



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

(21) BR 102020003657-2 A2



(22) Data do Depósito: 20/02/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 08/03/2022

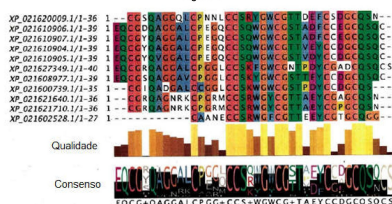
(54) Título: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS, COMPOSIÇÃO E USO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS

(51) Int. Cl.: C07K 7/08; A61K 38/10; A61P 31/04.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) Inventor(es): ANA MARIA BENKO-ISEPPON; CARLOS ANDRÉ DOS SANTOS SILVA; LÍVIA MARIA BATISTA VILELA; SERGIO CROVELLA.

(57) Resumo: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS, COMPOSIÇÃO E USO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS. O PHev-Me1 é uma sequência de aminoácidos sintética, modificada a partir de uma heveína de *Manihot esculenta*. Composição de vinte aminoácidos, PHev-Me1 possui atividade contra bactérias (ATCC e resistente) como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, além de leveduras do gênero *Candida*. Sua toxicidade foi testada contra células eritrocitárias humanas e macrófagos de ratos, onde PHev-Me1 apresentou potencial terapêutico, em sua dose ativa de 512 µg/mL. A presente invenção se situa nos campos da Biotecnologia, Farmácia e Medicina.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS, COMPOSIÇÃO E USO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS

Campo da Invenção

[0001]A presente invenção apresenta uma nova sequência de aminoácidos sintética modificada obtida a partir de uma heveína de *Manihot esculenta* com atividade antibacteriana e antifúngica. A presente invenção se situa nos campos da Biotecnologia, Farmácia e Medicina.

Antecedentes da Invenção

[0002]Desde que o primeiro antibiótico foi descoberto por Alexander Fleming em 1949, o uso inadequado de antibióticos se tornou um fator fundamental para desencadear uma enorme resistência bacteriana e isto tem se tornado um problema de saúde pública mundial reconhecida por organizações mundiais.

[0003]Uma ferramenta inovadora surge como aliada na luta contra infecções graves causadas por bactérias resistentes a inúmeras drogas já consolidadas no mercado, como é o caso dos peptídeos antimicrobianos (AMPs). Tais compostos são considerados menos suscetíveis aos processos de resistência bacteriana do que os antibióticos tradicionais, apresentando potencial para o desenvolvimento de uma nova classe de agentes terapêuticos (CÂNDIDO et al., 2014).

[0004]Atualmente poucos medicamentos em fase de teste possuem atividade contra os principais patógenos listados pela Organização Mundial da Saúde, e PHev-Me1 apresentou um enorme potencial contra essas bactérias resistentes.

[0005]A *Hygeia biotech* é um Complexo Industrial da Saúde, que vem buscando implementar uma plataforma de produção de peptídeos bioativos para uso farmacêutico. Como um dos produtos de mercado, a Octreotida é um peptídeo sintético utilizado para o tratamento da acromegalia e outros cânceres responsivos a somatostatina e hormônio do crescimento.

[0006]Já a Leuprorrelina é um nonapeptídeo sintético análogo do fator de liberador do hormônio luteinizante (LHRH) ou GnRH (hormônio liberador de gonadotropina). Possui maior potência que o hormônio natural, atua como um inibidor de produção de gonadotropina e é quimicamente distinto dos esteroides. O medicamento com este ativo é indicado para: neoplasia de próstata, fibroma uterino, endometriose, puberdade precoce (PP), dentre outras aplicações.

[0007] A Goserelina é um peptídeo sintético, análogo do fator de liberação do hormônio luteinizante (LHRH) ou GnRH (hormônio liberador de gonadotropina). O acetato de goserelina é utilizado para suprimir a produção de hormônios sexuais (testosterona e estrógeno), particularmente no câncer de mama, de próstata e na endometriose. Este peptídeo estimula a produção destes hormônios sexuais de uma maneira não pulsátil (não fisiológica). Isto causa a interrupção dos mecanismos de feedback hormonal endógenos, resultando na diminuição da produção de testosterona e estrogênio.

[0008] O Glatiramer é um peptídeo randômico composto de 4 aminoácidos (L-Ala, L-Lys, L-Tyr e L-Glu) que são encontrados na mielina. Existem diversas propostas para o mecanismo de ação. A administração da Glatiramer muda a população de células T, das pró-inflamatórias Th1 às regulatórias Th2. Devido semelhança com a mielina, ela contrapõe a resposta autoimune contra a bainha de mielina, sendo eficiente no tratamento de esclerose múltipla.

[0009] Além disso, muitas pesquisas vêm sendo feitas com peptídeo sintético. Em 2014, a revista *Nature* publicou um artigo de um novo peptídeo sintético que possuía um aminoácido (cisteína) modificado para possuir duas pontes no peptídeo deixando-o mais estáveis. Isso proporcionou uma maior atividade dos dois peptídeos modificados.

