



INPI
INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102021022570-0

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102021022570-0

(22) Data do Depósito: 10/11/2021

(43) Data da Publicação Nacional: 31/05/2022

(51) Classificação Internacional: C07K 14/435; A61K 35/646; A61P 31/06.

(54) Título: PEPTÍDEO SINTÉTICO P.LOX5 COM AÇÃO ANTIBACTERIANA

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA, Pessoa Jurídica. Endereço: RUA JOÃO NEGRÃO, 280 2º ANDAR, CURITIBA, PR, BRASIL(BR), 80010-200, Brasileira

(72) Inventor: ALANA NADINE NICOLA BECKER; MANUEL HOSPINAL SANTIANI; PATRICIA MENDONÇA OLIVEIRA; VANETE THOMAZ SOCCOL; CARLOS RICARDO SOCCOL; RAPHAEL APARECIDO BOSCHERO.

Código de Controle: 775477DFFD684C1A CF5685E0FF8BB973

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 10/11/2021, observadas as condições legais

Expedida em: 12/12/2023



Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

Diretor de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados



PEPTÍDEO SINTÉTICO P.LOX5 COM AÇÃO ANTIBACTERIANA

Campo da Invenção

[1]. A presente invenção reivindica a sequência do peptídeo sintético P.LOX5, SEQ ID No 01 desenhado in silico a partir de uma proteína do veneno de aranha (*Loxocoles intermedia*) e seu uso como bactericida ou bacteriostático contra bactérias cocos Gram positivos, bacilos Gram negativos e bactérias álcool ácido resistente, incluindo *Mycobacterium* spp.

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[2]. As bactérias estão presentes em todos os lugares, objetos inanimados e organismos vivos, inclusive em simbiose com seres humanos e animais compondo a microbiota natural. Alguns microorganismos específicos ou mesmo inofensivos em ambiente fisiológico são capazes de provocar doença quando expostos a determinadas condições. Quando o microrganismo é capaz de desencadear o processo de doença é denominado patógeno. (TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. Microbiologia. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.)

[3]. Os patógenos podem ser classificados de acordo com seu formato e/ou a composição da parede celular quando corados por técnicas específicas. Essa classificação divide os microrganismos em grupos de importância clínica, entre eles, Gram positivos, Gram negativos e organismos álcool-ácido resistentes incluindo, por exemplo, o gênero *Mycobacterium* spp. (TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. Microbiologia. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.)

[4]. A parede celular das bactérias Gram-positivas possui uma camada espessa de peptidoglicano. Além disso, algumas possuem ácido teicóico na composição da sua parede, componente não

encontrado em bactérias Gram negativas. Os dois principais gêneros Gram positivos de importância médica são *Staphylococcus* e *Streptococcus*. (TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. Microbiologia. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.) No gênero *Staphylococcus* existem espécies como *S. aureus* que apresentam potencial de resistência a antibióticos, como meticilina e vancomicina. Outro gênero importante de Gram positivos, são os *Enterococcus*. Estas bactérias se destacam nas infecções nosocomiais, principalmente as linhagens resistentes a vancomicina (VRE). (LEVINSON, W. Microbiologia e imunologia médicas. 13. ed. Porto Alegre: AMGH, 2016.)

[5]. No caso dos microrganismos Gram-negativos, a parede celular é formada por camada fina de peptidoglicano, e uma membrana celular. Essa membrana contém na sua composição polissacarídeos, lipoproteínas e fosfolípidos. É no espaço periplasmático, entre a membrana externa e a membrana celular das bactérias Gram negativas que se encontram as enzimas capazes de degradar antibióticos, o que confere resistência. Ao microrganismo (TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. Microbiologia. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.)

[6]. Como exemplo de bactérias Gram negativas pode-se citar aquelas presentes no trato gastrointestinal, como *Salmonella* spp. que causa a salmonelose. Outro exemplo é a *Escherichia coli* que causa infecções do trato urinário (TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. Microbiologia. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.)

[7]. Entre os bacilos ácido resistentes o representante de maior importância clínica é o *Mycobacterium tuberculosis* causador da tuberculose. Sua parede celular possui uma fina camada de peptidoglicano e a parede externa é composta por camadas de ácido micólico, um lipídeo céreo e hidrofóbico. (Bertolli Filho, C. História social da tuberculose e do tuberculoso: 1900-1950. 2001.)

[8]. A resistência bacteriana a múltiplas drogas é preocupante. De acordo com a Organização Mundial da Saúde em seu relatório em 2018, foram registrados 10 milhões de novos casos de tuberculose, e cerca de 1,5 milhão de pessoas morreram da doença com mais de 500.000 casos resistentes a multidrogas ou extensivamente resistentes. (MARTÍN-GARCÍA, M.; ESTEBAN, J. Evaluating bedaquiline as a treatment option for multidrug-resistant tuberculosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v. 22, n. 5, p. 535–541, 2021. Taylor & Francis. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14656566.2020.1867538>>.) [009]

[9]. Um ponto crítico quanto ao tratamento de doenças infecciosas é o desenvolvimento e introdução de novas drogas no mercado, que ocorre de forma desproporcional ao aumento das taxas de resistências a múltiplas drogas. Nas últimas quatro décadas apenas cinco (05) novas classes de antimicrobianos entraram no mercado e foram adicionadas a prática clínica. (GOLAN, David E. et al. *Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara. Koogan, 2018.)

