



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 102023004066-7

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 102023004066-7

(22) Data do Depósito: 03/03/2023

(43) Data da Publicação Nacional: 20/08/2024

(51) Classificação Internacional: A61K 38/16; A61K 36/07; A61P 9/12.

(54) Título: COMPOSIÇÃO DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA BIOMASSA MICELIAL DE PLEUROTUS ERYNGII E SEU USO PARA O DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS ANTI-HIPERTENSIVOS

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA, Pessoa Jurídica. Endereço: RUA XV DE NOVEMBRO, 1299, CENTRO, CURITIBA, PR, BRASIL(BR), 80060-000, Brasileira

(72) Inventor: CARLOS RICARDO SOCCOL; RICARDO LUIZ VIEIRA; SUSAN GRACE KARP; VANETE THOMAZ SOCCOL.

Código de Controle: 5C010339D40D4E98 91252A56A74633E6

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 03/03/2023, observadas as condições legais

Expedida em: 03/12/2024

Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

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

PATENTES
ICTs



RELATÓRIO DESCRITIVO

COMPOSIÇÃO DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA BIOMASSA MICELIAL DE *Pleurotus eryngii* E SEU USO PARA O DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS ANTI-HIPERTENSIVOS

Campo da Invenção

[001]. A presente invenção está inserida no campo da biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de fármacos, e se refere a uma composição de três peptídeos, derivados da porção proteica purificada a partir do micélio cultivado de *Pleurotus eryngii* (Organismo celular; *Eukaryota*; *Opisthokonta*; *Fungi*; *Dikarya*; *Basidiomycota*; *Agaricomycotina*; *Agaricomycetes*; *Agaricomycetidae*; *Agaricales*; *Pleurotineae*; *Pleurotaceae*; *Pleurotus*), que pode ser utilizada para a produção de medicamentos aplicados à terapia de hipertensão ou mesmo em alimentos funcionais.

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[002]. De acordo com a base de dados *ourworldindata*TM, a principal causa de morte no mundo são as doenças cardiovasculares (DCV) (<https://ourworldindata.org/causes-of-death>).

[003]. Em 2019, essas doenças ceifaram a vida de quase 19 milhões de pessoas no mundo (<https://ourworldindata.org/causes-of-death#what-do-people-die-from>). As DCVs causam um prejuízo imenso por atingirem na mesma proporção a faixa etária populacional que está normalmente no auge da sua produtividade (14-49 anos). Essas doenças estão muitas vezes associadas ao consumo excessivo de sal, ou dietas ricas em sódio, amidos e gorduras saturadas, além de hábitos danosos, como sedentarismo, tabagismo e álcool, fatores genéticos ou comorbidades, como diabetes, colesterol alto e obesidade, e ainda, como resultado do estresse por fatores psicossociais ou risco ocupacional (Roth, G. A., Abate, D., Abate, K. H., Abay, S. M., Abbafati, C., Abbasi, N., ... & Abdollahpour, I. (2018). *The Lancet*, 392(10159), 1736-1788). As DCVs são

de um espectro amplo de morbidades, que culminam geralmente na morte por falência do coração, dos rins ou por acidentes vasculares. A hipertensão, ou pressão sanguínea elevada, é uma morbidade crônica e maior fator de risco relacionado com diversas destas e outras doenças, incluindo a osteoartrite (<https://doi.org/10.1038/s41584-021-00650-x>).

[004]. A hipertensão se caracteriza como uma alta pressão sistólica com valores persistentes acima de 140mmHg e uma pressão diastólica acima de 90 mm Hg (140/90). Afeta 30% da população, com cerca de 50% desses pacientes inconscientes desse problema. Vários medicamentos anti-hipertensivos estão disponíveis no mercado. A maioria das classes de medicamentos, em combinação ou não, e em doses baixas, proporciona vários benefícios nas terapias anti-hipertensivas e na prevenção de doenças renais, cardiovasculares e não vasculares como glaucoma e diabetes. As classes de anti-hipertensivos, atualmente consideradas preferenciais para o controle da pressão arterial (PA), são diuréticos (DIU), inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), bloqueadores dos canais de cálcio (BCC), bloqueadores do receptor de angiotensina (BRA) e β -bloqueadores (BB) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554579/>).

[005]. Porém, apesar do número elevado de medicamentos disponíveis no mercado para o tratamento da hipertensão, muitos deles são ineficazes e/ou apresentam efeitos colaterais adversos. Os medicamentos DIU de alça de Henle tiazídicos (que atuam no rim) são os anti-hipertensivos preferencialmente utilizados no tratamento da hipertensão arterial sistêmica (HAS). Pode haver efeitos adversos tais como depleção de fluido com desidratação e hipotensão, ototoxicidade (transitória ou não) pela inibição do transporte de eletrólitos no ouvido interno, e leve desequilíbrio eletrolítico (hipocalemia, hiponatremia, hipocalcemia). O uso excessivo pode causar grave depleção de sódio corporal. O aumento na excreção de Mg e Ca pode causar hipomagnesia e arritmias. Outros efeitos indesejáveis são as erupções cutâneas, fotossensibilidade, parestesia e depressão da medula óssea. A

furosemida (DIU), por exemplo, deve ser utilizada com precaução em doentes com hiperplasia da próstata, por condicionar risco de retenção urinária aguda. Além disso, ela não pode ser usada em pessoas já com depleção de sódio e volume. Não existem estudos sobre o seu efeito na gravidez no ser humano, mas resultados em animais de experiência mostram que não é segura, devendo ser evitada. A furosemida está contraindicada em caso de falência renal causada por fármacos nefrotóxicos ou hepatotóxicos, anúria e em casos de insuficiência renal associada a coma hepático (<https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2016.05.004>).

