de SEQ ID NO: 1, pode-se avaliar a integridade das membranas

celulares dos diferentes microrganismos testados (Figura 15).

[056] Na Figura 15, pode-se observar que, para todos os microrganismos, os controles apresentaram baixa proporção de células marcadas com PI, evidenciando a integridade das células não tratadas. Para a análise dos resultados, o controle foi utilizado como branco e, a porcentagem de células com dano na membrana (P2) foi subtraída dos resultados obtidos para os grupos tratados. O peptídeo de SEQ ID NO: 1 apresentou atividade de permeabilização de membranas correspondendo a 54% para *C. albicans*, 39% para MRSA e 14% para *E. coli*. A presença da ligação dissulfeto na posição C5-C5 parece favorecer uma possível conformação estrutural e interação com as membranas de diferentes microrganismos, favorecendo a permeabilização destas.

Ensaio de viabilidade e morfologia celular de células tumorais:

[057] O peptídeo da presente invenção teve sua atividade avaliada contra células de carcinoma epidermóide de colo uterino (SiHa), linhagem celular que apresenta alta expressão de topoisomerasas do tipo I e II.

[058] A linhagem celular de carcinoma epidermóide de colo uterino (SiHa) foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 0,1% de gentamicina, em garrafas de cultura de 150 cm². Inicialmente, as células foram lavadas com PBS e removidas da garrafa com tripsina 0,25% em DMEM. Em placa de 96 poços, as células foram cultivadas na concentração de $2,5 \times 10^4$ células por 100 µL do meio e incubadas overnight em estufa de cultura a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, o meio de cultura foi retirado

para adição do peptídeo de SEQ ID NO: 1 diluído em DMEM sem SFB nas seguintes concentrações: 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 6,25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 3,12 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 1,56 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e mantido em contato com as células durante 24 horas sob as mesmas condições de incubação. Por fim, o tratamento foi interrompido para adição de 50 μL de Resazurina 0,1% em DMEM suplementado com 10% de SFB. As células ficaram incubadas em estufa de cultura à 37°C e 5% de CO_2 durante 4 horas. Em seguida, realizou-se a leitura das amostras em fluorímetro com comprimentos de onda ajustados em 530 e 590 nm para a excitação e emissão, respectivamente. Foi utilizado como controle positivo células tratadas apenas com meio de cultura e como controle negativo, tratamento com DMSO por 24h. Como pode ser observado na Figura 16, na maior concentração testada (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), o peptídeo da presente invenção reduziu a viabilidade celular das células tumorais a aproximadamente 19% após 24 horas de incubação. A menor atividade inibitória do peptídeo contra as células testadas, comparado aos resultados de inibição da Topo IB humana (2,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), pode estar relacionado a uma baixa atividade de permeabilização celular.

[059] Buscando-se observar possíveis alterações morfológicas provocadas pelo peptídeo nas células tumorais estudadas (SiHa), micrografias foram obtidas após 24 horas de incubação com a concentração peptídica que promoveu a maior redução da viabilidade celular. Para isso, fez-se uso de um microscópio invertido Zeiss AxioVert A1. As células foram fotografadas após 24 h de incubação com o peptídeo de SEQ ID NO: 1 em placas de 96-poços.

[060] Como pode ser observado na Figura 17, as células tratadas com o peptídeo da presente invenção na concentração de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ apresentaram alterações morfológicas caracterizadas por diminuição do volume celular, formação de núcleos picnóticos e possíveis corpos apoptóticos.

Avaliação de células não tumorais:

[061] Um dos maiores desafios para o desenvolvimento de novos fármacos, tais como agentes antimicrobianos e antitumorais, consiste na obtenção de compostos ativos que não sejam tóxicos para células normais do corpo humano. Neste contexto, ensaios de viabilidade celular em células de queratinócitos não tumorais (HaCat) foram realizados, buscando-se avaliar a toxicidade do peptídeo da presente invenção.

[062] A linhagem celular de queratinócitos não tumorais (HaCat) foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 0,1% de gentamicina, em garrafas de cultura de 150 cm^2 . Inicialmente, as células foram lavadas com PBS e removidas da garrafa com tripsina 0,25% em DMEM. Em placa de 96 poços, as células foram cultivadas na concentração de $2,5 \times 10^4$ células por $100 \mu\text{L}$ do meio e incubadas overnight em estufa de cultura a 37°C e 5% de CO_2 . Após esse período, o meio de cultura foi retirado para adição do peptídeo de SEQ ID NO: 1 diluído em DMEM sem SFB nas seguintes concentrações: $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $12,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $6,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $3,12 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $1,56 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e mantido em contato com as células durante 24 horas sob as mesmas condições de incubação. Por fim, o tratamento foi interrompido para adição de $50 \mu\text{L}$ de Resazurina 0,1% em DMEM suplementado com 10% de SFB. As células ficaram incubadas em

estufa de cultura à 37°C e 5% de CO₂ durante 4 horas. Em seguida, realizou-se a leitura das amostras em fluorímetro com comprimentos de onda ajustados em 530 e 590 nm para a excitação e emissão, respectivamente. Foi utilizado como controle positivo células tratadas apenas com meio de cultura e como controle negativo, tratamento com DMSO por 24h.

[063] Como pode ser observado na Figura 18 o peptídeo promoveu uma baixa ou nula redução da viabilidade celular da linhagem HaCat, na faixa de concentração testada. Mesmo nas maiores concentrações do peptídeo, a viabilidade celular observada foi superior a 98%. Tal fato pode estar relacionado à menor taxa de expressão de topoisomerasas em células normais, comparado a células tumorais, as quais apresentam rápida proliferação (KELLNER; RUDOLPH; PARWARESCH, 2000).

