



\* B R 1 0 2 0 2 4 0 2 0 2 7 4 A 2 \*

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102024020274-0 A2

(22) Data do Depósito: 30/09/2024

(43) Data da Publicação Nacional:  
07/04/2026

(54) **Título:** MÉTODO DE OBTENÇÃO DE FRAGMENTOS PEPTÍDICOS DERIVADOS DE HISTATINA 5, COMPOSIÇÃO E USO DA COMPOSIÇÃO

(51) **Int. Cl.:** C07K 7/06; A61K 38/08; A61P 31/10.

(52) **CPC:** C07K 7/06; A61K 38/08; A61P 31/10.

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

(72) **Inventor(es):** SAULO SANTESSO GARRIDO; CAROLINA REIS ZAMBOM; ANDRÉ HENRIQUE FURTADO TORRES; ISADORA LINO MENDES.

(57) **Resumo:** MÉTODO DE OBTENÇÃO DE FRAGMENTOS PEPTÍDICOS DERIVADOS DE HISTATINA 5, COMPOSIÇÃO E USO DA COMPOSIÇÃO. O presente se refere a um método de obtenção de fragmentos peptídicos, mais especificamente, dos peptídeos antimicrobianos 8W5 e 7W5, cujas sequências de aminoácidos são definidas nas SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, derivados de Histatina 5, bem como o uso combinado desses peptídeos como agentes antifúngicos para obtenção de composições antifúngicas, e ainda a uma composição com atividade antifúngica, principalmente contra a espécie *Candida albicans*, a qual é responsável pela candidíase oral, incluindo cepas resistentes ao Fluconazol. Dessa maneira, são resolvidos problemas técnicos relacionados ao tamanho dos peptídeos derivados de Histatina 5, sendo ainda disponibilizados agentes ativos de interesse da indústria farmacêutica, devido a sua capacidade de combater cepas resistentes aos antifúngicos comerciais, sem, no entanto, causar efeitos tóxicos às células humanas.

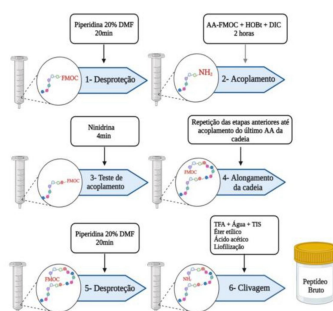


FIGURA 1

## **MÉTODO DE OBTENÇÃO DE FRAGMENTOS PEPTÍDICOS DERIVADOS DE HISTATINA 5, COMPOSIÇÃO E USO DA COMPOSIÇÃO**

### **BREVE DESCRIÇÃO**

[001] O presente pedido de patente de invenção se refere a um método de obtenção de fragmentos peptídicos, mais especificamente, dos peptídeos antimicrobianos 8W5 e 7W5, derivados de Histatina 5, bem como o uso combinado desses peptídeos como agentes antifúngicos para obtenção de composições antifúngicas, e ainda a uma composição com atividade antifúngica, principalmente contra a espécie *Candida albicans*, incluindo cepas resistentes ao Fluconazol, a qual é responsável pela candidíase oral.

### **CAMPO DE APLICAÇÃO**

[002] A presente invenção pertence à seção de necessidades humanas, ao campo de ciências médicas, mais especificamente, ao campo de obtenção e preparação de composições medicinais contendo peptídeos; por se referir a um método de obtenção de fragmentos peptídicos, ao seu uso como agentes antifúngicos para obtenção de composições antifúngicas e à composição com atividade antifúngica em si.

### **FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

[003] Em um tempo passado, a descoberta de novas moléculas com atividade antimicrobiana era realizada por meio de abordagens empíricas e básicas.

[004] Os compostos eram sintetizados por metodologias trabalhosas e dispendiosas e a necessidade de obtenção de quantidades significativas de produtos para realização dos testes biológicos tornava todo o processo ainda mais demorado e custoso.

[005] A síntese de moléculas análogas àqueles naturais (derivados estruturais com algumas modificações pontuais) permitiu a realização de estudos químicos, físicos e bioquímicos de grande parte dos peptídeos biologicamente ativos conhecidos até o presente momento.

[006] O uso de peptídeos antimicrobianos, tais como a Histatina 5, aparece como uma alternativa promissora aos agentes convencionais de combate.

[007] A Histatina 5 é o peptídeo com maior ação antifúngica da família das Histatinas os quais são secretados naturalmente pelas glândulas parótidas e submandibulares. Esses peptídeos possuem elevada atividade antifúngica e antibacteriana contra diversas espécies de patógenos orais. São importantes para a manutenção da homeostase da cavidade bucal, pois auxiliam na cicatrização de feridas e na reepitelização oral.

[008] Estes peptídeos foram descritos pela primeira vez em 1988 e são ricos no aminoácido histidina, possuem carga líquida positiva e são geralmente pequenos (de 2 a 4 kDa). Histatina 1, Histatina 3 e Histatina 5 são os três principais peptídeos desta família presentes na saliva humana. Histatina 5 é produto da clivagem proteolítica de Histatina 3 e é o peptídeo com maior ação antifúngica da família das Histatinas.

[009] Nos últimos dez anos houve um considerável aumento dos casos de doenças infecciosas com destaque para as causadas por fungos. O aumento de casos de infecções fúngicas está diretamente relacionado com o aumento de intervenções médicas como quimioterapia para tratamento de câncer, imunossupressão para realização de transplantes, infecções causadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), e mais recentemente, pelo vírus da COVID-19. Tal fato permitiu o aparecimento de infecções prevalentes, dentre as quais, aproximadamente 80% são causadas por espécies do gênero *Candida ssp.*

[010] Das várias espécies conhecidas de *Candida ssp.*, *Candida albicans* é responsável por quase metade dos casos infecciosos em todo o mundo, representando 47% deles.

[011] Essa espécie já apresenta mecanismos de resistência a antifúngicos convencionais, como o fluconazol. Além disso, *Candida albicans* também é capaz de promover a degradação enzimática de alguns agentes antifúngicos. Todos esses mecanismos adaptativos permitem que esse micro-organismo sobreviva mesmo

durante o tratamento com antibióticos. Além disso, por se tratar de uma célula eucariótica, semelhante a células humanas, existe certa dificuldade em se encontrar novas moléculas que apresentem seletividade para as células fúngicas e não causem danos as demais células do organismo.

[012] Histatina-5 é o peptídeo com maior ação antifúngica da família das Histatinas e possui ampla ação contra fungos patogênicos, incluindo *Candida albicans*. No entanto, Histatina 5 sofre extensa degradação por enzimas proteolíticas presentes na saliva humana.

[013] Dessa forma, produzir peptídeos menores (fragmentos) baseados na estrutura da Histatina 5 ou modificar a sequência de aminoácidos do peptídeo Histatina 5, podem ser a chave para a produção de moléculas resistentes a degradação proteolítica e com melhor atividade antifúngica.

