



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

(21) BR 102014021761-4 A2

(22) Data do Depósito: 03/09/2014

(43) Data da Publicação: 26/04/2016
(RPI 2364)



(54) **Título:** PEPTÍDEO SINTÉTICO DIMÉRICO ANTIMICROBIANO E ANTIFÚNGICO E SEUS USOS

(51) **Int. Cl.:** C07K 14/00; A61K 38/16; A61P 31/04; A61P 31/10; A61P 31/02; (...)

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

(72) **Inventor(es):** ESTEBAN NICOLÁS LORENZÓN, EDUARDO MAFFUD CILLI, MATHEUS APARECIDO DOS SANTOS RAMOS, TAÍS MARIA BAUAB

(74) **Procurador(es):** FABÍOLA DE MORAES SPIANDORELLO

(57) **Resumo:** PEPTÍDEO SINTÉTICO DIMÉRICO ANTIMICROBIANO E ANTIFÚNGICO E SEUS USOS. A invenção se refere a um peptí-deo sintético dimérico capaz de inibir o crescimento de Escherichia coli e Staphylococcus aureus. O peptí-deo sintético dimérico (MG2)2K, descrito pela presente invenção, foi desenhado e sintetizado utilizando um resí-duo de lisina como linker (ligante) para a ligação entre as duas cadeias do peptí-deo Magainina 2.

PEPTÍDEO SINTÉTICO DIMÉRICO ANTIMICROBIANO E ANTIFÚNGICO E SEUS USOS

Campo da invenção:

[001] A invenção se insere nas áreas médica, farmacêutica, veterinária, cosmética e de alimentos, uma vez que se refere a peptídeos sintéticos diméricos oriundos de PAMs (peptídeos antimicrobianos) de amplo espectro de ação e seus usos como moléculas antibacterianas e antifúngicas.

Fundamentos da invenção:

[002] Nas últimas décadas, a ocorrência de micro-organismos patogênicos resistentes a antibióticos vem sendo cada vez maior. Isto, somado à diminuição contínua de novos antibióticos aprovados para a comercialização, representa um grande problema de saúde mundial com um forte impacto social e econômico, o que obriga o desenvolvimento de novas moléculas para o controle das doenças provocadas por esses micro-organismos.

[003] A falta de políticas efetivas de orientação quanto ao uso indiscriminado de medicamentos leva a situações cada vez mais preocupantes. Estes fatos conduzem a necessidade do desenvolvimento de novas moléculas para o controle das doenças provocadas por esses micro-organismos resistentes.

[004] Dentre essas moléculas, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) surgem como uma alternativa interessante, já que atuam mediante mecanismos nos quais os patógenos dificilmente desenvolvem resistência.

[005] Além disso, o amplo espectro de atividade, a rápida atividade microbicida e a possibilidade de ser

utilizado em combinação com outros antibióticos fazem com que os estudos dos PAMs sejam cada vez maiores, evidenciando o alto potencial dessas moléculas.

[006] Além dos PAMs obtidos da biota mundial, milhares de variantes sintéticas têm sido produzidas, mas poucas são as que conseguem ter uma aplicação clínica. As principais razões são a baixa estabilidade em condições fisiológicas e a toxicidade frente a células eucariotas.

[007] Em contraste com os antibióticos convencionais, que exercem atividade tóxica pela ligação a alvos específicos, os PAMs, em geral, têm sido considerados desestabilizantes de membrana, sendo assim, não específicos.

[008] Muitos PAMs foram estudados, porém uma acurada compreensão molecular de seu mecanismo de ação ainda não é clara. No entanto, vários mecanismos têm sido propostos, sendo três os mais aceitos: poro em forma de barril ("barrel-stave"), carpete ("carpet like") e poro toroidal ("toroidal pore").

[009] Acredita-se que a presença de cargas positivas, a hidrofobicidade, a natureza anfipática e a estrutura secundária são os fatores que determinam a atividade e seletividade dos PAMs, e devem ser considerados na hora de desenhar uma nova molécula.