[10]. Ao pesquisar sobre o desenvolvimento de medicamentos inclusive antimicrobianos, percebe-se que a natureza representa uma fonte excepcional para pesquisas e desenvolvimento de novos compostos com ações diversas.

[11]. Os peptídeos antimicrobianos ainda são pouco empregados principalmente na área clínica e são alvo do interesse de pesquisadores. Esses peptídeos podem ser de origem natural ou sintética e a maioria dos peptídeos age atacando a membrana plasmática da célula bacteriana. Desta forma ocorre a morte celular num tempo o curtoo que O que levanta a hipótese de que são menos propensos a indução de resistência aos antibióticos convencionais. (MEMARIANI, H.; MEMARIANI, M.; ROBATI, R. M.; et al. Anti-

Staphylococcal and cytotoxic activities of the short anti-microbial peptide PVP. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 36, n. 11, p. 1–14, 2020. Springer Netherlands. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-020-02948-6>>.)

[12]. As defensinas são peptídeos de defesa do hospedeiro, e estão presentes em secreções de pele e hemolinfa de insetos. Estas poderiam ser outras fontes de substâncias contra bactérias patogênicas. Por exemplo, a peçonha de aranhas e escorpiões pode representar fonte a ser explorada para agentes antimicrobianos.

[13]. As aranhas do gênero *Loxosceles* spp. são comuns na América do Sul, incluindo o Brasil. Seu veneno (ou defensiva) foi pouco quanto ao seu potencial antimicrobiano e desenvolvimento de novas moléculas. As aranhas do gênero *Loxosceles* spp. compreendem cerca de 130 espécies, entre elas, a *Loxosceles intermedia*. Os acidentes causados por esta aranha são relativamente comuns. E causam reação local caracterizada por dermonecrose. Em raros casos pode haver uma reação sistêmica. Em geral o veneno destas aranhas é formado por peptídeos e glicoproteínas de baixo peso molecular. (GREMSKI, L. H.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V. P.; et al. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. *Toxicon*, v. 83, p. 91–120, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.02.023>>).

[14]. O volume de veneno produzido por essa aranha varia em microlitros e contém de 20 a 200 µg de proteínas no total. De acordo com Gremskiet al. 2014 a quantidade e conteúdo do veneno produzido dependerá de fatores como tamanho, sexo, estado nutricional e fatores ambientais relacionados a aranha. O grupo ICK compreende a maior parte dos compostos no veneno dessas aranhas, cerca de 95% das toxinas presentes no veneno de *Loxosceles intermedia*. (GREMSKI, L. H.;

TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V. P.; et al. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. *Toxicon*, v. 83, p. 91–120, 2014. ElsevierLtd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.02.023>>).

[15]. Com a explosão dos estudos sobre peptídeos antimicrobianos percebeu-se a necessidade de aprimorar as metodologias até então usadas. A identificação experimental é um método caro e demorado, o que impulsionou o desenvolvimento de ferramentas de triagem in silico como os algoritmos CAMPR3 e AtbPpred, ferramentas utilizadas nesta pesquisa.

[16]. O Algoritmo CAMPR3 fornece informações abrangentes sobre peptídeos antimicrobianos, incluindo a previsão e o recurso de design racional de peptídeos antimicrobianos por meio da substituição de resíduos de aminoácidos no peptídeo de interesse. MANAVALAN, B.; BASITH, S.; SHIN, T. H.; WEI, L.; LEE, G. AtbPpred: A Robust Sequence-Based Prediction of Anti-Tubercular Peptides Using Extremely Randomized Trees. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 17, p. 972–981, 2019. The Authors. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.06.024>>.

[17]. AtbPpred é uma ferramenta para a predição de peptídeos antituberculose baseado em um modelo de previsão de duas camadas. (WAGHU, F. H.; BARAI, R. S.; GURUNG, P.; IDICULA-THOMAS, S. CAMPR3: A database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. *NucleicAcidsResearch*, v. 44, n. D1, p. D1094–D1097, 2016.).

[18]. Visando aprofundar nas inovações relacionadas a peptídeos antimicrobianos derivados de veneno de aranhas o atual estado da arte foi avaliado por meio de busca de documentos patentários referentes a peptídeos antimicrobianos derivados do

veneno de aranhas. As buscas patentárias foram realizadas nas bases de dados Patentscope e do INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial).

