



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(21) BR 102021014737-7 A2

(22) Data do Depósito: 27/07/2021

(43) Data da Publicação Nacional:
14/03/2023

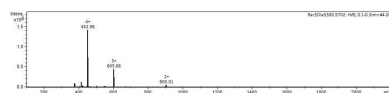
(54) Título: COMPOSTO COM PROPRIEDADES ANTIVIRAIS CONTRA VÍRUS ZIKA

(51) Int. Cl.: C07K 7/08; C07K 1/113; A61K 38/10; A61P 31/14.

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

(72) Inventor(es): BRUNO MOREIRA CARNEIRO; CINTIA BITTAR OLIVA; EDUARDO MAFFUD CILLI; GABRIELA MIRANDA AYUSSO; MARIA LETICIA DUARTE LIMA; MARIANA NOGUEIRA BATISTA; MARILIA DE FREITAS CALMON; PAULA RAHAL; PAULO RICARDO DA SILVA SANCHES.

(57) Resumo: COMPOSTO COM PROPRIEDADES ANTIVIRAIS CONTRA VÍRUS ZIKA. A presente patente de invenção trata de composto com propriedades antivirais contra vírus Zika onde, notadamente, a molécula de origem sintética é composta pelo peptídeo de sequência FALALKALKKALKKL-COOH conjugado com o composto natural ácido gálico (Gallic Acid - FALALKALKKALKKL-COOH). O composto apresenta atividade de inibição de duas linhagens de Zika vírus (PE243) e (MP1751) em seus processos de entrada e replicação citoplasmática, além de atividade virucida.



“COMPOSTO COM PROPRIEDADES ANTIVIRAIS CONTRA VÍRUS ZIKA”.**CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO**

[001] A presente patente de invenção trata de composto com propriedades antivirais contra vírus Zika onde, notadamente, a molécula de origem sintética é composta pelo peptídeo de sequência FALALKALKKALKKL-COOH conjugado com o composto natural ácido gálico (*Gallic Acid* - FALALKALKKALKKL-COOH). O composto apresenta atividade de inibição de duas linhagens de Zika vírus (PE243) e (MP1751) em seus processos de entrada e replicação citoplasmática, além de atividade virucida.

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

[002] É sabido que, atualmente, o surto de viroses emergentes e re-emergentes é um grande problema para a saúde pública de diversos países, incluindo o Brasil.

[003] Zika Vírus – ZIKV - é um vírus da família *Flaviviridae*, inserido no gênero flavivirus, dividindo família e gênero com os vírus da Febre Amarela – YFV - e Dengue - DENV.

[004] A transmissão principal do Zika Vírus – ZIKV - é ocasionada por meio da picada do mosquito infectado, principalmente, o *Aedes aegypti*. Segundo estudos, o vírus, também, pode ser transmitido por contato sexual e da mãe para o filho durante a gravidez, causando complicações no desenvolvimento do feto, podendo levar ao mau desenvolvimento encefálico.

[005] O Zika Vírus – ZIKV - também foi associado com a síndrome de Guillain-Barré, uma doença pós-infecção relacionada à danos no sistema nervoso de indivíduos adultos. Em 2015, transmissões autóctones foram confirmadas no Brasil e, desde então, a doença tem sido relatada em diferentes países como Porto Rico, México, Tailândia, Cingapura,

[006] Malásia, Estados Unidos entre outras regiões mundiais. Não há, até o momento, vacinas ou medicamentos aprovados para o tratamento de infecções causadas pelo Zika vírus – ZIKV.

[007] Apesar de não existir tratamentos para infecções causadas pelo ZIKV, muitos antivirais foram desenvolvidos e descritos para o tratamento de infecções causadas por outros vírus da mesma família, como o vírus da Hepatite C. Esses compostos, apesar de eficientes no tratamento da hepatite, apresentam alto custo e agem, geralmente, em

uma única etapa da produção de novos vírus, seja ela virucida, entrada, replicação citoplasmática, montagem ou liberação.