[006]. Os inibidores adrenérgicos atuam em receptores β -adrenérgicos e α -adrenérgicos e, geralmente, como monoterapia, apresentando efeito hipotensor discreto. Contudo, esses inibidores apresentam como principais reações adversas sonolência, boca seca, fadiga e disfunção sexual. Ainda, dependendo do inibidor de ação central usado em associação pelo paciente, este poderá provocar anemia hemolítica (ruptura das hemácias) e lesão hepática (MALACHIAS, M. V. B. et al. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 107(3):1-83, 2016).

[007]. O mecanismo anti-hipertensivo BB envolve a redução inicial do débito cardíaco e das catecolaminas, além de readaptação dos barorreceptores e redução da secreção de renina, acionando o sistema renina-angiotensina-aldosterona nos rins. São eficazes em monoterapia anti-hipertensiva, sendo a primeira opção em pacientes hipertensos que apresentam doenças coronarianas e/ou arritmias cardíacas associadas. No entanto, esses β -bloqueadores são contraindicados para asmáticos, portadores de doenças pulmonares obstrutivas crônicas (DPOC) e bloqueio atrioventricular grave e podem causar, mais frequentemente, intolerância à glicose e dislipidemias (DULIN, B. & ABRAHAM, W. T. *American Journal of Cardiology*. 93(9A):3B-6B, 2004; PEDERSEN, M. E. & COCKCROFT, J. R. *Current Hypertension Reports*. 9(4): 269-277, 2007).

[008]. Os α -bloqueadores, utilizados como monoterapia, apresentam em longo prazo efeito hipotensor discreto, necessitando, para melhor efeito, de associações com outros anti-hipertensivos. São responsáveis por melhora discreta no metabolismo lipídico e glicídico e dos sintomas de hipertrofia prostática benigna. Porém, apresentam tolerância medicamentosa, sendo necessários ajustes crescentes de doses e, além disso, dentre suas reações adversas estão: palpitações; astenia (perda ou diminuição das forças físicas); incontinência urinária; e alguns podem contribuir para insuficiência cardíaca congestiva, não sendo um medicamento de primeira escolha para hipertensos (DOUMAS, M. et al. *Asian Journal of Andrology*. 8(2):177-182, 2006).

[009]. Outra opção para o tratamento de hipertensão é a utilização de BCC, que apresentam ação anti-hipertensiva devido à redução na resistência vascular periférica, pois reduzem a concentração de cálcio nas células musculares lisas vasculares. Estudos consideram os BCC anti-hipertensivos eficazes por reduzirem tanto a morbidade como a mortalidade cardiovascular (STASSEN, J. A., et al. *The Lancet*. 350:757-764, 1997; HANSSON, L. et al. *The Lancet*. 354(9192):1751-1756, 1999; HANSSON, L. et al. *The Lancet*. 353(9153):611-616, 1999; NEAL, B.; et al. *The Lancet*, 356:1955-1964, 2000; DAHLÖF, B. et al. *The Lancet*. 366(9489):895-906, 2005). Porém, esses medicamentos provocam cefaleia, rubor facial, tontura, obstipação intestinal, depressão miocárdica e bloqueio atrioventricular, como efeitos colaterais, dentre outros.

[010]. O sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), ou simplesmente RAS, um sistema hormonal peptidérgico, é o mais conhecido e estudado grupo envolvido na regulação da pressão sanguínea, no balanço eletrolítico e no remodelamento vascular ([10.1371/journal.pone.0165371](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165371)). A renina cliva o angiotensinogênio para o decapeptídeo angiotensina I (Ang I). Subsequentemente, a clivagem de His-Leu no seu terminal carboxílico é feita pela enzima conversora de angiotensina (ECA), gerando o octapeptídeo angiotensina II (Ang II), que é a sua forma ativa, altamente vasoconstritora. A

ECA também é responsável pela inativação do peptidormônio bradiquinina, que atua como vasodilatador.

[011]. A ECA (kininase, dipeptidil carboxipeptidase, peptidil carboxihidrolase, EC 3.4.15.1) facilita a remoção de dipeptídeos e, em alguns casos, tripeptídeos a partir do terminal carboxílico de substratos compatíveis. É uma glicoproteína com 8 a 32% de carboidratos e peso molecular de 146,6 kDa. Essa ectoenzima está presente na superfície das células epiteliais e endoteliais distribuídas pelo corpo, em vários órgãos. Acreditava-se que essa conversão ocorria na corrente sanguínea, mas os níveis plasmáticos da concentração dessa enzima não seriam capazes de converter na velocidade observada. Dessa forma, suspeitou-se que essa reação deveria ocorrer em outras cavidades ou superfícies. E de fato, a constatação in vivo foi que a maior parte da conversão ocorre nos pulmões, entretanto, a conversão ainda era alta, sugerindo que esta enzima está presente também em outros sítios vasculares além dos pulmões (MOHAN K. RAIZADA, M. IAN PHILLIPS, COLIN SUMNERS (eds.) (1993) *Cellular and molecular biology of the renin-angiotensin system*, 592 pp., CRC press).

[012]. Em humanos, a ECA é expressa em duas formas distintas, uma somática, abundante, presente principalmente nos endotélios pulmonares, e a segunda, mais escassa, uma isoenzima presente apenas nos testículos. A conversão de Ang I para Ang II pela atividade somática de ECA é crucial para modular a pressão sanguínea, vasoconstrição, inflamação, proliferação celular e rearranjos vasculares ([10.1371/journal.pone.0165371](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165371)).