[19]. Na base patentscope quando realizada a busca por meio do termo “PEPTIDE [AND] ANTIMICROBIAL [AND] VENOM” foram encontradas as patentes WO/2003/03567 e AU 2002363081 ambas relacionadas a peptídeos antimicrobianos do veneno da aranha *Cupienniusalei*. O documento WO/2003/03567 trata de um peptídeo inseticida e também bactericida com uma massa molecular de 3.701,25 Da que foi isolado do veneno de *Cupienniusalei* denominado CSTX-4. Os relatórios não divulgam nenhum dado de sequência aminoacídica. De acordo com o documento, a atividade antimicrobiana para o peptídeo CSTX-4 foi determinada por concentração inibitória mínima em microdiluição em caldo, frente às bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

[20]. Na mesma base de dados ao realizar a busca por meio do termo “ANTIBIOTIC [AND] PEPTIDE [AND] VENOM” foram encontradas oito (08) patentes. A patente CN1683399 descreve um peptídeo do veneno de vespa com atividade de inibição de bactérias, fungos, vírus e crescimento de células tumorais e com a vantagem de não apresentar atividade de hemólise. Os autores reivindicam seu uso na preparação de medicamentos para o tratamento de doenças infecciosas microbianas patogênicas e tumorais. Na patente CN1683399 o peptídeo foi testado frente aos microrganismos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 2592, *Pseudomonas aeruginosa* CMCCB10104, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus magisterium* e *Bacillus subtilis*. Outro documento (CN101070340) descreve um peptídeo derivado da *Vespa magnifica* Smith com atividade antimicrobiana de amplo espectro,

testada frente as bactérias *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 2592 e *Pseudomonasaeruginosa* CMCCB10104 e antitumoral, também está descrito seu método de preparação e de aplicação.

[21]. O depósito CN105456143 traz uma essência para remoção de acne contendo peptídeo antimicrobiano de veneno de cobra com base na atividade antimicrobiana de seus componentes que incluem peroxidase, fosfolipase A2, toxina de membrana e peptídeos antimicrobianos de catelicidina, identificando o peptídeo antibacteriano catelicidina-BF, derivada do veneno da cobra anelada dourada, com ação bactericida contra acne. O documento não traz uma avaliação específica da atividade antimicrobiana, apenas cita que a ação se dá contra o bacilo da acne.

[22]. O peptídeo RLL (CN111423501) do veneno de escorpião tem efeito inibitório altamente eficaz sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Salmonellatyphimurium*, com atividade hemolítica baixa.

[23]. Vejovina (MX/a/2009009090) é um peptídeo isolado e purificado do veneno escorpião *Vaejovismexicanus* que possui componentes neurotóxicos. A maioria dessas toxinas apresenta folha β pregueada, ligada a uma alfa-hélice anfipática e um fragmento emaranhado por pontes dissulfeto. A estrutura tridimensional é formada por três ou quatro dessas ligações dissulfeto, geralmente com atividade antibiótica. Porém, tóxica para organismos diferentes por causarem dano às membranas biológicas às quais se ligam. Vejovina mostrou atividade antibiótica contra *Escherichia coli*, *Enterobactercloacae*, *Klebsiellapneumoniae* e *Pseudomonasspp.*.

[24]. O peptídeo Css54 (MX343126) foi isolado e purificado do veneno do escorpião *Centruroidessuffususuffusus*. O peptídeo foi testado com *Pseudomonasaeruginosa*, *E. coli*, *Enterococcusfaecalis*,

Bacillus subtilis, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans*.

[25]. Existe ainda o peptídeo híbrido (MX2011007177) e suas variantes, sintetizado quimicamente a partir de análogos isolados do veneno do escorpião *Hadrurus gertschi* (Patente Mexicana No. 985522, julho 31, 2007) e *Vaejovismexicanus* (Pedido de Patente nº MX / a / 2009 009090, 26 de agosto de 2009) com modificações no que diz respeito ao número de aminoácidos e à natureza química dos mesmos. O documento não traz maiores informações em relação aos microrganismos em que o peptídeo foi testado.

[26]. Em relação a peptídeos antimicrobianos derivados de veneno com ação contra o gênero *Mycobacterium* spp., nenhum documento foi encontrado nas bases de patentes nacionais e internacionais.

[27]. Portanto, o estado atual do campo da presente inovação indica que foram desenvolvidas e protegidas formulações contendo peptídeos, sintéticos ou naturais, provenientes de diversas fontes, inclusive do veneno de cobras e escorpiões. Porém, não há trabalhos indicando peptídeos sintéticos baseados em proteínas de aranhas, especialmente da aranha *Loxosceles intermedia*.

Descrição da abordagem do problema técnico

[28]. A presente invenção inclui o peptídeo sintético P.LOX5 de sequência de aminoácidos (SEQ No 01) mimético ao da aranha *Loxosceles intermedia* e seu uso como agente antimicrobiano.

[29]. Desde a descoberta da Penicilina, vem surgindo linhagens bacterianas resistentes aos antibióticos disponíveis. O uso indiscriminado destes fármacos ao longo dos anos contribuiu para o surgimento destas linhagens.

[30]. Como alternativa para amenizar esse problema, o comércio de antibióticos passou a ser controlado por órgão regulador,

sendo alguns antibióticos limitados ao uso hospitalar. Surgiram ainda comitês voltados ao estudo dos microrganismos frente aos antibióticos, com o objetivo de padronizar e dar direcionamento no tratamento de pacientes com doença infecciosa e o uso coerente destes fármacos pela classe médica.

