

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2001.07.11	(73) Titular(es): IPF PHARMACEUTICALS GMBH
(30) Prioridade(s): 2000.07.11 DE 10033505	FEODOR-LYNEN-STR. 31 30625 HANNOVER DE
(43) Data de publicação do pedido: 2003.04.09	(72) Inventor(es): WOLF-GEORG FORSSMANN DE
(45) Data e BPI da concessão: 2007.09.12	JOSE-RAMON CONEJO-GARCIA DE
091/2007	KNUT ADERMANN DE
	(74) Mandatário: PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA
	RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PROCESSO PARA OBTENÇÃO E UTILIZAÇÃO DE NOVAS DEFENSINAS HUMANAS COMO PROTEÍNAS BIOLOGICAMENTE ACTIVAS PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES E OUTRAS DOENÇAS**

(57) Resumo:

RESUMO

"PROCESSO PARA A OBTENÇÃO E UTILIZAÇÃO DE NOVAS DEFENSINAS HUMANAS COMO PROTEÍNAS BIOLOGICAMENTE ACTIVAS PARA O TRATAMENTO DE INFECCÕES E OUTRAS DOENÇAS"

A invenção refere-se aos novos peptídeos obtidos de sangue humano, hbd-5 (beta-defensina humana 5), hBD-6, hBD-7, hBD-8, hBD-10, hBD-11, hBD-12, hBD-13, hBD-14, hBD-15, hBD-16, hBD-17, hBD-18, hBD-19, hBD-20, hBD-22, hBD-23, hBD-24, hBD-25, hBD-26, hBD-27, hBD-28, hBD-29, hBD-30, hBD-31 e hBD-32 e seus derivados, cuja estrutura foi elucidada de maneira que possam ser utilizadas terapeuticamente, em diagnóstico e comercialmente como medicamentos. Os peptídeos podem ser preparados biotecnologicamente, por processos recombinantes, e síntese química bem como proteoliticamente das correspondentes proteínas precursoras.

DESCRIÇÃO

"PROCESSO PARA A OBTENÇÃO E UTILIZAÇÃO DE NOVAS DEFENSINAS HUMANAS COMO PROTEÍNAS BIOLOGICAMENTE ACTIVAS PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES E OUTRAS DOENÇAS"

A invenção refere-se ao peptídeo hBD-6 do tipo defensina humana, um processo para a obtenção de peptídeos de acordo com a invenção numa forma pura ou parcialmente purificada a partir de líquidos corporais humanos e animais, que apresentem a capacidade de evitar a invasão bacteriana em doenças inflamatórias, ácidos nucleicos, que são codificados para estes peptídeos, medicamentos contendo estes peptídeos, bem como utilizações destes peptídeos para o tratamento de diferentes doenças.

Estes peptídeos deixam-se obter, em especial, a partir de hemofiltrado ou hemodialisado de sangue humano e animal. Estas substâncias são classificadas como defensinas humanas e podem ser de utilidade como fim (1) na utilização em medicina e comercialmente como medicamento e (2) na análise de doenças.

A substância com a designação abreviada de hBD-6 (beta-defensina humana 6) foi obtida pela primeira vez a partir do hemofiltrado de doentes com doença renal, depois de ultrafiltração em aparelhos de hemodiálise, sendo caracterizada funcionalmente através de um teste de inibição antibacteriano. Para a preparação dos peptídeos de defensina foi refinado um processo patenteado (Forssmann, 1988; DE 3633707 C1), o qual foi inventado anteriormente para a obtenção de proteínas a partir de

hemofiltrados. A partir das moléculas obtidas a partir deste processo com um peso molecular abaixo de 20 kDalton, que são filtradas veno-venosa ou artero-venosamente por filtração com ligação de derivação, podem ser reconhecidas através de um teste funcional, as fracções de peptídeos contendo os peptídeos de defensina humana. O processo até agora conhecido foi utilizado de maneira a obter os extractos brutos de peptídeo, com os quais foi verificado um forte efeito, na aplicação do teste de difusão radial de LEHRER, no qual o crescimento de bactérias em cultura é fortemente inibido sob a influência desta substância.

