



**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**  
MINISTÉRIO DA ECONOMIA  
**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

CARTA PATENTE Nº BR 102015013386-3

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 102015013386-3

**(22) Data do Depósito:** 09/06/2015

**(43) Data da Publicação Nacional:** 27/12/2016

**(51) Classificação Internacional:** C07K 7/06; A61K 38/08; A61K 31/43; A61P 31/04.

**(54) Título:** COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDO PEPTÍDEOS INIBIDORES

**(73) Titular:** UNIÃO BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO CATÓLICA - UBEC, Associação com intuito não econômico. CGC/CPF: 00331801000130. Endereço: QS 07 lote 01 - bloco M - sala M115 - Águas Claras, Brasília, DF, BRASIL(BR), 71950-770, Brasileira

**(72) Inventor:** OCTAVIO LUIZ FRANCO; OSMAR NASCIMENTO SILVA; ISABEL CRISTINA MARQUES FENSTERSEIFER; SIMONI CAMPOS DIAS; LUDOVICO MIGLIOLO; SANTI M. MANDAL.

**Código de Controle:** 4EDDB9161E80A505 4DCCCB208F0BF660

**Prazo de Validade:** 20 (vinte) anos contados a partir de 09/06/2015, observadas as condições legais

**Expedida em:** 15/06/2021

Assinado digitalmente por:

**Liane Elizabeth Caldeira Lage**

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

## **Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

### COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREEDENDO PEPTÍDEOS INIBIDORES

#### **Campo da Invenção**

**[0001]** A presente invenção refere-se à construção de peptídeos inibidores de  $\beta$ -lactamase, a partir do desenho racional de peptídeos, sendo utilizados no controle da resistência bacteriana aos antibióticos. Adicionalmente, a presente invenção refere-se ao emprego de peptídeos inibidores de  $\beta$ -lactamase associados a antibióticos convencionais. A invenção pode ser aplicada na indústria farmacêutica.

#### **Antecedentes da Invenção**

**[0002]** A resistência antimicrobiana não é um problema novo, mas o número de organismos resistentes e os surtos letais, atualmente, não têm precedentes (LEVY, S. B., MARSHALL, B. *Nat. Med.* 10: 122-129, 2004; SANDORA, T.J., GOLDMANN, D. A. *N Engl. J. Med.* 367: 2168-70, 2012; TURNER, C. E. et al. *J Clin Microbiol.* 51: 2089-95, 2013). Os agentes infecciosos que supostamente seriam controlados por algumas classes de antibióticos estão retornando em novas formas resistentes às terapias convencionais, tornando mais difícil o controle eficiente e estável dos microrganismos (TSE, H. et al. *J. Infect Dis.* 206: 314-54, 2012; WALKER, M.J., BEATSON, S.A. *Science.* 338: 1161-1162, 2012).

**[0003]** Entre as terapias antibacterianas, os antibióticos mais frequentemente utilizados são os lactâmicos, incluindo penicilinas, e cefalosporinas (SARRAF-YAXDI, S. et al. *J. Surg. Res.* 176: 73-78, 2012). No entanto, devido ao uso generalizado dos antibióticos lactâmicos e aos fatores genéticos e bioquímicos, a resistência bacteriana representa uma séria ameaça ao uso continuado desses antibióticos (TENOVER, F.C, HUGHES, J.M. *JAMA.* 275: 300-304, 1996).

**[0004]** O mecanismo bacteriano mais convencional de resistência aos antibióticos lactâmicos é a síntese de  $\beta$ -lactamases, que são capazes de clivar a ligação amídica do anel  $\beta$ -lactâmico, tornando esses antibióticos inefetivos (JAHNSEN, R.D. et al. *J. Med. Chem.* 55: 7253-61, 2012). Nesse contexto, uma estratégia lógica tem sido a de buscar inibidores de  $\beta$ -lactamase para atuar em associação com os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, para evitar ou reduzir a clivagem do anel  $\beta$ -lactâmico (GARY, W. et al. *Ant. Agents Chem.* 45: 3279-3286, 2001; EIDAM, O. et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109: 17448-53, 2012).