[0010] Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

[0011] CN107022549 (A) – Pelteobagrus fulvidraco beta defensin gene, and beta defensin antibacterial peptide and application thereof. O documento se difere do presente invento por se tratar de peptídeo antimicrobiano diferente, com afinidades diferentes à superfície das membranas dos patógenos.

[0012] JP2017132755 (A) – Defensin production promoter, and antibacterial agent. O documento se difere do presente invento por se tratar de peptídeo antimicrobiano diferente, com afinidades diferentes à superfície das membranas dos patógenos.

[0013] KR20170023352 (A) – An antibacterial peptide isolated from *Hermetia illucens*. O documento se difere do presente invento por se tratar de peptídeo antimicrobiano diferente, com características tridimensionais diferentes das heveínas.

[0014] US2017049102 (A) – Agents and methods for treatment of pathogens. Os

peptídeos do documento não apresentam a mesma afinidade à superfície das membranas dos patógenos como o presente invento e, são peptídeos de fase inicial de ataque que podem ser facilmente degradados por proteases.

[0015]US2017029842 (A) – Modified plant defensins useful as anti-pathogenic agents. O documento se difere do presente invento por se tratar de peptídeo antimicrobiano diferente, com afinidades diferentes à superfície das membranas dos patógenos.

[0016]Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

[0017]Dessa forma, a presente invenção resolve os problemas do estado da técnica a partir de uma nova sequência de aminoácidos sintética antimicrobiana, denominada de PHev-Me1 (SEQ ID NO 2), desenvolvida a partir de heveína de *Manihot esculenta*, com ação em bactérias gram-positivas e negativas, além de apresentar ação antifúngica.

[0018]Os peptídeos derivados da classe heveína tem uma maior afinidade com a parede de quitina presentes nos fungos em comparação com qualquer outra classe de peptídeo. Essa característica única faz com que esse tipo de peptídeo antimicrobiano tenha uma preferência por fungos e bactérias que também apresentam quitina em sua composição membranar.

[0019]Os peptídeos do tipo heveína são descritos na literatura como promissores para aplicações biotecnológicas, inclusive no agronegócio como pesticidas naturais (fornecendo resistência aos principais patógenos) e na terapia humana e animal no combate as infecções por patógenos resistentes a medicamentos tradicionais.

[0020]Atualmente, os inventores estão realizando ensaios piloto para a atividade pesticida do peptídeo modificado da presente invenção, e o mesmo está apresentando atividade contra diversos fitopatógenos, dessa forma, possuindo grande capacidade como pesticida.

[0021]Além disso, esta sequência de aminoácidos foi desenhada para preservar essa característica (de combate a infecções por bactérias e fungos, como mostram os resultados) e potencializar seus efeitos para bactérias que não

apresentam quitina como base de sua membrana, a partir da disposição de aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos, que dão uma maior atividade para a sequência da presente invenção e da adição de aminoácidos hidrofílicos e aniônicos para manter o nível de seletividade de membrana e melhorar o índice terapêutico.

[0022]A estrutura tridimensional deste peptídeo foi desenhada para manter algumas pontes de dissulfeto para dar uma maior resistência contra as proteases que destroem peptídeos menores.

[0023]A presente invenção apresenta como conceito inventivo os seguintes objetos:

[0024]Como primeiro objeto, tem-se sequência de aminoácidos, compreendendo uma sequência SEQ ID NO 1, em que:

X2 é Val, Ala, Arg ou Gln;

X5 é Pro, Ala ou Cys;

X6 é Gly, Glu, Ala ou Asn;

X7 é Tyr, Gly, Asn ou Arg;

X8 é Arg, Leu, Gln, Met ou Glu;

X12 é Gln, Arg ou Lys;

X13 é Trp, Tyr ou Phe; e

X20 é Lys, Ala, Pro, Tyr, Asp, Glu ou Thr.

[0025]Como um segundo objeto tem-se composição compreendendo a sequência de aminoácidos conforme definida no primeiro objeto.

[0026]Em um terceiro objeto tem-se o uso da sequência de aminoácidos compreendendo ser nas áreas farmacêutica, médica, cosmética, alimentícia ou agrícola.

[0027]Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e serão descritos detalhadamente a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0028]São apresentadas as seguintes figuras:

[0029]A Figura 1 apresenta o alinhamento das sequências caracterizadas mostrando o domínio conservado de ligação a quitina das onze sequências de heveínas de *Manihot esculenta*. Abaixo se pode observar o gráfico de barras amarelas da qualidade da conservação dos resíduos de aminoácidos e o gráfico em barras pretas da sequência consenso entre as onze sequências encontradas.

[0030] A Figura 2 apresenta uma modelagem tridimensional de PHev-Me1, em que as setas vermelhas representam fitas- β e as regiões em magenta são regiões sem estruturas definidas.

