



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

(21) BR 102020020310-0 A2



(22) Data do Depósito: 02/10/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 10/05/2022

(54) Título: PEPTÍDEOS SINTÉTICOS, ANÁLOGOS AOS DO FEIJÃO CAUPÍ, COM A ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA HMG-COA REDUTASE

(51) Int. Cl.: C07K 5/093; C07K 7/06; A61K 38/06; A61K 38/08; A61K 36/48; (...).

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO; UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA.

(72) Inventor(es): JAFF RIBEIRO DA SILVA; EDUARDO MAFFUD CILLI; MARIANA BARROS DE CERQUEIRA E SILVA; BIANE OLIVEIRA PHILADELPHO; EDERLAN DE SOUZA FERREIRA; MARCELO SANTOS CASTILHO; VICTÓRIA CRUZ DE SOUZA.

(57) Resumo: PEPTÍDEOS SINTÉTICOS, ANÁLOGOS AOS DO FEIJÃO CAUPÍ, COM A ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA HMG-COA REDUTASE. A presente patente de invenção trata de peptídeos sintéticos, análogos aos do feijão caupí, com a atividade de inibição da enzima HMG-CoA redutase. A enzima HMGCoA redutase é responsável pela síntese do colesterol endógeno, que por sua vez está intimamente relacionado com a incidência de doenças cardiovasculares. Moléculas capazes de regular a síntese endógena do colesterol possibilitam a criação de novos fármacos para redução da incidência e da mortalidade causadas por doenças cardiovasculares.

“PEPTÍDEOS SINTÉTICOS, ANÁLOGOS AOS DO FEIJÃO CAUPÍ, COM A ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA HMG-COA REDUTASE”.

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

[001] A presente patente de invenção trata de peptídeos sintéticos, análogos aos do feijão caupí, com a atividade de inibição da enzima HMG-CoA redutase. A enzima HMG-CoA redutase é responsável pela síntese do colesterol endógeno, que por sua vez está intimamente relacionado com a incidência de doenças cardiovasculares. Moléculas capazes de regular a síntese endógena do colesterol possibilitam a criação de novos fármacos para redução da incidência e da mortalidade causadas por doenças cardiovasculares.

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

[002] Segundo a Organização Mundial da Saúde as doenças crônicas não-transmissíveis foram responsáveis por 41 das 57 milhões de mortes no mundo em 2016. A maioria destas mortes foram causadas por doenças cardiovasculares - DCV - 44 %, seguido dos cânceres 22 %, doenças respiratórias crônicas 9 % e diabetes 4 % ‘WHO 2018’. No Brasil, este cenário não é diferente, entre período de 2004 a 2014, o percentual de mortes relacionadas às DCVs foi de 28,73 %, neoplasias 15,62 %, doenças respiratórias 10,5 % e diabetes 4,61 % ‘SBC 2019’. Hoje, há um consenso na literatura de que a dislipidemia, especialmente a hipercolesterolemia, deve ser considerada a principal causadora da aterosclerose e, conseqüentemente, das DCVs - ‘Baik et al. 2013’.

[003] Atualmente, as diretrizes para tratamento farmacológico de hipercolesterolemias indicam o uso das estatinas. Contudo, muitos efeitos adversos têm sido relacionados ao seu uso, tais como: dor abdominal, diarreia, cefaléia, náuseas, dispepsia, mialgia, fadiga, hepatotoxicidade, rabdomiólise, dentre outros. Dentre esses, os mais graves são a hepatotoxicidade e a *rabdomiólise* ‘Faludi et al. 2017; Campo e Carvalho 2007’.

[004] Considerando que as estatinas agem nos hepatócitos, a toxicidade hepática deve ser bem avaliada em pacientes tratados com estes fármacos. Assim como deve-se ter maior atenção em pacientes com histórico de doenças hepáticas ou que fazem uso concomitante de outras substâncias tóxicas ao fígado ‘Faludi et al. 2017; Thompson et

al. 2016'.

[005] No caso das miopatias, estas são responsáveis por reduzir significativamente a aderência dos pacientes ao tratamento. Além disso, podem evoluir para um quadro de rabdomiólise que é caracterizado por uma necrose muscular que libera para circulação sanguínea a mioglobina das células musculares. Dentre os sintomas da rabdomiólise apresentam-se mialgia, fraqueza muscular e urina escura. Soma-se a isso, o fato de que a mioglobina presente no sangue passa a lesar os rins, culminando num quadro mais grave de insuficiência renal aguda '*Moniz et al. 2017; Thompson et al. 2016; Gulum e Hume 2015*'.