**[0005]** Com a necessidade do desenvolvimento de novas moléculas capazes de inibir a atividade de  $\beta$ -lactamases, novos estudos e estratégias vem sendo propostos. Entre os estudos podemos citar aqueles relacionados à síntese de novos peptídeos.

**[0006]** O documento CN1778916 refere-se a um gene que codifica um polipeptídeo de 16 aminoácidos, inibidor de  $\beta$ -lactamase, e a utilização de um vetor de expressão para síntese desse peptídeo. Já, a patente CN102212110 descreve um polipeptídeo contendo 10 aminoácidos apresentando atividade inibidora de  $\beta$ -lactamases. Os documentos CN103396471 e CN103588861 descrevem peptídeos com três aminoácidos (cisteína, alanina e fenilalanina) capazes de inibir a atividade de metalo- $\beta$ -lactamases. A publicação internacional CN101935341 descreve um método de obtenção de um peptídeo com sequência de 36 aminoácidos e sua aplicação na inibição de  $\beta$ -lactamases.

**[0007]** Alguns estudos revelam a identificação de mutantes da proteína inibitória de  $\beta$ -lactamase (BLIP), isoladas da bactéria *Streptomyces clavuligerus*, que alteram a afinidade de ligação a  $\beta$ -lactamases (HUANG, W. et al. *J Biol Chem.* 275: 14964-14968, 2000; YUANG, J. et al. *J Mol Biol.* 406: 730-744, 2010).

**[0008]** O documento WO2005009948 revela a construção de peptídeos, de até seis aminoácidos, com atividade contra um grande espectro de  $\beta$ -lactamases e com uma diversidade de aplicações.

**[0009]** Nenhum dos documentos citados descreve o emprego de sequências peptídicas inibidoras de  $\beta$ -lactamases, semelhantes às apresentadas na presente invenção, bem como sua associação a antibióticos.

**[0010]** Com base nos problemas acima relatados e no propósito de superá-los, a presente invenção descreve peptídeos sintéticos, denominados de dBLIP-1 e dBLIP-2, os quais apresentam atividade inibitória de enzimas  $\beta$ -lactamases em associação com antibióticos comerciais. Dessa forma, os peptídeos propostos são uma nova alternativa para o controle da resistência bacteriana aos antibióticos e abre o mercado para o desenvolvimento de novos produtos.

### **Breve Descrição das Figuras**

**[0011]** A Figura 1 apresenta os estudos de interação de dBLIP-1 e dBLIP-2 e as  $\beta$ -lactamases de duas diferentes bactérias. Complementaridade estrutural entre dBLIP-1 (a) e dBLIP-2 (b) em direção a  $\beta$ -lactamase de *Escherichia coli*. Em detalhe, as interações não covalentes (linhas pontilhadas) de dBLIP-1 (c) e dBLIP-2 (d) e o sítio catalítico da  $\beta$ -lactamase de *E. coli*. Complementaridade estrutural entre dBLIP-1 (e) e dBLIP-2 (f) com  $\beta$ -lactamase de *Staphylococcus aureus*. Em detalhe, as interações não covalentes (linhas pontilhadas) de dBLIP-1 (g) e dBLIP-2 (h) e o sítio catalítico da  $\beta$ -lactamase de *S. aureus*.

**[0012]** A Figura 2 apresenta a atividade inibitória de  $\beta$ -lactamase de *Bacillus cereus* 569 pelo uso dos peptídeos dBLIP-1 e dBLIP-2. Espectro de massa MALDI-ToF de dBLIP-1 (a) e dBLIP-2 (b) purificados. Estudo *in vitro* para inibição (IC50) da atividade de  $\beta$ -lactamase por dBLIP-1 e dBLIP-2 (c).

**[0013]** A Figura 3 mostra os dados brutos obtidos por meio do ensaio de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) para a ligação da  $\beta$ -lactamase com dBLIP-1 (a e c) e dBLIP-2 (b e d).