[008] O artigo denominado como Otimização de inibidores à base de uréia 1,3-dissubstituídos da infecção pelo vírus Zika e publicado em 15 outubro de 2019 na *'Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters'* revela que o vírus Zika - ZIKV - tornou-se um problema de saúde pública em todo o mundo devido à sua associação com anomalias congênitas e doenças neurológicas. Até o momento, não foram aprovadas vacinas ou medicamentos antivirais eficazes para o tratamento da infecção pelo ZIKV, e novas opções terapêuticas de baixo custo são urgentemente necessárias. Neste estudo, usamos um ensaio de placa in vitro para avaliar uma atividade antiviral da segunda geração de compostos anti-ZIKV, com base no andaime 1,3-dissubstituído (tio) de uréia. Verificou-se que vários compostos da biblioteca possuem excelente atividade contra o vírus Zika com valores de IC50 <200pM. O analógico mais ativo, A5 exibiu um IC50 excepcional = $85,1 \pm 1,7$ pM. Análises posteriores delinearam os requisitos estruturais necessários para efeitos antivirais potentes dessa classe de compostos. Coletivamente, nossos resultados sugerem que os derivados de 1,3-dissubstituídos (tio) ureia são excelentes candidatos pré-clínicos para o desenvolvimento de terapêuticas anti-ZIKV.

[009] O artigo denominado como Atividade antiviral do medicamento candesartan cilexetil aprovado pela FDA contra a infecção pelo vírus Zika, publicado em *'Antiviral Research'* Volume 172, dezembro 2019, 104637 revela que O vírus zika (ZIKV) é um vírus transmitido por mosquitos que ganhou destaque como uma ameaça significativa à saúde pública na última década. Desde seu ressurgimento em 2007, o ZIKV se espalhou a um ritmo alarmante e tornou-se endêmico em várias regiões do mundo. As infecções são principalmente assintomáticas, no entanto, o vírus tornou-se associado ao desenvolvimento de complicações neurológicas graves, como a síndrome de Guillain-Barré (GBS) e microcefalia congênita. Atualmente, não há antivirais aprovados para infecções por ZIKV. Neste estudo, utilizamos uma plataforma de triagem baseada em fenótipo para realizar uma triagem de alto rendimento em uma biblioteca de medicamentos aprovada pelo FDA dos EUA, com 1172 compostos, para identificar potenciais novos inibidores contra o ZIKV. O candesartan cilexetil, um inibidor do

receptor da angiotensina II, apresentou potentes efeitos de inibição contra o ZIKV e estudos subsequentes ao longo do tempo revelaram que ele visa um estágio (s) pós-entrada do ciclo de replicação do ZIKV. Além disso, o candesartan cilexetil também inibiu a produção de RNA viral e a síntese de proteínas virais. O candesartan cilexetil também exibiu efeitos antivirais contra o vírus da dengue serotipo-2 (DENV2), vírus Kunjin (KUNV) e vírus Chikungunya (CHIKV), indicando que suas propriedades antivirais podem não estar restritas ao ZIKV. Nosso estudo demonstrou pela primeira vez a potencial aplicação de candesartan cilexetil como antiviral.

[010] O artigo denominado como Identificação de novos inibidores de moléculas pequenas da infecção pelo vírus Zika, publicado em 1 de fevereiro de 2018 '*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*' revela que o recente ressurgimento do vírus Zika (ZIKV), um membro da família *Flaviviridae*, tornou-se uma emergência global e uma séria ameaça à saúde pública em todo o mundo. A infecção pelo ZIKV causa neuroimunopatologia grave e é particularmente prejudicial ao desenvolvimento de fetos de mulheres grávidas infectadas, causando várias anormalidades no desenvolvimento. Atualmente, não existem métodos eficazes de prevenção ou tratamento da infecção pelo ZIKV, e novas opções de tratamento são urgentemente necessárias. Portanto, usamos um ensaio de placa in vitro para rastrear uma biblioteca proprietária limitada de pequenos compostos orgânicos e identificamos derivações altamente bioativas, com os análogos mais ativos mostrando atividade em faixa picomolar baixa. Os "acertos" identificados possuem certas características estruturais comuns que podem ser usadas no projeto da (s) próxima(s) geração(s) de inibidores de ZIKV. Coletivamente, nossas descobertas sugerem que os compostos identificados representam excelentes modelos para o desenvolvimento de medicamentos anti-zika baratos e disponíveis por via oral.