[31]. Apesar dos esforços ao longo dos anos, a resistência antimicrobiana está cada vez mais presente inclusive em infecções na comunidade. Em contrapartida, o desenvolvimento de novos antimicrobianos é um processo oneroso e lento quando comparado a evolução da resistência nos perfis de susceptibilidade de microrganismos diversos.

[32]. Cada vez mais a busca por alternativas se mostra necessária e com isso se faz notório o desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos como uma opção no desenvolvimento de novos fármacos.

[33]. Esses peptídeos podem ser desenvolvidos a partir de sequências de proteínas conhecidas, obtidas por meio de bancos de dados, utilizando algoritmos especializados em predição de atividade antimicrobiana.

[34]. Esses peptídeos podem ser então produzidos por meio de síntese química utilizando equipamentos especializados, sendo possível a otimização do tempo no processo de análise e avaliação destas moléculas.

[35]. Os peptídeos apresentam ainda a vantagem de em geral serem molécula de baixa imunogenicidade devido ao tamanho pequeno o que contribui para redução de efeitos colaterais quando utilizados como fármacos.

Descrição detalhada da Invenção

[36]. A presente invenção refere-se ao peptídeo sintético P.LOX5 (SEQ No 01) derivado de proteína presente no veneno da aranha *Loxosceles intermedia* apresentando atividade antimicrobiana.

[37]. A utilização do peptídeo P.LOX5 como antimicrobiano se dá preferencialmente contra espécies de bactéria.

[38]. O peptídeo foi desenvolvido a partir da triagem in silico das proteínas descritas no banco de dados Swiss-Prot por meio dos algoritmos CampR3 (WAGHU, F. H.; BARAI, R. S.; GURUNG, P.; IDICULA-THOMAS, S. CAMPR3: A database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research*, v. 44, n. D1, p. D1094–D1097, 2016.) e AtbPpred (MANAVALAN, B.; BASITH, S.; SHIN, T. H.; WEI, L.; LEE, G. AtbPpred: A Robust Sequence-Based Prediction of Anti-Tubercular Peptides Using Extremely Randomized Trees. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 17, p. 972–981, 2019. The Authors. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.06.024>>)

[39]. O peptídeo foi desenvolvido a partir da predição in silico dos peptídeos antimicrobianos presentes na proteína loxtox i2 da família de proteínas loxtox de *Loxosceles intermedia* descrita no banco de dados Swiss-Prot.

[40]. O peptídeo desenvolvido foi avaliado frente a diferentes espécies de bactérias. Os resultados obtidos serão detalhados nos exemplos a seguir. Exemplos de obtenção dos peptídeos (exemplos 1 e 2) e avaliações de atividade antimicrobiana (3) e de citotoxicidade (4).

Exemplo 1 – Método para obtenção e triagem do peptídeo

[41]. O peptídeo foi desenvolvido a partir da predição in silico dos peptídeos antimicrobianos presentes na proteína loxtox i2 da família

de proteínas loxtox de *Loxosceles intermedia* descrita no banco de dados Swiss-Prot.

[42]. A escolha de *Loxosceles intermedia* se deu pelo fato de ser um gênero amplamente distribuído na América do sul, e a espécie bastante comum na cidade de Curitiba em que foi realizada a pesquisa. Apoiase ao fato de haver deficiência de estudos sobre peptídeos antimicrobianos derivados da espécie. O peptídeo foi desenvolvido por meio da predição *in silico* a partir da proteína loxtox i2, trata-se de um fragmento composto por 25 aminoácidos com modificações nas posições 11, 12 e 23 o que faz com que não seja uma sequência natural (SEQ No 01).

[43]. Foi utilizada primeiramente a ferramenta *PredictAntimicrobialregionwithinPeptides* disponível em CAMPR3 – *CollectionofAnti-MicrobialPeptides* (<http://www.camp3.bicnirrh.res.in/index.php>), um algoritmo de previsão de peptídeos antimicrobianos. MANAVALAN, B.; BASITH, S.; SHIN, T. H.; WEI, L.; LEE, G. AtbPpred: A Robust Sequence-Based Prediction of Anti-Tubercular Peptides Using Extremely Randomized Trees. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 17, p. 972–981, 2019. The Authors. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.06.024>>.

[44]. Foram realizadas modificações nas sequências dos peptídeos naturais com objetivo de melhorar a atividade antimicrobiana. As modificações foram selecionadas a partir do recurso *Rational Design ofAntimicrobialPeptides* disponível em CampR3. Trata-se de um recurso de design racional de peptídeos antimicrobianos por meio da substituição de resíduos de aminoácidos no peptídeo de interesse.

[45]. Uma nova triagem específica foi realizada por meio das ferramentas AntiTB_MD e AntiTB_RD disponíveis em AtbPpred

(<http://thegleelab.org/AtbPpred/index.html>) para a predição de peptídeos antituberculose baseado em um modelo de previsão de duas camadas. WAGHU, F. H.; BARAI, R. S.; GURUNG, P.; IDICULA-THOMAS, S. CAMPR3: A database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. *NucleicAcidsResearch*, v. 44, n. D1, p. D1094–D1097, 2016.

[46]. O peptídeo selecionado (SEQ No 01) foi denominado de P.LOX5.