[006] Como uma alternativa terapêutica, os peptídeos têm ganhado destaque na pesquisa e desenvolvimento farmacêutico. Estas moléculas são reconhecidas por serem altamente seletivas e eficazes, além disso são relativamente seguras e bem toleradas pelo organismo '*Fosgerau e Hoffmann 2015; Otvos e Wade 2014*'. Neste contexto, as proteínas das leguminosas destacam-se quanto ao seu papel no metabolismo e na prevenção de desordens lipídicas. Os estudos indicam que os peptídeos derivados destas proteínas podem modular o metabolismo lipídico '*Ferreira et al. 2015*'.

ANÁLISE DO ESTADO DA TÉCNICA

[007] Em pesquisa realizada em bancos de dados especializados foram encontrados documentos referentes à novos peptídeos para controlar hipercolesterolemias por diversos mecanismos de ação, tais como:

- i) inibição da atividade da HMG-CoA redutase encontrado nos documentos de nº. KR100900044B1, CN103739666A, CN103739665A;
- ii) reduzindo a expressão da HMG-CoA redutase encontrado no documento de nº. WO2008034117A2;
- iii) modulação via sistema imunológico encontrado nos documentos de nº. WO2019136307A1, WO2019094581A1, WO2019033040A1;
- iv) vacinas encontradas nos documentos de nº. WO2015128287A1, EP3409770A2, WO2018189705A1;
- v) modulação via sistema endócrino encontrado nos documentos de nº. WO2017210100A1, WO2011048614A2;

vi) estimulação do efluxo do colesterol encontrado nos documentos de nº. WO2016044177A1, WO2016019333A1, WO2014144708A1, WO2011139819A2, WO2008156873A2, WO2009129263A1; e

vii) inibindo a absorção do colesterol encontrado no documento de nº. JP2003238590A.

[008] No entanto, nenhum dos documentos citados acima descreve os peptídeos sintéticos obtidos e descritos na presente invenção, ficando evidente a novidade da presente invenção.

[009] O artigo *“Proteolytic hydrolysis of cowpea proteins is able to release peptides with hypocholesterolemic activity”*, publicado em abril de 2015, descreve parte do processo de obtenção dos peptídeos, descrevendo os peptídeos obtidos do feijão caupí.

[010] Ainda, o artigo *“In vitro and in silico studies of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme: A reductase inhibitory activity of the cowpea Gln-Asp-Phe peptide”*, publicado pelo Requerente em março de 2018, descreve a identificação de outros peptídeos com indicação de atividade de inibição da enzima HMG-CoA redutase. O grupo de peptídeos identificados foi utilizado como base para o processo de aprimoramento e obtenção sintética de novos peptídeos.

[011] Estes dois documentos, juntamente com os outros já mencionados e descritos no estado da técnica, antecipam os efeitos inibitórios da HMG-CoA redutase, uma vez que a simples sintetização de compostos já descritos pode ser considerada óbvia para um técnico no assunto.

[012] Assim, explica-se que os peptídeos pGluGF e GSTLN são compostos novos sintetizados a partir de peptídeos obtidos da hidrólise virtual ou enzimática de proteínas existentes no feijão caupí: QGF e GCTLN, sendo as modificações realizadas inéditas. Apesar de haver outras moléculas com efeitos inibitórios da HMG-CoA redutase descritas, os peptídeos sintetizados promovem avanços técnicos nos seguintes pontos:

- Estas são as primeiras moléculas desenvolvidas e descritas que mostraram capacidade de agir em conjunto com as estatinas aumentando a eficiência do processo de inibição da HMG-CoA redutase. Isto possibilita a redução da dose das estatinas e assim reduzir os efeitos tóxicos destas;

- O peptídeo GSTLN age em um sítio diferente do sítio de ação das estatinas e das outras moléculas publicadas com efeitos inibitórios da ação da HMG-CoA redutase. Este dado foi comprovado pelos estudos realizados *in silico* onde ao acoplar o peptídeo GSTLN no sítio de ação das estatinas, o peptídeo não interagiu com este sítio. Além disso, quando se avalia o efeito da combinação da pravastatina (16,7 η M) com o GSTLN (100 μ M), o incremento de atividade foi o maior obtido em todos os ensaios (65,24 %) (tabela 1). Ao comparar com as atividades individuais da pravastatina e do GSTLN os aumentos foram de, respectivamente, 19,11 e 38,10 % na inibição (tabela 1). O valor obtido de inibição da mistura é próximo do valor obtido se somarmos as atividades dos dois compostos individualmente, isto mostra que o peptídeo GSTLN exerce um efeito aditivo ou sinérgico na ação do fármaco pravastatina sem competir com a ação deste e indica novamente que os sítios de ligação destes compostos são diferentes.