Foi verificado, além disso, que estas actividades biológicas podiam ser concentradas em posteriores processos de purificação até que pudessem ser identificadas finalmente diferentes proteínas homogéneas e a sua estrutura elucidada. De forma vantajosa, estas substâncias podem ser purificadas a partir do hemofiltrado que foi até agora considerado sem valor para serem utilizadas como substâncias de aproveitamento económica. Os peptídeos de acordo com a invenção deixam-se obter através de síntese química e através de produção de engenharia genética, deixando-se utilizar, entre outros, como sintoma de diagnóstico pantogonómico para a análise de doenças inflamatórias do tracto gastro-intestinal, tracto respiratório extracto urogenital bem como outros órgãos epiteliais.

A presente invenção refere-se a um peptídeo com a sequência de aminoácidos

(b) hBD-6

Z_{N3}-CGYGTARCRKKCRSQEYRIGRCPNTYACC-Z_{C3}

Os seguintes quatro peptídeos não são objecto da invenção e foram apenas indicados para fins de comparação:

(e) hBD-10

-CHMQQGICRLFFCHSGEKKRGICSDPWNRRCC-

(k) hBD-16

-CWNNYVQGHCRKICRVNEVPEALCENGRYCC-

(l) hBD-17

-CWNLYGKCRYRCSKKERVYVYCINNKMCC-

(n) hBD-19

-CLMGLGRCRDHCNVDEKEIQKCKMKKCC-

em que

Z_{N3} significa um resíduo de aminoácidos ou um resíduo de peptídeo de até 30 aminoácidos, em especial o resíduo de peptídeo EFELDRI e os seus fragmentos N-terminal encurtados,

Z_{C3} significa um resíduo de aminoácidos ou um resíduo de peptídeo de até 30 aminoácidos, em especial o resíduo de peptídeo LRKWDESLNRTKP e os seus fragmentos C-terminal encurtados,

e os derivados cíclicos, amidados, acetilados, sulfatados, fosforilados, glicosilados e oxidados com actividade antibiótica, que são derivados das sequências de aminoácidos acima descritos.

Para os novos peptídeos de defensina acima descritos foi encontrada a seguinte sequência de codificação de ácido nucleico (cDNA), que é também objecto da presente invenção:

(b) hBD-6

```
CGAATTTGAATTGGACAGAATATGTGGTTATGGGACTGCCCCGTTGCCGGAAGAAATGTCGCAGC  
CAAGAATACAGAATTGGAAGATGTCCCAACACCTATGCATGCTGTTTGAGAAAATGGGATGAGA  
GCTTACTGAATCGTACAAAACCC
```

Através da análise da sequência de codificação nucleotídica foi encontrado o gene do novo peptídeo de defensina hBD-6 sobre o cromossoma 8.

Assim, é além disso objectivo da presente invenção, disponibilizar o novo peptídeo hBD-6, que é caracterizado por poder ser utilizado respectivamente como um medicamento bem acessível, com actividade biológica e terapêutica de uma substância natural.

A presente invenção disponibiliza além disso um processo para a preparação dos peptídeos de acordo com a invenção, bem como a utilização dos peptídeos de acordo com a invenção como medicamentos para diferentes indicações terapêuticas e de diagnóstico. Para este efeito os peptídeos de defensina podem ser utilizados como substâncias altamente puras ou - se suficientes para uma utilização determinada - dentro de uma mistura de peptídeos parcialmente purificada, ou como mistura de vários dos peptídeos de defensina altamente puros de acordo com a invenção.

Os peptídeos de acordo com a invenção podem ser utilizados para o tratamento de doenças que resultam da colonização de órgãos por bactérias.

Os peptídeos de acordo com a invenção podem ser utilizados, além disso, para o tratamento de doenças do organismo humano, em especial envolvendo o tracto gastro-intestinal, as vias respiratórias e o aparelho urogenital.

Os peptídeos de acordo com a invenção podem ser utilizados noutra realização da invenção, para o tratamento de doenças do organismo humano, em especial envolvendo o integumento e suas glândulas anexas.

Os peptídeos de acordo com a invenção podem também ser utilizados para o tratamento de doenças sistémicas na sobreprodução ou carência dos peptídeos de defensina, em especial através de anticorpos formados contra os peptídeos de defensina ou para a utilização na terapia de substituição.