[47]. P.LOX5 foi avaliado quanto a homologia, relação da sequência de aminoácidos a outras patentes por meio do algoritmo BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) na base de dados "Sequência de proteínas patenteadas (pataa)". A sequência com maior similaridade apresentou 88% de identidade e 100% de cobertura (US8287860).

[48]. A Tabela 1 mostra a similaridade com sequências patenteadas e traz o resultado da busca de cinco sequências com maior similaridade. Não existe homologia com nenhuma sequência, sendo o P.LOX5 é um novo peptídeo ainda não patenteadado conferindo-lhe a condição de invenção. O que era esperado uma vez que se trata de uma sequência com base em uma sequência natural. Porém, com diversos aminoácidos modificados visando aumentar a ação antimicrobiana.

Tabela 1 – Similaridade do peptídeo P.LOX5 com sequências já patenteadas.

Descrição	Cobertura	Valor de E	Identidade
Sequência 13 da patente US8287860	100%	5e-12	88%
Sequência 30 da patente US8287860	100%	3e-08	76%
Sequência 11 da patente US8287860	100%	3e-08	76%

Sequência 28 da patente US8287860	100%	3e-08	76%
Sequência 19 da patente US8287860	84%	5e-04	71,43%

[49]. O peptídeo artificial desenvolvido P.LOX5 (SEQ No 01) foi avaliado quanto a homologia em relação a sequências naturais por meio do algoritmo Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) na base de dados "Sequências de proteínas não redundantes (nr)". A sequência com maior similaridade apresentou 88% de identidade e 100% de cobertura. A Tabela 2 traz o resultado da busca mostrando as cinco sequências naturais com maior similaridade. Não existe homologia com nenhuma sequência, sendo o P.LOX5 um peptídeo não natural.

Tabela 2 – Similaridade com sequências naturais

Organismo	Cobertura	Identidade
<i>Loxosceles intermedia</i>	100%	88%

Exemplo 2 - Método para obtenção do peptídeo

[50]. Foi realizada a síntese automatizada do peptídeo P.LOX5 baseada na técnica de síntese em suporte sólido (Resende e Soccol, 2016) utilizando o sintetizador automatizado MultiPepRSi (Intavis). A síntese foi realizada em colunas descartáveis contendo resina derivatizada como suporte sólido e utilizando aminoácidos modificados com grupos funcionais de proteção Fmoc. (Resende, Rodrigo, R. e

Soccol, Carlos, R. Biotecnologia aplicada a agro & indústria: fundamentos e aplicações. 4ª edição. São Paulo: Blucher, 2016).

[51]. O peptídeo foi quantificado por meio do kit de análise de proteínas (ThermoScientific™ MicroBCA™), que é uma formulação de ácido bicinonínico compatível com detergente para a detecção colorimétrica e quantificação de proteína total. Uma adaptação do ThermoScientific™ BCA Protein Assay Kit. O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (PIERCE BIOTECHNOLOGY. Micro BCA Protein Assay Kit. Thermo Scientific, v. product nu, n. 23235, p. 1–6, 2017).

Exemplo 3 – Método para determinação da atividade antibacteriana

[52]. A determinação da atividade antibacteriana, foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, avaliando a taxa de mortalidade celular, frente às linhagens *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 51299, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Mycobacterium tuberculosis*.

[53]. A cepa *E. faecalis* ATCC 51299, é resistente a vancomicina de acordo com certificado disponível em www.atcc.org/products/51299.

[54]. Para coco Gram positivo *S. aureus* ATCC 25923 (Figura1) e para o bacilo Gram negativo *E. coli* ATCC 25922 (Figura2) foi utilizado caldo Mueller Hinton como diluente para o preparo de uma série de soluções do peptídeo antimicrobiano.

[55]. Foram preparadas diluições sequenciais usando o método de diluição dupla em uma placa de 96 poços, sendo que cada poço contém 100 µL da solução do peptídeo. As concentrações finais testadas foram 0,25 – 0,50 – 1,0 – 2,0 – 4,0 – 8,0 – 16,0 – 32,0 e 64,0 µg/mL.

[56]. Para *M.tuberculosis* foram testadas as concentrações 8,0 – 16,0 – 32,0 e 64,0 µg/mL.

[57]. Em seguida, foi adicionado igual volume da solução bacteriana na concentração 1×10^8 , determinada de acordo com a escavanefelométrica de Mac Farland. Configurou-se como controle positivo do teste o cultivo (poço) que contém suspensão bacteriana, mas nenhum peptídeo antimicrobiano.

[58]. As placas foram Incubadas em estufa a 37 °C por 18-24 h. Passado esse tempo, para determinação da viabilidade celular bacteriana por meio de revelador MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-tetrazolium bromide), preparou-se uma solução de 5 mg/mL de MTT em água destilada, adicionou-se 10 µL da solução em cada poço e incubar a placa protegida da luz por 30 min para *S. aureus* ATCC 25923 ou *E.coli* ATCC 25922.

[59]. Passados 30 minutos foi medido o valor da absorbância no comprimento de onda de 585 nm com auxílio de um leitor de microplaca.