[013] Tabela 1. Dados do ensaio de inibição *in vitro* da enzima HMG-CoA redutase.

Inibidor	Concentração	Inibição da HMGCoA Redutase (%)
QGF	100 μ M	38,50 $\pm$ 3,01
pGluGF	100 μ M	54,28 $\pm$ 3,22
GCTLN	100 μ M	17,93 $\pm$ 1,41
GSTLN	100 μ M	27,14 $\pm$ 3,39
pGluGF : GSTLN	pGluGF = 50 μ M GSTLN = 50 μ M	55,42 $\pm$ 3,40
Pravastatina	Pravastatina = 16,7 η M	46,13 $\pm$ 0,74
Pravastatina : pGluGF	Pravastatina = 16,7 η M pGluGF = 100 μ M	54,40 $\pm$ 7,87
Pravastatina : GSTLN	Pravastatina = 16,7 η M GSTLN = 100 μ M	65,24 $\pm$ 4,28

- Ao combinar o peptídeo pGluGF (100 μ M) com o fármaco pravastatina (16,7 η M), o aumento foi menor que a soma das atividades destes dois compostos (tabela 1). Os resultados estão de acordo com o que foi evidenciado pelos ensaios realizados *in silico* que mostraram que a pravastatina e o peptídeo pGluGF agem no mesmo sítio da enzima, e assim podem apresentar uma inibição competitiva. De toda forma, os resultados obtidos na tabela 1 demonstram que o pGluGF pode funcionar como um adjuvante na ação das estatinas, propiciando a utilização de doses menores destas sem comprometer

a atividade inibitória e com menores efeitos adversos;

- Os peptídeos pGluGF e GSTLN demonstraram a capacidade de agirem combinados entre si (tabela 1), onde em uma concentração de 50 μ M de cada peptídeo inibiu a ação da HMG-CoA redutase em 55,42 %, maior que a inibição individual da pravastatina (16,7 η M) que foi de 46,13 %. Além disso, o peptídeo pGluGF quando analisado individualmente também apresentou capacidade de inibição maior que a pravastatina nas concentrações estudadas (tabela 1).

- A ciclização existente no peptídeo pGluGF aumenta a estabilidade desta molécula no sangue.

[014] Os dados acima mostram que as modificações realizadas no desenvolvimento das duas novas moléculas melhoram a atividade desses compostos, tornando-as melhores e mais adequadas para a formulação de fármacos, alimentos funcionais ou nutracêuticos.

DIFERENCIAL

[015] Trata-se de peptídeos com pequenas modificações estruturais quando comparados com seus precursores naturais. Mesmo tendo sua origem sintética, são formados essencialmente pela união de moléculas de ocorrência natural associadas de um modo específico. Sendo assim, tendem a possuir baixa toxicidade aos indivíduos tratados.

[016] Os medicamentos atuais utilizados para o tratamento de hipercolesterolemias são principalmente as estatinas que possuem uma toxicidade associada ao seu uso.

[017] Os peptídeos aqui descritos podem atuar simultaneamente com as estatinas, e assim diminuir a dose necessária destes compostos para obter uma resposta terapêutica eficiente. Sendo assim, será possível reduzir efeitos tóxicos e melhorar a qualidade de vida dos indivíduos tratados.

APLICAÇÕES

[018] A aplicação principal dos peptídeos inovados está no desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de dislipidemias, bem como fármacos adjuvantes em associações terapêuticas com medicamentos que já estão no mercado. Além disso, é plausível considerar a possibilidade da existência de efeitos pleiotrópicos destes

peptídeos, semelhantes aos que ocorrem com as estatinas.

[019] Os peptídeos inovados também podem ser formulados quimicamente ligados a outros compostos bioconjugados a fim de incrementar a atividade, além de contornar quaisquer dificuldades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e toxicológicas.