Determinação da atividade hemolítica:

[064] Células vermelhas de sangue humano, obtidas a partir do sangue fresco de doador voluntário, foram separadas do plasma por centrifugação e lavadas 3 vezes em tampão PBS (0,01 mol.L⁻¹, contendo 0,15 mol.L⁻¹ de cloreto de sódio) pH 7,4. Da solução inicial do peptídeo de SEQ ID NO: 1 a 200 µmol.L⁻¹, foram realizadas diluições seriadas em tubos tipo eppendorf, sendo o volume final de 200 µL em cada tubo. Previamente foi adicionado 1% (v/v) de eritrócito em cada tubo. A referência de 100% de lise foi 2 µL de eritrócitos (1%) misturado com 198 µL de uma solução 1% (v/v) Triton X-100 (controle positivo). A referência de 0% de lise foi 2 µL de eritrócitos (1%) com 198 µL de tampão PBS (controle negativo). Após incubação em temperatura ambiente por 1 hora, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 3 minutos e alíquotas de 100 µL do sobrenadante foram pipetadas em

microplacas de 96 poços. A absorbância a 540 nm foi determinada usando leitor de microplaca (BioTek, modelo Epoch). O ensaio foi realizado em triplicata. De acordo com a Figura 19, mesmo na maior concentração testada (100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), o peptídeo da presente invenção apresentou um baixo percentual de lise eritrocitária (14%).

[065] 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.

REFERÊNCIAS:

1. BARBOSA, L. C. B.; GARRIDO, S. S.; GARCIA, A.; DELFINO, D. B.; SANTOS, L. N.; MARCHETTO, R. Design and synthesis of peptides from bacterial ParE toxin as inhibitors of topoisomerases. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 54, p. 591-596, 2012.
2. ESSMANN, U. et al. A smooth particle-mesh Ewald method. *Journal of Chemical Physics*, v. 103, p. 8577-8593, 1995.
3. FUJIMOTO, D. F.; PINILLA, C.; SEGALL, A. M. New peptide inhibitors of type IB topoisomerases: similarities and differences vis-a-vis inhibitors of tyrosine recombinases. *Journal of Molecular Biology*, v. 363, n. 5, p. 891-907, 2006.
4. HIDER, R. C. et al. Origin of the positive 225-230 nm circular dichroism band in proteins. Its application to conformational analysis. *Biophysical Chemistry*, v. 31, p. 45-51, 1998.
5. KAISER, E. et al. Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides. *Analytical Biochemistry*, v. 34, p. 595-598, 1970.

6. KELLNER, U.; RUDOLPH, P.; PARWARESCH, R. Human DNA topoisomerase diagnostic and therapeutic implications for cancer. *Onkologie*, v. 23, p. 424-430, 2000.
7. KLEMM, M. et al. Peptide inhibitors of DNA cleavage by tyrosine recombinases and topoisomerases. *Journal of Molecular Biology*, v. 299, n. 5, p. 1203-1216, 2000.
8. O'NEILL, J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Review on Antimicrobial Resistance*, 2014.
9. POND, C. D.; MARSHALL, K. M.; BARROWS, L. R. Identification of a small topoisomerase I-binding peptide that has synergistic antitumor activity with 9-aminocamptothecin. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 5, n. 3, p. 739-745, 2006.
10. POMMIER, Y. et al. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol.*, v. 17, p. 421-433, 2010.
11. REECE, R.; MAXWELL, A. The C-terminal domain of the *Escherichia coli* DNA gyrase A subunit is a DNA-binding protein. *Nucleic Acids Res.*, v. 19, n. 7, p. 1399-1405, 1991.
12. SINGH, S. K. et al. Synthetic peptides as inactivators of multimeric enzymes: inhibition of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase by interface peptides. *FEBS Letters*, v. 501, n. 1, p. 19-23, 2001.
13. TETENBAUM, J.; MILLER, L. M. A new spectroscopic approach to examining the role of disulfide bonds in the structure and unfolding of soybean trypsin inhibitor, *Biochemistry*, v. 40, n. 40, p. 12215-12219, 2001.
14. TROVATTI, E.; COTRIM, C. A.; GARRIDO, S. S.; BARROS, R. S.; MARCHETTO, R. Peptides based on CcdB protein as novel

inhibitors of bacterial topoisomerases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 18, p. 6161-6164, 2008.

15. WOODY, R. W. Contributions of tryptophan side chains to the far-ultraviolet circular dichroism of proteins. *European Biophysical Journal*, v. 23, n 4, p. 253-262, 1994.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de obtenção de peptídeo dimérico, **caracterizado** pelo fato de que compreende as etapas:

- a) síntese em fase sólida e
- b) dimerização do octapeptídeo de SEQ ID NO: 2.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que na etapa a) o suporte polímero compreende qualquer resina a base de poliestireno funcionalizada, mais preferivelmente, a resina Rink amida AM Resina, com substituição inicial de $0,52 \text{ mmol.g}^{-1}$, com a formação de um peptídeo carboxi-amida terminal.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que na etapa a) compreende grupo fluorenilmetiloxicarbonila (Fmoc) como protetor de todos os L- α -aminogrupos utilizados e grupos t-butílicos (t-Bu) ou derivados para a proteção das cadeias laterais dos resíduos dos aminoácidos trifuncionais.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que a remoção do grupo Fmoc é realizada com uma solução que é selecionada de piperidina a 20% em DMF ou morfolina a 50% em dimetilformamida (DMF), mais preferivelmente 4-metil-piperidina a 20% (v/v) em DMF.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que compreende os solventes e agentes de condensação selecionados a partir do grupo que compreende dimetilformamida, diclorometano, N-diisopropilcarbodiimida e N-hidroxibenzotriazol, preferivelmente N,N'-diisopropilcarbodiimida/N-hidroxibenzotriazol (DIC/HOBt) em dimetilformamida (DMF): diclorometano (DCM) (1:1).

