



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

(21) BR 102020020140-9 A2



(22) Data do Depósito: 30/09/2020

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

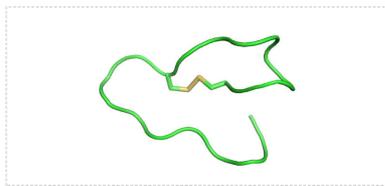
(54) **Título:** CCHEV1: PEPTÍDEO BIOINSPIRADO A PARTIR DE UMA HEVEÍNA DE CAJANUS CAJAN (FABACEAE) COM POTENCIAL LARVICIDA E ANTIFÚNGICO

(51) **Int. Cl.:** C07K 7/08; C07K 14/415; A61K 38/10; A61K 36/48; A61P 31/10; (...).

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

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

(57) **Resumo:** CcHev1: PEPTÍDEO BIOINSPIRADO A PARTIR DE UMA HEVEÍNA DE CAJANUS CAJAN(FABACEAE) COM POTENCIAL LARVICIDA E ANTIFÚNGICO. O CcHev1 é um peptídeo modificado racionalmente, bioinspirados em uma heveína de *Cajanus cajan*. O peptídeo foi reduzido a vinte aminoácidos, teve sua composição ajustada e apresentou 100% de atividade larvicida contra larvas no estágio L2 de *Aedes aegypti* na concentração e 2048 µg/mL. Além disso, mostrou atividade antifúngica contra *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* nas concentrações de 64 e 32 µg/mL, respectivamente. Foi testada a toxicidade do peptídeo contra células de macrófagos de ratos e não houve citotoxicidade para estas células. No teste contra células eritrocitárias humanas o peptídeo apresentou concentração hemolítica apenas na maior concentração testada (1024 µg/mL). A presente invenção está situada nos campos da Biotecnologia, Bioquímica, Farmacologia e Medicina.



**CcHev1: peptídeo bioinspirado a partir de uma heveína de *Cajanus cajan* (Fabaceae) com potencial larvicida e antifúngico**

→ **Campo da invenção**

1. A presente invenção representa uma nova sequência de aminoácidos sintética modificada racionalmente e inspirada em uma heveína de *Cajanus cajan* com atividade antifúngica e principalmente larvicida. A invenção aqui relatada está situada nos campos da Biotecnologia, Farmácia e Medicina.

2. CcHev1 pode ser usado como um futuro larvicida e no controle do desenvolvimento e da proliferação das larvas do mosquito *Aedes aegypti* em substituição aos larvicidas biológicos utilizados atualmente. Por ser uma sequência curta, pode ser produzido com técnicas biotecnológicas de baixo custo (expressão heteróloga).

3. Além disso, o presente peptídeo possui potencial no combate a infecções contra alguns fungos oportunistas, tendo apresentado atividade antifúngica contra diferentes tipos de *Candidas*, o que pode inclusive estimular o desenvolvimento de uma possível pomada ou *spray* contra essas leveduras (fungos), podendo também ser utilizado como molde para futuras modificações e criação de novas moléculas com potencial farmacêutico, através de técnicas computacionais.

4. O CcHev1 pode ser testado contra patógenos que acometem plantas de relevante interesse agroeconômico, como potencial bioinseticida, antifúngico, podendo apresentar também atividade antiparasitária, além de poder apresentar ação imunomoduladora e resultados contra células cancerígenas, vírus e outros microrganismos.

→ **Fundamentos da invenção**

5. Várias arboviroses têm tomado proporções alarmantes pelo potencial de propagação que seus vetores podem causar em regiões de clima quente e úmido. O mosquito *Aedes aegypti* é um dos principais vetores de arboviroses como dengue, *chikungunya* e o *zika* vírus, todos de importância médica na maioria das regiões tropicais, mas também emergindo em regiões mais temperadas, incluindo a Europa continental. Entre as arboviroses, a dengue é a doença transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti* mais prevalente no mundo, com uma estimativa de 390 milhões de casos por ano (Bhatt *et al.*, 2013), sendo este vetor o principal causador das infecções por vírus *zika*, ainda com o agravante de durante a gravidez poder provocar microcefalia fetal (Ministério da Saúde, 2017).