[020] Uma outra aplicabilidade é a associação dos peptídeos pGluGF e GSTLN nas formulações de nutracêuticos e suplementos, deste modo funcionariam como adjuvantes nos tratamentos de dislipidemias.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[021] Com referência aos desenhos ilustrados, a presente patente de invenção se refere à “PEPTÍDEOS SINTÉTICOS, ANÁLOGOS AOS DO FEIJÃO CAUPÍ, COM A ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA HMG-COA REDUTASE”.

[022] Segundo a presente invenção, para a obtenção inicialmente os peptídeos naturais QGF e GCTLN são sintetizados em fase sólida – SPFS - utilizando o protocolo com fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc). Neste método, o acoplamento dos aminoácidos na sequência desejada é feito em um suporte polimérico a partir da região carboxi terminal. Seguidamente, os peptídeos são retirados do suporte sólido através de procedimento de clivagem utilizando o ácido trifluoroacético. Posteriormente purificados e caracterizados por técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas e assim foram obtidos os peptídeos purificados conforme tabela 2.

[023] Tabela 2. Dados de síntese dos peptídeos

Peptídeo	Pureza (%)	Massa Molar (g/mol)
QGF	97	350,15
pGluGF	99	334,12
GCTLN	99	506,30
GSTLN	99	490,40

[024] Estes foram testados ‘*in vitro*’ quanto a capacidade de inibir a enzima HMG-CoA redutase. Neste ensaio o peptídeo natural QGF (100 µM) inibiu a atividade da enzima HMG-CoA redutase em 38,50 %, ao passo que o peptídeo GCTLN (100 µM) em 17,93 %

(Tabela 1). Após as atividades destes peptídeos naturais terem sido comprovadas experimentalmente, estudos de modelagem molecular '*in silico*' foram realizados a fim de propor alterações estruturais que incrementassem a atividade inibitória na enzima HMG-CoA redutase. Através destes estudos foi obtido o peptídeo inédito pGluGF pela substituição da glutamina (Q) na extremidade amino terminal do peptídeo natural QGF por um resíduo de ácido piroglutâmico (pGlu) (Figura 1).

[025] Já o peptídeo natural GCTLN sofreu uma substituição do resíduo da cisteína (C) por uma serina (S), obtendo-se assim o novo peptídeo GSTLN (Figura 2).

[026] Com os novos peptídeos desenhados estes também foram sintetizados, purificados e caracterizados (Tabela 1). Os novos peptídeos desenvolvidos foram testados na sua capacidade de inibir a enzima HMG-CoA redutase de três modos: individualmente, juntos e associados ao medicamento comercial pravastatina (Tabela 1).

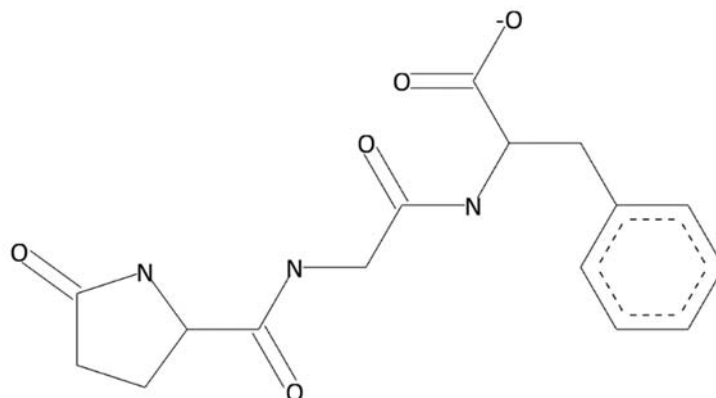
[027] No ensaio individual ambos os novos peptídeos foram testados na concentração de 100 µM, neste ensaio, o peptídeo pGluGF inibiu a atividade da enzima HMG-CoA redutase em 54,28 % e o peptídeo GSTLN em 27,14 %. No segundo teste foram utilizados uma mistura com 50 µM de cada peptídeo, totalizando 100 µM de inibidor, e foi obtido um percentual de inibição de 55,42 %. Nos estudos *in silico* realizados para determinar os novos peptídeos, os resultados do acoplamento molecular mostraram que o peptídeo GSTLN não interagia no mesmo sítio catalítico do pGluGF. Associando os resultados dos estudos *in silico* com o incremento na atividade inibitória da mistura pGluGF: GSTLN do ensaio *in vitro*, é possível concluir que os peptídeos pGluGF e GSTLN não competem pelo mesmo sítio ativo na enzima HMG-CoA redutase, podendo assim agir de um modo sinérgico (Tabela 1). Ressalta-se que, nos ensaios *in silico*, o peptídeo pGluGF interagiu na enzima no mesmo sítio ativo das estatinas.