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado**

pelo fato de que na etapa a) a clivagem final dos peptídeos das respectivas resinas e a desproteção dos grupos protetores das cadeiras laterais são efetuadas pelo tratamento da respectiva peptidil-resina com uma solução contendo ácido trifluoracético (TFA) a 94%, água deionizada a 2,5%, etanoditiol (EDT) a 2,5% e triisopropilsilano (TIS) a 1%, em temperatura a 25°C por 2 horas.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que é obtido o peptídeo linear bruto de SEQ ID NO: 2, em que o resíduo de cisteína da posição 7 é substituído por alanina.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que na etapa b), o peptídeo de SEQ ID NO: 2 é submetido à oxidação por areação controlada utilizando um compressor de ar, de 2 a 50 horas, sendo preferivelmente por 48 horas, em temperatura que varia de 15 a 35°C, preferivelmente a 25°C, em meio alcalino com pH 8,0 formando ligações dissulfeto inter-cadeias entre resíduos de cisteína na posição C5.

9. Peptídeo dimérico, obtido conforme método definido nas reivindicações 1-8, **caracterizado** pelo fato de que compreende a SEQ ID NO:1 e ser um inibidor da topoisomerase do tipo I e do tipo II.

10. Uso do peptídeo dimérico, obtido conforme definido na reivindicação 9, **caracterizado** por ser na preparação de uma formulação para tratamento de doenças de origem fúngica, bacteriana e tumoral.

11. Uso do peptídeo dimérico, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelas doenças de origem fúngica serem selecionadas de dermatofitoses,

esporotricoses, candidíases superficiais e invasivas; as doenças de origem bacteriana serem selecionadas de infecções urinárias, ósseas e de pele, pneumonia, meningite, endocardite e septicemia e as doenças tumorais serem selecionadas de carcinoma e melanoma.

12. Uso, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pela doença tumoral ser carcinoma epidermóide de colo uterino (SiHa).