[014] O uso de agentes antifúngicos para tratamento de infecções prevalentes é um tópico recorrente em discussão pública já que, ao falar sobre eles, muitos associam ao surgimento de espécies cada vez mais resistentes, o que acarretaria o uso de maior dosagem para o tratamento, aumentando a chance de toxicidade ao paciente em tratamento. No entanto, como alternativa para este problema, tais peptídeos são de interesse da indústria farmacêutica, pois conseguem combater cepas resistentes aos antifúngicos comerciais, sem, no entanto, causar efeitos tóxicos às células humanas.

### **ESTADO DA TÉCNICA**

[015] O documento BR102017004956-6, intitulado "Método de obtenção de bacteriocinas, bacteriocinas e uso das mesmas", descreve um método de obtenção de bacteriocinas, mais especificamente, peptídeo antimicrobiano LeuA1, análogo à Leucocina A, bem como o referido peptídeo (conforme definido na Seq. Id. nº 2), por meio da técnica de síntese de peptídeos em fase sólida. A invenção ainda provê o uso do referido peptídeo antimicrobiano LeuA1 como conservante biológico natural de alimentos. Ainda que a anterioridade descreva a obtenção dos peptídeos de interesse por meio de síntese de peptídeos em fase sólida, assim como a presente

invenção, cabe destacar que existem diferenças importantes nos processos, tais como: ajustes de parâmetros e escolha dos componentes empregados, além de os produtos obtidos e da aplicação deles também serem totalmente diferentes.

[016] O documento US10464977B2, intitulado "*Histatin-5 based synthetic peptides and uses thereof*", descreve peptídeos sintéticos ou fragmentos sintéticos baseados em um peptídeo Histatina-5, por exemplo, com a sequência DSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGY. Esses peptídeos sintéticos ou fragmentos sintéticos possuem pelo menos um aminoácido substituído que é arginina e/ou leucina para aumentar a resistência à degradação proteolítica por um microrganismo, como um fungo. Eles podem ser contidos em um hidrogel. Além disso, são fornecidos métodos para tratar ou prevenir uma condição patofisiológica através da administração tópica do peptídeo sintético ou fragmentos. A condição patofisiológica pode ser uma infecção fúngica ou bacteriana, incluindo inflamação associada ou uma condição crônica.

[017] Cabe destacar que, ainda que a anterioridade descreva uma solução técnica para aumentar a resistência à degradação proteolítica, a solução técnica da presente invenção, fornecer fragmentos menores de peptídeos, não é ensinada ou mesmo sugerida pelo referido documento. Além disso, o documento fornece fragmentos sintéticos modificados em pelo menos um aminoácido, bem como fornece uma formulação farmacêutica sob a forma de um hidrogel bioadesivo, diferentemente da presente invenção. A anterioridade ainda sugere a formulação farmacêutica contendo os peptídeos sintéticos derivados de Histatina 5 em combinação com pelo menos um agente antibacteriano, o que a afasta da presente invenção que não sugere o uso combinado, mas sim de apenas os peptídeos sintéticos derivados de Histatina 5.

[018] O documento US 2017/0224771, intitulado "*Histatins as therapeutic agents for ocular surface disease*", se refere a Histatinas que são utilizadas para tratar doenças da superfície ocular, como por exemplo o olho seco. Por exemplo, Histatinas são incluídas em colírios, géis oftálmicos, pomadas, adesivos ou

incorporadas em lentes de contato (polímero). Em alguns casos, são utilizados fragmentos peptídicos de pelo menos duas Histatinas diferentes. Em outras situações, um agente terapêutico adicional (não Histatina) é utilizado em combinação com as Histatinas. Em certos casos, a Histatina 5 ou seus fragmentos são usados em conjunto com um agente terapêutico adicional (não Histatina). Alternativamente, as Histatinas podem ser incluídas como conservantes em preparações oftálmicas.

[019] A anterioridade revela o uso combinado de Histatinas ou de seus fragmentos. No entanto, o documento não ensina ou sugere o uso combinado de diferentes fragmentos da Histatina 5, mas sim, de Histatina 5 em combinação com fragmentos de Histatina 1 e/ou Histatina 2. Desse modo, embora o referido documento revele uma combinação de Histatinas, os ensinamentos por ela trazidos se afastam da solução técnica fornecida pela presente invenção.

[020] A publicação de Zambom e colaboradores (2019), intitulada “*A novel antifungal system with potential for prolonged delivery of histatin 5 to limit growth of Candida albicans*”, descreve o desenvolvimento de lipossomas carregados com o peptídeo antifúngico 0WHistatina 5 para o tratamento da candidíase oral. Esses lipossomas, produzidos em diferentes composições lipídicas e submetidos a técnicas de extrusão e sonicação, mostraram eficiência na liberação gradual do peptídeo, mantendo sua atividade antifúngica. Testes demonstraram que os lipossomas foram capazes de controlar o crescimento de *Candida albicans* por até 72 horas, sugerindo sua viabilidade como um sistema terapêutico eficaz para o tratamento da candidíase oral.

[021] A publicação “*Antimicrobial peptide synergies for fighting infectious diseases*”, (Mhlongo *et al.*; 2023), discute que peptídeos antimicrobianos (AMPs) são componentes vitais do sistema de defesa do hospedeiro, oferecendo uma promissora estratégia contra a resistência a múltiplos medicamentos. Seu uso combinado com outros agentes antimicrobianos cria uma nova classe de medicamentos com ação sinérgica, superando as limitações das terapias únicas. Os

AMPs agem formando poros nas membranas dos microrganismos, inibindo suas funções internas e evitando a resistência a medicamentos. A revisão aborda diversas sinergias de AMPs com antimicrobianos e outros compostos, explorando as modificações químicas e estruturais que podem potencializar sua eficácia clínica.

[022] As duas publicações anteriormente mencionadas são apresentadas apenas como evidências do estado da técnica sobre o grande potencial antifúngico no uso de combinações de fragmentos derivados de Histatina 5, porém, foram consideradas distantes da presente invenção.

[023] Embora a Histatina 5 e seus peptídeos derivados sejam amplamente conhecidos como potentes agentes antifúngicos contra *Candida Albicans*, nenhuma das anterioridades localizadas sugerem o método de método de obtenção de fragmentos peptídicos derivados da Histatina 5, o uso desses fragmentos em composições com atividade antifúngica, mais especificamente com atividade contra *Candida albicans* e cepas resistentes ao Fluconazol, ou mesmo a composição compreendendo apenas fragmentos peptídicos derivados da Histatina 5, mais especificamente, dos peptídeos 8W5 e 7W5 combinados, como pleiteado na presente invenção, o que demonstra sua contribuição ao campo técnico.

### **OBJETIVOS DA INVENÇÃO**

[024] O presente pedido de patente, tem como objetivo disponibilizar: um método de obtenção de fragmentos peptídicos antimicrobianos derivados da Histatina 5; o uso desses peptídeos para obtenção de composições antifúngicas, e uma composição com atividade fúngicas, principalmente contra a espécie *Candida albicans*, a qual é responsável pela candidíase oral, incluindo cepas resistentes ao Fluconazol.