[013]. Além disso, outras funções de ECA têm sido descobertas recentemente, que vão muito além da sua função canônica clássica de interagir com os receptores AT1 e AT2, que basicamente operam de maneira oposta. AT2 interage com ACE2, que é a enzima crucial para controlar qualquer efeito vasoativo excessivo ou promotor de crescimento de RAAS. ECA e ACE2 operam ambas como carboxipeptidases acopladas ao endotélio, com similaridade de até 40% na sequência de aminoácidos. ACE2 cliva Ang-II para Ang-(1-7) com alta afinidade catalítica.

[014]. As principais indicações dos inibidores de ECA, ou IECA, são listadas como atenuação de certas patologias renais, doença coronária arterial, disfunção sistólica esquerda, falência cardíaca, pressão sanguínea elevada, prevenção de enxaquecas, esclerodermatite, redução do infarto do miocárdio, e redução da nefropatia diabética (<https://www.drugs.com/drug-class/angiotensin-converting-enzyme-inhibitors.html>).

[015]. Existem cerca de 10 medicamentos IECA que são os mais indicados e usados, como por exemplo, captopril, enalapril e lisinopril. Em um estudo de revisão (*SUN, W., ZHANG, H., GUO, J., et al. Comparison of the Efficacy and Safety of Different ACE Inhibitors in Patients With Chronic Heart Failure: A PRISMA-Compliant Network Meta-Analysis. Leischik. R, ed. Medicine. 2016;95(6):e2554. doi:10.1097/MD.0000000000002554.*), o IECA mais eficaz foi otrandolapril, com maior redução da pressão sistólica e diastólica. O menos eficaz foi o lisinopril, com maior associação aos índices de mortalidade.

[016]. Esses medicamentos IECA são geralmente considerados seguros, sendo contraindicados por aumentar os riscos de dano e/ou mortalidade fetal em caso de gravidez, aumentar o risco de angioedema em afrodescendentes ou fumantes, ou por causar reações anafilactóides em pessoas alérgicas a algum desses componentes.

[017]. Os efeitos adversos listados para os IECA são tosse seca persistente, visão borrada, tontura, boca seca, perda de paladar, fadiga, coceira, erupção cutânea, desordens hepáticas ou gastrointestinais tais como diarreia, náusea, falta de apetite ou obstipação, dores de cabeça, aumento dos níveis sanguíneos de potássio ou creatinina, problemas renais, dores no peito, hipotensão ou queda brusca da pressão, no caso de mudar da posição deitada para em pé, e suadouros. Existem outros efeitos adversos que podem estar incluídos em cada medicamento em particular. Alguns IECA podem ainda interagir com outros medicamentos tais como lítio ou drogas anti-inflamatórias não esteroidais, como o ibuprofeno, cetoprofeno, meloxicam, etc.

(<https://www.drugs.com/drug-class/angiotensin-converting-enzyme-inhibitors.html>).

[018]. Por causarem efeitos colaterais negativos em alguns pacientes esses medicamentos anti-hipertensivos têm contribuído para redução da adesão ao tratamento medicamentoso prescrito (*BREMNER, A. D. Cardiovascular drugs and therapy. 16:353-364, 2002; LAW, M. R.; MORRIS, J. K.; WALD, N. J. British Medical Journal. 338:2-19, 2009; TAMARGO, J., et al. Current medicinal chemistry. 22:305-342, 2015*). Dessa forma, a identificação de novas moléculas tem sido fundamental como alternativa para o desenvolvimento de fármacos com potencial terapêutico para o tratamento da hipertensão e outras doenças cardiovasculares, a exemplo dos peptídeos bioativos de origem vegetal, compostos naturais e sintéticos ou modificados (*ALUKO, R. E. Journal AOAC International. 91(4):947-956, 2008; CHEN, Z. Y. et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57:4485-4499, 2009; MANSO, M. E. G., et al. Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia. 18:151-164*).

[019]. Peptídeos têm emergido como uma alternativa terapêutica e vêm sendo explorados exponencialmente nos últimos anos, em função da sua baixa toxicidade, poder de penetração, alta especificidade e estabilidade. Essa classe de compostos possui interessantes pleiotropias, ou multifunções, em uma única sequência. Muitos dos IECA supracitados são, de fato, substâncias sintéticas derivadas de peptídeos. Adicionalmente, esses novos compostos podem servir como alternativas para o tratamento da hipertensão com menos efeitos colaterais que os anti-hipertensivos sintéticos (*CHAN, P. et al. British Journal of Clinical Pharmacology, 50(3):215-220, 2000; GREENWAY, F. et al. Medicine Review. 16:338-347, 2011*).

[020]. Peptídeos anti-hipertensivos de origem natural têm sido a classe bioativa mais pesquisada dentre esses compostos. São realizados vários métodos para a extração, purificação e triagem da bioatividade, muitas vezes demorados, caros e bastante trabalhosos. Centenas de peptídeos foram descritos e testados nas duas últimas décadas, e o avanço da base de dados do

conhecimento permitiu o desenvolvimento de métodos mais rápidos, baratos e eficazes para triagem desses compostos, principalmente pela facilidade das ferramentas de análise in silico (MINKIEWICZ *et al. Journal of AOAC International vol. 91, no. 4, 2008*). A maior fonte destes peptídeos tem sido os alimentos, com número de estudos em ordem decrescente das seguintes fontes: carne, leite, queijo e plantas alimentares de várias espécies (<http://www.uwn.cdu.pl/biochemia/index.php/pl/bioep>).

[021]. Cogumelos ou macrofungos, são uma classe de organismos cultivados em escala industrial em diversos países, especialmente como alimento, mas também como produtos medicinais. São uma importante fonte nutricional de proteínas, fibras, sais minerais, carboidratos complexos e vitaminas. Algumas espécies são responsáveis pela produção de moléculas bioativas com pronunciados efeitos medicinais. Atualmente algumas dessas moléculas já são exploradas industrialmente como farmacêuticos, cosmecêuticos ou nutracêuticos (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213434417300051>).