**[0014]** A Figura 4 apresenta os efeitos de dBLIP-1 e dBLIP-2 em camundongos, modelo *in vivo*, contra infecção de *Staphylococcus aureus*. Determinação do CFU nos grupos com *S. aureus* tratados com dBLIP-1 e 2(a), penicilina (PG) (b), ampicilina (AMP) (c) e cefotaxime (CTX) (d). Determinação

do CFU nos grupos com *E. coli* tratados com dBLIP-1 e 2 (e), penicilina (PG) (f), ampicilina (AMP) (g) e gentamicina (GEM) (h). Os resultados são mostrados como média  $\pm$  DP das triplicatas. \*p,0,05; \*\*p, 0,01; \*\*\*p, 0,001.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

**[0015]** A presente invenção se refere a novos peptídeos empregados no controle da resistência bacteriana, por meio da inibição da atividade de  $\beta$ -lactamases.

**[0016]** Para melhor entendimento da invenção, segue a definição de alguns termos.

**[0017]** O termo “ $\beta$ -lactamase” diz respeito a uma proteína sintetizada por bactérias que é capaz de inativar um antibiótico  $\beta$ -lactâmico.

**[0018]** O termo “antibiótico  $\beta$ -lactâmico” refere-se a uma classe de antibióticos que contém um anel  $\beta$ -lactâmico.

**[0019]** O termo “inibidores de  $\beta$ -lactamase” refere-se a peptídeos, com pelo menos 5 aminoácidos, capazes de inibir ou reduzir a atividade de um amplo espectro de  $\beta$ -lactamases.

**[0020]** O termo “aumentar a atividade de um  $\beta$ -lactâmico” refere-se a capacidade de um peptídeo inibidor de  $\beta$ -lactamase para aumentar a capacidade de um antibiótico de inibir a atividade bacteriana.

**[0021]** O termo “veículo farmacologicamente aceitável” refere-se a um diluente, adjuvante, excipiente ou veículo com o qual o peptídeo será administrado e que não produz uma reação adversa nociva.

**[0022]** Uma das modalidades da presente invenção descreve um peptídeo sintético inibidor de  $\beta$ -lactamase sendo representado pela sequência:

**Lys-X1-X2-X3- Glu (SEQ ID NO: 3)**, onde:

X1 é representado por Lys, Gly, Gln ou Asn;

X2 é representado por Gly ou Pro;

X3 é representado por Glu, Gly, Gln ou Asn.

**[0023]** Os peptídeos sintéticos foram racionalizados por modelagem molecular baseado no tamanho dos bolsões e as distâncias entre os resíduos de aminoácidos que compõem a tríade catalítica de  $\beta$ -lactamase e os resíduos de aminoácidos adjacentes. Os estudos de *docking* dos inibidores enzimáticos levou à construção de peptídeos curtos e flexíveis que interagem com resíduos de aminoácidos próximos a tríade catalítica de  $\beta$ -lactamase. A relação entre os peptídeos e a enzima foram amplamente coordenados e guiados *in silico* por meio do tamanho das cadeias dos resíduos de aminoácidos.

**[0024]** De forma preferencial a presente invenção utiliza os peptídeos inibidores de  $\beta$ -lactamases representados pelas sequências SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2 e são denominados de dBLIP-1 e dBLIP-2, respectivamente.

**[0025]** Em outra forma de realização a presente invenção prevê a obtenção de uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade eficaz de pelo menos um dos peptídeos inibidores de  $\beta$ -lactamase e um excipiente farmacêuticamente aceitável. Diversas são as formas que a composição farmacêutica pode assumir. Entre estas podem ser citadas: comprimidos, cápsulas, emulsão, suspensão, solução, elixir, loção, granulado ou pó. A composição farmacêutica pode ainda ser empregada em associação com antibióticos comerciais  $\beta$ -lactâmicos. A proporção recomendada é 1:10.

**[0026]** Outro aspecto da presente invenção está relacionado a um método para inibição de  $\beta$ -lactamases das classes A e C, preferencialmente da classe C, por meio do contato com um dos peptídeos inibidores.

**[0027]** A invenção descreve, ainda, o uso dos peptídeos para inibição da atividade de um microrganismo resistente a agentes antimicrobianos, por meio da administração de pelo menos um dos peptídeos selecionados de SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2 em combinação com antibióticos beta-lactâmicos. Os antibióticos podem ser selecionados entre penicilina, ampicilina, cefotaxima e gentamicina.