### **VANTAGENS DA INVENÇÃO**

[025] A presente invenção tem como vantagem disponibilizar fragmentos peptídicos antimicrobianos derivados da Histatina 5, mais especificamente dos fragmentos 8W5 e 7W5, cujas sequências de aminoácidos são definidas nas SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, que possuem alto potencial antifúngico e baixa toxicidade, a serem empregados em combinação, como agentes ativos, para preparação de

composições para o tratamento de infecções causadas por *Candida albicans* resistentes ou não ao Fluconazol.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FIGURAS**

[026] A Figura 1 mostra o fluxograma de obtenção dos peptídeos brutos, através da técnica de SPFS. AA-Fmoc representa um resíduo de aminoácido genérico.

[027] A Figura 2 ilustra o esquema da microplaca montada para o teste de concentração inibitória mínima (CIM).

[028] A Figura 3 ilustra o esquema da microplaca montada para o ensaio *checkerboard* combinação 8WH5-7WH5.

[029] A Figura 4 ilustra o esquema da microplaca montada para o ensaio *checkerboard* combinação 8WH5-Fármaco.

[030] A Figura 5 é um gráfico que mostra a comparação entre atividade antifúngica apresentadas pelos peptídeos e pelo fluconazol, nas três cepas testadas, quando na concentração de 160 µmol/L.

[031] A Figura 6 é um gráfico que ilustra os resultados obtidos no ensaio *killing-assay* para a combinação dos peptídeos 8WH5 e 7WH5.

[032] A Figura 7 é um gráfico que mostra a comparação entre a eficiência da ação das melhores combinações e a eficiência da ação individual dos peptídeos e do fármaco, nas mesmas concentrações.

### **DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS BIOLÓGICAS**

[033] SEQ ID NO: 1 – Sequência de aminoácidos do peptídeo antimicrobiano 8W5, derivado de Histatina 5;

[034] SEQ ID NO: 2 – Sequência de aminoácidos do peptídeo antimicrobiano 7W5, derivado de Histatina 5.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

[035] A presente invenção descreve um método de obtenção de fragmentos peptídicos, mais especificamente, dos peptídeos antimicrobianos 8W5 e 7W5, derivados de Histatina 5, cujas sequências de aminoácidos são definidas nas SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, respectivamente, ambos os peptídeos são fragmentos

artificiais da proteína Histatina 5, a qual é naturalmente encontrada na saliva humana, cabendo destacar que, um aminoácido triptofano foi adicionado na extremidade amino-terminal por via sintética, apenas para análises específicas, conforme apresentadas mais adiante. Adicionalmente, a invenção provê o uso desses peptídeos em combinação para obtenção de composições antifúngicas e uma composição com atividade antifúngica, principalmente contra a espécie *Candida albicans*, a qual é responsável pela candidíase oral, incluindo cepas resistentes ao Fluconazol.

[036] O método de obtenção dos fragmentos peptídicos antimicrobianos 8W5 e 7W5, derivados de Histatina 5, cujas sequências de aminoácidos são definidas nas SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, respectivamente, está ilustrado esquematicamente na Figura 1, e consiste em uma síntese em fase sólida compreendendo as etapas de:

- a. Alongamento da cadeia de aminoácidos do peptídeo;
- b. Clivagem; e
- c. Caracterização.

[037] A etapa (a) emprega o grupamento base-lábil Fmoc como protetor dos  $\alpha$ -amino grupos e grupos terc-butil como protetores das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais. A resina de partida é do tipo Fmoc-AA-Wang, onde AA representa o primeiro aminoácido que já vem acoplado à resina, correspondente à extremidade carboxi-terminal. Como agentes de condensação, utiliza-se uma mistura de DIC/HOBT. Para o acoplamento dos aminoácidos, emprega-se excesso molar de 3 equivalentes tanto para o Fmoc-aminoácido quanto para os reagentes de condensação, os quais são dissolvidos em DCM:DMF (1:1 v/v) permanecendo por 2 horas para cada acoplamento. A eficiência das etapas de acoplamento é monitorada pelo teste de ninidrina e, quando positivo, o processo é repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes.

[038] Na etapa (b), a clivagem do peptídeo da resina e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais é realizada com uma solução de clivagem (10 mL/g

de peptidil-resina) contendo TFA (95%), água deionizada (2,5%) e triisopropilsilano (0,5%), a 25°C por 3 horas. O peptídeo *in natura*, é precipitado com éter dietílico gelado e centrifugado por 4 vezes, em seguida, sendo liofilizado e purificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

[039] Na etapa (c), a caracterização é realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), para análise da pureza, e por espectrometria de massa, para identificação dos peptídeos.

[040] Os peptídeos 8W5 e 7W5, cujas sequências de aminoácidos são definidas nas SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, respectivamente, possuem grande potencial como agentes antifúngicos, por essa razão, os dois peptídeos podem ser usados na preparação de composições antifúngicas, tais como composições para o tratamento de infecções causadas por *Candida albicans*, inclusive para o tratamento de infecções causadas por cepas de *Candida albicans* resistentes ao Fluconazol.

[041] Assim, uma composição farmacêutica compreendendo uma combinação de fragmentos peptídicos derivados da Histatina 5, mais especificamente, uma combinação dos peptídeos 8W5 e 7W5 como agentes ativos, cujas sequências de aminoácidos são definidas nas SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, respectivamente, combinadas a componentes farmacêuticamente aceitáveis é promissora para tratamento de infecções causadas por cepas de *Candida albicans* resistentes ao Fluconazol ou não.

[042] A seguir são apresentados os resultados obtidos nos ensaios de atividade antifúngica, *checkerboard* para avaliação de efeito sinérgico e ensaio *killing-assay*.

[043] Ensaios de atividade antifúngica.

[044] A concentração inibitória mínima (CIM) dos peptídeos e do fluconazol foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 poços) conforme o protocolo adaptado do manual M27-A2 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Primeiramente preenche-se os 96 orifícios de uma microplaca com 100 µL de caldo Sabouraud Dextrose. Subsequentemente, são adicionados 100 µL de uma solução-padrão da amostra a ser testada, sendo feita a diluição seriada de 160 µmol/L até

0,31 µmol/L. Logo após, eram acrescentados 100 µL de uma suspensão de *Candida albicans*, com concentração do inicial de inóculo de  $1 \times 10^3$  células/mL, e outros 100 µL de caldo Sabouraud Dextrose. Como controle de crescimento do microrganismo (controle positivo), não era acrescentado amostra a ser testada e como controle de esterilidade do teste (controle negativo), não era acrescentado solução com suspensão de *Candida albicans*.