[022]. Peptídeos bioativos derivados de cogumelos são uma classe de compostos com potencial medicinal ainda pouco explorado, embora diversos trabalhos já tenham isolado peptídeos dos cogumelos, principalmente dos esporomas, ou órgãos reprodutivos, e pouca atenção foi dada para os compostos produzidos pelas células vegetativas, ou micélio (<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109230>).

[023]. Por exemplo, Manoharam *et al.*, em 2017 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.07.020>), isolaram peptídeos anti-hipertensivos inibidores de ECA a partir do micélio de *Pleurotus pulmonarius*. Após separações cromatográficas em coluna de exclusão de tamanho, encontraram um IC50 de 4,5 µg/mL da fração isolada. Após outras separações por eletroforese desta fração, encontraram faixas de 63, 55 e 11 kDa. Essas bandas foram submetidas a identificação proteica por MALDI-TOF MS/MS. A partir desses resultados utilizaram a base de dados BIOPEP para predição da

digestão in silico, encontrando tripeptídeos estáveis GVR, VVR, NPR e VVL. O IC50 estimado foi de 55 µg/mL, 92 µg/mL, 110 µg/mL e >250 µg/mL. Determinaram o modo de inibição de cada um destes tripeptídeos em um gráfico da cinética Lineweaver-Burk, onde GVR foi determinado como um inibidor competitivo, confirmado posteriormente pela análise de ancoragem molecular (AutoDok). Esse peptídeo também demonstrou reduzir em 33,5 mm Hg a pressão sistólica na concentração de 100 mg/kg de massa corpórea em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), sendo recomendado como novo tratamento alternativo.

[024]. Na busca pelos termos “PEPTIDES” AND “ACE” AND “PLEUROTUS” na base Patentscope não foi encontrado nenhum pedido contendo composições derivadas deste organismo. A patente PT105073 descreve a obtenção de peptídeos a partir da hidrólise do soro de leite, seguida de ultrafiltração, resultando em 15 sequências de aminoácidos, das quais 7 ainda não foram descritas nem caracterizadas ainda como IECA, as quais são reivindicadas tanto para esta finalidade terapêutica quanto outras especificadas. Nenhuma dessas sequências apresentadas têm similaridade com as pleiteadas na presente petição. O pedido PT1794189, da mesma maneira, reivindica uma composição de peptídeos obtidos por hidrólise, desta vez com uso de uma protease microbiana. A composição peptídica tem efeitos IECA e é derivada da mesma matéria prima, soro de leite. Também nenhuma das sequências apresenta similaridade com as da presente petição.

Descrição da Abordagem do Problema Técnico

[025]. A presente invenção trata de uma composição contendo peptídeos hidrolisados derivados da biomassa celular de *Pleurotus eryngii*, descritos aqui como SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 e SEQ ID No. 3, e seu uso em medicamentos ou formulações farmacêuticas para tratamento da hipertensão, dada sua atividade inibidora de ECA.

[026]. Vários medicamentos vêm sendo aplicados no tratamento da hipertensão, porém com efeitos adversos e algumas contraindicações. Muitos desses são compostos sintéticos, que apresentam certos níveis de toxicidade. Notavelmente, esses inibidores foram desenvolvidos sem o conhecimento da estrutura da ECA humana, mas foram projetados com base em uma homologia mecanicista assumida com a carboxipeptidase A. A análise da estrutura tridimensional da ECA mostra que ela tem pouca semelhança com a da carboxipeptidase A, mas se assemelha à neurolisina e à carboxipeptidase de *Pyrococcus furiosus* - metalopeptidase de zinco sem semelhança de sequência detectável com a ECA. A estrutura oferece uma oportunidade para projetar inibidores de ECA seletivos de domínio que podem exibir novos perfis farmacológicos (<https://doi.org/10.1038/nature01370>).

[027]. *Pleurotus eryngii* é um importante cogumelo produzido intencionalmente pelas suas qualidades gastronômicas. Recentemente ganhou destaque nas investigações científicas em função das inúmeras moléculas bioativas presentes que vêm sendo isoladas e descritas (<https://doi.org/10.3390/jof7030190>; <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.104965>; <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.11.014>; <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.08.005>).

[028]. Foi utilizado também no desenvolvimento de novos ingredientes para a indústria alimentícia, tal como um suplemento para farinha de pão (<https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2021.100449>).

[029]. A quantidade e qualidade da proteína produzida por este organismo o torna uma fonte interessante para prospecção de peptídeos bioativos.

[030]. A produção da biomassa por meio da fermentação submersa em meio líquido apresenta diversas vantagens em relação ao método tradicional de cultivo dos esporomas em substratos sólidos, tais como tempo reduzido, maior controle das condições e facilidade na purificação dos compostos biológicos de interesse medicinal e gastronômico (<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109665>).

[031]. O método de obtenção de peptídeos a partir da biomassa é complexo do ponto de vista de tempo despendido em trabalho, equipamentos necessários e rendimento para produção industrial.

[032]. Todavia, a partir da descoberta das composições bioativas de peptídeos e da sua identificação e sequenciamento, é possível sintetizar quimicamente peptídeos idênticos aos naturais, o que torna o processo escalonável e reprodutível.