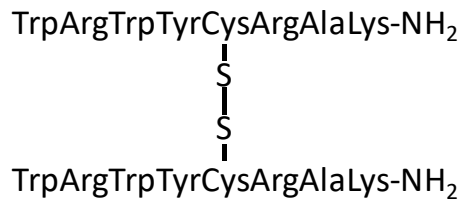


Figura 1

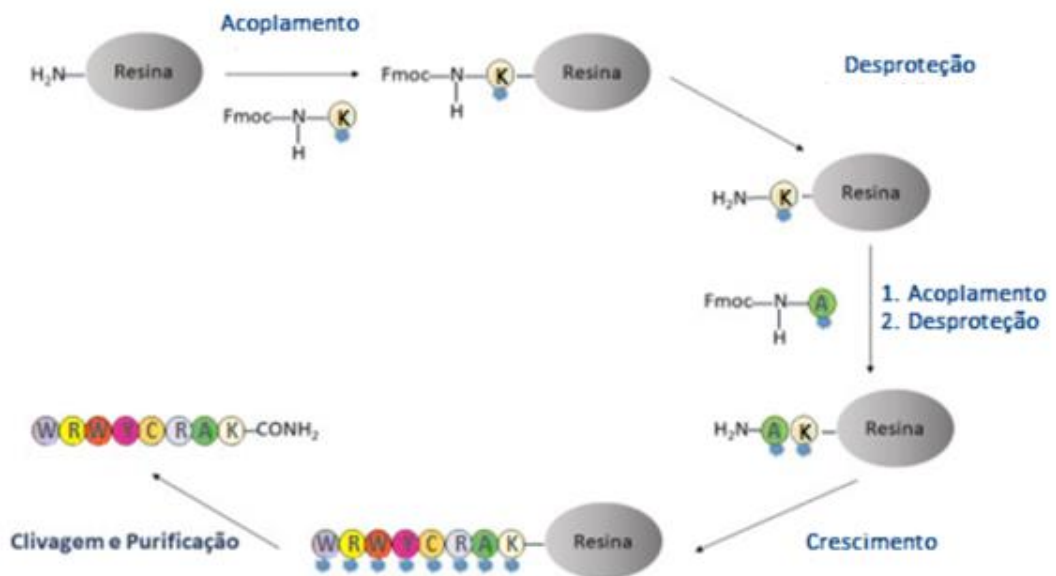


Figura 2

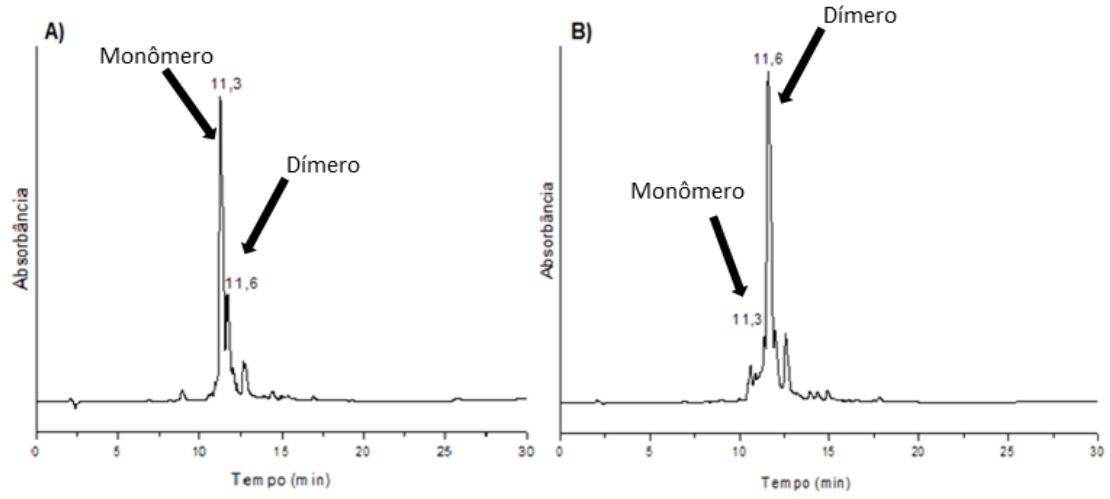


Figura 3

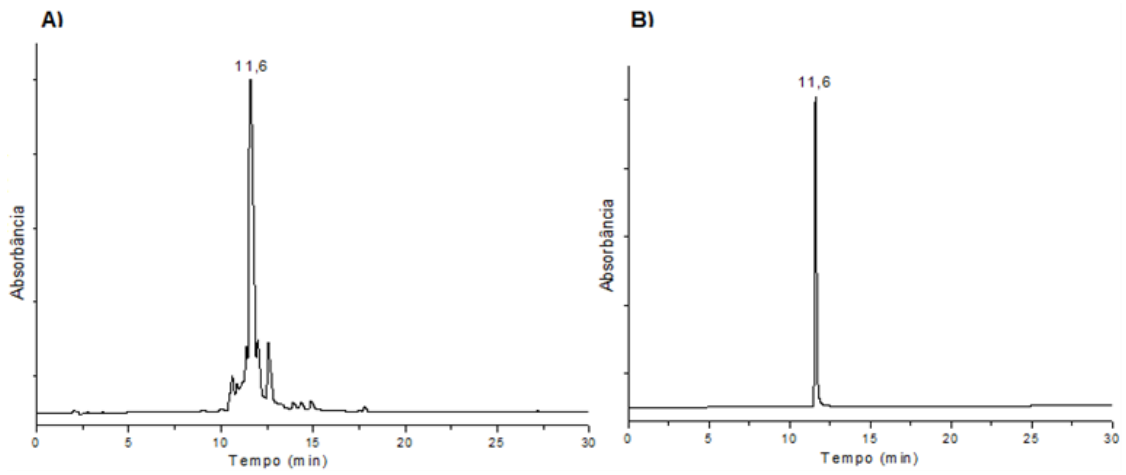


Figura 4

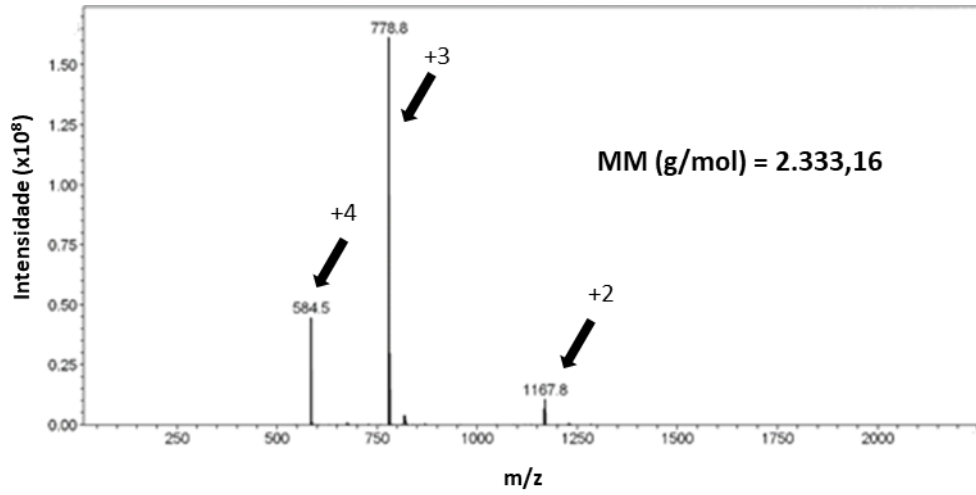


Figura 5

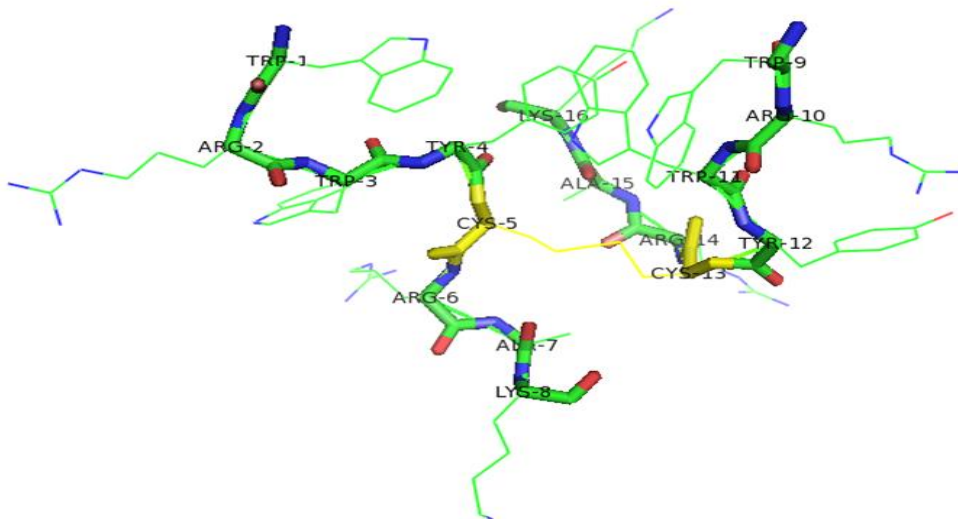


Figura 6

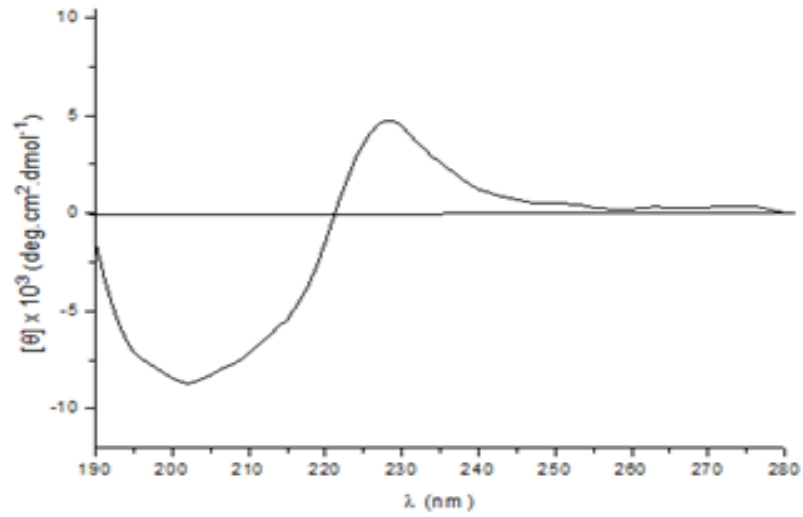


Figura 7

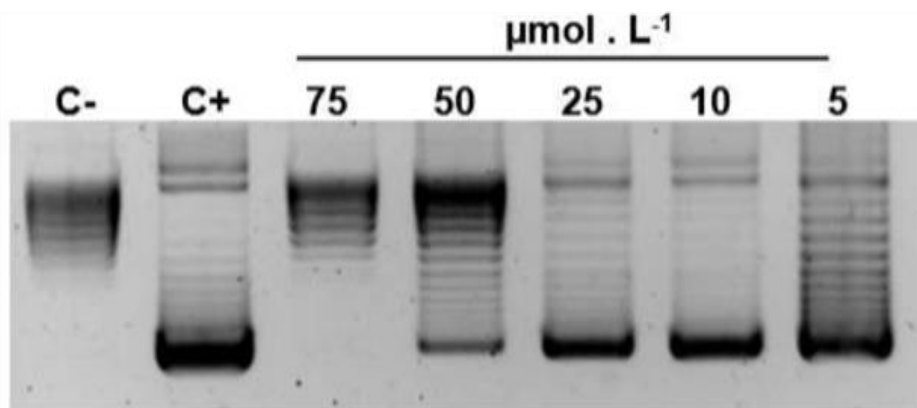


Figura 8