[010] Recentes pesquisas mostraram que, independente do mecanismo de ação, a agregação/oligomerização dos PAMs é um pré-requisito para a formação dos poros. É por isso que, além dos fatores acima descritos, atualmente se sugere que a autoassociação (oligomerização) dos PAMs também contribui com a seletividade para alvos específicos.

[011] A presente invenção refere-se a peptídeos diméricos oriundos de PAMs (peptídeos antimicrobianos) de amplo espectro de ação utilizados enquanto moléculas antibacterianas e antifúngicas.

[012] O grande diferencial dos PAMs, em comparação com os antibióticos convencionais, é o seu modo de ação. Os PAMs atuam principalmente na membrana celular, dificultando a resistência por parte dos micro-organismos. Além disso, os peptídeos antimicrobianos podem ser utilizados em combinação com outros antibióticos.

[013] Quando comparados com os PAMs tradicionais, algumas versões diméricas apresentam vantagens farmacotécnicas como aumento da solubilidade, maior atividade antimicrobiana e resistência frente a proteases.

[014] A presente tecnologia compreende um peptídeo sintético dimérico capaz de inibir o crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

[015] O peptídeo sintético dimérico (MG2)₂K, descrito na presente tecnologia, foi desenhado e sintetizado utilizando um resíduo de lisina como *linker* (ligante) para a ligação entre as duas cadeias do peptídeo Magainina 2 (MG2).

[016] A maioria dos PAMs diméricos reportados na bibliografia foram obtidos mediante a incorporação de um resíduo de cisteína na sequência e a sua posterior oxidação/dimerização.

[017] O peptídeo sintético dimérico (MG2)₂K, descrito na presente invenção, foi desenhado utilizando um resíduo de lisina como ligante (*linker*) para a ligação entre as duas cadeias do peptídeo Magainina 2.

[018] Este aminoácido caracteriza-se por ter dois grupos amino (alfa e épsilon), a partir dos quais as duas cadeias foram sintetizadas concomitantemente.

Estado da técnica:

[019] O documento WO2012129165 descreve um novo composto obtido a partir do peptídeo NK-2 do frango. O peptídeo sintético descrito do documento em questão tem atividade antimicrobiana e antitumoral. No entanto, a atividade antibacteriana não foi observada em *E. coli* tampouco em *Stafilococos*. Adicionalmente, os peptídeos do referido documento e da presente invenção são completamente distintos.

[020] O documento intitulado "Antibacterial activity of a synthetic peptide (PR-26) derived from PR-39, a prolinearginine-rich neutrophil antimicrobial peptide" (J Shi, C R Ross, M M Chengappa, M J Sylte, D S McVey, and F Blecha) descreve um peptídeo isolado com ação antibacteriana, este peptídeo é distinto do peptídeo descrito na presente invenção.

[021] O documento intitulado "A novel synthetic peptide from a tomato defensin exhibits antibacterial activities against *Helicobacter pylori*" (Rigano MM, Romanelli A, Fulgione A, Nocerino N, D'Agostino N, Avitabile C, Frusciante L, Barone A, Capuano F, Capparelli R.e) descreve um peptídeo isolado com ação antibacteriana, este peptídeo é distinto do peptídeo descrito na presente invenção.

[022] O documento intitulado "A synthetic peptide of human apoprotein E with antibacterial activity" (Azuma M, Kojimab T, Yokoyama I, Tajiri H, Yoshikawa K, Saga S, Del Carpio CA.) descreve um peptídeo isolado com ação

antibacteriana, este peptídeo é distinto do peptídeo descrito na presente invenção.

Breve descrição da invenção:

[023] A invenção se refere a um peptídeo sintético dimérico capaz de inibir o crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O peptídeo (MG2)₂K foi desenhado e sintetizado utilizando um resíduo de lisina como *linker* (ligante) para a ligação entre as duas cadeias do peptídeo Magainina 2.

Breve descrição das figuras:

[024] A figura 1 é um fluxograma da estratégia preferencial e não limitativa de síntese para o peptídeo (MG2)₂K.

[025] A figura 2 representa o perfil cromatográfico do peptídeo bruto (preto) e purificado (vermelho).

[026] A figura 3 é um espectro de massas do peptídeo purificado.