Numa outra realização da invenção, os peptídeos de acordo com a invenção podem ser utilizados para o tratamento de doenças crónicas, parcialmente associadas com as doenças já mencionadas, utilizando estes na forma adequada para o tratamento.

Os peptídeos de acordo com a invenção podem, além disso, ser utilizados para o tratamento de doenças em estado agudo.

Os peptídeos de acordo com a invenção podem ser utilizados para o tratamento da perturbação da fertilidade, em especial em doenças associadas com perturbações de penetração dos espermatozóides com oócitos e perturbações de nidação bem como

perturbações de maturação no aparelho reprodutor masculino, bem como contraceptivo.

Os peptídeos de acordo com a invenção podem ser utilizados para o diagnóstico das doenças já mencionadas, por exemplo, preparando anticorpos contra um ou vários dos peptídeos de acordo com a invenção ou seus derivados ou seus fragmentos e medindo a concentração no sangue de um ou vários dos peptídeos de acordo com a invenção através de processos imunológicos.

A presente invenção refere-se além disso a vários processos para a preparação dos novos peptídeos de defensina de acordo com a invenção ou seus derivados, caracterizados por estes serem preparados através de uma expressão procariótica ou eucariótica, e purificados por cromatografia, bem como um outro processo para a preparação dos peptídeos de defensina ou seus derivados, por isolamento a partir de sangue humano de forma conhecida através de processos cromatográficos e finalmente um processo para a preparação dos peptídeos de defensina, ao preparar estes peptídeos de defensina através dos processos habituais da síntese em fase sólida e líquida a partir dos aminoácidos protegidos, que estão contidos na sequência indicada, desbloqueando e purificando com os processos cromatográficos habituais.

Os peptídeos de defensina são sintetizados quimicamente e preparados como medicamento. A preparação através de engenharia genética também é estabelecida utilizando vetores habituais. Por esta via, os novos peptídeos de defensina são preparados quer em organismos (1) procariotas como também (2) eucariotas. Para este efeito estão disponíveis em rotina diferentes vetores

de expressão para a expressão secretória ou directamente citoplasmática.

As preparações medicamentosas contêm um ou vários dos novos peptídeos de defensina de acordo com a invenção ou um sal fisiologicamente aceitável destes peptídeos. A forma e a composição dos medicamentos, os quais contêm um ou vários dos novos peptídeos de defensina, depende do tipo de administração. Os medicamentos contendo um ou vários dos novos peptídeos de defensina podem ser administrados de forma parentérica, intranasal, oral e por meio de inalação. De um modo preferido, estes medicamentos contendo um ou vários dos novos peptídeos de defensina são produzidos com um preparado de injeção, como solução ou como liofilisado para dissolução, imediatamente antes da utilização. As preparações medicamentosas podem, além disso, conter substâncias auxiliares, que dependem da técnica de enchimento, contribuem para a solubilidade, estabilidade ou esterilidade do medicamento ou aumentam o grau de eficácia da absorção no corpo.

A dose diária a ser administrada para os peptídeos de defensina de acordo com a invenção depende da indicação e da aplicação de determinados derivados. Para a injeção i.v./i.m. ela encontra-se na gama de 100 até 1200 unidades (μg)/dia, para a injeção subcutânea diária, de um modo preferido, de 300 - 2400 unidades (μg)/dia.

A determinação da actividade biológica para os novos peptídeos de defensina de acordo com a invenção baseia-se em medições contra preparações de referência internacionalmente utilizadas para substâncias antibióticas.

O novo peptídeo de defensina hBD-6 de acordo com a invenção é caracterizado por se adequar, em especial também, para a terapia prolongada em doenças infecciosas, uma vez que dispõe de uma extraordinária eficácia biológica e por outro lado não desenvolve, mesmo no caso de um tratamento permanente, nenhuma reacção imune.

Devido ao efeito biológico dos peptídeos de defensina de acordo com a invenção é mostrado que os preparados de acordo com a invenção são aplicáveis, além disso, como agentes para a terapia de doenças infecciosas de muitos órgãos epiteliais.