[033]. Ainda, é possível realizar análises *in silico* de diversas bioatividades, predizendo certas características interessantes para sua exploração comercial do ponto de vista nutricional ou farmacêutico. Desta forma, peptídeos com atividades relevantes podem ser sintetizados facilmente em escala industrial, e utilizados em composições próprias tanto para alimentos funcionais quanto para medicamentos. Por exemplo, eles podem ser preparados por síntese de peptídeos em fase sólida, em que os aminoácidos individuais do peptídeo, em ordem definida, são adicionados e ligados a um primeiro aminoácido imobilizado em um suporte sólido, por exemplo, uma resina adequadamente funcionalizada. Ou ainda, os peptídeos podem ser sintetizados biologicamente por expressão celular heteróloga recombinante.

Descrição Detalhada da Invenção

[034]. A presente invenção trata de uma composição de peptídeos obtida a partir de *Pleurotus eryngii*, contendo três sequências peptídicas identificadas e caracterizadas, que pode ser utilizada para a produção de medicamentos aplicados à terapia de hipertensão ou mesmo em alimentos funcionais.

[035]. Os peptídeos são representados pelas sequências SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 e SEQ ID No. 3, e a composição pode se apresentar nas formas líquida ou sólida (liofilizada). No caso de composição líquida, os peptídeos SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 e SEQ ID No. 3 estão presentes em solução aquosa, em concentrações de 2,4 a 231 µg/mL, 2,4 a 334 µg/mL e 2,4 a 428 µg respectivamente, sendo que a composição pode conter aditivos convencionais, farmacologicamente aceitos, tais como, por exemplo, excipientes, diluentes,

aglutinantes, lubrificantes e similares. No caso de formulação sólida, os peptídeos SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 e SEQ ID No. 3 estão presentes em concentrações de 52 a 4452 µg/g, a 25 a 302 µg/g e 45 a 1645 µg/g.

[036]. Como aditivos utilizáveis, excipientes (diluentes) que podem ser usados incluem, por exemplo, lactose, amido, açúcar branco, manitol, sorbitol, sais inorgânicos, celulose cristalina e similares. Os aglutinantes que podem ser usados incluem, por exemplo, açúcar branco, glicose, amido, gelatina, carboximetilcelulose sódica, metilcelulose, goma Arábica, etilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose e similares. Os desintegrantes que podem ser usados incluem, por exemplo, croscarmelose sódica, carmelose cálcica, polivinilpirrolidona e similares. Os lubrificantes que podem ser usados incluem, por exemplo, estearato de magnésio, estearato de cálcio, talco e similares.

[037]. A dose de cada ingrediente ativo da presente invenção pode ser determinada com base na concentração conhecida de cada ingrediente ativo. Entretanto, considerando que os ingredientes ativos da presente invenção exibem um efeito sinérgico um com o outro, a dose de cada ingrediente ativo pode ser reduzida quando comparada com quando o mesmo é administrado sozinho.

[038]. A composição peptídica foi obtida a partir da biomassa celular de *Pleurotus eryngii*, produzida em fermentação submersa em meio líquido MCM (Mushroom Complete Medium), segundo Jeong et al., 2009 (*JEONG YT, JEONG SC, YANG BK, ISLAM R, SONG CH. Optimal Culture Conditions for Mycelial Growth and Exo-polymer Production of Ganoderma applanatum. Mycobiology. (2009) Jun;37(2):89-93*), com agitação orbital entre 120-146 rpm, temperatura de 24 °C, pH inicial 5,5, por 7-10 dias de incubação, preferencialmente na ausência de luz, com rendimento médio de biomassa de 6,59 g/L (base seca).

[039]. A biomassa foi separada do caldo de fermentação por filtração simples, lavada com água deionizada repetidas vezes e seca em estufa por 12-24 h, sob constante ventilação e temperatura de 40-60 °C. Após esse passo, a biomassa desidratada foi pesada em balança analítica e triturada em almofariz

e pistilo até a menor granulação possível, sendo então armazenada em freezer -20 °C até as próximas análises e extração proteica. Uma fração deste micélio (0,440 g) foi submetida a titulação pelo método Kjeldahl para determinação da concentração de nitrogênio total, cujo valor foi multiplicado pelo fator 4,38 para proteína total em fungos, com resultado de 18,614 % de proteína em base seca.

[040]. A partir desta biomassa foram extraídos, purificados, identificados, caracterizados e testados os peptídeos SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 e SEQ ID No. 3. Essas sequências foram nomeadas, na listagem de sequências, da seguinte forma: SEQ ID No 1: **seq21_Pet**; SEQ ID No. 2: **seq22_Pet** e SEQ ID No. 3: **seq23_Pet**.

Exemplo 1: Método para obtenção da composição peptídica

[041]. Para a extração proteica foi realizado o rompimento celular por ultrassom, em 20 ciclos de 30 segundos, na potência de 80W, em temperaturas de 0-5 °C, com o micélio obtido na etapa anterior, que foi ressuscitado na proporção de 1:10 em água ultrapura esterilizada, com pH previamente ajustado para 10 com NaOH. Após o rompimento celular a solução foi deixada em repouso *overnight* a 4 °C. O pH da suspensão foi novamente medido e ajustado para 10, seguido de centrifugação a 4000 rpm, por 20 min, a 4 °C.

[042]. O sobrenadante da etapa anterior foi então separado do precipitado. Esta suspensão teve o volume completado para 10 mL e o pH ajustado para 4, e novamente foi centrifugada a 4000 rpm, por 20 min, a 4 °C, de modo a precipitar a fração proteica, que foi separada do sobrenadante. O pellet proteico obtido foi liofilizado e mantido a -80 °C.

[043]. Para purificação dos peptídeos foi realizada a ressuspensão do pellet proteico liofilizado na proporção de 1:5 em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,8 (Sigma/Merck), submerso em banho ultrassônico e vórtex até a completa dissolução dos grumos visíveis. Neste ponto foi medida a concentração proteica pelo método Bradford. Após essa etapa, a suspensão foi filtrada com membrana de 0,22 µm em seringa e submetida a operações de ultrafiltração tangencial com

membranas de limiar molecular de 3 kDa, 5 kDa e 10 kDa (Cytiva, Sartorius, GE), por 20 min a 4 °C e 4000 rpm.