[045] Uma vez finalizada a montagem da placa, foi realizada a incubação desta, por um período de 48 horas, a 37°C. Após este tempo, a densidade ótica (DO) de cada orifício era lida em um espectrofotômetro de microplacas a 595 nm. O teste foi realizado em quintuplicata para todas as cepas, a média das DOs foi calculada e, por fim, a inibição do crescimento da *Candida albicans* produzida pelas distintas concentrações de cada peptídeo e fármaco testado foi determinada pela Equação 1:

$$\% \text{ de inibição} = \left( 1 - \left( \frac{\text{DO do poço} - \text{DO do meio de cultura}}{\text{DO controle positivo} - \text{DO do meio de cultura}} \right) \right) \times 100\%$$

Equação 1

[046] Ensaio *checkerboard* para avaliação de efeito sinérgico.

[047] Para a realização do ensaio, duas combinações foram escolhidas para serem testadas, sendo elas a 7WH5 com o 8WH5, e a 8WH5 com o fluconazol. A execução do teste baseou-se inicialmente no preparo das soluções-padrão de todas as amostras a serem analisadas. Subsequentemente, a uma microplaca, eram adicionados 50 µL de cada concentração do peptídeo 8WH5 ou do fluconazol, e 50 µL de cada concentração dos peptídeos 7WH5 ou 8WH5. Logo após eram acrescentados 100 µL de uma suspensão de *Candida albicans*, com concentração do inicial de inóculo de  $1 \times 10^3$  células/mL. Por fim, eram adicionados 50 µL de meio de cultura Sabouraud Dextrose. Também eram realizados os controles positivo e negativo como já descrito. A faixa de concentração testada para os peptídeos

8WH5 e 7WH5, em todas as cepas, foi de 160 a 2,5  $\mu\text{mol/L}$ . Já para o fluconazol, esses valores variaram de 160 a 2,5  $\mu\text{mol/L}$  para as cepas ATCC 18804 e ATCC 10231, e de 10 a 0,15  $\mu\text{mol/L}$  para a cepa ATCC 90028. Nas Figuras 3 e 4 é possível visualizar o esquema final da montagem das placas.

[048] Uma vez finalizada a montagem das placas, realizava-se a incubação destas, por um período de 48 horas, a 37°C. Após este tempo, a densidade ótica (DO) de cada orifício era lida em um espectrofotômetro de microplacas a 595 nm. Por fim, era realizado o cálculo da média das DOs e da porcentagem de inibição do crescimento de *Candida albicans* produzida pelas combinações testadas, conforme Equação 1. Cada combinação foi testada em triplicata nas cepas de *Candida albicans* ATCC 90028, ATCC 18804 e ATCC 10231.

[049] Ensaio *killing-assay*.

[050] Para a realização do ensaio, foi primeiramente executado o preparo das soluções-padrão de cada amostra a ser testada, numa concentração quatro vezes superior ao valor final pretendido. Uma vez que tais soluções se encontravam prontas, estas foram utilizadas para preencher os orifícios de uma microplaca de 96 poços. O enchimento dos poços foi realizado através da adição de 50  $\mu\text{L}$  de solução de cada componente da combinação e 100  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de *Candida albicans*, com concentração do inicial de inóculo de  $1 \times 10^3$  células/mL. Já, nos orifícios de controle do fármaco e dos peptídeos isolados, realizou-se a adição de 50  $\mu\text{L}$  de solução da amostra, 50  $\mu\text{L}$  de meio de cultura Sabouraud Dextrose e 100  $\mu\text{L}$  de inóculo. Após o preenchimento das placas, estas foram incubadas a 37°C, por um período de 48 horas, e a DO a 530 nm foi lida nos tempos de 0, 6, 12, 24, 48 horas de incubação. O teste foi realizado com a cepa ATCC 10231, em triplicata, e o crescimento relativo foi calculado segundo a Equação 2. As concentrações testadas para os peptídeos 8WH5 e 7WH5 foram, 160, 80 e 40  $\mu\text{mol/L}$ . Já para o fluconazol, foram utilizadas as concentrações de 5, 2,5 e 1,25  $\mu\text{mol/L}$ .

$$\% \text{ crescimento} = \left( \frac{\text{DO da amostra tempo } t - \text{DO do meio de cultura após 48h}}{\text{DO controle positivo após 48h} - \text{DO do meio de cultura após 48h}} \right) \times 100\%$$

## Equação 2

[051] Foram determinados, para o fármaco e para os três peptídeos sintetizados neste trabalho, os valores de CIM, capaz de gerar inibição mínima de 90% no crescimento de *Candida albicans*, no prazo de 48 horas. Os testes foram realizados em quintuplicata, a leitura da DO foi feita no comprimento de onda de 595 nm, e as cepas de *Candida albicans* utilizadas foram a ATCC 10231, ATCC 18804 e ATCC 90028. Os dados obtidos podem ser visualizados, de maneira resumida, na Tabela 1.

	<b>ATCC 90028</b>	<b>ATCC 18804</b>	<b>ATCC 10231</b>
7WH5	>160	>160	>160
8WH5	>160	160	>160
0WHst-5	160	80	160
Fluconazol	10	>160	>160

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima das moléculas analisadas, determinada para diferentes cepas de *Candida albicans*. Os valores de CIM estão representados em  $\mu\text{mol/L}$ .

[052] Conforme observado, o peptídeo 0WHst-5 mostrou inibir o crescimento das três cepas analisadas, apresentando CIM de 80  $\mu\text{mol/L}$  para *Candida albicans* ATCC 18804 e 160  $\mu\text{mol/L}$  para as demais. Ao comparar estes resultados, com aqueles obtidos para o fluconazol, observa-se que o peptídeo apresentou melhor inibição para as cepas ATCC 18804 e ATCC 10231 que o antifúngico comercial. Sendo assim, tem-se que estes dados são extremamente atrativos no que diz respeito ao combate às cepas resistentes, uma vez que se sabe que a ATCC 10231 apresenta perfil de resistência frente a ação do fluconazol.

[053] Para o peptídeo 7WH5, fragmento do domínio funcional da Histatina-5, não foi possível observar, no intervalo de concentrações testadas, concentração inibitória mínima de 90% em nenhuma das cepas utilizadas. Entretanto, esta molécula

apresentou na concentração de 160  $\mu\text{mol/L}$  porcentagem de inibição de mais de 80% para a cepa ATCC 90028, e de 50% para ATCC 10231, conforme mostrado na Figura 5. Já o peptídeo 8WH5 apresentou CIM de 160  $\mu\text{mol/L}$  para a cepa ATCC 18804.

[054] Ao realizar a comparação dos dados apresentados na Figura 5, observa-se que ambos os fragmentos sintetizados possuem ação antifúngica contra as cepas ATCC 18804 e ATCC 10231 de *Candida albicans*, mas que o peptídeo 8WH5 apresentou maior atividade, a estas cepas, quando comparado ao peptídeo 7WH5. Além disso, nota-se, também, que todos os peptídeos utilizados neste trabalho demonstraram ser mais eficientes na inibição das cepas ATCC 18804 e ATCC 10231 que o Fluconazol. Logo, estes são interessantes métodos alternativos ao tratamento de infecções causadas pelas cepas anteriormente mencionadas.