6. Nas Américas, o Brasil é o país mais afetado, sendo notificados cerca de 1,5 milhão de casos, só em 2016, sendo o *Aedes aegypti* o principal vetor da dengue nos quatro sorotipos do vírus causador da dengue circulantes no país (Fares *et al.*, 2015). Estão sendo desenvolvidas vacinas contra as doenças causadas por este culicídeo, mas atualmente ainda não existe imunização ou medidas efetivas para o controle dessas três doenças, o que faz da redução da população de vetores a principal estratégia para minimizar sua incidência.

7. O Brasil e o mundo ainda enfrentam uma progressão no aumento da resistência a medicamentos antimicrobianos. Atualmente poucos medicamentos antimicrobianos em fase de teste possuem atividade contra patógenos oportunistas listados pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

8. Além das arboviroses citadas, o Brasil apresenta durante todo o ano infecções por fungos oportunistas, sendo proliferados mais facilmente pelo clima quente e úmido. Uma abordagem inovadora surge

como uma aliada na luta contra a disseminação de vetores que causam arboviroses, bem como para microrganismos que causam infecções. Esta proposta apresenta alternativas em substituição a diversas drogas já consolidadas no mercado, são os chamados peptídeos antimicrobianos (AMPs), que possuem várias classes, sendo aqui destacados os peptídeos do tipo heveína. Tais compostos são considerados menos susceptíveis aos processos de resistência a microrganismos do que fármacos tradicionais, são de fácil eliminação pelo sistema excretor e não apresentam efeitos colaterais significativos.

9. CcHev1 apresentou potencial contra algumas espécies de fungos patogênicos humanos. A confiabilidade do peptídeo CcHev1 foi testada através das análises *in vitro* de viabilidade celular (MTT) e hemólise, onde foi verificado o possível uso frente aos tipos de células humanas testadas. A partir de ensaios da concentração mínima inibitória (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC), o peptídeo CcHev1 mostrou ter uma ação contra alguns dos microrganismos testados (a partir de 24 e 48 h, para os fungos).

10. CcHev1 foi bioinspirado em moléculas nativas, sendo desenhado, modificado racionalmente e sintetizado para potencializar sua atividade antimicrobiana contra diversos patógenos. Entretanto, o peptídeo teve maior atividade contra larvas de culicídeos, como o *Aedes aegypti* que é o vetor da dengue, *chikungunya* e *zika*. Por esta razão, o novo peptídeo (CcHev1) apresenta-se também como potencial para o desenvolvimento de uma nova classe de agente terapêutico (Cândido *et al.*, 2014).

11. Atualmente, a colistina é um ciclopeptídeo, considerado como a última linha de terapia antimicrobiana usada contra microrganismos resistentes a múltiplos fármacos (Sierra *et al.*, 2017) (Sierra, Josep M. *et al.* **An overview of antimicrobial peptides and the latest advances**

in their development. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 17(6):663-676, 2017.

12. Não há registros em patentes nacionais e internacionais para similaridade com CcHev1.

13. Alguns exemplos de patentes com abordagens semelhantes (porém distintas): CN 107022549 A - *Pelteobagrus fulvidraco* beta defensin gene, and beta defensin antibacterial peptide and application thereof; JP 2017132755 A - Defensin production promoter, and antibacterial agent; KR 20170023352 A - An antibacterial peptide isolated from *Hermetia illucens*; US 2017049102 A1 - Agents and methods for treatment of pathogens; US 2017029842 A1 - Modified plant defensins useful as anti-pathogenic agents.

#### → Breve descrição dos desenhos

14. A Figura 1 ilustra a modelagem tridimensional do peptídeo heveína (CcHev1).

15. A Figura 2 compreende a representação gráfica do *b-factor* do peptídeo CcHev1.

16. A Figura 3 representa a variação do RMSD da estrutura da heveína (CcHev1) modelada após a simulação computacional de dinâmica molecular.

17. A Figura 4 apresenta a viabilidade celular em células RAW 264.7 para o peptídeo CcHev1.

18. A Figura 5 ilustra a atividade hemolítica de CcHev1.

#### → Descrição da invenção

19. A presente invenção apresenta como conceito inventivo o seguinte objeto que tem por base uma sequência de aminoácidos. Para

a invenção de CcHev1, foi feita uma vasta pesquisa de sequências de heveínas com atividade predita no banco de dados *PhyAMP*.