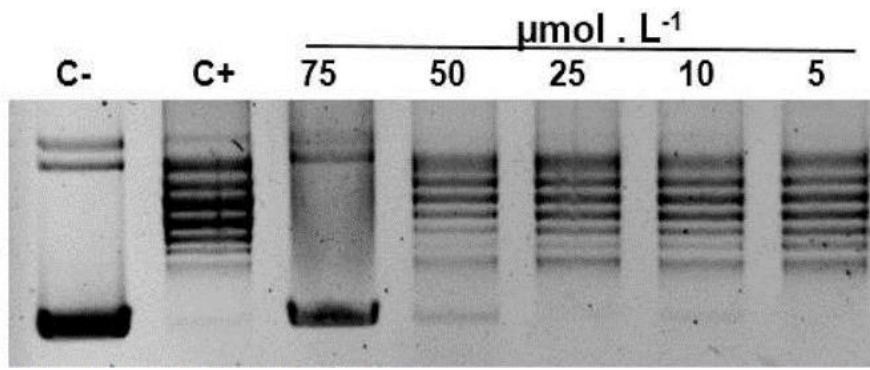


Figura 9

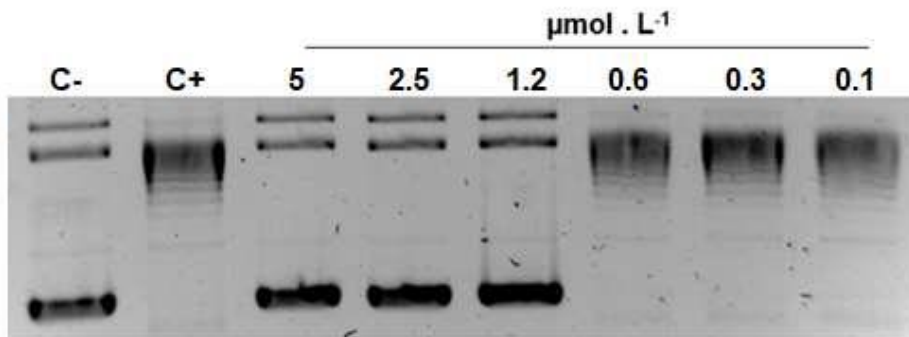


Figura 10

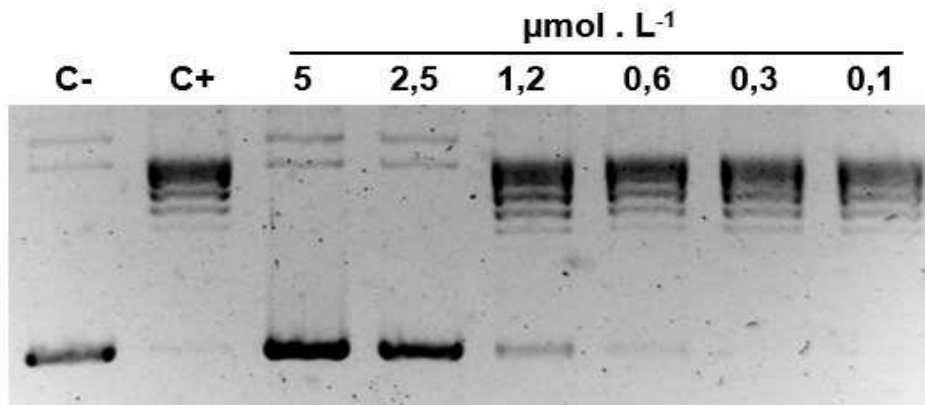


Figura 11

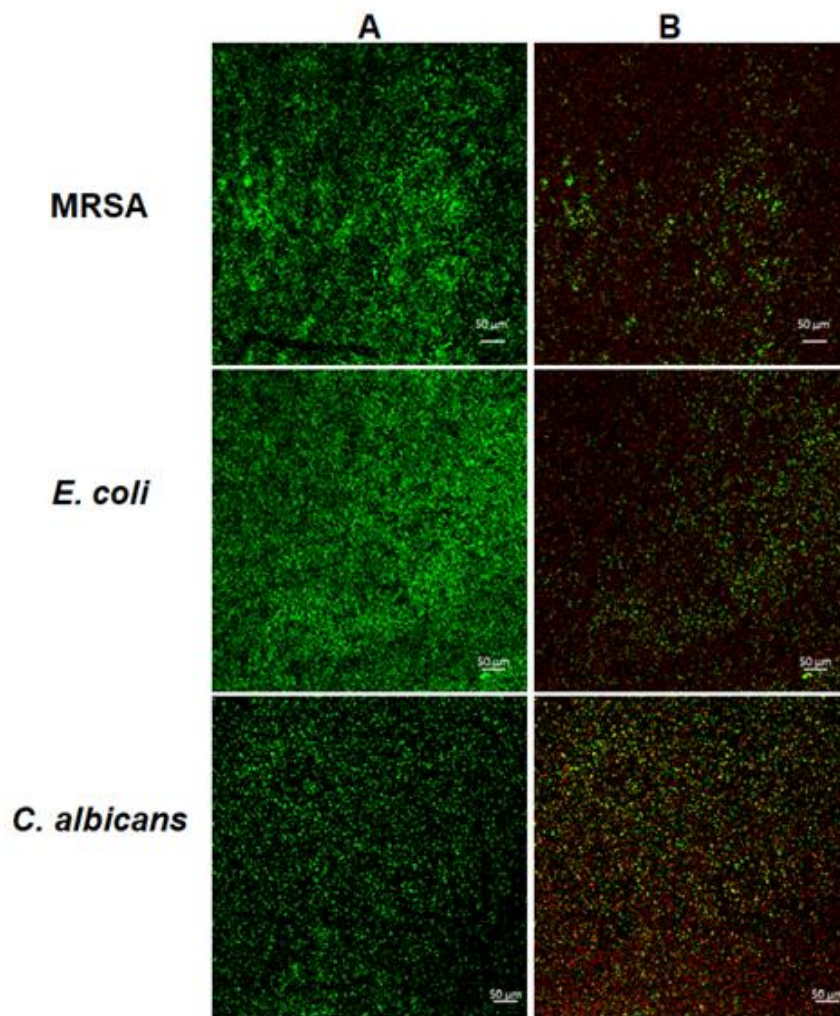


Figura 12

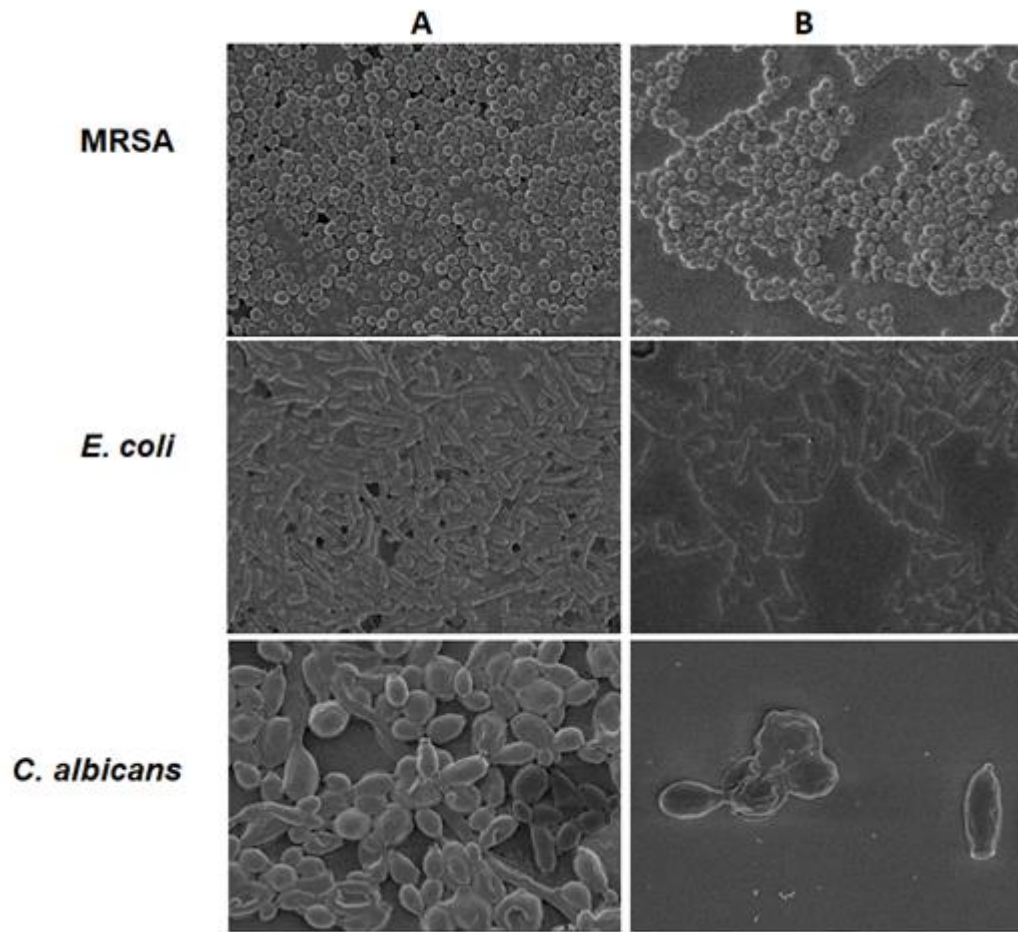


Figura 13

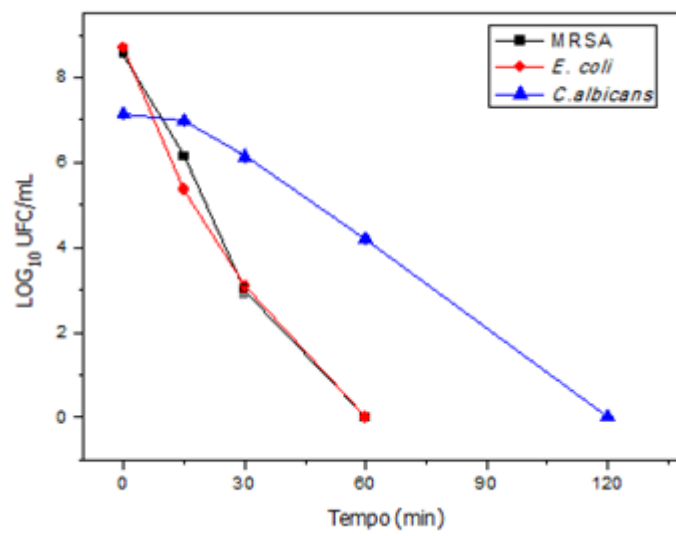


Figura 14

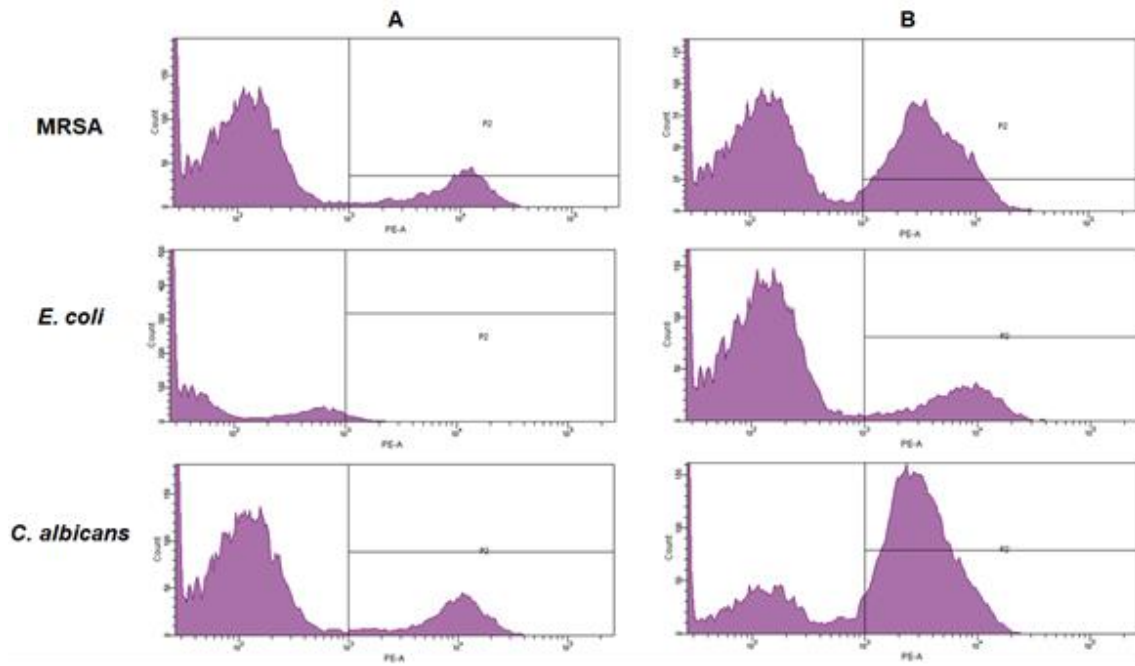


Figura 15

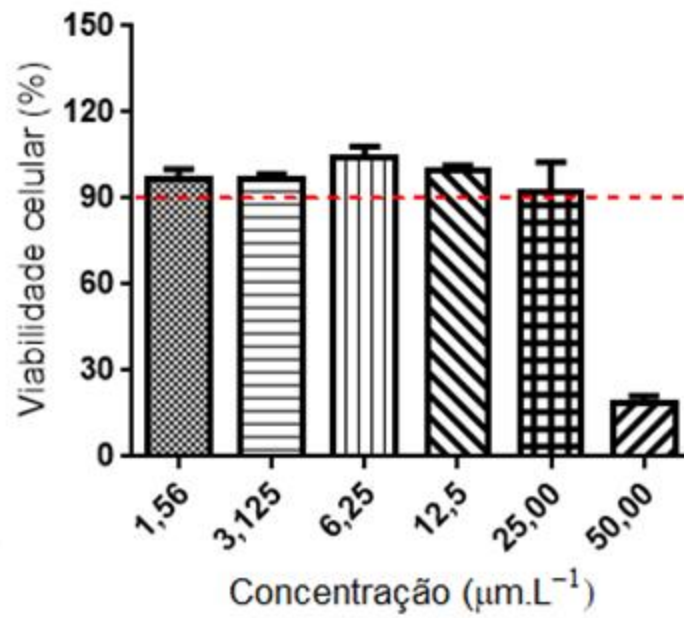