[0031] A Figura 3 apresenta o desvio da raiz quadrada média (RMSD) de PHev-Me1 após o MMQ ajustado contra a estrutura principal, mostrando a variação estrutural em um experimento computacional controlado. Os resultados mostram que, apesar da estrutura sair da conformação inicial de sua estrutura entre 30 e 70 ns, ela se manteve estável durante todo o processo, onde se pode pressupor que mesmo que a proteína mude sua estrutura para interagir com as moléculas, ela mantém preservada sua estrutura secundária.

[0032] A Figura 4 apresenta os resultados de toxicidade de PHev-Me1 contra células do tipo macrófagos de ratos (teste MTT), em que pôde-se observar que a dose só pode ser considerada tóxica para este tipo de célula quando está em uma concentração ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$.

[0033] A Figura 5 apresenta os resultados de toxicidade de PHev-Me1 contra células eritrocitárias humanas (teste de hemólise), em que a maior dose testada de 1024 $\mu\text{g/mL}$ causou hemólise suficiente para ser considerada tóxica.

Descrição Detalhada da Invenção

[0034] PHev-Me1 (SEQ ID NO 2) é uma sequência de aminoácidos curta e sintética com ação inibitória e bactericida contra as principais bactérias listadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Bactérias essas que apresentam resistência a diversos medicamentos tradicionais. Como não é comum as bactérias criarem resistência aos peptídeos antimicrobianos (devido ao seu diversificado mecanismos de ação), eles surgem como candidatos a solucionar o problema da resistência antimicrobiana.

[0035] A presente invenção apresenta como primeiro objeto sequência de aminoácidos compreendendo uma sequência SEQ ID NO 1, em que:

X2 é Val, Ala, Arg ou Gln;

X5 é Pro, Ala ou Cys;

X6 é Gly, Glu, Ala ou Asn;

X7 é Tyr, Gly, Asn ou Arg;

X8 é Arg, Leu, Gln, Met ou Glu;

X12 é Gln, Arg ou Lys;

X13 é Trp, Tyr ou Phe; e

X20 é Lys, Ala, Pro, Tyr, Asp, Glu ou Thr.

[0036]Em uma realização, a sequência de aminoácidos é derivada de heveína de *Manihot esculenta*.

[0037]Em uma realização, a sequência de aminoácidos compreende sequência de 20 aminoácidos, em que pelo menos 4 cisteínas estão presentes.

[0038]Em uma realização, a sequência de aminoácidos compreende atividade antimicrobiana e antifúngica.

[0039]Em uma realização, a sequência de aminoácidos compreende aminoácidos hidrofílicos e aniônicos.

[0040]Em uma realização, a sequência de aminoácidos compreende $\geq 70\%$ de identidade à SEQ ID NO 1.

[0041]Em uma realização, a sequência de aminoácidos compreende opcionalmente 80% de identidade à SEQ ID NO 1, mais preferencialmente 90% de identidade, mais preferencialmente 95% de identidade, com maior preferência 98% de identidade com a SEQ ID NO 1.

[0042]Em uma realização, a sequência de aminoácidos é opcionalmente o PHev-Me1 (SEQ ID NO 2).

[0043]Em um segundo objeto, tem-se composição compreendendo a sequência de aminoácidos, conforme definida no primeiro objeto.

[0044]Em uma realização, a concentração da sequência de aminoácidos em dita composição é menor do que 1024 $\mu\text{g/mL}$.

[0045]Em uma realização, a composição ainda compreende outros antimicrobianos.

[0046]Em uma realização, a concentração da sequência de aminoácidos é opcionalmente na faixa de 64 a 512 $\mu\text{g/mL}$ para atividade antimicrobiana.

[0047]Em uma realização, a concentração da sequência de aminoácidos é opcionalmente na faixa de 64 – 128 $\mu\text{g/mL}$ para atividade antifúngica.

[0048]Em uma realização, a concentração preferida da sequência de aminoácidos para atividade antimicrobiana é de 512 $\mu\text{g/mL}$.

[0049]Em uma realização, a concentração preferida da sequência de aminoácidos para atividade antifúngica é de 64 $\mu\text{g/mL}$.

[0050]Como um terceiro objeto, tem-se o uso da sequência de aminoácidos compreendendo aplicação nas áreas farmacêutica, médica, cosmética, alimentícia ou agrícola.

[0051]Em uma realização, a sequência de aminoácidos pode ser usada na preparação de um pesticida.

[0052]Em uma realização, compreende-se o uso da sequência de aminoácidos para preparar um medicamento para tratar infecções bacterianas e/ou fúngicas.

[0053]Em uma realização, o medicamento é usado para tratar infecções bacterianas de amplo espectro e resistentes.

[0054]Em uma realização, as infecções bacterianas são opcionalmente por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* resistente, *Acinetobacter baumannii* e/ou *Acinetobacter baumannii* resistente.

[0055]Em uma realização, o medicamento compreende ser pomada ou spray contra leveduras.

[0056]Em uma realização, as leveduras são opcionalmente *Candida* ou *Cryptococcus*, opcionalmente as leveduras são *Candida parapsilosis*, *Candida albicans* e/ou *Cryptococcus neoformans*.