20. Após a pesquisa por sequências candidatas de heveínas, foi gerado um alinhamento dessas sequências utilizando a ferramenta *BLASTp* contra o genoma de *Cajanus cajan* disponível no banco de dados do NCBI, a fim de verificar se existiam sequências similares às sequências obtidas no *PhyAMP*. Após a retirada das sequências repetidas, foram obtidas as candidatas (seis sequências) de *C. cajan*.

21. As sequências candidatas foram caracterizadas com ferramentas *on-line*, onde pôde-se observar seu domínio conservado pela ferramenta *CD-Search*, verificação da presença ou ausência de peptídeo sinal pela ferramenta *SignalP* e observação da conservação das pontes dissulfeto pela ferramenta *Disulfide* e *DIANNA*. Todas as ferramentas utilizadas tiveram o objetivo de constatar a autenticidade das sequências de heveínas.

22. Além da caracterização, foi feita uma predição da atividade antimicrobiana das sequências pela ferramenta *on-line CampR3*. Com as sequências caracterizadas, foram desenhados *primers* com a ferramenta *on-line Primer3plus*, a fim de analisar se as sequências obtidas amplificavam no DNA extraído previamente da espécie *C. cajan* através da técnica de PCR convencional. As sequências amplificadas pela técnica de PCR foram enviadas para sequenciamento, a fim de obter toda a sequência e comparar com a sequência obtida no banco de dados.

23. Após a confirmação que se tratavam de sequências de heveína de *C. cajan*, estas sequências que possuíam aproximadamente 39 a 40 aminoácidos foram reduzidas racionalmente para 20 aminoácidos, utilizando a ferramenta *CampR3* para redução de sequências, preservando ao máximo o domínio conservado presente na estrutura primária, substituindo alguns aminoácidos para diminuição da

toxicidade e monitorando se as sequências mantiveram uma boa predição de atividade antimicrobiana.

24. A presente invenção apresenta como primeiro objeto sequência de aminoácidos compreendendo uma sequência, sendo a sequência assim obtida: Cys-Gly-Lys-Glm-Ala-Gly-Gly-Ala-Leu-Cys-Pro-Asn-Gly-Leu-Cys-Cys-Ser-Lys-Phe-Gly (CGKQAGGALCPNGLCCSKFG).

25. A redução e modificação da sequência foi feita para diminuir os custos da síntese, propiciar a ação larvicida e antimicrobiana e minimizar a ação citotóxica e a complexidade da mesma.

26. Com o intuito de verificar a estabilidade da molécula e sua interação com algum solvente, considerando que esta molécula foi modificada e não existe na natureza, foi realizada uma modelagem e um teste de simulação em dinâmica molecular no computador, onde foram realizadas inicialmente a modelagem (representação tridimensional na Figura 1) da estrutura da sequência modificada utilizando ferramentas de modelagens do programa *Rosetta* (Figura 1).

27. Posteriormente, a estrutura tridimensional (3D) foi submetida a uma avaliação em caixa virtual desenhada no programa e submetida a uma simulação em dinâmica molecular sob meio aquoso, pressão e temperatura controlados, através da ferramenta *GROMOS96 43A1* e o pacote *GROMACS*, a fim de analisar a estabilidade conformacional do peptídeo. O resultado da simulação pode ser observado nas Figuras 2 e 3.

28. Após a síntese, a atividade de CcHev1 foi testada contra diversos patógenos humanos e fitopatógenos, incluindo bactérias e fungos.

29. O Quadro 1 demonstra a atividade obtida nos testes com fungos.

30. Outra atividade foi também observada utilizando o peptídeo do tipo heveína (CcHev1), quando testado contra larvas do mosquito

*Aedes aegypti*, agente causador da dengue, confirmando atividade contra as larvas no estágio L2 do mosquito, como mostra o Quadro 2.

→ **Exemplos de concretizações da invenção**

31. Através da análise da modelagem tridimensional de CcHev1 (Figura 1) foi possível verificar como a estrutura pode se dobrar a partir de sua sequência primária. A conformação adotada pelo peptídeo não apresentou formação de estrutura secundária, sendo, portanto, formada por uma estrutura em *loop* (representada em verde). Houve formação de uma ponte dissulfeto (representada em amarelo) constituída por dois resíduos de cisteína, aumentando assim a estabilidade da molécula.