[60]. Para *M.tuberculosis* cepa H37Rv (Figura 3) utilizou-se caldo Midelbrook 7H9 suplementado com 10% v/v de OADC (ácido oleico-albumina-dextrose-catalase) como diluente para o preparo das soluções gradientes. As placas foram Incubadas a 37 °C por sete dias. Passado esse tempo, para determinação da concentração inibitória mínima por meio de revelador MTT, foi preparada a solução de 5 mg/mL em água destilada, adicionados 10 µL da solução em cada poço e a placa incubada protegida da luz por 24 horas. O valor da absorbância foi medido a 585 nm com um leitor de microplaca para determinação da taxa de mortalidade celular. (BRASIL. Manual Nacional de VIGILÂNCIA LABORATORIAL da TUBERCULOSE e outras MICOBACTÉRIAS. 2008).

[61]. A taxa de mortalidade de *E. coli* ATCC 25922 foi superior a 50% frente a P.LOX5 na concentração de 16 µg/mL (Figura 1).

[62]. A taxa de mortalidade de *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi superior a 50% frente a P.LOX5 na concentração de 16 µg/mL (Figura 2).

[63]. A taxa de mortalidade de *S. aureus* ATCC 25923, foi superior a 50% frente a P.LOX5 na concentração de 32 µg/mL (Figura 3).

[64]. A taxa de mortalidade de *E. faecalis* ATCC 51299, foi superior a 50% frente a P.LOX5 na concentração de 32 µg/mL (Figura 4).

[65]. A taxa de mortalidade de *M. tuberculosis* H37RV foi superior a 50% frente a P.LOX5 na concentração de 64 µg/mL (Figura 5).

Exemplo 4 - Método para determinação da toxicidade celular

[66]. Visando identificar uma possível ação citotóxica da formulação contendo o peptídeo P.LOX5, avaliou-se a viabilidade celular pelo método com reagente MTT em modelo in vitro de linhagem celular HaCat.

[67]. Uma alíquota da linhagem celular HaCat mantida a -80 °C foi re-ativada e mantida em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Os cultivos foram incubados a 37 °C em 5% CO₂ e atmosfera úmida (> 80%).

[68]. Para manutenção do cultivo e subcultivo, o meio foi descartado e o cultivo aderido foi lavado com 10 mL de solução tampão fosfato-salina (PBS), em seguida, adicionado 3mL de tripsina a 0,05% e incubado a 37 °C por 3 min para desprendimento das células aderidas na garrafa de cultura. As células liberadas com auxílio de alça e a tripsina inativada com meio RPMI suplementado (10% SFB). O conteúdo do frasco de cultivo foi transferido para um tubo de centrífuga de 15 mL estéril e centrifugado por 5 minutos a 1.500 rpm, o

sobrenadante desprezado e o pellet contendo as células foi ressuspendido em 1 mL de meio RPMI (10% SFB). Semeou-se as células em novas garrafas de cultivo de 25 mL.

[69]. Quando as células atingiram até 90% de confluência, realizou-se o desprendimento e contagem celular em câmara de Neubauer em microscópio óptico. Foram inoculadas 1×10^3 células por poço em microplacas de 96 poços com volume final de 100 μ L por poço. O cultivo em microplaca foi mantido por 24 horas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após as 24 h de incubação as placas foram analisadas por microscopia de luz invertida para avaliar se houve crescimento e aderência das células.

[70]. Ao atingir o crescimento ideal, o sobrenadante foi retirado e as células aderidas foram lavadas com solução tampão PBS a 37 °C. Aos poços da microplaca foram adicionados 100 μ L de meio RPMI suplementado com 100 μ L da solução do peptídeo ou antibiótico teste para controle da morte celular. Obtendo-se concentrações finais de 64 μ g/mL 32 μ g/mL 16 μ g/mL e 8 μ g/mL. A placa foi incubada por 24 h.

[71]. Após as 24 h de incubação e exposição ao composto alvo, o sobrenadante foi removido e as células aderidas foram lavadas com PBS a 37 °C. Adicionou-se às cavidades da microplaca 100 μ L de solução de MTT a 5 mg/mL diluído em meio. Incubou-se por 30 min ao abrigo da luz em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e então adicionado 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) e homogeneizado. A absorbância foi medida em leitor de microplacas em comprimento de onda de 585 nm.

[72]. Calculou-se o percentual de morte celular relativo a uma viabilidade de 100% para o experimento controle sem tratamento. O resultado foi expresso em % (Figura 6).

[73]. O percentual de morte celular avaliado mostrou toxicidade inferior a 10% para o peptídeo quando aplicado em células HaCat.

Descrição das figuras

[74]. Figura 1: Ação de P.LOX5 (SEQ ID No 01) contra *Escherichia coli* ATCC 25922. A figura 1 mostra o percentual de morte celular de *Escherichia coli* ATCC 25922 frente ao peptídeo P.LOX5 (SEQ ID No 01). *** representa diferença estatística ($P < 0,005$) em relação à concentração seguinte.

[75]. Figura 2: Ação de P.LOX5 (SEQ ID No 01) contra *Pseudomonasaeruginosa* ATCC 27853. A figura 2 representa o percentual de morte celular da bactéria *Pseudomonasaeruginosa* ATCC 27853 frente ao peptídeo P.LOX5 (SEQ ID No 01). *** representa diferença estatística ($P < 0,0005$) em relação a concentração seguinte.