[0057]Em uma realização, tem-se o uso da sequência de aminoácidos em produtos cosméticos.

[0058]O presente invento tem como algumas de suas vantagens:

[0059]O PHev-Me1 possui 4 cisteínas que favorecem uma maior estabilidade a sua estrutura.

[0060]O PHev-Me1 pode ser usado como um futuro fármaco contra diversas bactérias, incluindo bactérias resistentes. Além disso, apresentou atividade antifúngica contra diferentes cepas do gênero *Candida* e pode inclusive ser usado como uma possível pomada ou spray contra essas leveduras. Ainda, seu efeito associado a outros antibióticos ainda não foi testada, como outras pesquisas com diferentes formulações, os peptídeos podem aumentar a atividade dos antibióticos.

[0061]A região antimicrobiana foi alterada para que haja um equilíbrio entre atividade antimicrobiana de amplo espectro e uma atividade que tenha a menor toxicidade possível para as células do hospedeiro. Neste sentido oito aminoácidos foram modificados para que apresentasse o melhor efeito terapêutico possível para esta sequência.

Exemplos

[0062]Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma

das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

Exemplo 1 – Desenvolvimento do peptídeo

[0063] Foi feita uma vasta pesquisa de sequências de heveínas com atividade predita no banco de dados PhyAMP, em seguida feito um alinhamento de sequências utilizando um algoritmo de aprendizagem de máquina baseado em Modelo Oculto de Markov, contra o genoma de *Manihot esculenta* disponível no banco de dados do NCBI, afim de verificar se existiam sequências com similaridade com as sequências obtidas no PhyAMP. Após a retirada das sequências repetidas obteve-se os candidatos (onze sequências). As sequências candidatas foram caracterizadas com ferramentas online, onde se pôde observar seu domínio conservado de ligação à quitina pela ferramenta *CD-Search*, com o objetivo de constatar que se tratavam de sequências de heveínas (Figura 1).

[0064] Além da caracterização, foi feita uma predição de atividade antimicrobiana das sequências pela ferramenta online CAMP_{R3}. Após a caracterização e a predição de atividade antimicrobiana *in silico* das sequências, a sequência com identificação XP_021620009.1 que possuía 39 aminoácidos foi escolhida devido a sua estabilidade e predição de atividade antimicrobiana e modificada para 20 aminoácidos, sendo agora chamada de PHev-Me1 (SEQ ID No 2). Foi utilizada a ferramenta CAMP_{R3} para a redução da sequência de 39 para 20 aminoácidos e, em seguida, oito aminoácidos foram modificados utilizando o software SCWRL 4.0. Estas mudanças foram realizadas para manter a predição de atividade antimicrobiana e diminuir a possível citotoxicidade que a sequência poderia apresentar, melhorando assim seu potencial terapêutico. Além disso, a redução foi feita para facilitar a síntese e diminuir os custos, já que a sequência original é de 36 aminoácidos e a síntese se paga pelo tamanho da sequência, o peptídeo da presente invenção com apenas 20 aminoácidos diminui os custos com a síntese. Ainda, a sequência original possui uma quantidade de pontes dissulfeto muito maior em comparação com PHev-Me1, em que a síntese de pontes dissulfeto dificulta em cerca de 80% das vezes para formar os padrões corretos, sendo necessário repetir inúmeras vezes para alcançar o padrão correto, visto que a síntese química em fase sólida ocorre de maneira inversa da síntese natural dos peptídeos. A formação da sequência de PHev-Me1 foi pensada em

tudo isso, visando um futuro fármaco terapêutico. As modificações foram feitas para que houvesse um equilíbrio entre atividade antimicrobiana de largo espectro e menor toxicidade possível para o hospedeiro, deste modo o peptídeo pode ser considerado como promissor:

Tabela 1. Comparação de sequência entre PHev-Me1 e a natural

	Sequência
PHev-Me1	SEQ ID NO 2
Parte da Sequência original de heveína de <i>Manihot esculenta</i>	SEQ ID NO 3

em que os aminoácidos em destaque são os aminoácidos conservados no peptídeo sintético.

[0065] Como não se conhecia a estabilidade desta molécula, nem como seria sua interação com algum solvente, foi feito um teste de simulação no computador, onde foi feito inicialmente as modelagens (representação tridimensional) da estrutura da sequência modificada utilizando ferramentas de modelagem do programa ROSETTA (Figura 2).

[0066] Em seguida, a estrutura 3D foi colocada em uma caixa desenhada no programa GROMACS. Dentro da caixa foi colocado solvente (água) e observado por um determinado tempo sob uma temperatura e pressão constante. O resultado da simulação é observado na Figura 3. Com o gráfico da RMSD (onde é possível observar o quanto que a estrutura variou, em forma, da original) foi possível observar que a estrutura variou principalmente entre 30 e 70 ns e logo após voltou a estabilizar. Desta forma, PHev-Me1 foi escolhida para a síntese em fase sólida, onde obteve-se uma pureza superior a 95%.