32. A estrutura também pode ser observada de acordo com a distribuição dos átomos e da amplitude das oscilações atômicas em torno das posições de equilíbrio dos mesmos, além da dispersão desses átomos. O *b-factor* é um gráfico (Figura 2) que representa a distribuição dos átomos e foi gerado pelo resultado da dinâmica molecular onde foram obtidos os valores da vibração dos átomos de acordo com os respectivos aminoácidos. As cores quentes como o vermelho e amarelo representam uma maior flexibilidade dos átomos, em contrapartida, as regiões de cores frias (como as tonalidades em azul e verde) possuem uma menor flexibilidade, sendo, portanto, menos estáveis.

33. Através da simulação em dinâmica molecular também foi possível obter o gráfico do RMSD (desvio médio da raiz quadrada, Figura 3) que representa a variação da conformação da estrutura. Através desse gráfico, verificou-se que a estrutura da sequência representada em preto teve pouca variação conformacional em contato com o solvente (água). Desta forma, esta sequência foi escolhida como melhor candidata, procedendo-se à sua síntese química em fase sólida em laboratório, onde foi obtido um peptídeo sintético com uma pureza

superior a 95% e uma massa molecular de 1914,27KDa. O peptídeo bioinspirado e sintetizado foi então nomeado CcHev1.

34. Após a síntese, a atividade de CcHev1 foi testada contra diversos patógenos humanos e fitopatógenos, sendo estes bactérias e fungos. O Quadro 1 demonstra a atividade antifúngica obtida nos testes com as espécies de fungos *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* que tiveram 30,71, 25 e 8,21 % de inibição na concentração de 64 µg/mL, respectivamente. Por sua vez, contra a *Candida tropicalis* o peptídeo apresentou uma inibição de 8,92 % na concentração 32 µg/mL.

Quadro 1 - Atividade antifúngica de CcHev1 (µg/mL)

Fungos	MIC (%)	MBC (%)	Concentrações testadas*
<i>Candida albicans</i>	X	X	1024 a 8 µg/mL
<i>Candida krusei</i>	X	X	1024 a 8 µg/mL
<i>Candida parapsilosis</i>	30,71	X	1024 a 8 µg/mL
<i>Candida glabrata</i>	25	X	1024 a 8 µg/mL
<i>Candida tropicalis</i>	8,21	8,92	1024 a 8 µg/mL
<i>Colletotrichum sp.</i>	X	X	1024 a 8 µg/mL
<i>Fusarium sp.</i>	X	X	1024 a 8 µg/mL
<i>Neopestalotiopsis sp.</i>	X	X	1024 a 8 µg/mL

X - representa uma concentração não ativa para os valores de MIC e MBC nas concentrações testadas; MIC - concentração mínima inibitória; MBC - concentração bactericida mínima.

35. Foi analisada também a toxicidade do peptídeo CcHev1 pela técnica do MTT (contra células do tipo macrófagos de rato) (Figura 4) e hemólise (contra células eritrocitárias humanas). Através do teste de MTT foi possível observar que entre as doses testadas não houve toxicidade de CcHev1. Para o teste de hemólise (Figura 5), o peptídeo foi considerado hemolítico apenas na concentração 1024 µg/mL.

36. Para as células eritrocitárias humanas, a maior dose testada (1024 µg/mL) causou hemólise suficiente para ser considerada tóxica, como mostrado abaixo, referente ao teste de hemólise.

37. Outra atividade foi também observada utilizando o peptídeo do tipo heveína (CcHev1), quando testado contra larvas do mosquito *Aedes aegypti*, agente causador da dengue. Foi constatada atividade inibitória de 100% contra as larvas no estágio L2 do mosquito, como mostra o Quadro 2.