[044]. Os filtrados e os retentatos da etapa anterior foram separados e foi medida a concentração proteica novamente por Bradford, BCA e Lowry nas diferentes fases. O filtrado, composto de peptídeos endógenos, foi reservado, e o retentato foi submetido a hidrólise enzimática microbiana a fim de gerar novos peptídeos.

[045]. A hidrólise foi realizada com a enzima Protolicheterm – 145, uma serino protease alcalina derivada de *Bacillus licheniformis* (E.V. KOSTYLEVA, A.S. SEREDA, I.A. VELIKORETSKAYA, L.I. NEFEDOVA, A.YU. SHARIKOV, N.V. TSURIKOVA, N.S. LOBANOV, M.V. SEMENOVA, A.P. SINITSYN. *A New Bacillus licheniformis Mutant Strain Producing Serine Protease Efficient for Hydrolysis of Soy Meal Proteins. Mikrobiologiya, 2016, Vol. 85, No. 4, pp. 436–445*). A suspensão do retentato foi incubada na proporção de 0,02 g/g Enzima/Substrato. Os volumes foram misturados e agitados em vórtex por 1 min, incubados a 50 °C e foram medidas as concentrações de proteína a cada hora de digestão, até 3h, sendo interrompida com incubação em banho a 100 °C por 3 min. O grau de hidrólise (D.H.) foi calculado de acordo com:

$$D. H. = [(Conc. inicial - Conc. final)/Conc. inicial] * 100$$

[046]. O grau de hidrólise foi de 41,76 % e a concentração proteica foi de 16,12 µg/mL. Essa suspensão foi novamente submetida a operação de ultrafiltração e foi medida a concentração proteica do filtrado por Bradford. Após essa etapa, a suspensão de peptídeos < 3 kDa foi mantida em ultrafreezer a -80 °C. A curva padrão para determinação da concentração de proteína foi preparada com albumina do soro bovino (BSA, bovine serum albumine, Sigma-Aldrich). Os testes foram feitos em microplacas transparentes de 96 poços e as absorbâncias foram determinadas no aparelho Biotek® PowerWave XS, de acordo com o comprimento de onda recomendado.

[047]. As composições resultantes, de diferentes faixas de tamanho molecular, foram mantidas a -80 °C.

Exemplo 2: Método para determinação da atividade IECA

[048]. As suspensões peptídicas foram submetidas ao ensaio de inibição da enzima conversora da angiotensina. O ensaio para quantificação da inibição da atividade de ECA foi feito com o uso do kit *Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) Activity Assay Kit (Fluorometric)*, Sigma-Aldrich, Catalog Number CS0002.

[049]. O kit é baseado na clivagem de um peptídeo fluorogênico sintético, e a medida da fluorescência é resultado direto da atividade de ECA. Dessa forma, o controle positivo do kit pode ser usado como rastreador de inibidores para ECA. O alcance linear do método é de 1,5-110 mU de atividade de ECA.

[050]. Uma unidade de ECA é definida pela quantidade de enzima que libera 1 nmol de produto fluorescente a partir do substrato, em 1 min, nas condições do ensaio, a 37 °C.

[051]. Esse ensaio foi feito em um aparelho de leitura de fluorescência TECAN®- Infinite M200 (Áustria), em placa negra de 96 poços modelo Cornig™, com tampa transparente e fundo opaco, com agitação programada para reação dentro do aparelho.

[052]. O ensaio foi realizado de acordo com o manual do fabricante do *kit ACE* fluorimétrico. Os resultados foram então transcritos em uma planilha CVS Excel® fornecida pelo próprio fabricante, de onde foram construídas as curvas padrão e de cinética. A regressão linear da curva padrão e das cinéticas das amostras foram transformadas de RFU/min para nmol/min (Unidades), de acordo com a equação:

[053]. Atividade das amostras (nmol/min) = [curva amostra]/[curva padrão] x DF, onde [curva amostra] = curva amostra menos o branco da curva de amostra (RFU/nmol), [curva padrão] = curva padrão menos o branco da curva padrão (RFU/nmol) DF = fator de diluição das amostras, se não foi usado nenhum considerar 1

[054]. O resultado desse ensaio apontou inibição média de ECA de 80,16% pela composição de peptídeos endógenos, na concentração aproximada de 2,4

µg/mL. A **Tabela 1** apresenta as faixas de concentração para as quais se observou atividade de inibição de ACE.

Tabela 1 - Faixas de concentração peptídica (fase líquida em µg/mL e fase sólida em µg/g) para inibição de ACE

	Fase líquida	Fase sólida
seq21_Pet	2,4 a 230,6	52 a 4452
seq22_Pet	2,4 a 330,1	25 a 302
seq22_Pet	2,4 a 428	45 a 1645

[055]. A mesma composição apresentou poder de limpeza do radical DPPH média de 28,93 % (ação antioxidante).

Exemplo 3 – Métodos para identificação e caracterização da composição peptídica

[056]. A composição peptídica com resultado positivo para IECA foi então liofilizada e submetida a análise de identificação proteica em MALDI-TOF/MS (Bruker, Daltonics) acoplado com o software Mascot (Matrix Science Ltd., London – UK), (<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106074>). A identificação da sequência proteica foi desenvolvida a partir das bases de dados SWISSPROT e NCBI (Fungi).