[011] Já o artigo denominado como '*Glycosylated diphyllin as a broad-spectrum antiviral agent against*' Zika vírus, publicado em 06/09/2019 e revela que Flavivírus como o zika causam surtos esporádicos de pandemia em todo o mundo. Há uma necessidade urgente de medicamentos contra o vírus Zika (ZIKV) para impedir a transmissão de ZIKV de mãe para filho, novas infecções em populações de alto risco e a

infecção do pessoal médico nas áreas afetadas pelo ZIKV. Aqui, mostramos que a molécula pequena 6-desoxiglucose-difilina (DGP) exibiu atividade anti-ZIKV tanto in vitro quanto in vivo. O DGP bloqueou potentemente a infecção por ZIKV em todas as linhas celulares humanas e de macacos testadas. O DGP também exibiu atividade antiviral de amplo espectro contra outros flavivírus. Notavelmente, o DGP impediu a mortalidade induzida por ZIKV em camundongos sem o receptor de interferon tipo I (Ifnar1 - / -). Experiências celulares e virológicas mostraram que o DGP bloqueou o ZIKV em uma etapa de pré-fusão ou durante a fusão, o que impediu a entrega do conteúdo viral no citosol da célula-alvo. Estudos mecanísticos revelaram que o DGP impediu a acidificação dos compartimentos endossômicos/lisossômicos nas células-alvo, inibindo assim a fusão do ZIKV com membranas celulares e infecções.

[012] Da mesma forma, o artigo denominado como Atividade antiviral da pinocembrina contra a replicação do vírus Zika publicado em *'Antiviral Research'* e revela A atividade antiviral da pinocembrina contra a replicação do vírus Zika publicado em Antiviral Research Volume 167, Julho 2019, Páginas 13-24, revela que o vírus Zika (ZIKV) é um vírus transmitido por mosquitos que tem atraído muita atenção nos últimos anos, devido ao epidemia explosiva de 2014 a 2016. Desde a sua introdução nas Américas no final de 2014, o ZIKV se espalhou a uma taxa e escala sem precedentes em todo o mundo e infectou milhões de pessoas. Sua infecção também tem sido associada a distúrbios neurológicos graves, como síndrome de Guillain-Barré e microcefalia em fetos. Apesar disso, atualmente não há antiviral aprovado contra o ZIKV. Neste estudo, uma triagem de alto rendimento baseada em imunofluorescência foi realizada em uma biblioteca de 483 derivados de flavonoides para identificar possíveis compostos anti-ZIKV. Os flavonoides, que são compostos polifenólicos naturais encontrados nas plantas, representam uma fonte atraente de antivirais devido à sua abundância em alimentos e à baixa toxicidade esperada. No rastreio primário, três resultados foram selecionados para validação por viabilidade celular e ensaios de redução da placa viral. A pinocembrina, uma flavanona encontrada no mel, chá e vinho tinto, foi escolhida para estudos a jusante, pois exibiu a maior inibição da infecção pelo ZIKV nas células JEG-3 da placenta humana (IC₅₀ = 17,4 µM). Estudos ao longo do tempo revelaram que a

pinocembrina atua no (s) processo (s) pós-entrada do ciclo de replicação do ZIKV. Além disso, a pinocembrina inibe a produção de RNA viral e a síntese de proteínas do envelope com base em análises quantitativas de transcrição reversa-PCR (qRT-PCR) e Western blot. Este estudo demonstrou pela primeira vez a atividade anti-ZIKV in vitro da pinocembrina.

[013] Observou-se que, os artigos apresentaram diversos compostos e potenciais antivirais contra o Zika vírus, no entanto não descrevem a utilização de compostos similares aos descritos na presente invenção, tampouco resultados que possam ser considerados similares por não apresentar mesma vida terapêutica.

[014] Em pesquisa realizada em bancos de dados especializados foram encontrados documentos que revelam métodos de tratamentos da infecção proveniente do vírus Zika, tal como, no documento de nº. WO 2017/136271 que trata de método para tratar a infecção pelo vírus Zika com uma composição contendo quercetina ou isoquercetina, juntamente com uma ou mais de vitamina B3, vitamina C e um composto de folato é descrito. Também são descritos métodos de prevenção da microcefalia e tratamento e prevenção de infecções de outros vírus *Flaviviridae*.

[015] O documento de nº. WO 2017/142807 diz respeito ao tratamento ou prevenção de infecções pelo vírus Zika por administração de uma ribonuclease.