[055] Uma vez finalizado o ensaio, foram elaboradas as matrizes de inibição de crescimento microbiano para todas as combinações e cepas testadas, através do uso da média de cada uma das triplicatas realizadas. Subsequentemente, foi calculada a concentração inibitória fracionária (CIF) de cada associação, nas diferentes cepas utilizadas. Este cálculo foi realizado através do uso da CIM das moléculas atuando individualmente e da menor combinação de concentrações peptídeo/peptídeo, que conseguiu gerar inibição maior ou igual a 90%. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2.

<b>Cepa analisada</b>	<b>Combinação 8WH5/7WH5 (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>CIF</b>	<b>Tipo de efeito</b>
<b>ATCC 90028</b>	40/160	1,2	Indiferença
<b>ATCC 18804</b>	80/40	0,7	Aditividade
<b>ATCC 10231</b>	160/40	1,2	Indiferença

Tabela 2 - Concentração inibitória fracionária (CIF) da menor combinação de concentrações de 8WH5/7WH5, que conseguiu gerar inibição maior ou igual a 90%.

[056] A combinação dos peptídeos antimicrobianos 7WH5 e 8WH5, gerou uma atividade antifúngica indiferente para as cepas de *Candida albicans* ATCC 90028 e

ATCC 10231, e aditiva para ATCC 18804. Entretanto, ao analisar as combinações de inibição, comparando com aqueles obtidos no ensaio de CIM, observa-se que a associação, além de aumentar consideravelmente a potência inibitória dos peptídeos, também, diminuiu a concentração utilizada de cada molécula. Desta forma, é possível dizer que a resposta obtida no experimento é muito importante, pois mesmo que não indique a ocorrência de sinergismo, ela comprova que os fragmentos da Histatina-5 são mais potentes juntos do que separados. Portanto, conclui-se que estes dados são um forte indício de que a ação combinada de fragmentos da Histatina-5 frente a *Candida albicans*, é mais expressiva do que a demonstrada pela molécula de Histatina-5 individualmente.

[057] Para a obtenção de um melhor entendimento sobre a atividade de tais associações, foi proposta a realização do ensaio *killing-assay*, a fim de investigar a ação dessas combinações em função do tempo. Além disso, também foram realizados controles dos peptídeos e fármaco isolados, com o intuito de obter um meio de comparação entre a eficiência das combinações e das moléculas sozinhas. Para a execução desse ensaio, foi utilizada a cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, que apresenta um perfil de resistência ao fármaco comercial fluconazol.

[058] Ao analisar os resultados obtidos para as distintas combinações dos peptídeos 8WH5 e 7WH5 (Figura 6), observa-se que três, das quatro associações testadas, apresentaram perfis de ação extremamente semelhantes ao longo de todo o teste. Estas exibiram poder inibitório de aproximadamente 98%, em relação ao controle de crescimento. A única exceção a tal padrão, foi o observado pela combinação de 40 µM de 8WH5 com 160 µM de 7WH5, que apresentou 60,8% de inibição. Entretanto, destaca-se que a associação de 160 µM de 8WH5 com 40 µM de 7WH5 foi a que demonstrou ser a mais eficiente no controle do crescimento da cepa de *Candida albicans* analisada, uma vez, que exibiu um nível de crescimento microbiano ao longo do experimento ligeiramente mais baixo que as demais.

[059] Um estudo comparativo entre a combinação dos peptídeos 8WH5 e 7WH5, foi realizado utilizando uma combinação do peptídeo 8WH5, que é mais ativo

individualmente, com o fármaco comercial fluconazol. A partir da análise da Figura 7, fica nítido que as combinações de 8WH5/Flu e 8WH5/7WH5 foram muito mais eficientes no impedimento do crescimento microbiano do que as moléculas sozinhas.

[060] Quando isolados, o fluconazol 2,5  $\mu\text{M}$ , 7WH5 40  $\mu\text{M}$  e 8WH5 160  $\mu\text{M}$  apresentaram, respectivamente, um poder inibitório de 10, 12 e 51% em relação ao controle de crescimento. Já as combinações, exibiram uma taxa de inibição superior a 96%. Sendo assim, tem-se que os dados conseguidos nesse experimento, corroboram para a confirmação da hipótese de que essas moléculas, são mais eficientes no controle do crescimento de *Candida albicans* quando estão associadas.

## REIVINDICAÇÕES

1. **MÉTODO DE OBTENÇÃO DE FRAGMENTOS PEPTÍDICOS ANTIMICROBIANOS DERIVADOS DE HISTADINA 5**, consistindo em síntese em fase sólida **caracterizado pelas** etapas de:
  - a. Alongamento de cadeia de aminoácidos do peptídeo, a partir do emprego de: grupamento base-lábil Fmoc como protetor dos  $\alpha$ -amino grupos e grupos terc-butil como protetores das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais, sendo a resina de partida é do tipo Fmoc-AA-Wang, onde AA representa o primeiro aminoácido que já vem acoplado à resina, correspondente à extremidade carboxi-terminal; mistura de DIC/HOBT como agentes de condensação, em excesso molar de 3 equivalentes tanto para o Fmoc-aminoácido quanto para os reagentes de condensação, os quais são dissolvidos em DCM:DMF (1:1 v/v) permanecendo por 2 horas para cada acoplamento dos aminoácidos, sendo a eficiência das etapas de acoplamento monitoradas pelo teste de ninidrina e, quando positivo, o processo ser repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes;
  - b. Clivagem do peptídeo da resina e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais ser realizada com uma solução de clivagem (10 mL/g de peptidil-resina) contendo TFA (95%), água deionizada (2,5%) e triisopropilsilano (0,5%), a 25°C, por 3h; então o peptídeo *in natura*, ser precipitado com éter dietílico gelado e centrifugado por 4 vezes, em seguida, ser liofilizado e purificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).
2. **USO DOS FRAGMENTOS PEPTÍDICOS DERIVADOS DE HISTATINA 5**, obtidos conforme definido na reivindicação 1, **caracterizado por** ser para preparação de composições antifúngicas.

3. **USO DOS FRAGMENTOS PEPTÍDICOS DERIVADOS DE HISTATINA 5**, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado por** ser para preparação de composições para o tratamento de infecções causadas por *Candida albicans*.
4. **USO DOS FRAGMENTOS PEPTÍDICOS DERIVADOS DE HISTATINA 5**, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado por** ser para preparação de composições para o tratamento de infecções causadas por *Candida albicans* resistentes ao Fluconazol.
5. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA caracterizada por** compreender uma combinação de fragmentos peptídicos derivados da Histatina 5, mais especificamente, uma combinação dos peptídeos 8W5 e 7W5 como agentes ativos, cujas sequências de aminoácidos são definidas nas SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, obtidos de acordo com o definido na reivindicação 1.
6. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA**, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada por** ser possuir atividade antifúngica.
7. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA**, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada por** ser possuir atividade antifúngica contra *Candida albicans*.
8. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA**, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada por** ser possuir atividade antifúngica contra *Candida albicans* resistentes ao Fluconazol.