**[0028]** Um aspecto refere-se ao fato de que dentre os microrganismos empregados para controle da resistência aos antibióticos, incluem-se bactérias

Gram-positivas e Gram-negativas (em especial enterobactérias produtoras de ESBL) do género *Acinetobacter sp.*, *Chryseobacterium sp.*, *Citrobacter sp.*, *Edwardisiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Kluyvera sp.*, *Proteus sp.*, *Providencia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella sp.*, *Serratia sp.*, sendo preferencialmente *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

**[0029]** Os resultados obtidos mostram que os peptídeos (SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2), em combinação com antibióticos são capazes de reduzir o crescimento bacteriano. Além disso, não apresentam efeitos citotóxicos em eritrócitos e macrófagos.

### **EXEMPLOS**

**[0030]** Os exemplos a seguir são representados a fim de detalhar alguns aspectos da invenção. É importante destacar que a presente invenção não se limita aos exemplos citados, podendo ser utilizada em todas as aplicações descritas ou em quaisquer outras variações.

### **EXEMPLO 1 – INTERAÇÕES IN SILICO**

**[0031]** Cálculos de atração foram realizadas utilizando o programa AutoDock 4.2. Simulações de interação de ambos os peptídeos (dBLIP-1 e dBLIP-2) foram realizados com duas  $\beta$ -lactamases (CE 3.5.2.6), pdb 1zg4 de *Escherichia coli* e PDB 3blm de *Staphylococcus aureus* conforme apresentado na Figura 1. Todos os átomos de hidrogénio foram adicionados usando o AutoDockToo126. Mapas de grade foram calculados com 20 x 15 x 15 para ambos dBLIP-1 e -2, e testados contra enzima de *E. coli*; para a enzima de *S. aureus* a grade foi calculada com 35 x 35 x 15 para ambos dBLIP-1 e -2, e em todos os testes, o centro de espaçamento foi de 1,0 Å na fenda catalítica de ambas as enzimas. A fim de compreender a inibição competitiva em observada in vitro, a simulação foi otimizado para uma região em volta da fenda catalítica.

**[0032]** Um algoritmo genético lamarckiano foi usado como o método de pesquisa para encontrar o melhor complexo de interação peptídeo-proteína.

Cinquenta corridas de encaixe foram realizadas para cada peptídeo, onde que o máximo de liberdade de cadeias laterais foi desbloqueado devido ao comprimento dos peptídeos. As estruturas geradas foram classificadas em duas etapas: em primeiro lugar, um cluster com os melhores modelos com menor energia livre (abaixo de  $-4,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ), e em segundo lugar, com um desvio-root-mean square (RMSD), para todos os átomos entraram na fenda catalítica da serino-proteinase, mostrando tolerância de 4Å, como recomendado para o encaixe cego. O programa PyMOL <http://pymol.sourceforge.net/22> foi usado para caracterizar as interações peptídeo-proteína.

### **EXEMPLO 2 – CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA**

**[0033]** Para medir a afinidade de ligação entre  $\beta$ -lactamase com os peptídeos (dBLIP-1 e dBLIP-2), calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foi realizada utilizando Sistemas iTC200 (GE Healthcare, EUA), juntamente com as células Hastelloy® não reativas para resistência química conforme apresentado na Figura 3. Todas as amostras puras foram dissolvidas em tampão de fosfato (pH 7,5). O mesmo tampão foi desgaseificado antes da titulação, o experimento foi conduzido a temperatura ambiente. Interações entre proteínas e isotérmicas peptídeos foram medidas por titulação de mais de 20 injeções usando uma solução de 40  $\mu\text{L}$  de peptídeos (1 mM) e proteínas em células da amostra com uma concentração de 5  $\mu\text{M}$  a 200  $\mu\text{L}$ .