[028] Sendo assim, associou-se os peptídeos pGluGF e GSTLN com o fármaco comercial pravastatina. A pravastatina testada numa dosagem de 16,7 ηM obtém-se um percentual médio de inibição de 46,13 %. Quando associado os 16,7 ηM de pravastatina com 100 µM do peptídeo GSTLN obtém-se um percentual de inibição de 65,24 %. Ao passo que, quando a pravastatina (16,7 ηM) associada com 100 µM do peptídeo pGluGF

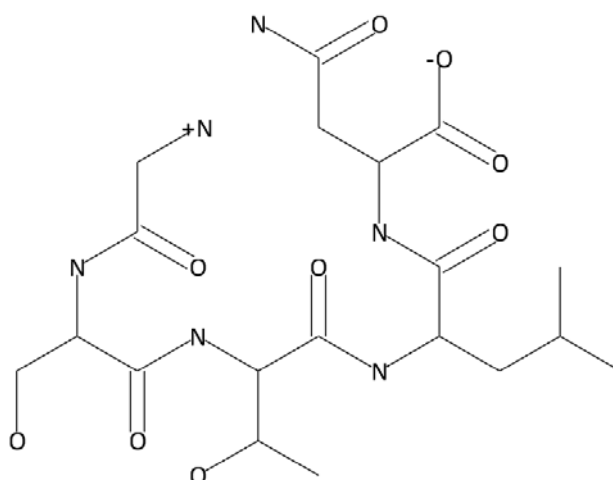
o percentual de inibição é de 54,40 %. Em ambos os casos, houve um incremento da atividade inibitória (Tabela 1). Estes dados mostram a possibilidade dos peptídeos pGluGF e GSTLN atuarem tanto em mistura entre si, quanto junto às estatinas melhorando a atividade inibitória.

[029] Os peptídeos sintéticos obtidos apresentam sequências pGluGF (pGlu=Ácido Piroglutâmico / G=Glicina / F= Fenilalanina) e GSTLN (G=Glicina / S=Serina / T=Treonina / L=Leucina / N=Asparagina), ambos são derivados dos peptídeos naturais do feijão caupí (*Vigna unguiculata*) QGF e GCTLN.

[030] O peptídeo sintético com a sequência pGluGF (pGlu=Ácido Piroglutâmico / G=Glicina / F= Fenilalanina) apresenta a estrutura molecular pGluGF em pH 7,4:



[031] O peptídeo sintético com a sequência GSTLN (G=Glicina / S=Serina / T=Treonina / L=Leucina / N=Asparagina) apresenta a estrutura molecular:



[032] É certo que quando o presente invento for colocado em prática, poderão ser introduzidas modificações, sem que isso implique afastar-se dos princípios

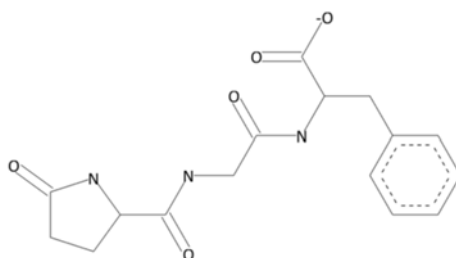
fundamentais que estão claramente substanciados no quadro reivindicatório, ficando assim entendido que a terminologia empregada não teve a finalidade de limitação.