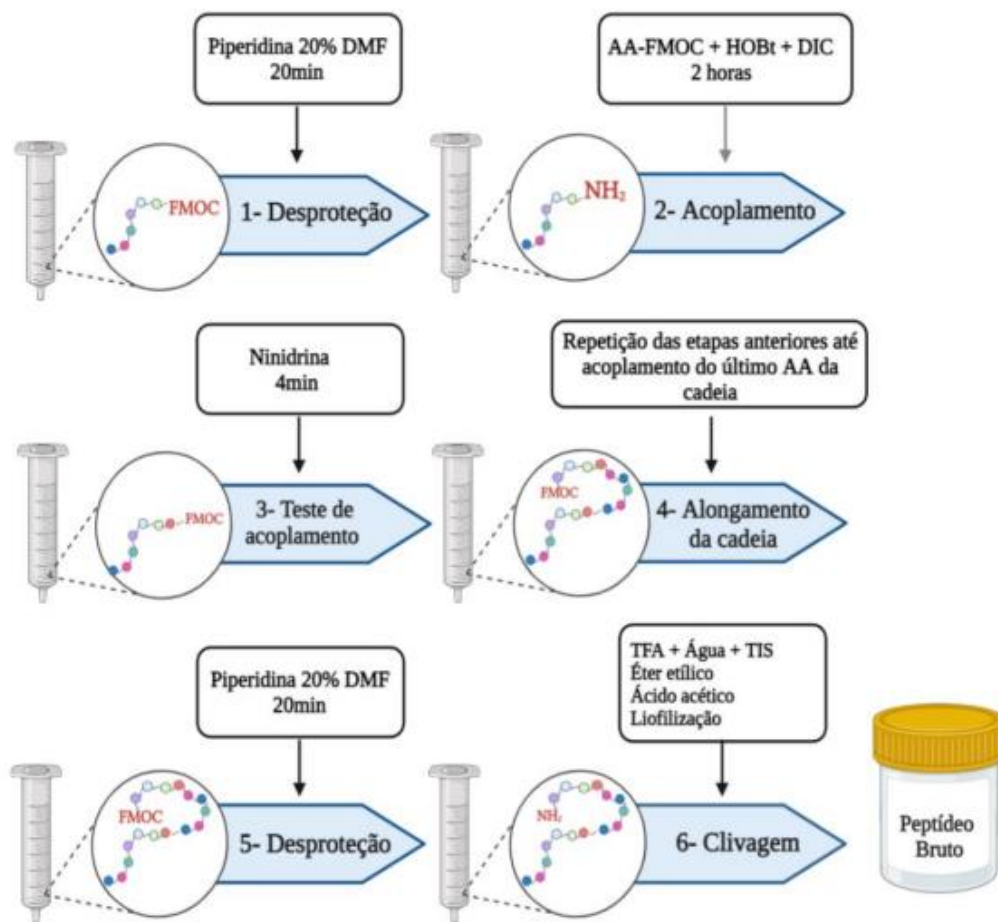


FIGURA 1

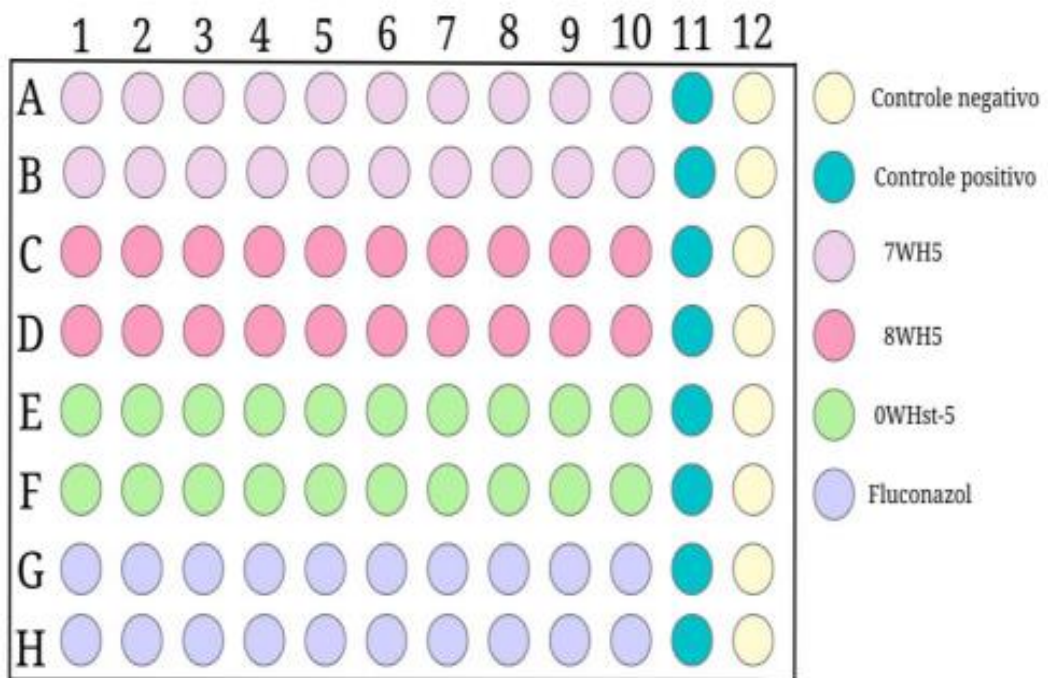