### **EXEMPLO 3: INIBIÇÃO DE B-LACTAMASE *IN VITRO***

**[0034]** A inibição da  $\beta$ -lactamase por dBLIP-1 e dBLIP-2 foi determinada espectrofotometricamente pela hidrólise de nitrocefina como substrato. A mistura de ensaio continha 83 mg de nitrocefina, 167 mg de BSA, glicerol a 10% e 0,30 mL ( $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de  $\beta$ -lactamase, obtidos a partir de *Bacillus cereus* 569) em um volume final de 1,5 mL de 50 mM de tampão de fosfato. B-lactamase atividade foi verificada por medição da redução da absorbância a

340 nm. Inibidores, dBLIP-1 e dBLIP-2 a várias concentrações (10 a 500 mM) foram pré-incubados com a enzima durante 10 min a 30 °C antes da adição do substrato. A percentagem de inibição foi calculada como  $100 \times [(cr) / c]$ , em que  $c$  é a atividade em amostras de controle incubadas sem inibidor e  $r$  é a atividade remanescente em amostras incubadas com inibidor (Figura 2). Os valores de IC50 são calculados para inibir 50% da atividade da enzima a partir do gráfico da percentagem de inibição versus o valor logaritmo da concentração do inibidor. Os parâmetros cinéticos foram obtidos a partir da velocidade inicial utilizando SigmaPlot versão 10.0.

#### **EXEMPLO 4: AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS**

**[0035]** A avaliação da citotoxicidade foi medida pelo ensaio de MTT. Para determinar as concentrações máximas não tóxicas de d-BLIPS livres e também combinados com antibióticos, a viabilidade celular foi posteriormente avaliada por brometode 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difenil-tetrazoliumbromide (MTT; Sigma) ( $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  em tampão fosfato salino (PBS)) em triplicata usando células RAW 264.7. Os resultados foram expressos como percentagem de cada amostra comparado ao controle negativo (tampão PBS, pH 7.4) e controle positivo [mastoparan-L ( $1-100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ )] (O'CALLAGHAN, C.H., et al. *Antimicrob Agents Chemoter.* 1: 283-288, 1972; LOPES-ABARRATEGUI, C. et al. *Biochimie.* 94: 968-974, 2012; PASUPULETI, M. et al. *PLoS One.* 4: 5285, 2009; LAAKKONEN, P. et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101: 9381-9386, 2004). A Tabela 1, a seguir, mostra a atividade citotóxica in vitro dos d-BLIPs de diferentes tratamentos contra células vermelhas do sangue de camundongos (mRBCs) e macrófagos RAW 264.7.

Tabela 1

Tratamentos ( $\mu\text{g/mL}$ )	Tipo celular	
	mRBCs	RAW 264.7
dBlip-1	>200	>200
dBlip-2	>200	>200
Penicilina G	150	150
Penicilina G + dBLIP-1	>200	>200
Penicilina G + dBLIP-2	>200	>200
Ampicilina	200	200
Ampicilina + dBLIP-1	>200	>200
Ampicilina + dBLIP-2	>200	>200
Gentamicina	150	150
Gentamicina + dBLIP-1	>200	>200
Gentamicina + dBLIP-2	>200	>200
Cefotaxime	100	100
Cefotaxime + dBLIP-1	>200	>200
Cefotaxime + dBLIP-2	>200	>200
PBS	-	-
Tampão de lise	>200	>200
Mastoparan-L	20	10

**EXEMPLO 5: MODELO MURINO DE INFECÇÃO NÃO LETAL POR *ESCHERICHIA COLI* E *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

[0036] Os camundongos receberam uma injeção intraperitoneal com  $2 \times 10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup> de *S. aureus* (ATCC33591) e  $2.5 \times 10^8$  CFU de *E. coli* 1812446, previamente cultivadas. Uma hora após a injeção, os camundongos (n = 6 / grupo) foram tratados por via intraperitoneal com dBLIP-1 e dBLIP-2 (1 mg.kg<sup>-1</sup>) em combinação com penicilina (100 e 200 mg.kg<sup>-1</sup>), ampicilina (100 e 200 mg.kg<sup>-1</sup>), ou cefotaxima (35 mg.kg<sup>-1</sup>). Os tratamentos foram realizados em intervalos de 12, 24, 48 e 72 horas, durante 7 dias. Os camundongos foram eutanasiados 7 dias após a infecção, sangue e líquido peritoneal foram coletados. Diluições seriadas das amostras foram semeadas em triplicado em ágar de sal Manitol (Himedia, Índia) e os resultados foram expressos como CFU.mL<sup>-1</sup>, conforme apresentado na Figura 4.