Para a determinação da actividade foram testados, a título de exemplo, os peptídeos hBD10, hBD17 e hBD19, que não são de acordo com a invenção, relativamente ao seu efeito antimicrobiano. No teste de difusão radial, puderam ser medidas as actividades dos peptídeos indicadas na tabela 1 contra diferentes estirpes de bactérias. Aqui (+) significa a formação de um halo de inibição e (-) significa nenhuma formação de um halo de inibição.

Tabela 1

	hBD10	hBD17	hBD19
<i>Escherichia coli</i>	(+)	(+)	(+)
<i>Staphylococcus carnosus</i>	(+)	(+)	(+)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(+)	(+)	(-)

Para uma determinação mais exacta da actividade antibiótica foi determinada a concentração inibitória mínima (MIC) das

defensinas acima mencionadas de acordo com métodos convencionais. Os resultados estão indicados na tabela 2, em que os valores de MIC correspondem a concentração em [µg/mL] (nd = não determinado).

Tabela 2

	hBD10	hBD17	hBD19
<i>Escherichia coli</i>	nd	nd	nd
<i>Staphylococcus carnosus</i>	<50	<25	<25
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	nd	nd	nd

Além disso, foram efectuadas análises de estrutura com o hBD16 não de acordo com a invenção. A figura 1 mostra a estrutura de RMN encontrada em solução.

A posição espacial das cisteínas Cys 6, 15, 29 e 35 mostra que as pontes formadas nestas posições não significa necessariamente uma mudança estrutural que resulta numa redução da actividade. Isto pode ser mostrado por comparação de dois padrões de pontes (figura 2).

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> IPF Pharmaceuticals GmbH

<120> Processo para a obtenção e utilização de novas defensinas humanas como proteínas biologicamente activas para o tratamento de infecções e outras doenças

<130> 011666wo

<140> PCT/EP01/07973

<141> 2001-07-11

<150> DE10033505.5

<151> 2001-07-11

<160> 78

<170> Patent In Ver. 2.1

<210> 2

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Cys Gly Tyr Gly Thr Ala Arg Cys Arg Lys Lys Cys Arg Ser Gln Glu

1

5

10

15

Tyr Arg Ile Gly Arg Cys Pro Asn Thr Tyr Ala Cys Cys

20

25

<210> 54

<211> 151

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 54

cgaatttgaa ttggacagaa tatgtgggta tgggactgcc cgttgccgga
agaaatgtcg 60

cagccaagaa tacagaattg gaagatgtcc caacacctat gcatgctggt
tgagaaaatg 120

ggatgagagc ttactgaatc gtacaaaacc c 151

Lisboa, 18 de Setembro de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Peptídeo com a sequência de aminoácidos

(bb) hBD-6

Z_{N3} -CGYGTARCRKKCRSQEYRIGRCPNTYACC- Z_{C3} ,

em que Z_{N3} significa um resíduo de aminoácidos ou um resíduo de peptídeo até 30 aminoácidos, em especial o resíduo de peptídeo EFELDRI e os seus fragmentos N-terminal encurtados e Z_{C3} significa um resíduo de aminoácidos ou um resíduo de peptídeo até 30 aminoácidos, em especial o resíduo de peptídeo LRKWDESLNRTKP e os seus fragmentos C-terminal encurtados.

2. Peptídeo de acordo com a reivindicação 1, em que o peptídeo é um derivado cíclico, amidado, acetilado, sulfatado, fosforilado, glicosilado ou oxidado que deriva das sequências de aminoácidos descritas na reivindicação 1 e apresenta actividade antibiótica.
3. Processo para a preparação dos peptídeos de defensina ou seus derivados de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 até 2, caracterizado por se preparar estes através de uma expressão procariota ou eucariota e se purificar.
4. Processo para a preparação dos peptídeos de defensina ou seus derivados de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 até 2, caracterizado por se isolar de forma conhecida os peptídeos a partir de sangue humano

através de processos cromatográficos habituais em si conhecidos.