FIGURA 2

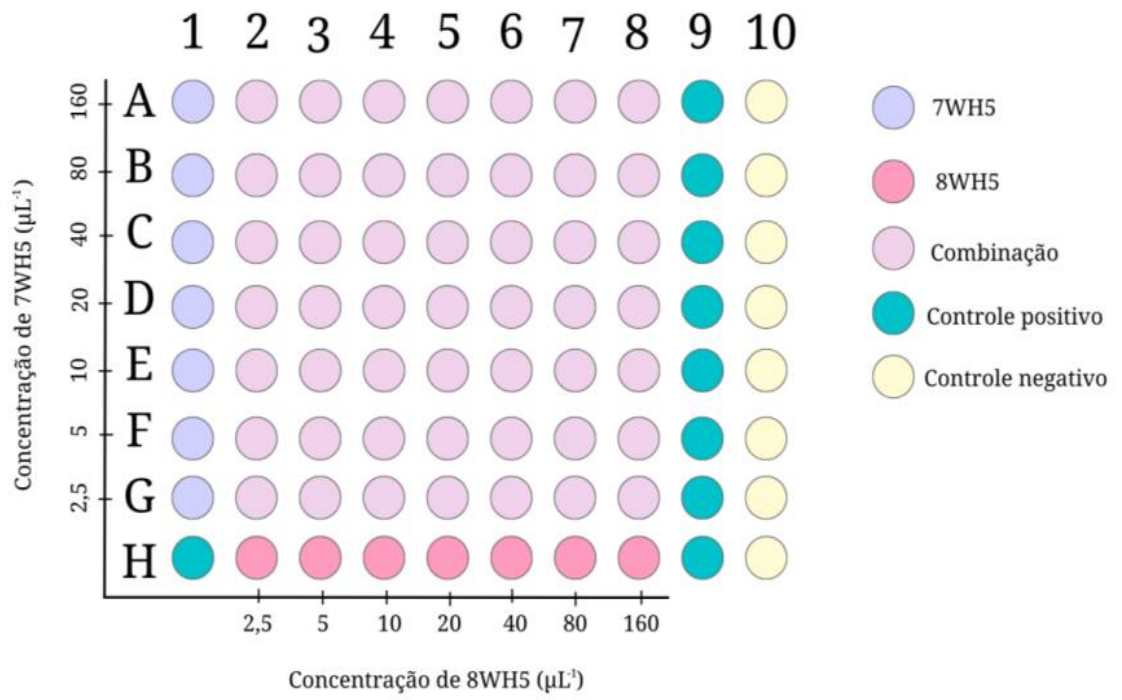
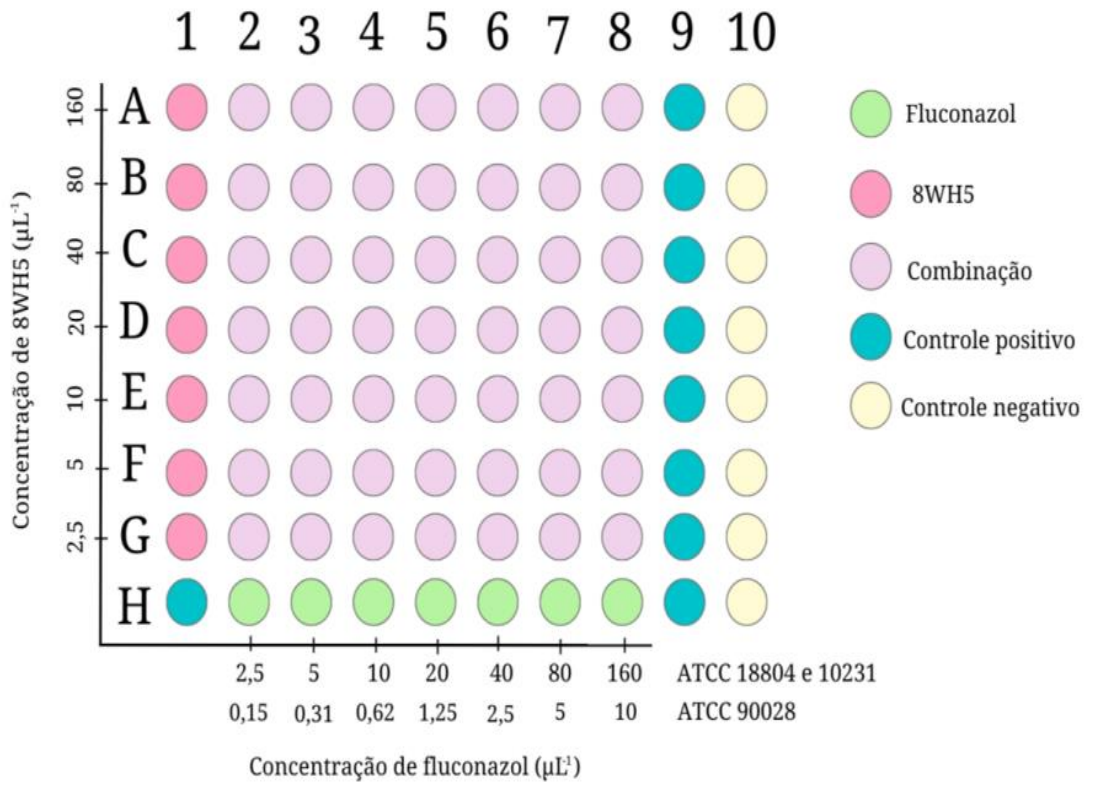