[016] O documento de nº. WO 2017/190193 apresenta métodos de prevenção da transmissão do vírus Zika, e de prevenção de doenças, distúrbios e sintomas associados a infecções pelo vírus Zika, em especial para prevenir a transmissão durante a relação sexual. Os métodos compreendem a administração tópica de uma macromolécula composta por um dendrímero de 1 a 8 gerações com um ou mais porções contendo ácido sulfônico ou sulfonato ligados a um ou mais grupos superficiais do dendrímero. Também são fornecidos aqui usos, composições, dispositivos e sistemas relacionados.

[017] O documento de nº. WO 2017/214080 revela métodos para tratar ou reduzir o risco de desenvolver infecção pelo vírus Zika em um sujeito, compreendendo a administração de uma quantidade efetiva de lanatoside C, ribavirin e/ou ivermectina ao sujeito.

[018] Nos documentos supracitados foram encontradas moléculas e descrições de

tratamentos para infecções causadas pelo vírus Zika, mas nenhuma descreveu um bioconjugado com a mesma sequência de aminoácidos e derivatização com ácido gálico. Dessarte, apesar dos documentos supracitados, apesar de pertencerem ao mesmo campo de aplicação diferenciam-se do presente invento em questão, especialmente, por não apresentarem referências a sequência de peptídeos sintetizada, garantindo, assim, que o mesmo atenda, plenamente, aos requisitos legais de patenteabilidade.

PESQUISA

[019] O composto foi sintetizado por meio da técnica de síntese de peptídeos em fase sólida, purificado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando coluna em fase reversa e caracterizado por espectrometria de massas em modo *eletraspray* positivo no laboratório de Síntese e Estudos de Biomoléculas do Instituto de Química de Araraquara - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - IQ- UNESP - São Paulo - Brasil.

[020] O material final foi obtido com pureza acima de 95%, 65% de rendimento, com massa molecular de 1808,25 g/mol, carga líquida positiva de +4, solúvel em água.

[021] A caracterização por espectrometria de massas mostrou uma relação massa/carga de 905,01 g/mol ($z=+2$); 603,68 g/mol ($z=+3$) e 452,98 g/mol ($z=+4$), coerente com a massa molecular do composto sintetizado.

[022] Os ensaios de Viabilidade celular utilizando células de rim de macaco (linhagem VERO) por meio da técnica de colorimetria utilizando os reagentes MTT e WST-1, além dos ensaios de inibição viral como entrada, replicação e virucida utilizando as técnicas de microneutralização, ensaio de polimerização em cadeia (PCR) e imunofluorescência foram realizados nos laboratórios de virologia vinculados ao Instituto de Biociências e Ciências Exatas da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho - IBILCE-UNESP - São Paulo - Brasil e Centre for '*Virus Research - University of Glasgow*' - Scotland - UK.

[023] Os resultados mostraram que a molécula foi capaz de inibir os processos de entrada e replicação de duas linhagens do vírus Zika linhagem PE243, asiática, isolada no estado de Recife-Brasil no ano de 2015, causadora dos surtos de microcefalia no Brasil e recentes surtos nas américas e linhagem MP1751, africana, isolada em Uganda, África em 1962).

[024] Com uma concentração $\leq 40 \mu\text{M}$, o composto apresentou viabilidade celular acima de 95% com inibição de replicação citoplasmática de 40% para a linhagem PE243 (72 horas pós-infecção) e MP1751 (48 horas pós-infecção).

[025] Nos ensaios virucidas o composto inibiu 75% e 99% nas linhagens PE243 e MP1751, respectivamente, em concentrações de 40 e 20 μM , após 72 h de infecção, evidenciando seu alto potencial de inibição. Além disso, os ensaios protetivos mostraram bloqueio da entrada da linhagem MP1751 em células VERO de 95% na concentração de 40 μM . Os ensaios protetivos para a linhagem brasileira estão sendo realizados.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[026] É objetivo da presente patente apresentar um composto com propriedades antivirais contra vírus Zika com atividade de inibição de duas linhagens de Zika vírus (PE243) e (MP1751) em seus processos de entrada e replicação citoplasmática, além de atividade virucida.

[027] É outro objetivo desta presente patente apresentar um composto com propriedades antivirais contra vírus Zika para aplicações em medicamento de uso oral, medicamento de uso intravenoso, utilização em géis, pomadas e preservativos devido sua atividade virucida, entre outras.