[0067] A síntese química em fase sólida de peptídeos baseia-se no uso de um composto químico ativador que reage com o grupo carboxila (-COOH) de um aminoácido e o torna mais reativo ao grupo amina (H₂N-) do outro aminoácido,

resultando na liberação de água e formação da ligação peptídica entre eles (R1-CONH-R2). Assim, o peptídeo cresce ligado a um polímero e em seguida pode ser separado dos reagentes por simples filtração.

Exemplo 2 – Teste de toxicidade e atividade antimicrobiana e antifúngica

[0068] Após a síntese, a atividade de PHev-Me1 foi testada contra diversos patógenos conforme a Tabela 2, e analisado sua toxicidade pela técnica do MTT (contra células do tipo macrófagos de rato) e hemólise (contra células eritrocitárias humanas), conforme a Tabela 3.

[0069] A concentração inibitória mínima (MIC ou CIM) e a concentração bactericida mínima (MBC) contra PHev-Me1 foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo, seguindo as recomendações do Institute of Clinical and Laboratory Standards (CLSI, 2015) com modificações. Para isso, o PHev-Me1 no caldo de Müller-Hinton ajustado por cátion (CA-MHB) (Sigma) foi adicionado à placa sob diluição serial (50 µL). Resumidamente, as células bacterianas foram cultivadas em Müller Hinton (Himedia) com 1 mL de CA-MHB durante a noite a 37 °C e foram determinadas pela densidade de oxigênio dissolvido (OD_{625nm} de 0,08-0,13 UA) correspondente a 0,5 da escala de McFarland. -5×10^8 UFC.mL⁻¹). A solução foi diluída (1: 1000) em CA-MHB e inoculada nos poços da placa de microdiluição (50 µL) para que a concentração final da densidade celular bacteriana fosse de aproximadamente $1-5 \times 10^5$ CFU.mL⁻¹. As CIM foram determinadas como a menor concentração de peptídeo que inibiu o crescimento bacteriano após incubação a 37°C por 18 a 20 h, sendo o meio CA-MHB não inoculado usado como controle negativo, e culturas sem adição de peptídeo serviram como controle positivo. Para o MBC, foi realizado o revestimento de 10 µL de cada poço que não apresentou crescimento visível na placa Müller-Hinton e incubado por 24 horas a 37 °C, sendo considerado o MBC a concentração em que não apresentou crescimento bacteriano. As cepas bacterianas utilizadas no experimento foram fornecidas pelo laboratório de microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães (Fiocruz / PE).

[0070] O Hev-Me1 foi testado contra as cepas Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e resistente a *S. aureus* MRSA04673 e Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* Pa_39, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e *K. pneumonia* resistente a Carbapenemase L016,

A. baumannii ATCC 19606 e *A. baumannii* resistente. Os experimentos foram realizadas em duplicatas em diferentes intervalos de tempo.

[0071] A CIM antifúngica foi realizada seguindo as diretrizes CLSI M27-A3 (2008). O PHev-Me1 foi diluído em água destilada. O antifúngico comercial Fluconazol® e a cepa de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 como levedura padrão de controle foram utilizados como referência. As leveduras foram cultivadas em Sabouraud Agar Dextrose (SDA; Difco) e incubadas por 48 h a 37 °C. Para as leveduras, duas diluições seriadas de 1: 100 e 1:20 foram realizadas para obter o inóculo final contendo $1,0$ a $5,0 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹. Esta solução foi inoculada em toda a placa de 96 poços contendo o meio de cultura padrão RPMI 1640, tamponado a pH 7,0 com ácido morfolinopropanossulfônico 0,1M (MOPS), para obter a concentração final de 512 µg.mL⁻¹ para cada levedura testada. As leveduras foram incubadas a 37 °C e visualizadas 24 e 48h depois. Os fungos utilizados no experimento vieram do microclínico localizado no Departamento de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco, sendo *Candida albicans* 4986, *Candida parapsilosis* 4970 e *Cryptococcus neoformans* 5980 resistentes a múltiplas drogas, incluindo linhagens de origem clínica. Os CIMs corresponderam às menores concentrações de fármacos que mostraram inibição do crescimento em comparação com os fungos não tratados.

Atividade hemolítica

[0072] A atividade hemolítica de PHev-Me1 foi medida pela quantidade de hemoglobina liberada por lise de eritrócitos humanos. As células humanas foram suspensas em solução salina a 2% (NaCl 0,85% + CaCl₂) e incubadas em placas de 96 poços com diferentes concentrações de PHev-Me1 (512 a 32 µg.mL⁻¹). As placas foram incubadas por um período de 3 horas a 37 °C sob agitação constante e centrifugadas a 3500 rpm por 4 min a 4 °C e a absorbância do sobrenadante foi medida a 540 nm para estabelecer a porcentagem de hemólise. Como controle positivo da lise celular, Triton X-100 a 1% (Sigma-Aldrich, EUA) e solução salina (NaCl a 0,85% + CaCl₂ a 10 mM) foram utilizados como controle negativo. Os experimentos foram realizados em quadruplicata, com repetição em diferentes intervalos de tempo.