[057]. Após a análise dos espectros de massa pelo MALDI-TOF/MS, foram identificadas e selecionadas as seguintes sequências: SEQ ID No. 1: fragmento composto de 22 aminoácidos, SEQ ID No. 2: fragmento de 21 aminoácidos e SEQ ID No. 3: fragmento de 8 aminoácidos. A seleção foi feita com base nos parâmetros indicados pelo software Mascot como maior probabilidade para identidade de acordo com os espectros de massa. A **Tabela 2** apresenta os

valores de bioatividades, a massa das sequências identificadas e o percentual de cobertura com outras espécies fúngicas.

Tabela 2 – Valores médios de bioatividades da composição peptídica (amostra Pet <3) e massa das sequências identificadas com o software Mascot, pelo SWISSProt e NCBI (Fungi).

Amostra	% IECA	%DPPH	Massa (Da)	Cobertura	Organismo
			2770	88%	<i>Neurospora crassa</i>
Pet<3	80,16	28,93	2638	88%	<i>Agaricus bisporus</i>
			1189	80%	<i>Agrocybe aegerita</i>

[058]. Identificadas as sequências, essas foram então submetidas a diversas análises in silico. A primeira foi a caracterização físico-química de cada uma pela ferramenta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) que permite estabelecer parâmetros que incluem o peso molecular, ponto isoelétrico (pI) teórico, composição de aminoácidos, coeficiente de extinção, meia-vida estimada, índice de estabilidade, índice alifático e hidropaticidade (GRAVY). Os resultados estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Características físico-químicas das sequências peptídicas determinadas pelo algoritmo ProtParam.

Sequências	seq21_Pet	seq22_Pet	seq23_Pet
Número de AA ¹	22	21	8
Peso Molecular ²	2059,25	1915,1	908,12
Ponto isoelétrico teórico	5,57	5,8	5,57
Coeficiente de extinção	375	375	1490

Meia-vida estimada ³	30h/20h/10h	30h/20h/10h	4,4h/20h/10h
Índice de estabilidade	57,59 (instável)	50,00 (instável)	38,35 (estável)
Sequência terminal N	S(Serina)	M (Metionina)	M (Metionina)
Índice alifático	4,55	4,76	158,75
Hidropaticidade (GRAVY)	-0,105	-0,033	1,738

¹amino ácidos; ²em Daltons; ³reticulócitos de mamífero, *in vitro*/levedura, *in vivo*/*E. coli*, *in vivo*

[059]. As sequências foram então caracterizadas quanto à existência em outros organismos pela ferramenta de homologia BLAST nr (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pelo critério “sequências de proteínas não redundantes - nr”. As sequências com maior similaridade estão apresentadas na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Similaridades BLAST nr dos peptídeos com sequências naturais

Seq	Organismo	Cobertura	Identidade
seq21_Pet	<i>Neurospora crassa</i>	95%	86,96%
	Construção sintética	95%	86,96%
	Construção sintética	90%	86,36%
	<i>Fusarium oxysporum</i>	90%	82,61%
	<i>Neurospora crassa</i>	86%	85,71%
seq22_Pet	<i>Agaricus bisporus</i>	100%	84%
	<i>Fusarium</i> sp.	100%	79,17%
	<i>Fusarium oxysporum</i>	100%	75,00%
	<i>Fusarium graminearum</i>	100%	75,00%
	<i>Neurospora crassa</i>	95%	69,57%
seq23_Pet	<i>Granulosicoccus antarcticus</i>	100%	100% (E-value 30)
	<i>Gammaproteobacteria bacterium</i>	100%	87,5% (E-value 208)
	<i>Oceanoglobus indicus</i>	100%	87,5%
	<i>Hepatitis C vírus</i> genotype a	87%	100% (E-value 290)

[060]. Essas mesmas sequências também foram analisadas pelo BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), agora pelo critério “sequência de proteínas patenteadas – pataa”. As sequências com maior similaridade estão apresentadas nas Tabelas 5, 6 e 7.

Tabela 5 – Similaridade do peptídeo seq21_Pet com sequências já patenteadas e sua aplicação de acordo com o Blast pataa.

Seq	US PATENT	cobertura	E-value	Identidade	Uso
4	4732864	90%	6e-09	86,36%	diagnóstico/terapia
1	7655620	86%	6e-09	85,71%	terapia para câncer
16	7214786	86%	6e-07	85,71%	adesivo ou copolímero
9	5466785	72%	1e-04	83,33%	vetor de transformação

Tabela 6 – Similaridade do peptídeo seq22_Pet com sequências já patenteadas e sua aplicação de acordo com o Blast pataa.

Seq	US PATENT	cobertura	E-value	Identidade	Uso
164260	7214786	100%	7e-09	75,00%	melhoramento vegetal
4	4732863	95%	1e-06	69,57%	diagnóstico/terapia
1	7655620	90%	1e-05	68,18%	terapia celular
640	8183436	95%	1e-05	70,00%	plantas transgênicas

Tabela 7 – Similaridade do peptídeo seq23_Pet com sequências já patenteadas e sua aplicação de acordo com o Blast pataa.

Seq	US PATENT	cobertura	E-value	Identidade	Uso
20	8460672	100%	14	85,71%	vacina HCV
36	5670152	100%	14	85,71%	imunológico
39	8460672	87%	14	85,71%	vacina HCV
6	5989905	100%	14	85,71%	virologia HCV

[061]. Nenhuma das sequências apresentou identidade acima de 87% com sequências naturais já depositadas, tampouco com sequências patenteadas. Dentre as sequências patenteadas, nenhuma das reivindicações é para medicamentos anti-hipertensivos. Deste modo, esta composição é inédita para a aplicação como agente anti-hipertensivo.