[76]. Figura 3: Ação de P.LOX5 (SEQ ID No 01) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. A figura 3 representa o percentual de morte celular da bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente ao peptídeo P.LOX5 (SEQ ID No 01). *** representa diferença estatística ($P < 0,0005$) em relação à concentração seguinte. ** representa diferença estatística ($P < 0,005$) em relação à concentração seguinte.

[77]. Figura 4: Ação do peptídeo P.LOX5 contra *Enterococcusfaecalis* ATCC 51299. A figura 4 representa o percentual de morte celular da bactéria *Enterococcusfaecalis* ATCC 51299 frente ao peptídeo P.LOX5 (SEQ ID No 01). *** representa diferença estatística ($P < 0,0005$) em relação a concentração seguinte.

[78]. Figura 5: Ação de P.LOX5 (SEQ ID No 01) contra *Mycobacterium tuberculosis* H37RV. A figura 5 representa o percentual de morte celular da bactéria *Mycobacterium tuberculosis* H37RV frente

ao peptídeo P.LOX5 (SEQ ID No 01). *** representa diferença estatística ($P < 0,0005$) em relação a concentração seguinte.

[79]. Figura 6: Toxicidade celular de P.LOX5 (SEQ ID No 01) em células HaCat. A figura 6 representa o percentual de morte celular de células HaCat frente ao peptídeo P.LOX5 (SEQ ID No 01). * representa diferença estatística ($P < 0,05$) em relação à concentração seguinte.

Definições

[80]. O termo “antimicrobiano” ou “antibacteriano” se refere a um agente que produz efeitos bactericidas ou bacteriostáticos. (GOLAN, David E. et al. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara. Koogan, 2018).

[81]. O termo “bactericida” refere-se a fármacos que matam bactérias. (GOLAN, David E. et al. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara. Koogan, 2018).

[82]. O termo “bacteriostático” refere-se a fármacos que inibem o crescimento da bactéria sem causar a sua morte. (GOLAN, David E. et al. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara. Koogan, 2018).

[83]. 79 O termo “antibiótico” se refere a um produto natural com efeito antimicrobiano (Franco, André, S. e José Eduardo Krieger. *Manual de Farmacologia*. São Paulo: Editora Manole, 2016).

REIVINDICAÇÕES

1. Peptídeo sintético caracterizado por compreender a sequência de amino ácidos SEQ No 01, identificado como P.LOX5.
2. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser capaz de atuar como agente bactericida, bacteriostática contra espécies de bactérias gram positivas, gram negativas e incluindo *Mycobacterium tuberculosis*.
3. Peptídeo, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por ser produzido por síntese química.
4. Peptídeo, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por ser produzido por via recombinante.