Atividade citotóxica (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio -

MTT)

[0073]A atividade citotóxica de PHev-Me1 foi avaliada a partir das células do exsudato peritoneal de camundongos (CEUA / IAM número 119/2017), fornecido pelo laboratório de microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães (Fiocruz-PE). Para isso, as células foram semeadas em placas de 96 poços contendo meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute), sem vermelho de fenol, suplementadas com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) e incubadas por 24h a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Foram realizadas cinco diluições seriadas de PHev-Me1 a partir de 1024 µg.mL⁻¹. As células cultivadas também foram utilizadas na ausência dos compostos, mas mantidas nas mesmas condições, como controle de 100% da viabilidade celular. Após 24 h, o meio foi removido e as células foram tratadas na presença de diferentes concentrações de PHev-Me1 e incubadas a 37°C com 5% de CO₂ por 24 h. Após o período de incubação, o efeito de PHev-Me1 foi determinado medindo a atividade da desidrogenase mitocondrial, adicionando 10 µL por poço de MTT (3- (5,4-dimetil-tizol-2-l) -2-5-tretracil) e incubação a 37°C por 3 horas. Em seguida, os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO e a absorbância foi determinada em um espectrofotômetro a 540 nm. A concentração capaz de matar 50% das células (CC50) foi calculada por regressão linear. Poços contendo meio e MTT foram utilizados como controle de reação. Cada concentração de PHev-Me1, bem como o controle sem o composto, foi avaliado em quadruplicado em duas experiências independentes.

[0074]PHev-Me1 mostrou atividade contra todos os patógenos testados, com melhores resultados para *S. aureus*, *Candida parapsilosis* e *C. neoformans* na concentração de 64 µg/mL. Tanto o MTT quanto o teste de hemólise mostraram que PHev-Me1 apresentou baixa toxicidade, tendo a faixa de atividade 64 – 512 µg/mL um excelente índice terapêutico.

[0075]Pelos testes do MTT pôde verificar-se uma dose tóxica do PHev-Me1 quando este está em uma concentração ≥1024 µg/mL e, no teste de hemólise, a maior dose testada de 1024 µg/mL causou rompimento suficiente das hemácias para ser considerada tóxica (Figuras 4 e 5).

Tabela 2 – Atividade antimicrobiana de PHev-Me1 (µg/mL) contra diversos patógenos

	PHev-Me1	
	MIC	MBC
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	64	>512
<i>S. aureus</i> Resistente MRSA04673	>512	>512
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	512	>512
<i>P. aeruginosa</i> resistente Pa_39	512	>512
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC	512	>512
<i>A. baumannii</i> resistente Acb 45	512	>512
<i>Candida albicans</i>	128	X
<i>Candida parapsilosis</i>	64	X
<i>Cryptococcus neoformas</i>	64	X

Tabela 3 – Toxicidade de PHev-Me1

	PHev-Me1
MTT	1024
Hemólise	1024

[0076] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes e alternativas, abrangidas pelo escopo das reivindicações a seguir

Reivindicações

1. Sequência de aminoácidos, **caracterizada por** compreender uma sequência SEQ ID NO 1, em que:

X2 é Val, Ala, Arg ou Gln;

X5 é Pro, Ala ou Cys;

X6 é Gly, Glu, Ala ou Asn;

X7 é Tyr, Gly, Asn ou Arg;

X8 é Arg, Leu, Gln, Met ou Glu;

X12 é Gln, Arg ou Lys;

X13 é Trp, Tyr ou Phe; e

X20 é Lys, Ala, Pro, Tyr, Asp, Glu ou Thr.

2. Sequência de aminoácidos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pela** sequência compreender 20 aminoácidos, em que pelo menos 4 cisteínas estão presentes.

3. Sequência de aminoácidos, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada por** compreender aminoácidos hidrofílicos e aniônicos.

4. Sequência de aminoácidos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** compreender no mínimo 70% de identidade à SEQ ID NO 1.

5. Sequência de aminoácidos, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizada por** ser opcionalmente a SEQ ID No 2.

6. Composição, **caracterizada por** compreender a sequência de aminoácidos, conforme definida em qualquer uma das reivindicações anteriores.

7. Composição, de acordo a reivindicação 6, **caracterizada pela** dita composição compreender uma concentração da sequência de aminoácidos menor do que 1024 µg/mL.

8. Composição, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada pela** concentração da sequência de aminoácidos ser opcionalmente de 64 a 512 µg/mL para atividade antimicrobiana e de 64 – 128 µg/mL para atividade antifúngica.

9. Composição, de acordo com a reivindicação 7 ou 8, **caracterizada pela** concentração da sequência de aminoácidos ser opcionalmente 512 µg/mL para atividade antimicrobiana e de 64 µg/mL para atividade antifúngica.