Descrição detalhada da invenção:

[027] A invenção se refere a um peptídeo sintético dimérico capaz de inibir o crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

[028] O peptídeo sintético dimérico (MG2)₂K, descrito pela presente invenção, está representado na SEQ. ID. no. 3 e foi desenhado e sintetizado utilizando um resíduo de lisina como *linker* (ligante) para a ligação entre as duas cadeias do peptídeo Magainina 2.

[029] As duas cadeias do peptídeo Magainina 2 são formadas a partir do grupo alfa e do grupo épsilon da lisina ligante e estão representadas nas SEQ. ID. nos. 1 e 2, respectivamente.

Peptídeo (MG2)₂ K

[030] A invenção se trata de um peptídeo sintético dimérico, obtido utilizando um resíduo de lisina como *linker*, a partir do qual crescem as cadeias do peptídeo Magainina 2. O peptídeo (MG2)₂K compreende a sequência GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS (α) K (ε) SNMIEGVFAKGFKKASHLFGIG, que está representada na SED ID No. 3.

[031] As cadeias do peptídeo Magainina 2 são formadas a partir do grupo alfa e do grupo épsilon da lisina usada como *linker* e estão representadas nas SEQ. ID. nos. 1 e 2, respectivamente.

[032] O peptídeo tem uma massa molecular de 5043 g/mol. Trata-se de um peptídeo catiônico (+10 em pH fisiológico), com um ponto isoelétrico de aproximadamente 11. Em solução aquosa o peptídeo não tem uma estrutura secundária definida. Já, em presença de miméticos de membrana adquire uma estrutura tipo alfa hélice.

Usos do Peptídeo Dimérico

[033] No campo da Medicina, o peptídeo pode ser utilizado no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas (como princípio ativo de formulações de uso sistêmico ou tópico), na prevenção da contaminação de cateteres e outros materiais cirúrgicos, como também em formulações odontológicas para a prevenção do desenvolvimento da cárie. Somado a isto, o peptídeo também pode ser utilizado no tratamento do câncer, como droga contraceptiva etc. Quando incorporado ao látex ou outros biopolímeros poderia ter sua liberação controlada.

[034] No campo da Indústria de Alimentos, o peptídeo pode ser utilizado como conservante de alimentos, na forma

de imersão ou incorporado na embalagem.

Processo de Síntese do Peptídeo (MG2)₂K

[035] A modalidade preferida e não limitativa do processo de síntese do peptídeo sintético dimérico (MG2)₂K compreende as seguintes etapas, conforme demonstrado na figura 1:

1) Acoplamento do resíduo de lisina: foi utilizado um resíduo de lisina com o grupo Fmoc como protetor do ε-amino e do α-amino. Desta forma, a eliminação dos protetores foi conjunta, deixando dois grupos amino livres.

2) Elongação das Cadeias: a elongação simultânea das duas cadeias peptídicas foi realizada a partir dos grupos amino livres do resíduo de lisina.

3) Clivagem: ao fim da síntese, para separar o peptídeo da resina, o peptídeo foi clivado utilizando uma solução de ácido trifluoroacético. Posteriormente foi precipitado com éter etílico, extraído com água e liofilizado.

4) Purificação e caracterização: a purificação e caracterização, ambas opcionais, foram realizadas mediante cromatografia e espectrometria de massas, respectivamente.

Exemplo de Concretização da Invenção - Avaliação dos Resultados Obtidos

[036] A síntese do peptídeo sintético dimérico (MG2)₂K foi desenvolvida seguindo os protocolos básicos da síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS).

[037] Foi utilizado um resíduo de lisina como *linker* (ligante) entre as duas cadeias de MG2 (conforme figura 1). O aminoácido lisina caracteriza-se por ter dois grupos amino a partir dos quais se pode realizar a elongação de

cadeias peptídicas, e desta forma obter moléculas diméricas. Para a síntese deste peptídeo, utilizou-se o grupo Fmoc como protetor do ϵ -amino e do α -amino. Desta forma, a eliminação dos protetores foi conjunta, permitindo a elongação simultânea das duas cadeias peptídicas.