DESENHOS

Figura 1 –

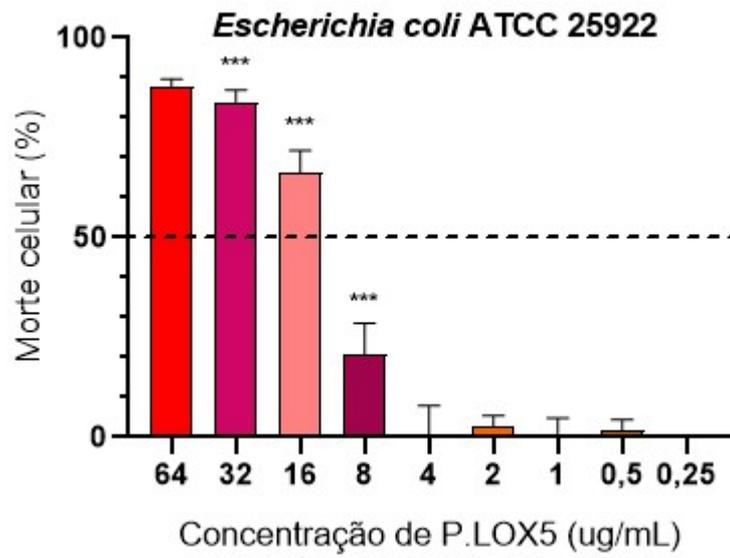


Figura 2 –

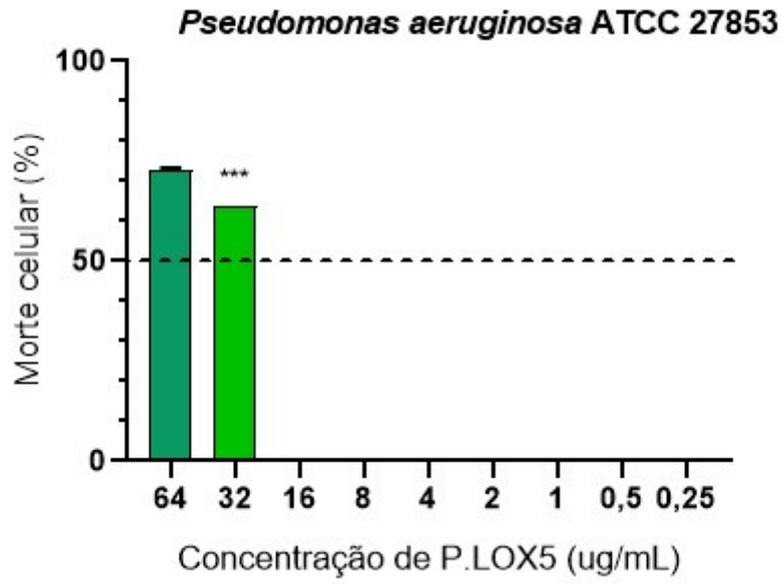


Figura 3 –

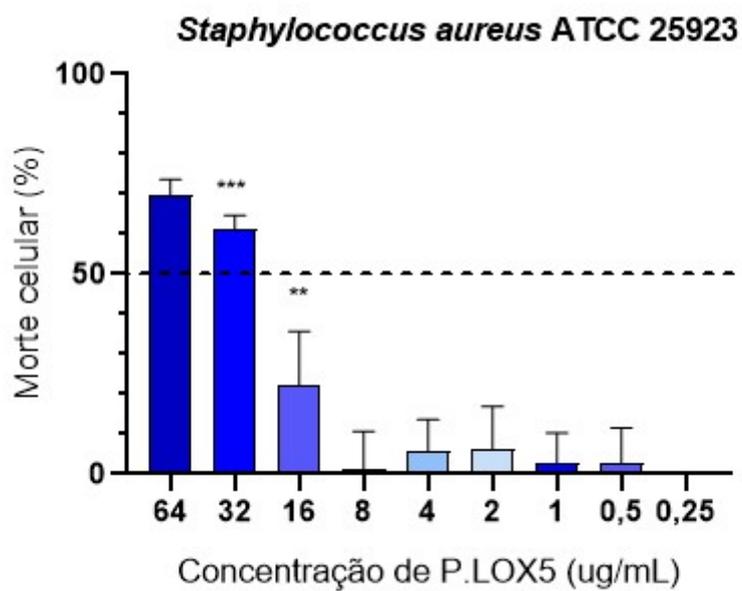


Figura 4 -

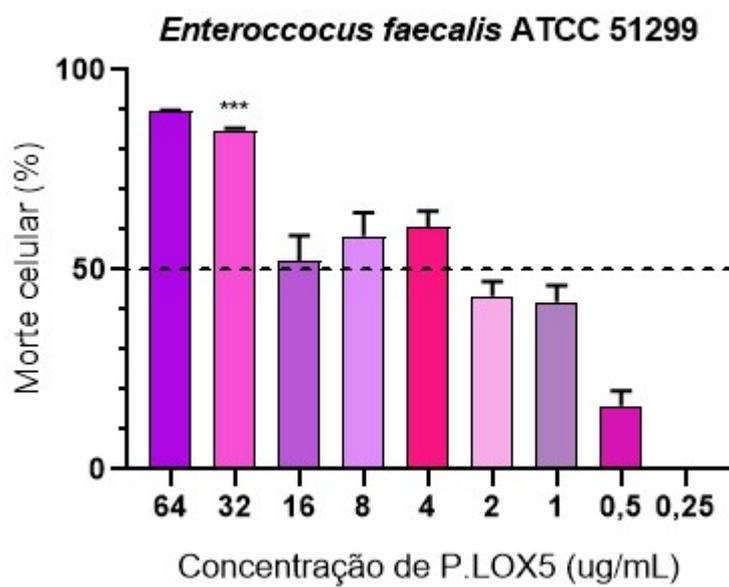


Figura 5 -

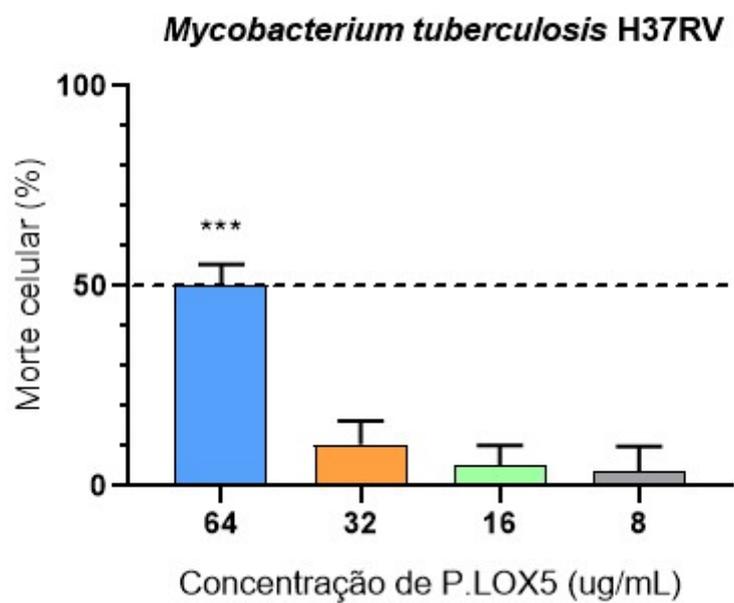


Figura 6 -