[062]. Foi realizada a predição para bioatividade dessas sequências individualmente, com uso de diversas ferramentas de predição disponíveis na base BIOPEP. A avaliação de atividade anti-hipertensiva por meio da inibição de ACE (AHTPin) foi realizada pela ferramenta disponível em http://crdd.osdd.net/raghava/ahtpin/large_batch.php.

[063]. As três sequências resultaram em positivo para atividade anti-hipertensiva (AHT) por inibição de ECA, com diferentes escores, apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8 – Sequências com atividade anti-hipertensiva (AHT) pelo algoritmo AHTPin.

Peptídeo	Escore SVM ^a	Predição	Peso molecular
seq21_Pet	0,38	AHT	2059,54
seq22_Pet	1,14	AHT	1915,38
seq23_Pet	0,33	AHT	908,22

a: SVM = *Supported Vector Machine*, um algoritmo usado para *Machine Learning*

[064]. Na **Tabela 9** está a indicação direta do resultado de inibição da fração peptídica menor que 3kDa (Pet <3), segundo o ensaio de fluorescência pelo kit Merck CS0002, assim como seu poder de limpeza do radical DPPH.

Tabela 9 – Valores de referência para inibição da atividade ECA pela fração peptídica <3 kDa de *Pleurotus eryngii*.

Amostra	mU amostra	mU padrão	% IECA	%DPPH
---------	------------	-----------	--------	-------

Pet<3	24,2	122	80,14	29,06
-------	------	-----	-------	-------

[065]. As sequências foram então submetidas a análises de ancoragem molecular com a enzima alvo, para realizar iterações com modelos mais energéticos e sítios de ligação. Foram utilizadas 4 ferramentas para ancoragem molecular: PEPDOK, GalaxyPepDock, CABS, ACLUSTER. O mapa de contato entre as sequências e ECA são apresentados nas **Tabelas 10, 11 e 12**, com aproximação entre os pares de resíduos menor do que 4,5 angstroms.

Tabela 10 – Mapa de contato entre o peptídeo **seq21_Pet** e ECA (Simulação pelo algoritmo CABS, disponível em <http://biocomp.chem.uw.edu.pl/CABSdock>)

Resíduo	Resíduo de interação com ECA e sua respectiva posição		
M			
G	PRO500		
D	PRO500	ARG501	THR502
C	W486		
G	W486	GLN483	SER487
C	LEU490	W486	GLN483
G	SER487	LEU490	
A			
S	PRO617		

S	PRO617	W616	LEU490		
C	W616	PRO269	LEU490	PRO617	CYS496
N	PRO617	W616			
C					
G					
S					
C					
G	ASN265	GLN262	ILE264		
S	CYS496	PRO269	ASN265	ILE270	GLY268
C	CYS496	PRO497			
S					
N	W175	PRO498	GLN262	ILE264	H263
R	H263	Y175	Y259		

Tabela 11 – Mapa de contato entre o peptídeo **seq22_Pet** e ECA, de acordo com o algoritmo CABS.

Resíduo	Resíduo e respectiva posição em ECA
---------	-------------------------------------

G

D GLNA483

C PROA500

G

C PROA497 LEUA490 CYSA496

S

G

A TRPA616

S TRP616 ASNA265 GLUA267

S PROA269

C HISA263

T ILEA264 PROA271 PROA271 CYSA496

Q PROA496 HISA273 TYRA175 LEUA274 LEUA178 PROA271 HISA263 LEUA179

C PROA498 PROA497 PROA500 VALA499

T

C PROA500

S

G

C VALA500 PROA500

G GLUA183 VALA499

K GLUA183 VALA499 ASPA187

Tabela 12 – Mapa de contato entre o peptídeo **seq23_Pet** e ECA, de acordo com o algoritmo CABS.

Resíduo Resíduo e posição em ECA

A LEU609 THR605 GLU606

Y PHE293 TRP602

A

Q SER295 PRO294 PHE293

M PRO292 GLU606 TRP602 PHE293

V ARG257 ARG253

I PRO294 VAL291

I VAL291 LEU289 ALA254 TYR250 VAL290 PRO294 PRO292 ARG257 ARG253

REIVINDICAÇÕES

1. USO DE PEPTÍDEO, ou de um conjunto de peptídeos, **caracterizado por** ser para preparar uma composição para o tratamento ou prevenção de doenças vasculares do tipo hipertensão em um indivíduo, como, por exemplo, cardiopatia hipertensiva, nefropatia hipertensiva, hipertensão secundária e hipertensão renovascular, em que o peptídeo ou o conjunto de peptídeos são selecionados a partir do grupo constituído por SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 e SEQ ID No. 3.

2. USO DE PEPTÍDEO, ou de um conjunto de peptídeos, conforme definido na reivindicação 1, **caracterizado por** ser aplicável a indivíduo humano ou animal.

3. USO DE PEPTÍDEO, ou de um conjunto de peptídeos, conforme definido em qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado pelo** fato de que a composição compreende pelo menos um peptídeo.

4. USO DE PEPTÍDEO, ou de um conjunto de peptídeos, conforme definido em qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado pelo** fato de que a composição compreende dois ou três peptídeos.

5. USO DE PEPTÍDEO, ou de um conjunto de peptídeos, conforme definido em qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado pelo** fato de que a composição compreende ainda excipientes, carreadores, diluentes ou veículos terapeuticamente aceitáveis.

6. USO DE PEPTÍDEO, ou de um conjunto de peptídeos, conforme definido em qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado por** ser para preparar uma composição em forma líquida, em solução aquosa, ou sólida, preferencialmente liofilizada.

7. USO DE PEPTÍDEO, ou de um conjunto de peptídeos, conforme definido em qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado por** ser para administração oral ou injetável.