Referências

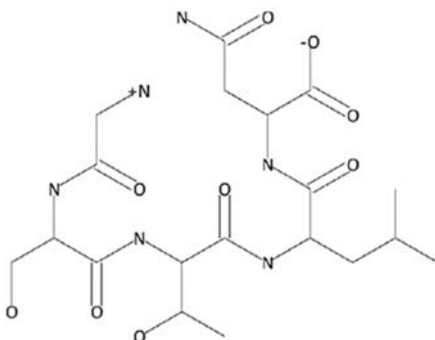
- BAIK, I.; CHO, N. H.; KIM, S. H.; SHIN, C. Dietary information improves cardiovascular disease risk prediction models. **Eur J Clin Nut.** v. 67, p. 25-30, 2013.
- CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Quim Nova.** v. 30, n. 2, p. 425-430, 2007.
- FALUDI, A. A.; IZAR, M. C. O.; SARAIVA, J. F. K.; CHACRA, A. P. M.; BIANCO, H. T.; AFIUNE NETO, A.; et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. **Arq Bras Cardiol.** 2017.
- FERREIRA, E. S.; AMARAL, A. L. S.; DEMONTE, A.; ZANELLI, C. F.; DURANTI, M.; NEVES, V. A. Hypocholesterolaemic effect of rat-administered oral doses of the isolated 7S globulins from cowpeas and adzuki beans. **J Nut Sci.** v. 4, p. 1-9, 2015.
- FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Disc Tod.** v. 30, n. 1, p. 122-128, 2015.
- GULUM, A. H.; HUME, A. L. Statins: An update on clinical issues and selected adverse effects. **J Nurs Pract.** v. 11, n. 3, p.287-294, 2015.
- MONIZ, M. S.; MASCARENHAS, M. I.; ESCOBAR, C.; NUNES, P.; ABADESSO, C.; LOUREIRO, H.; ALMEIDA, H. Rabdomiólise como manifestação de uma doença metabólica: relato de caso. **Rev Bras Ter Intens.** v. 29, n. 1, p. 111-114, 2017.
- OTVOS, L.; WADE, J. D. Current challenges in peptide-based drug discovery. **Front Chem.** v. 2, p. 1-4, 2014.
- SBC - SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **Cardiômetro: Mortes por doenças cardiovasculares no Brasil.** Rio de Janeiro. 2019.
- THOMPSON, P. D.; PANZA, G.; ZALESKI, A.; TAYLOR, B. Statin-associated side effects. **J Am Col Cardiol.** v. 67, n. 20, p. 2395-2410, 2016.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals.** Geneva: World Helth Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2018.

REIVINDICAÇÕES

- 1) **“PEPTÍDEOS SINTÉTICOS, ANÁLOGOS AOS DO FEIJÃO CAUPÍ, COM A ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA HMG-COA REDUTASE”, caracterizado** por peptídeos sintéticos apresentarem sequências pGluGF (pGlu=Ácido Piroglutâmico/G=Glicina/F=Fenilalanina) e GSTLN (G=Glicina / S=Serina / T=Treonina / L=Leucina / N=Asparagina).
- 2) **“PEPTÍDEOS SINTÉTICOS, ANÁLOGOS AOS DO FEIJÃO CAUPÍ, COM A ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA HMG-COA REDUTASE”,** de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ambos peptídeos sintéticos serem derivados dos peptídeos naturais do feijão caupí (*Vigna unguiculata*) QGF e GCTLN.
- 3) **“PEPTÍDEOS SINTÉTICOS, ANÁLOGOS AOS DO FEIJÃO CAUPÍ, COM A ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA HMG-COA REDUTASE”,** de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por estrutura molecular pGluGF em pH 7,4 do peptídeo sintético com a sequência pGluGF (pGlu=Ácido Piroglutâmico / G=Glicina / F=Fenilalanina) apresentar:



- 4) **“PEPTÍDEOS SINTÉTICOS, ANÁLOGOS AOS DO FEIJÃO CAUPÍ, COM A ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA HMG-COA REDUTASE”,** de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por estrutura molecular do peptídeo sintético com a sequência GSTLN (G=Glicina / S=Serina / T=Treonina / L=Leucina / N=Asparagina) compreender:



- 5) **“USO”, caracterizado** por peptídeos sintéticos das reivindicações anteriores serem

componentes de medicamentos para o tratamento de dislipidemias.

6) **“USO”**, caracterizado por peptídeos sintéticos das reivindicações de 1 a 4 serem associados a peptídeos pGluGF e GSTLN nas formulações de nutracêuticos, alimentos funcionais e suplementos como adjuvantes nos tratamentos de dislipidemias.

RESUMO

“PEPTÍDEOS SINTÉTICOS, ANÁLOGOS AOS DO FEIJÃO CAUPÍ, COM A ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA HMG-COA REDUTASE”.

A presente patente de invenção trata de peptídeos sintéticos, análogos aos do feijão caupí, com a atividade de inibição da enzima HMG-CoA redutase. A enzima HMG-CoA redutase é responsável pela síntese do colesterol endógeno, que por sua vez está intimamente relacionado com a incidência de doenças cardiovasculares. Moléculas capazes de regular a síntese endógena do colesterol possibilitam a criação de novos fármacos para redução da incidência e da mortalidade causadas por doenças cardiovasculares.