[028] É, ainda, objetivo desta presente patente apresentar um composto com propriedades antivirais contra vírus Zika que pode ajudar na profilaxia e tratamento de uma doença de ordem pública (febre Zika), cujo número de casos aumenta progressivamente e movimenta grandes investimentos anualmente.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[029] A complementar a presente descrição de modo a obter uma melhor compreensão das características do presente invento, acompanha a descrição, em anexo, um conjunto imagens ilustrativas, onde, de maneira exemplificada, embora não limitativa, se representou:

[030] a figura 1 mostra um gráfico do espectro de massas evidenciando a obtenção do material sintetizado onde a massa molecular: 1808.25 g/mol.;

[031] a figura 2 ilustra um gráfico da viabilidade celular em células de rim de macaco

(VERO).;

[032] as figuras 3 e 3A representam gráficos da porcentagem de replicação após ensaio de inibição de replicação citoplasmática após (a) 72 h para as linhagens PE243 (brasileira) e MP1751 (africana) e (b) após 48 h para a linhagem MP1751;

[033] a figura 4 ilustra um gráfico da porcentagem de replicação após ensaio virucida para as linhagens PE243 (brasileira) e MP1751 (africana); e

[034] a figura 5 mostra um gráfico da porcentagem de replicação após ensaio protetivo para a linhagem MP1751 (africana).

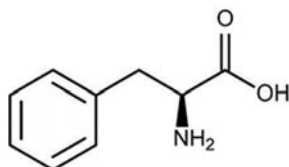
DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[035] A presente patente de invenção se refere à “COMPOSTO COM PROPRIEDADES ANTIVIRAIS CONTRA VÍRUS ZIKA”.

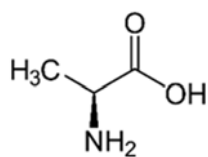
[036] Segundo a presente invenção, a molécula de origem sintética é composta pelo peptídeo de sequência FALALKALKKKALKKL-COOH conjugado com o composto natural ácido gálico (*Gallic Acid* - FALALKALKKKALKKL-COOH).

[037] A estrutura molecular dos componentes pode ser assim definida:

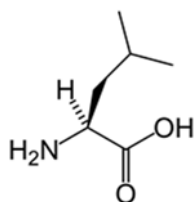
F – Fenilalanina



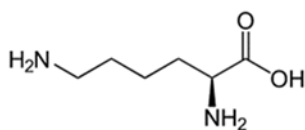
A – Alanina



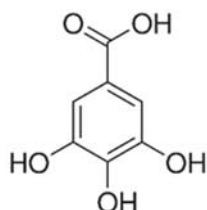
L- Leucina



K- Lisina



GA- Gallic Acid



[038] Preferencialmente, a sintetização pode ser por meio da técnica de síntese de peptídeos em fase sólida, purificado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando coluna em fase reversa e caracterizado por espectrometria de massas em modo 'eletrospray'.

[039] O composto obtido resulta numa molécula capaz de inibir os processos de entrada e replicação de duas linhagens do vírus Zika, especificamente, atividade de inibição de duas linhagens de Zika vírus (PE243) e (MP1751) em seus processos de entrada e replicação citoplasmática, além de atividade virucida.

[040] É certo que quando o presente invento for colocado em prática, poderão ser introduzidas modificações, sem que isso implique afastar-se dos princípios fundamentais que estão claramente substanciados no quadro reivindicatório, ficando assim entendido que a terminologia empregada não teve a finalidade de limitação.

REIVINDICAÇÕES

- 1) **“COMPOSTO COM PROPRIEDADES ANTIVIRAIS CONTRA VÍRUS ZIKA”**, caracterizado por compreender molécula de origem sintética composta pelo peptídeo de sequência FALALKALKKKL-COOH conjugado com o composto natural ácido gálico.
- 2) **“COMPOSTO COM PROPRIEDADES ANTIVIRAIS CONTRA VÍRUS ZIKA”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da estrutura molecular do peptídeo sintético apresentar fenilalanina, alanina, leucina, lisina e ácido gálico.
- 3) **“PROCESSO DE OBTENÇÃO DE COMPOSTO COM PROPRIEDADES ANTIVIRAIS CONTRA VÍRUS ZIKA”**, conforme definido nas reivindicações 1 e 2, caracterizado por compreender técnica de síntese de peptídeos em fase sólida, purificação por meio de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando coluna em fase reversa e caracterização por espectrometria de massas em modo ‘*eletrospray*’.
- 4) **“USO DO COMPOSTO COM PROPRIEDADES ANTIVIRAIS CONTRA VÍRUS ZIKA”**, conforme definido nas reivindicações 1 e 2, caracterizado por ser na inibição do vírus Zika.
- 5) **“USO DO COMPOSTO COM PROPRIEDADES ANTIVIRAIS CONTRA VÍRUS ZIKA”**, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por ser na inibição dos processos de entrada e replicação citoplasmática de duas linhagens do vírus Zika, quais sejam PE243 e MP1751.