Figura 16

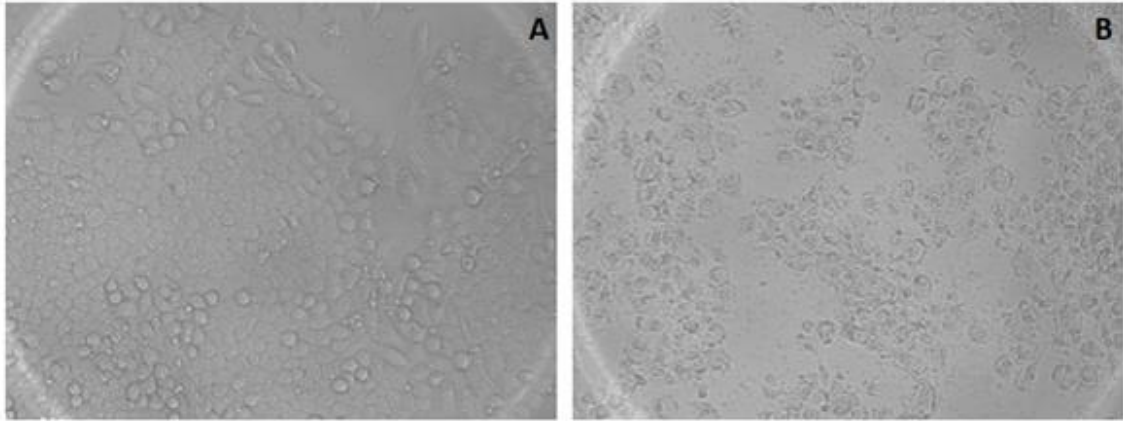


Figura 17

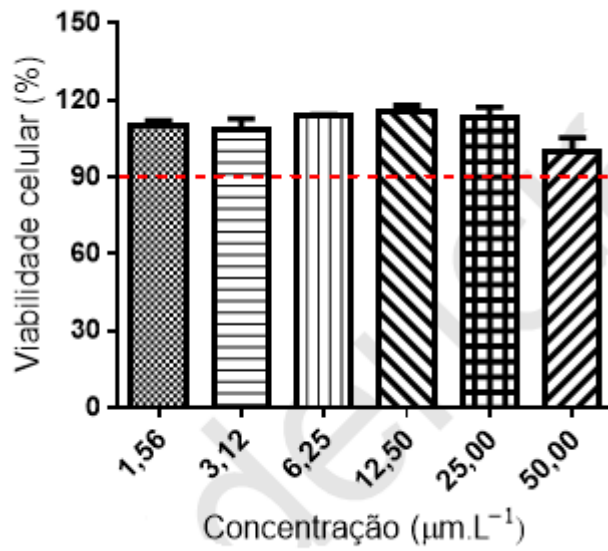


Figura 18

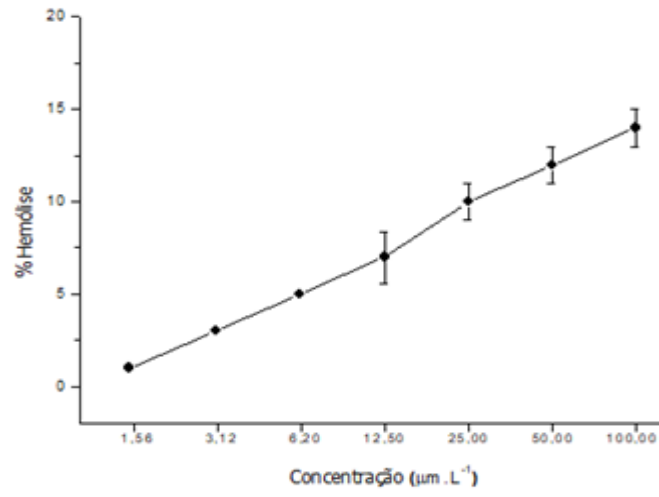


Figura 19

Resumo

**MÉTODO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEO DIMÉRICO, PEPTÍDEOS
DIMÉRICOS E USO DO PEPTÍDEO DIMÉRICO**

A presente invenção se enquadra no campo da biotecnologia, mais particularmente a um método de obtenção de um peptídeo dimérico, ao peptídeo dimérico e seu uso como agente bactericida, fungicida e antitumoral.

Mais particularmente, a presente invenção refere-se ao método de obtenção de peptídeos diméricos pela síntese em fase sólida e pela dimerização em solução em que ocorre a formação de uma ligação dissulfeto intermolecular. O homodímero obtido apresenta a SEQ ID NO: 1 e atua na inibição de diferentes classes de DNA topoisomerasas, o que lhe confere grande capacidade bactericida/fungicida com amplo espectro antimicrobiano. Em adição, apresenta atividade contra células tumorais e baixa toxicidade para células humanas normais.

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 sequencia.txt
- Data de Geração do Código: 04/12/2019
- Hora de Geração do Código: 15:41:16
- Código de Controle:
 - Campo 1: B539B6ED24E489DA
 - Campo 2: 2FC42DA54764C7E2