Quadro 2 - \*Atividade larvicida (concentração 2048µg/mL) de CcHev1 em 48h

<b>Controle: Água destilada + Larvas L2 (larvas vivas)</b>	<b>Teste: Heveína CcHev1 + L2 (larvas mortas)</b>	<b>% L2 mortas</b>
100% (5)	100% (5)	100 %
100% (5)	100% (5)	
100% (5)	100% (5)	

\* O teste foi realizado duas vezes em triplicata

## REIVINDICAÇÕES

- 1) Sequência de aminoácidos de peptídeo antimicrobiano, **caracterizada por** compreender uma sequência, composta por: Cys-Gly-Lys-Glm-Ala-Gly-Gly-Ala-Leu-Cys-Pro-Asn-Gly-Leu-Cys-Cys-Ser-Lys-Phe-Gly.
- 2) Sequência de aminoácidos de peptídeo antimicrobiano, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizada pela** sequência conter 20 aminoácidos, em que pelo menos 4 cisteínas estão presentes.
- 3) Sequência de aminoácidos de peptídeo antimicrobiano, de acordo com as Reivindicações 1 ou 2, **caracterizada por** compreender aminoácidos hidrofílicos e aniônicos.
- 4) Composição química e biológica, **caracterizada por** compreender a sequência de aminoácidos, conforme definida em qualquer uma das Reivindicações anteriores.
- 5) Composição química e biológica, **caracterizada pela** concentração da sequência de aminoácidos ser entre 32 a 64 µg/mL para atividade antifúngica e de 2048µg/mL para atividade larvicida.
- 6) 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.
- 7) Uso da sequência de aminoácidos, de acordo com a Reivindicação 5, **caracterizado por** ser para a preparação de um pesticida.
- 8) Uso da sequência de aminoácidos, de acordo com a Reivindicação 5, **caracterizado por** ser apto a preparar um medicamento que trate infecções fúngicas.
- 9) Uso da sequência de aminoácidos, de acordo com a Reivindicação 5, **caracterizado pelas** infecções fúngicas serem por *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*, opcionalmente as leveduras são *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e/ou *Candida tropicalis*.

10) Uso da sequência de aminoácidos, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 5 a 9, **caracterizado pelo** medicamento estar na forma de pomada ou *spray*.

11) Uso da sequência de aminoácidos, de acordo com a Reivindicação 5, **caracterizado pelo** peptídeo estar na forma de larvicida.

12) Uso da sequência de aminoácidos, de acordo com a Reivindicação 5, **caracterizado pelo** peptídeo apresentar concentrações seguras (8 a 1024 µg/mL) para atividade celular *in vitro* contra células do tipo macrófago de murino (RAW 264-7).

13) Uso da sequência de aminoácidos, de acordo com a Reivindicação 5, **caracterizado pelo** peptídeo apresentar atividade hemolítica a partir da concentração 1024 µg/mL.