FIGURA 3



**FIGURA 4**

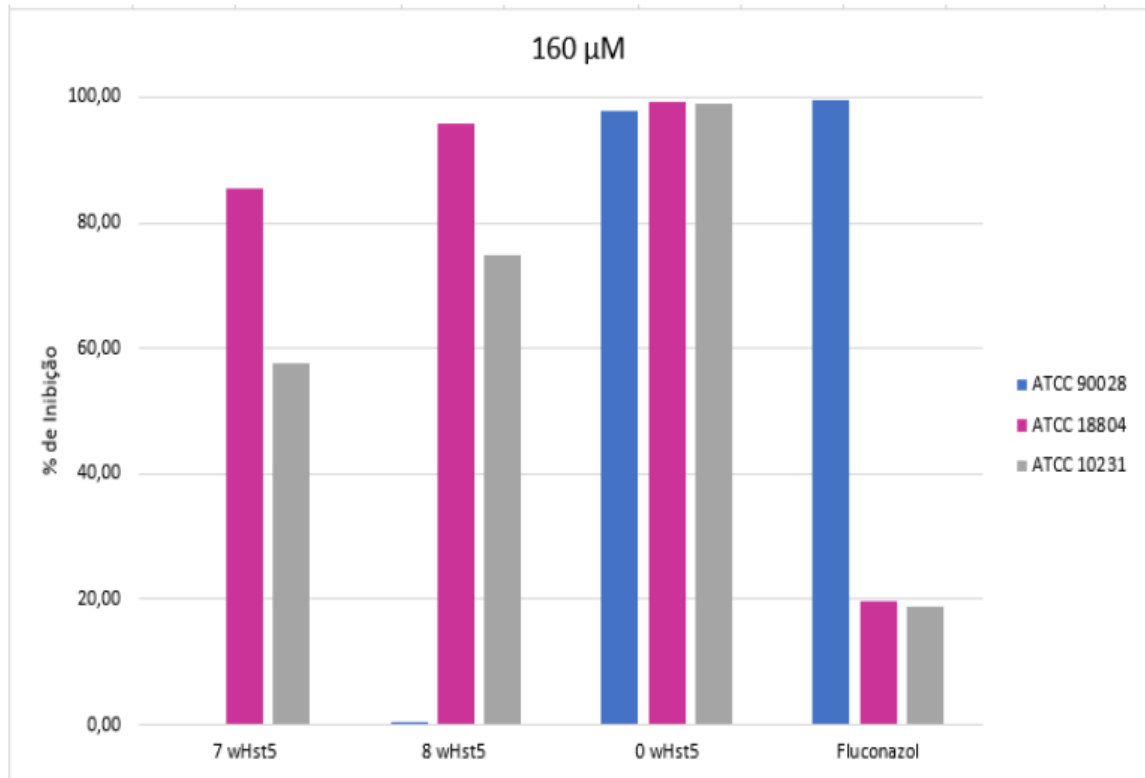


FIGURA 5

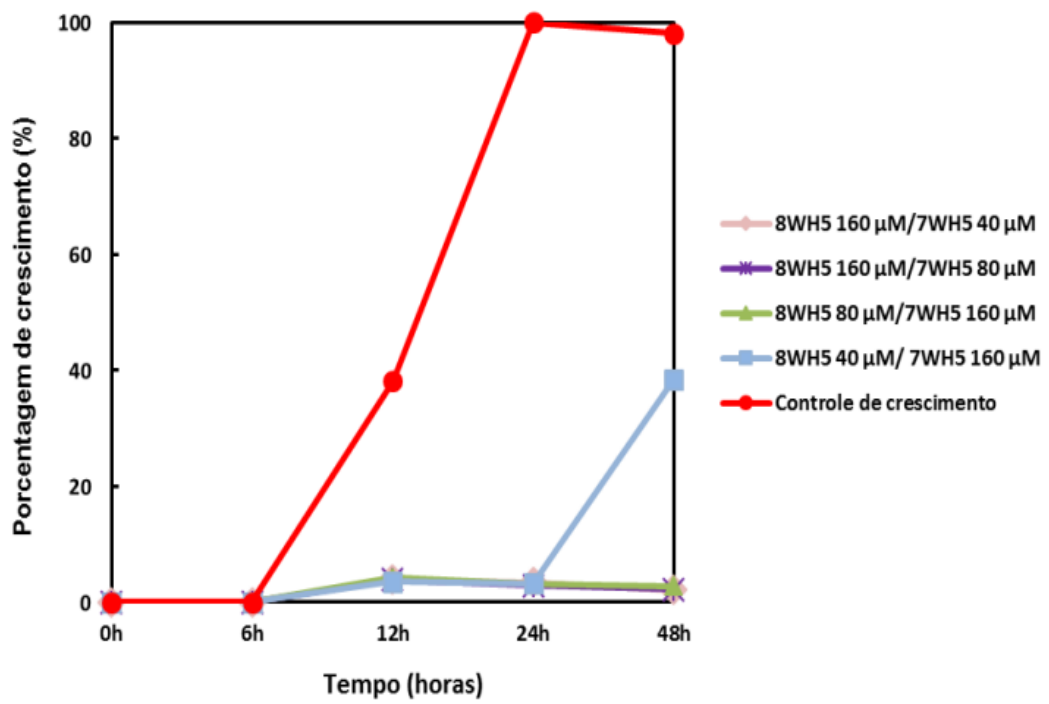


FIGURA 6

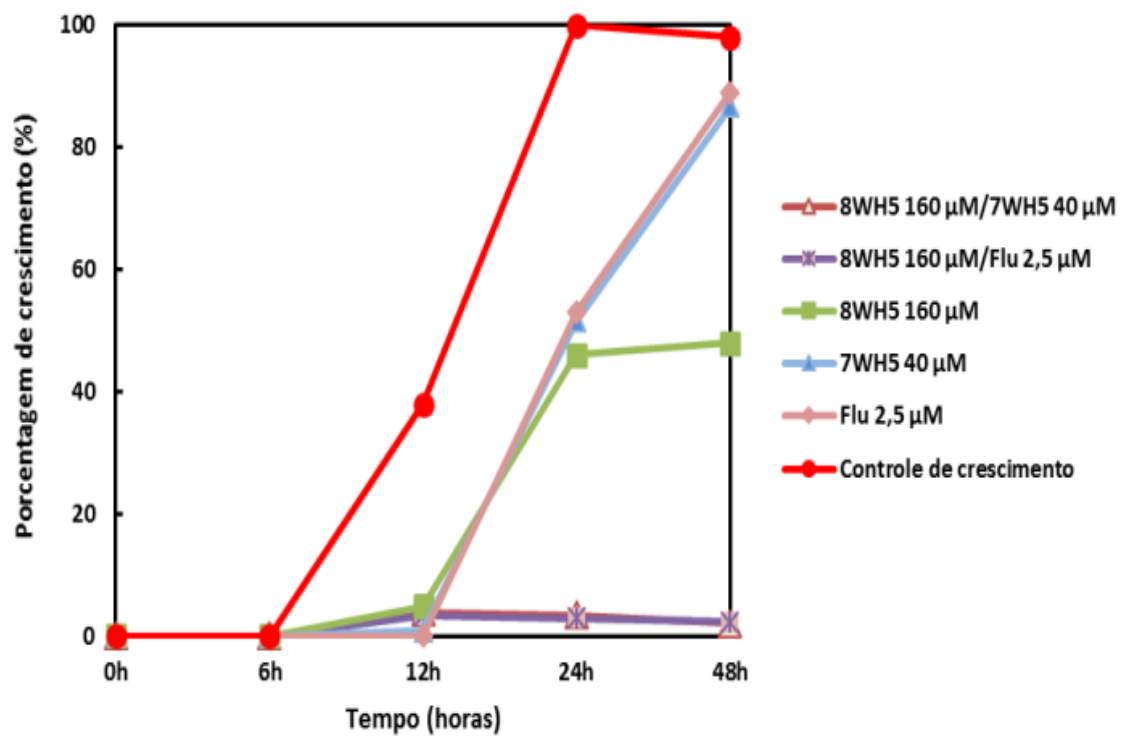


FIGURA 7

## RESUMO

**MÉTODO DE OBTENÇÃO DE FRAGMENTOS PEPTÍDICOS DERIVADOS DE HISTATINA 5, COMPOSIÇÃO E USO DA COMPOSIÇÃO**

O presente se refere a um método de obtenção de fragmentos peptídicos, mais especificamente, dos peptídeos antimicrobianos 8W5 e 7W5, cujas sequências de aminoácidos são definidas nas SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, derivados de Histatina 5, bem como o uso combinado desses peptídeos como agentes antifúngicos para obtenção de composições antifúngicas, e ainda a uma composição com atividade antifúngica, principalmente contra a espécie *Candida albicans*, a qual é responsável pela candidíase oral, incluindo cepas resistentes ao Fluconazol. Dessa maneira, são resolvidos problemas técnicos relacionados ao tamanho dos peptídeos derivados de Histadina 5, sendo ainda disponibilizados agentes ativos de interesse da indústria farmacêutica, devido a sua capacidade de combater cepas resistentes aos antifúngicos comerciais, sem, no entanto, causar efeitos tóxicos às células humanas.

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

### Código de Controle

Campo 1



Campo 2



### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Sequencias
- Data de Geração do Código: 30/09/2024
- Hora de Geração do Código: 16:17:10
- Código de Controle:
  - Campo 1: 8EA2AEDD889067BE
  - Campo 2: D20BC695DBB93C40