5. Processo para a preparação dos peptídeos de defensina ou seus derivados de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 até 2, caracterizado por se preparar os peptídeos de defensina ou seus derivados através dos processos habituais da síntese química em fase sólida e líquida a partir dos aminoácidos protegidos que estão contidos nas sequências indicadas de acordo com a reivindicação 1, desbloqueando e purificando por meio de processos em si conhecidos.
6. Medicamento contendo um ou vários dos peptídeos de defensina ou seus derivados de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 até 2 como substância activa a par de substâncias auxiliares e aditivos habituais.
7. Utilização de um ou vários dos peptídeos de defensina ou seus derivados de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 até 2, para a preparação de um medicamento para o tratamento de doenças que resultam da colonização dos órgãos por bactérias.
8. Utilização de um ou vários dos peptídeos de defensina ou seus derivados de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 até 2, para a preparação de um medicamento para o tratamento de doenças do organismo humano, em especial, envolvendo o tracto gastro-intestinal, vias respiratórias e tracto urogenital.

9. Utilização de um ou vários dos peptídeos de defensina ou seus derivados de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 até 2, para a preparação de um medicamento para o tratamento de doenças do organismo humano, em especial envolvendo o tegumento e suas glândulas anexas.
10. Utilização de um ou vários dos peptídeos de defensina ou seus derivados de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 até 2, para a preparação de um medicamento para o tratamento de doenças sistêmicas na sobreprodução ou carência dos peptídeos de defensina, em especial, através de anticorpos formados contra os peptídeos de defensina ou para a utilização dos peptídeos de defensina de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 até 2 para a preparação de um medicamento para a terapia de substituição.
11. Utilização de um ou vários dos peptídeos de defensina ou seus derivados de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 até 2, para a preparação de um medicamento para o tratamento de doenças crônicas, parcialmente associadas com doenças de acordo com as reivindicações 7 até 10, em que é utilizado na forma adequada para a preparação de um medicamento para o tratamento.
12. Utilização de um ou vários dos peptídeos de defensina ou seus derivados de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 até 2, para a preparação de um medicamento para o tratamento de doenças agudas de acordo com as reivindicações 7 até 11, em que é utilizado na forma adequada para a preparação de um medicamento para o tratamento no tratamento intensivo destas doenças.

13. Utilização de um ou vários dos peptídeos de defensina ou seus derivados de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 até 2, para a preparação de um medicamento para o tratamento da perturbação da fertilidade, em especial em doenças associadas com perturbações de penetração dos espermatozóides com oócitos e perturbações de nidação bem como perturbações de maturação no aparelho reprodutor masculino, bem como como contraceptivo.
14. Utilização de um ou vários dos peptídeos de defensina ou seus derivados de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 até 2, para o diagnóstico de doenças *in vitro*, em especial de acordo com as reivindicações 7 até 13, em que são preparados anticorpos específicos contra um ou vários dos peptídeos de defensina ou seus derivados de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 até 2 e a concentração no sangue de um ou vários dos peptídeos de defensina de acordo com uma das reivindicações 1 até 2 é medida através de processos imunológicos.
15. Utilização de um ou vários dos peptídeos de defensina ou seus derivados de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 até 2, para a preparação de um medicamento em diferentes formas de aplicação galénica, em especial na forma liofilizada, incorporada em manitol em ampolas esterilizadas para a dissolução em solução salina fisiológica e/ou soluções de infusão para injeções individuais repetidas e/ou infusão prolongada em quantidades de 300 microgramas até 300 miligramas de um vários dos peptídeos de defensina de acordo com a reivindicação 1 por unidade terapêutica.

16. Utilização das sondas genéticas ou genes derivados dos peptídeos de defensina de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 até 2, para a preparação de um medicamento para a terapia genética local ou sistémica das indicações de acordo com uma das reivindicações 7 até 13 em tecidos e órgãos epiteliais.
17. Sequência de ácido nucleico codificadora de um ou vários dos peptídeos de defensina ou seus derivados de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 até 2.
18. Ácido nucleico com a sequência

```
CGAATTTGAATTGGACAGAATATGTGGTTATGGGACTGCCCCGTTGCCGGAAGAAATGTC  
GCAGCCAAGAATACAGAATTGGAAGATGTCCCAACACCTATGCATGCTGTTTGAGAAAA  
TGGGATGAGAGCTTACTGAATCGTACAAAACCC
```

codificadora do peptídeo de defensina hBD-6.

Lisboa, 18 de Setembro de 2007