FIGURAS

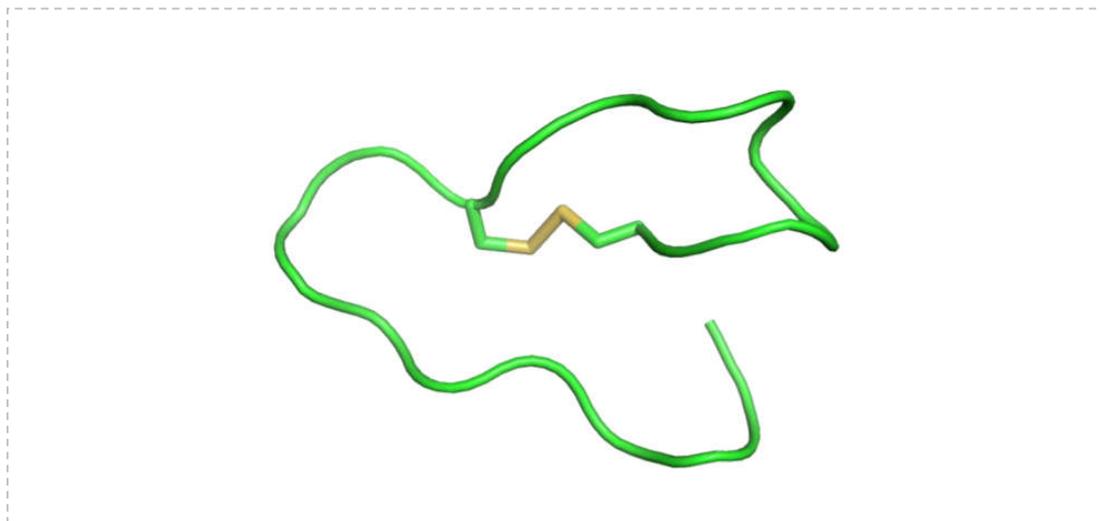


Figura 1

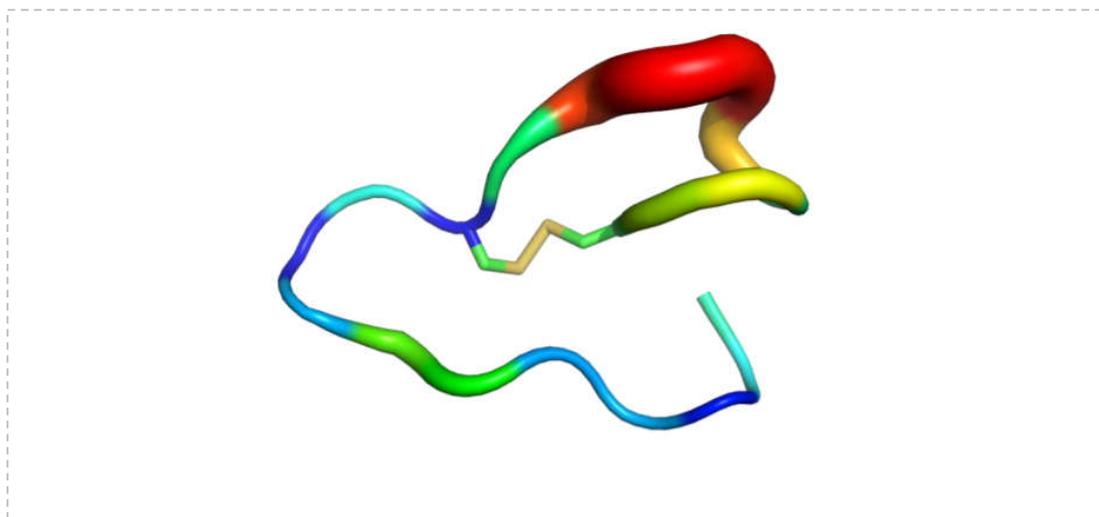


Figura 2

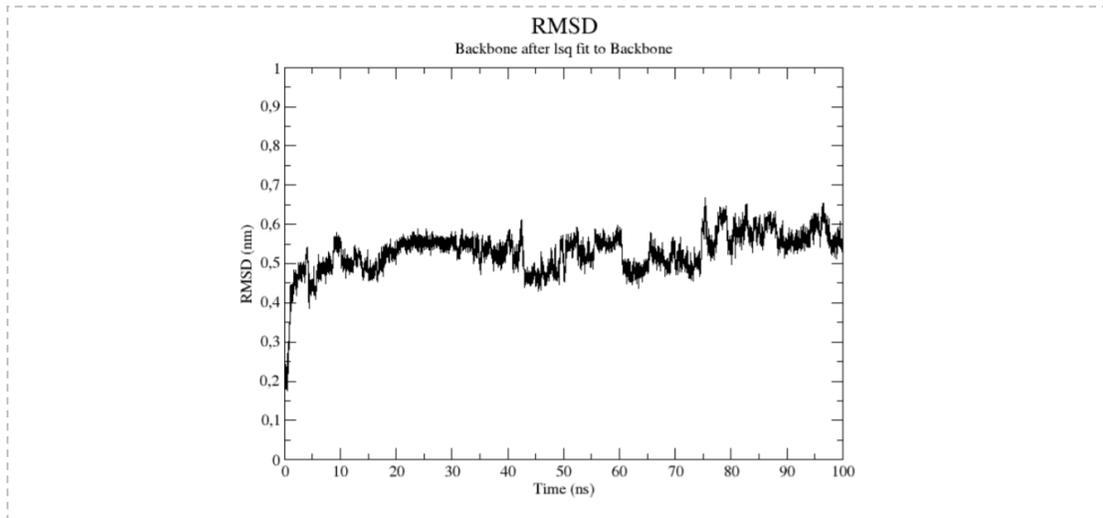


Figura 3

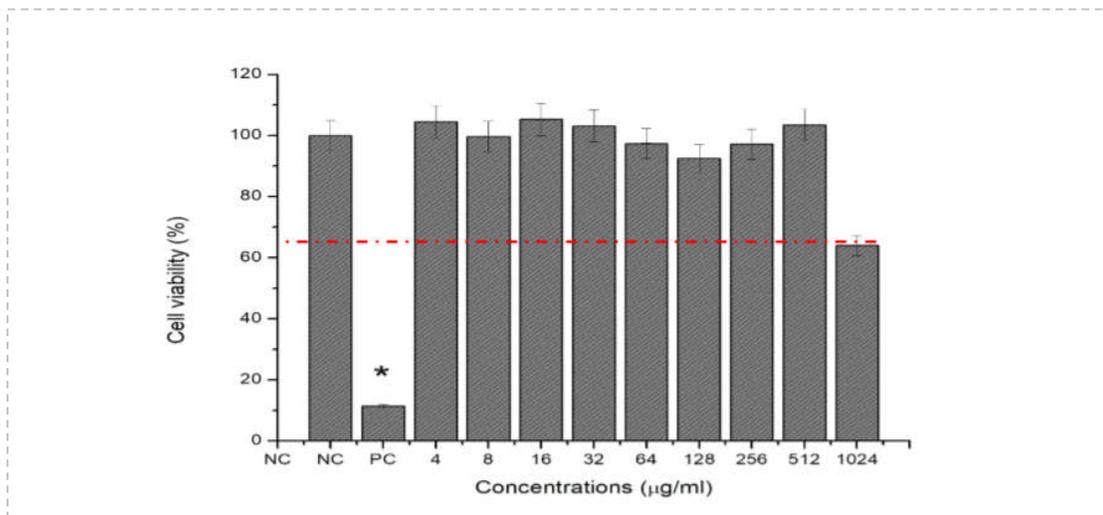


Figura 4

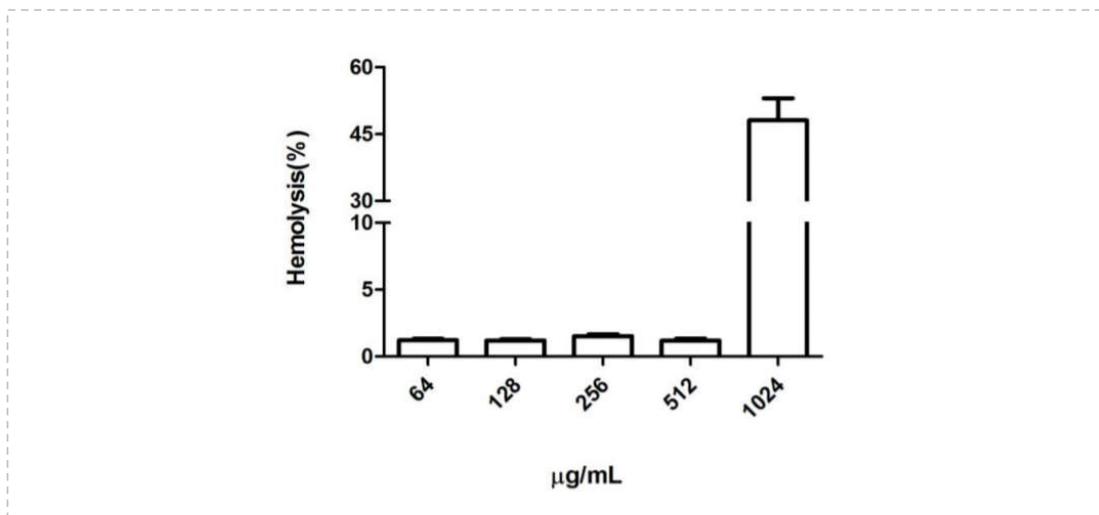


Figura 5

**RESUMO****CcHev1: peptídeo bioinspirado a partir de uma heveína de *Cajanus cajan* (Fabaceae) com potencial larvicida e antifúngico**

O CcHev1 é um peptídeo modificado a partir de uma heveína de *Cajanus cajan*. O peptídeo foi reduzido a vinte aminoácidos, teve sua composição ajustada e apresentou 100% de atividade larvicida contra larvas no estágio L2 de *Aedes aegypti* na concentração de 2048 µg/mL. Além disso, mostrou atividade antifúngica contra *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* nas concentrações de 64 e 32 µg/mL, respectivamente. Foi testada a toxicidade do peptídeo contra células de macrófagos de ratos e não houve citotoxicidade para estas células. No teste contra células eritrocitárias humanas, o peptídeo apresentou concentração hemolítica apenas na maior concentração testada (1024 µg/mL). A presente invenção está situada nos campos da Biotecnologia, Bioquímica, Farmacologia e Medicina.