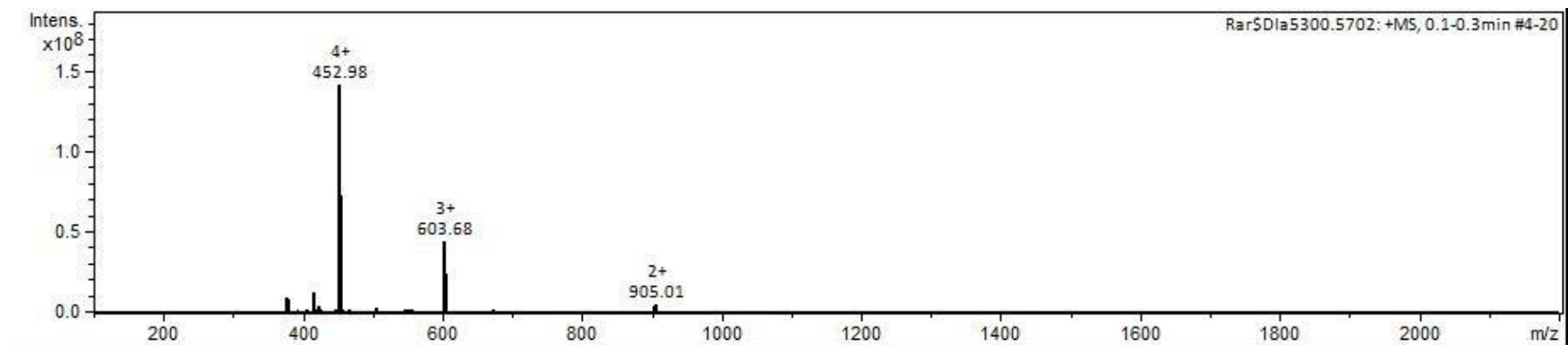


FIG.1

1/3

FIG.2

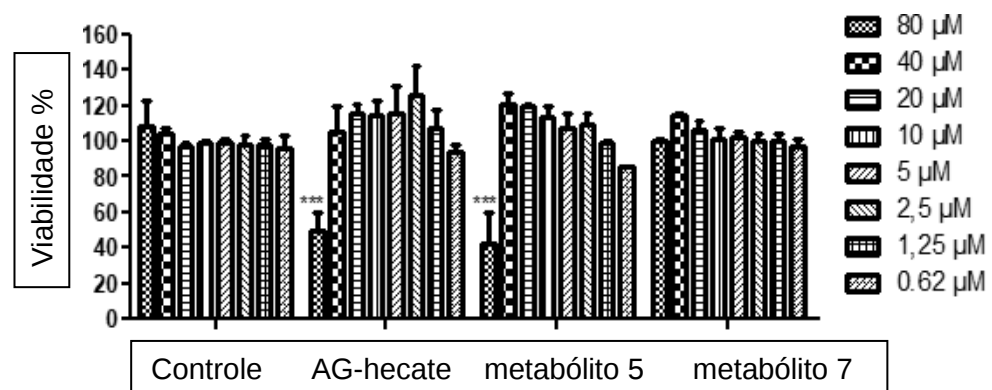


FIG.3

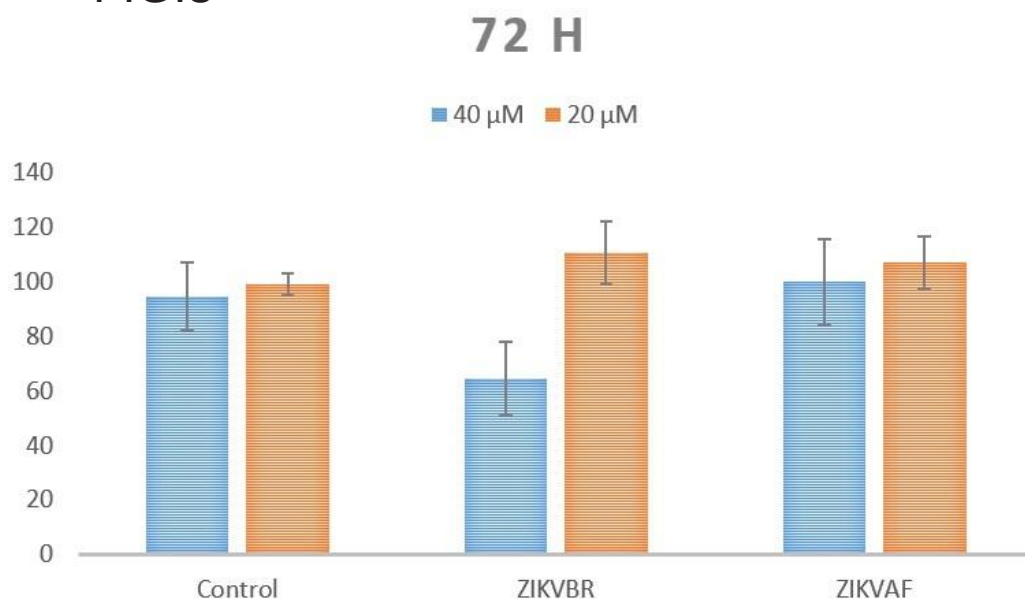


FIG.3A

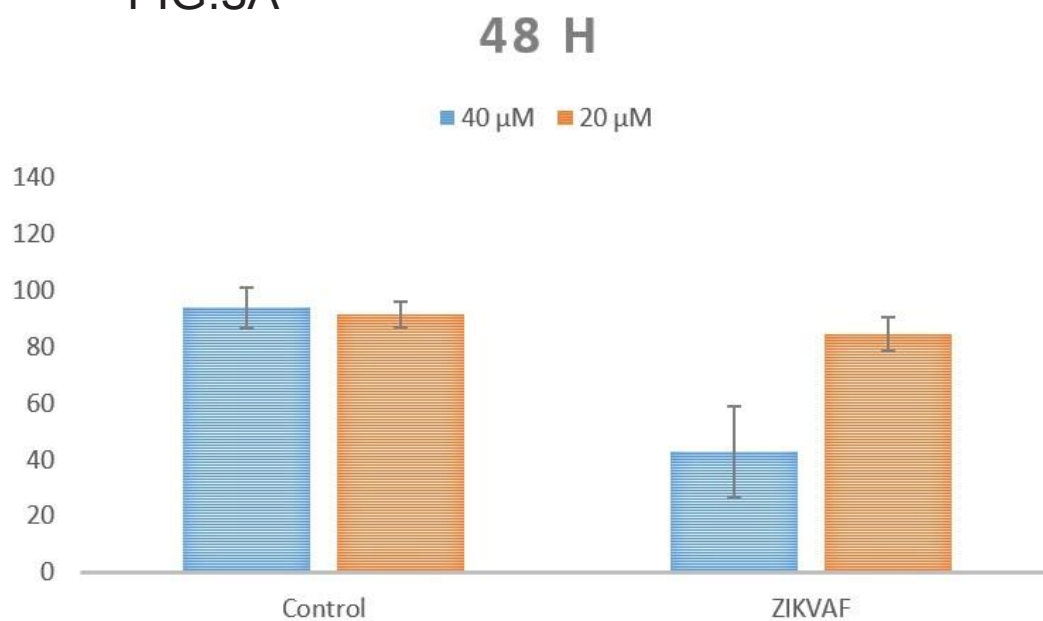


FIG.4

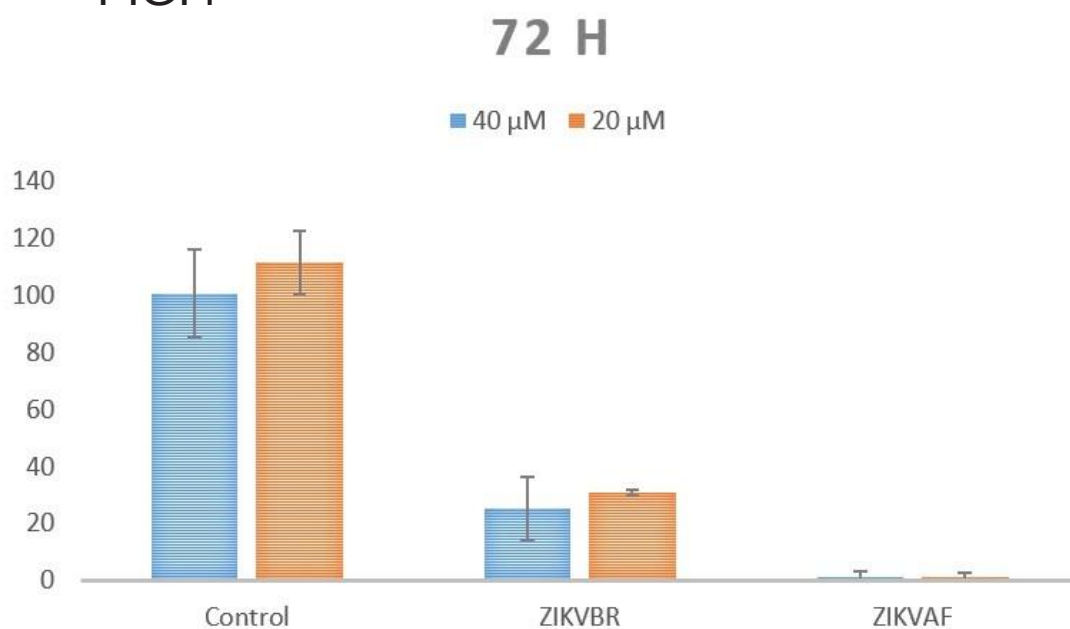
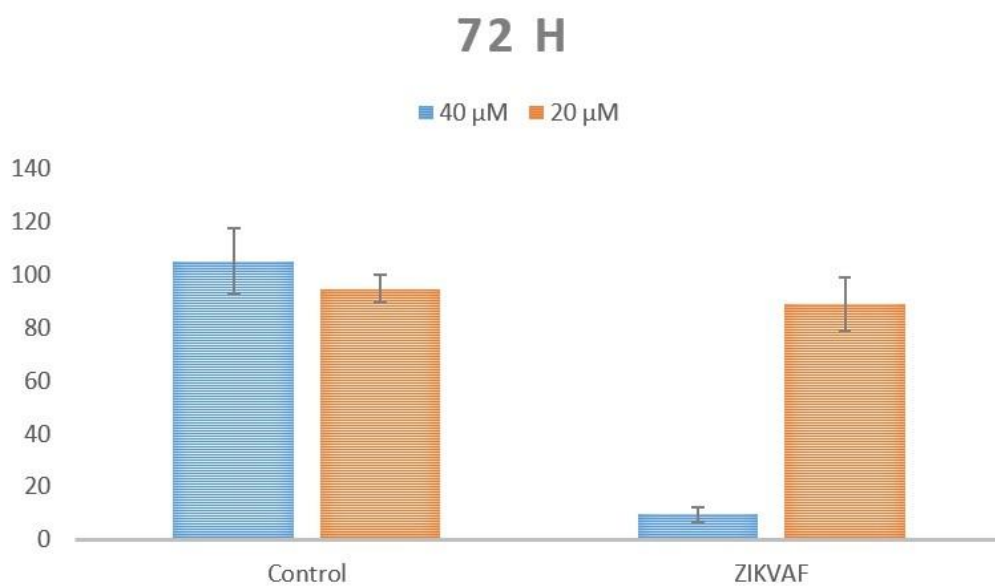


FIG.5



RESUMO

“COMPOSTO COM PROPRIEDADES ANTIVIRAIS CONTRA VÍRUS ZIKA”.

A presente patente de invenção trata de composto com propriedades antivirais contra vírus Zika onde, notadamente, a molécula de origem sintética é composta pelo peptídeo de sequência FALALKALKKALKKL-COOH conjugado com o composto natural ácido gálico (Gallic Acid - FALALKALKKALKKL-COOH). O composto apresenta atividade de inibição de duas linhagens de Zika vírus (PE243) e (MP1751) em seus processos de entrada e replicação citoplasmática, além de atividade virucida.