10. Uso da sequência de aminoácidos, conforme definida em qualquer

uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado por** ser nas áreas farmacêutica, médica, cosmética, alimentícia ou agrícola.

11. Uso, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado por** ser para a preparação de um pesticida.

12. Uso, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado por** ser para preparar um medicamento para tratar infecções bacterianas e/ou fúngicas.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado pelo** medicamento tratar infecções bacterianas de amplo espectro e resistentes.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 12 ou 13, **caracterizado pelas** infecções bacterianas serem por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* resistente, *Acinetobacter baumannii* e/ou *Acinetobacter baumannii* resistente e;

pelas infecções fúngicas serem opcionalmente por *Candida* ou *Cryptococcus*, opcionalmente as leveduras são *Candida parapsilosis*, *Candida albicans* e/ou *Cryptococcus neoformans*.

15. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 14, **caracterizado pelo** medicamento estar na forma de pomada ou spray.

Figuras

Figura 1

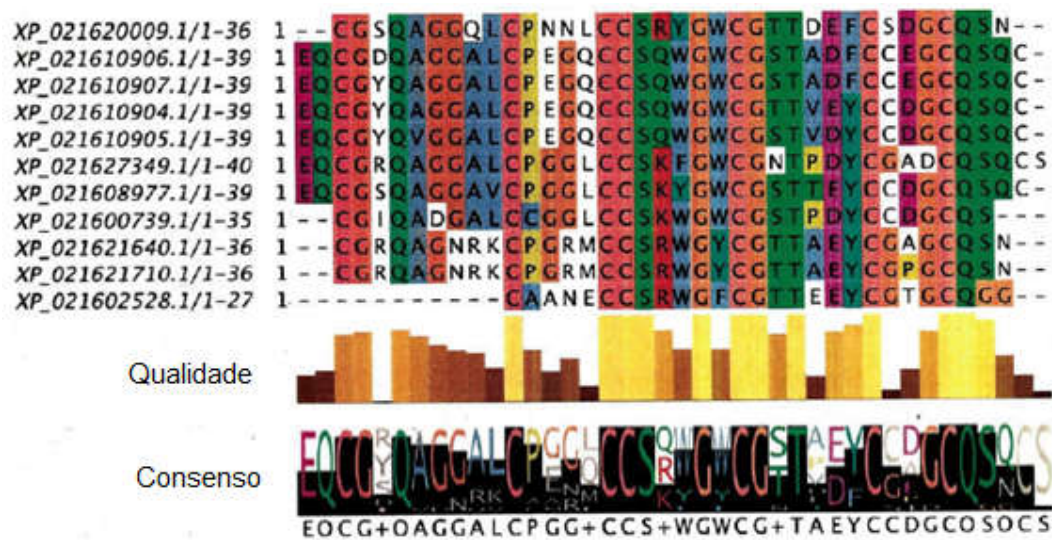


Figura 2

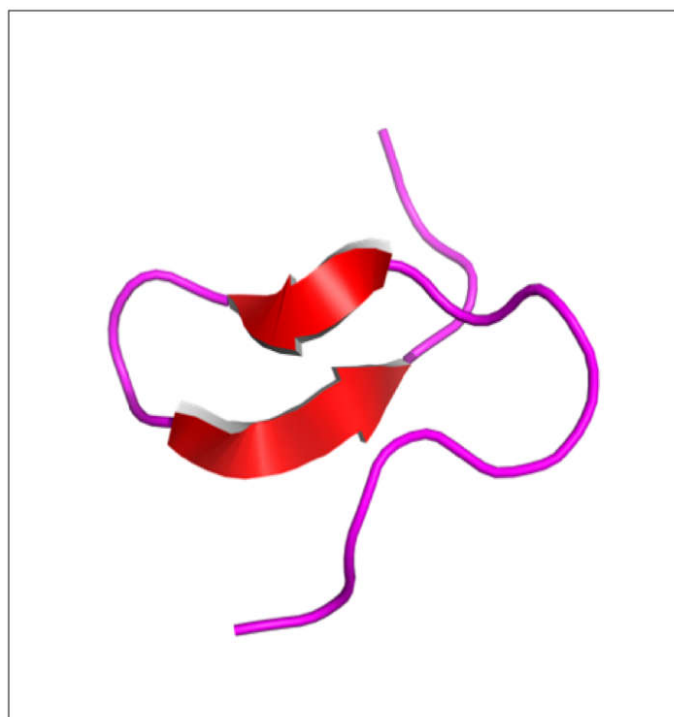


Figura 3

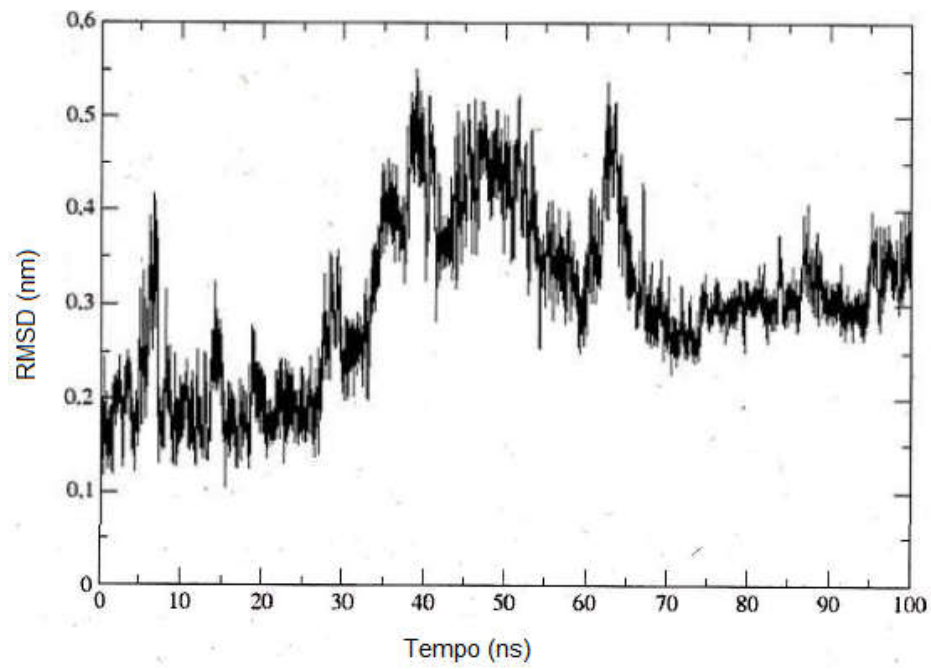


Figura 4

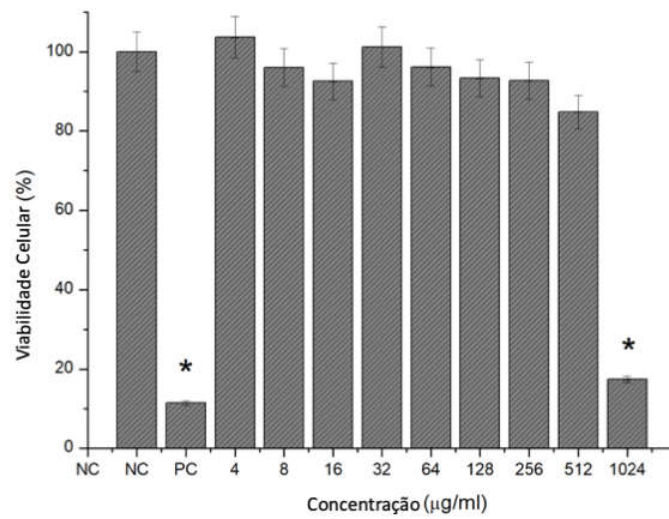
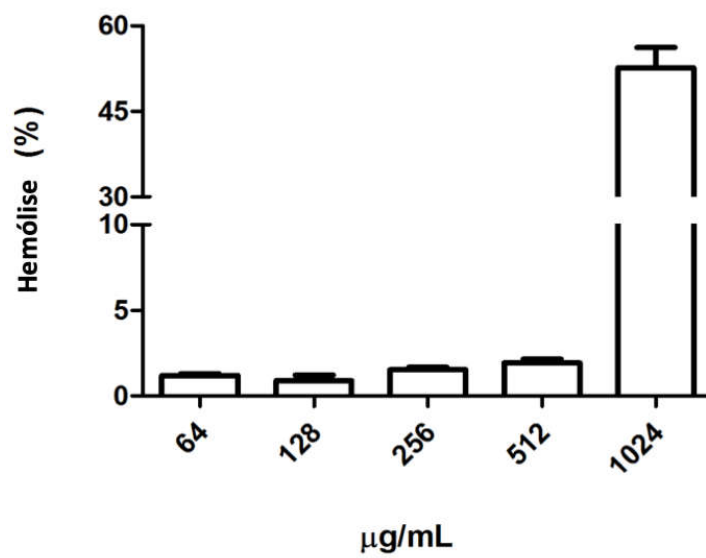


Figura 5



Resumo**SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS, COMPOSIÇÃO E USO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS**

O PHev-Me1 é uma sequência de aminoácidos sintética modificada a partir de uma heveína de *Manihot esculenta*. Composição de vinte aminoácidos, PHev-Me1 possui atividade contra bactérias (ATCC e resistente) como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. Além de leveduras do gênero *Candida*. Sua toxicidade foi testada contra células eritrocitárias humanas e macrófagos de ratos, onde PHev-Me1 apresentou potencial terapêutico em sua dose ativa de 512 µg/mL. A presente invenção se situa nos campos da Biotecnologia, Farmácia e Medicina.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de sequências.txt
- Data de Geração do Código: 20/02/2020
- Hora de Geração do Código: 18:56:56
- Código de Controle:
 - Campo 1: 9AA4F676B8DCFF05
 - Campo 2: C930B15EFB31E42A