### Reivindicações

1. Composição farmacêutica **caracterizada por** compreender:
  - a) pelo menos um peptídeo inibidor representado pelas SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2; e
  - b) pelo menos um carreador farmacêuticamente aceitável selecionado do grupo consistindo de estearato de magnésio, amidoglicolato de sódio, sílica coloidal, anicelulose microcristalina, dióxido de titânio, hipromelose, polietilenoglicol, dimeticona, óleo mineral e petrolato branco.
2. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** apresentar-se na forma farmacêutica selecionada dentre comprimido, cápsula, elixir, solução, suspensão emulsão, loção, creme, pomada ou granulado em pó.
3. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada por** compreender adicionalmente antibióticos.
4. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada pelo** antibiótico ser penicilina, ampicilina ou cefotaxima.
5. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizada por** ser para inibição de lactamases.
6. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizada por** ser para inibição de bactérias.
7. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada pela** bactéria ser gram-negativas e gram-positivas.
8. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, **caracterizada pela** bactéria ser resistente a antibióticos lactâmicos.

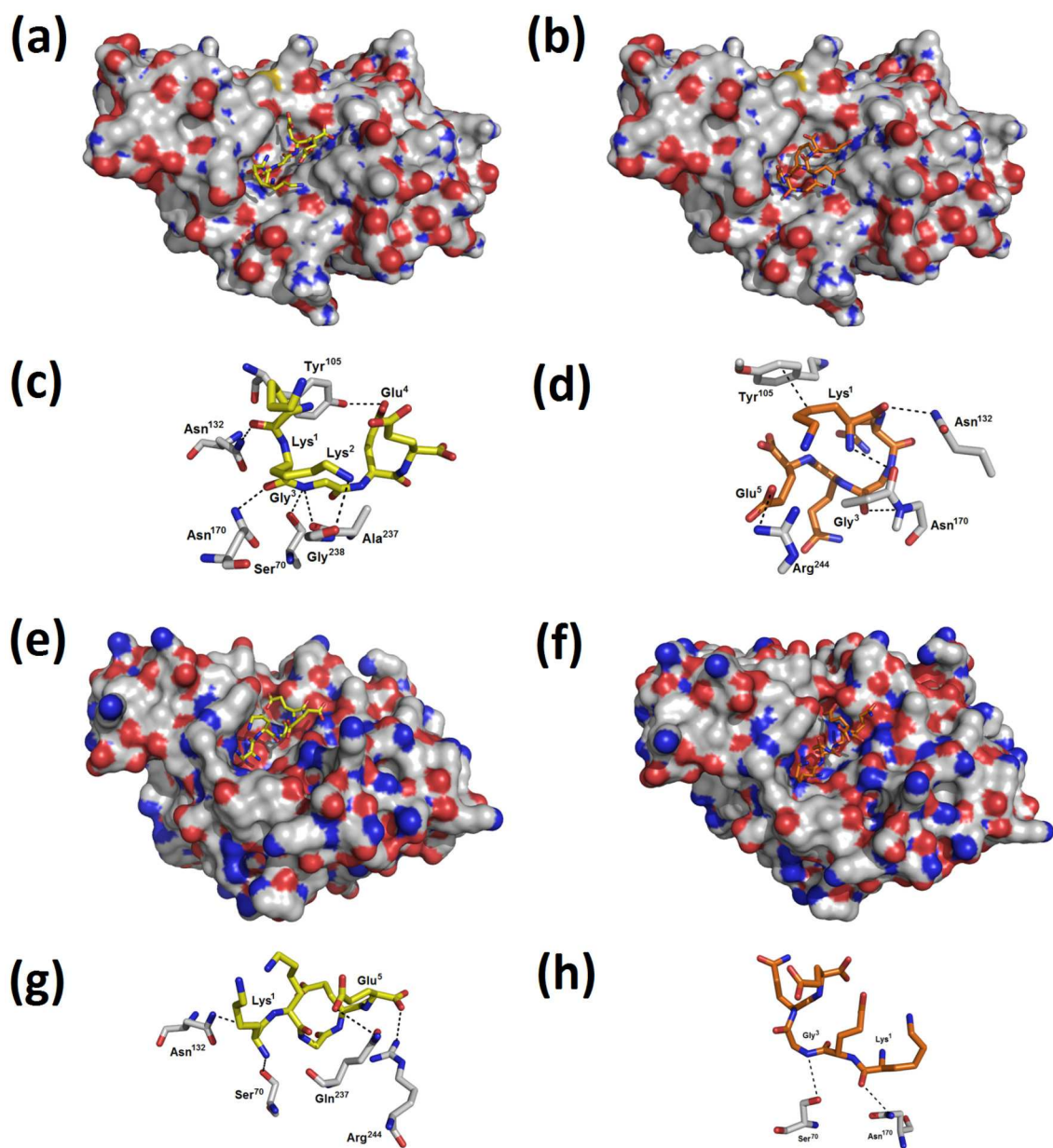
**FIGURAS**

Figura 1

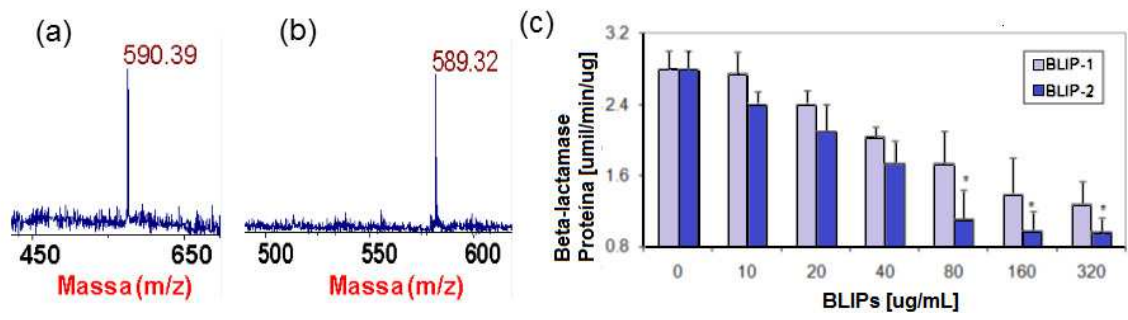


Figura 2

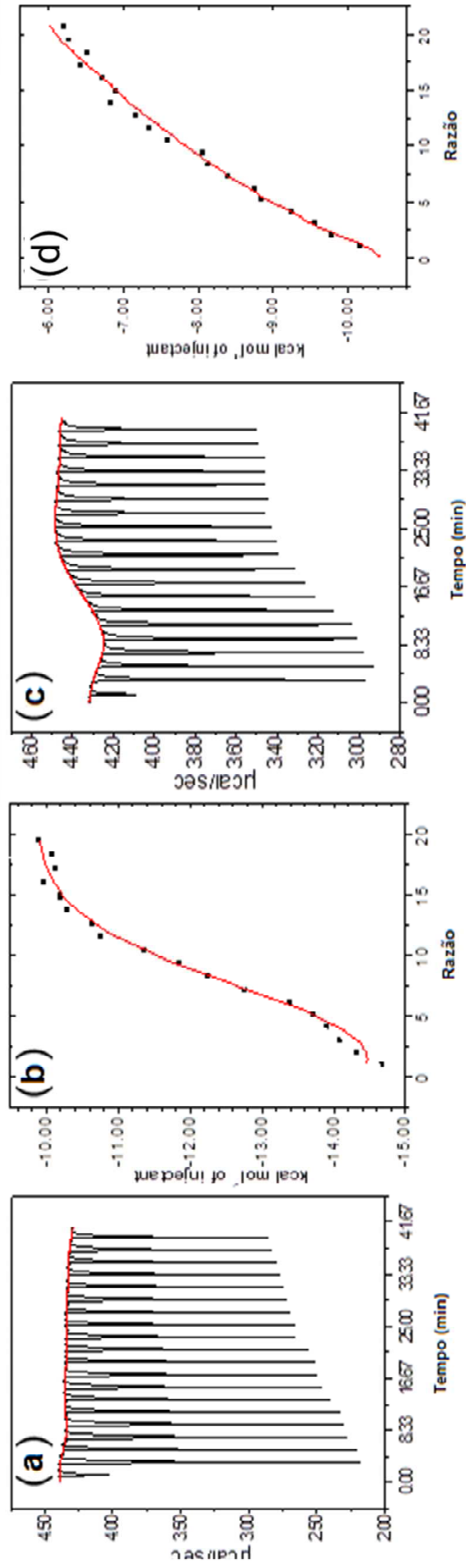


Figura 3

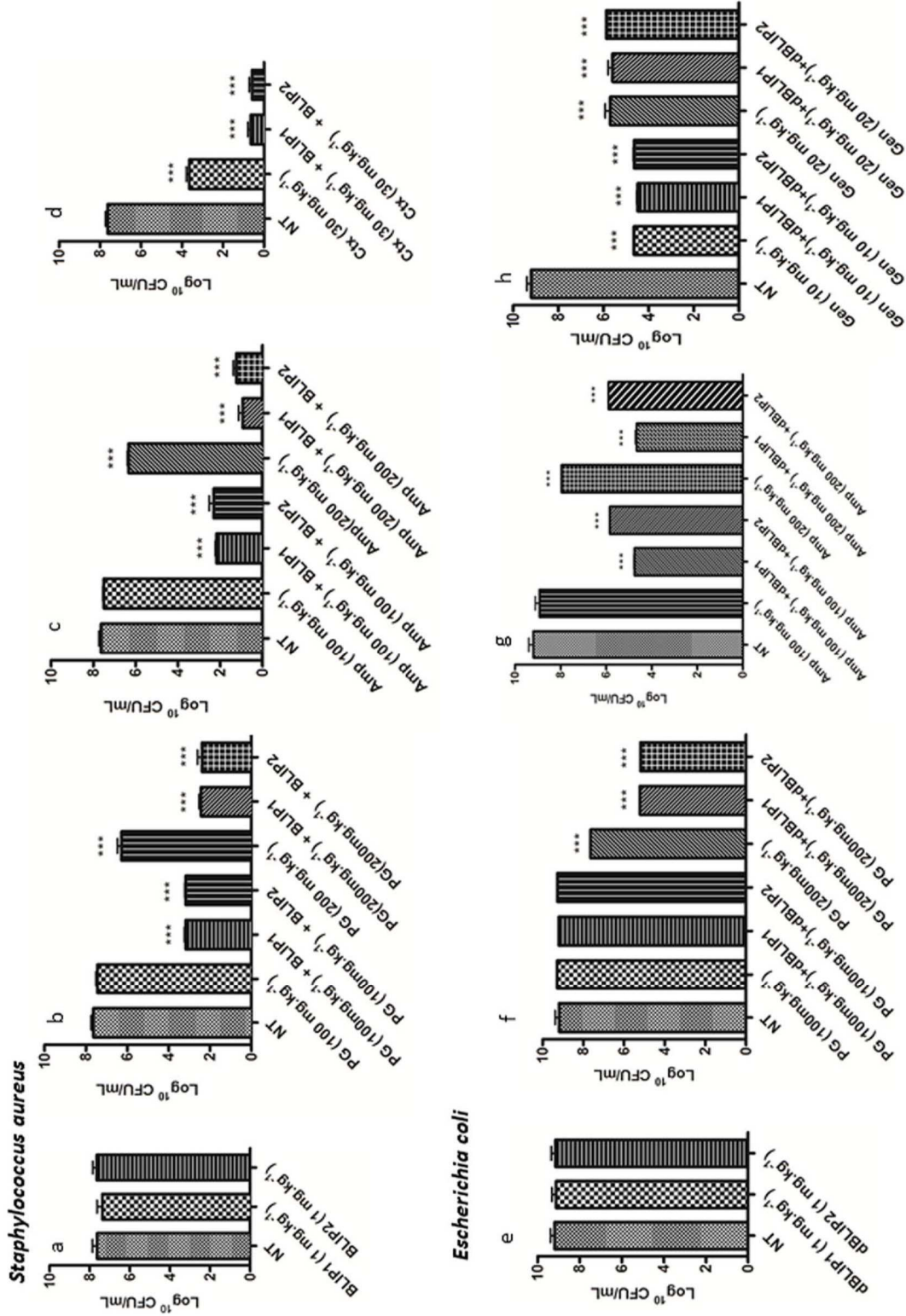


Figura 4