[038] A purificação do produto da síntese foi realizada por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em modo semi-preparativo. O sucesso da síntese foi confirmado por espectrometria de massas. A atividade antimicrobiana foi avaliada em termos de concentração inibitória mínima (CIM) utilizando o método de microdiluição em placa. Os micro-organismos testados foram *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

[039] A atividade hemolítica foi avaliada em termos de concentração hemolítica 50 (HC50) utilizando o método de microdiluição em placa. O valor HC50 foi considerado como a concentração de peptídeo que produz 50% de hemólise.

Resultados

[040] A estratégia de síntese utilizada demonstrou ser efetiva na obtenção do peptídeo. As análises por CLAE e espectrometria de massas confirmam a identidade do peptídeo (conforme figuras 2 e 3).

[041] A atividade antimicrobiana do peptídeo foi avaliada frente a um micro-organismo representante dos Gram (-) e um dos Gram (+), *Escherichia coli* e *Estafilococos aureus*, respectivamente. Os resultados podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2: atividade biológica.

	CIM ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	
Peptídeo	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>

(MG2) ₂ K	1	16
----------------------	---	----

[042] A toxicidade do peptídeo foi determinada em hemácias de sangue humano. O HC50 obtido foi de 22 µmol.L-

Exemplo de Concretização da Invenção - Avaliação da Cinética de Atividade Antimicrobiana: E. coli

[043] A cinética de morte celular de *E. coli* foi avaliada utilizando o dobro da CIM. A cinética de morte celular foi comparada com a versão monomérica (MG2).

[044] O resultado da avaliação cinética de atividade antimicrobiana para *E. coli* está representado de forma esquemática na figura 4. O peptídeo sintético dimérico (MG2)₂K mata o micro-organismo em menos de 5 minutos, enquanto que o peptídeo controle tarda entre 20 e 40 minutos.

[045] Embora a invenção tenha sido amplamente descrita, é óbvio para aqueles versados na técnica que várias alterações e modificações podem ser feitas visando aprimoramento do projeto sem que as referidas alterações não estejam cobertas pelo escopo da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1- Peptídeo sintético dimérico antimicrobiano e antifúngico **caracterizado** por ser conforme representado na SEQ ID NO. 3 e por compreender um resíduo de lisina como *linker*, a partir do qual crescem duas cadeias do peptídeo Magainina 2.

2- Peptídeo sintético dimérico, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de as duas cadeias do peptídeo Magainina 2 serem formadas a partir do grupo alfa e do grupo épsilon da lisina usada como *linker* e serem conforme representadas nas SEQ. ID. nos. 1 e 2.

3- Uso do peptídeo sintético dimérico, conforme definido nas reivindicações de 1 a 2, **caracterizado** pelo fato de ser na preparação de um medicamento para tratar doença causada por bactérias ou fungos.

4- Uso do peptídeo sintético dimérico, conforme definido nas reivindicações de 1 a 2, **caracterizado** pelo fato de ser na prevenção da contaminação de cateteres e outros materiais cirúrgicos.

5- Uso do peptídeo sintético dimérico, conforme definido nas reivindicações de 1 a 2, **caracterizado** pelo fato de ser em formulações odontológicas.

6- Uso do peptídeo sintético dimérico, conforme definido nas reivindicações de 1 a 2, **caracterizado** pelo fato de ser na preparação de um medicamento para tratar câncer.

7- Uso do peptídeo sintético dimérico, conforme definido nas reivindicações de 1 a 2, **caracterizado** pelo fato de ser na preparação de um medicamento contraceptivo.

8- Uso do peptídeo sintético dimérico, conforme

definido nas reivindicações de 1 a 2, **caracterizado** pelo fato de ser como conservante de alimentos, na forma de imersão ou incorporado na embalagem.

Resumo**PEPTÍDEO SINTÉTICO DIMÉRICO ANTIMICROBIANO E ANTIFÚNGICO E SEUS USOS**

A invenção se refere a um peptídeo sintético dimérico capaz de inibir o crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O peptídeo sintético dimérico (MG2)₂K, descrito pela presente invenção, foi desenhado e sintetizado utilizando um resíduo de lisina como *linker* (ligante) para a ligação entre as duas cadeias do peptídeo Magainina 2.