



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0621148-8 A2**

(22) Data de Depósito: 29/12/2006
(43) Data da Publicação: 29/11/2011
(RPI 2134)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/47

(54) Título: POLIPEPTÍDEO PURIFICADO, MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLÉICO ISOLADA, CÉLULA ISOLADA, MÉTODO PARA PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO, COMPOSIÇÃO, MÉTODOS PARA INIBIR O CRESCIMENTO MICROBIANO, ARTIGO MANUFATURADO E ANTICORPO PURIFICADO

(30) Prioridade Unionista: 29/12/2005 US 60/754,878

(73) Titular(es): KANSAS STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION

(72) Inventor(es): FRANK BLECHA, MARIA TERESA ORTEGA, TONATIUH MELGAREJO, YONGMING SANG

(74) Procurador(es): Carolina Nakata

(86) Pedido Internacional: PCT US2006049637 de 29/12/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/076162de 05/07/2007

(57) Resumo: POLIPEPTÍDEO PURIFICADO, MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLÉICO ISOLADA, CÉLULA ISOLADA, MÉTODO PARA PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO, COMPOSIÇÃO, MÉTODOS PARA INIBIR O CRESCIMENTO MICROBIANO, ARTIGO MANUFATURADO E ANTICORPO PURIFICADO. A invenção refere-se aos polipeptídeos antimicrobianos catelicidina relacionado a um peptídeo de 38 aminoácidos tendo a SEQ ID No: 4. A invenção fornece polipeptídeos que possui atividade antimicrobiana de amplo espectro, ácidos nucléicos e expressão de vetores que codificam esses polipeptídeos, bem como células hospedeiras e métodos para reduzir a sobrevivência de um micróbio. Além disso, a invenção fornece também composições, bem como artigos manufaturados, que compreendem um polipeptídeo antimicrobiano de amplo espectro.

**“POLIPEPTÍDEO PURIFICADO, MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLÉICO
ISOLADA, CÉLULA ISOLADA, MÉTODO PARA PRODUZIR UM
POLIPEPTÍDEO, COMPOSIÇÃO, MÉTODOS PARA INIBIR O
CRESCIMENTO MICROBIANO, ARTIGO MANUFATURADO E ANTICORPO
PURIFICADO”**

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDO RELACIONADO

O presente pedido reivindica o benefício de prioridade do pedido de patente provisório 60/754.878, depositado em 29 de dezembro de 2005, sendo que os ensinamentos do mesmo são incorporados a presente invenção por referência.

ESCLARECIMENTOS RELACIONADOS À PESQUISA PATROCINADA PELO GOVERNO

FEDERAL

O trabalho relacionado ao presente pedido encontra suporte por concessão do governo dos EUA (N.I.H. número de concessão P20 RR016475 e P20 RR017686). Desta forma, o governo pode possuir determinados direitos sobre a invenção.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Antimicrobianos são medicamentos vitais para o tratamento de infecções em humanos. Os antimicrobianos são também amplamente utilizados em animais domésticos e produção de peixe e plantas. Em animais, os antimicrobianos são utilizados para o tratamento de infecções e, profilaticamente, para a prevenção de doenças. Adicionalmente, doses sub-terapêuticas de antimicrobianos são utilizadas como promotores do crescimento. O resultado do uso difundido de antimicrobianos é responsável pelo aumento na prevalência de patógenos resistentes, levando à insuficiência terapêutica em humanos e animais. Desta forma, existe uma necessidade em desenvolver agentes antimicrobianos novos e eficazes.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece um polipeptídeo de catelicidina purificado, um fragmento do mesmo, uma variante do mesmo ou um fragmento da variante, que possui ampla atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, bem como leveduras e protozoários (definidos a seguir como "micróbio" ou "microorganismo"). Desta forma, o polipeptídeo purificado, sua variante ou fragmento do mesmo, ou uma molécula de ácido nucléico isolada, que codifica qualquer um destes, pode ser utilizado para inibir ou prevenir o crescimento de um microorganismo. Em uma realização, o polipeptídeo purificado, sua variante ou fragmento do mesmo, ou uma molécula de ácido nucléico isolada, que codifica qualquer um destes, pode ser utilizado para tratar ou prevenir uma doença, tal como intoxicação alimentar (*food-borne illness*) ou uma doença sexualmente transmissível, por exemplo, por membros do gênero *Trichomonas* e/ou *Neisseria*. Conforme descrito a seguir, a atividade antimicrobiana de um polipeptídeo da invenção, sua variante ou fragmento do mesmo, pode ser dependente de sal. Adicionalmente, em uma realização, o polipeptídeo da presente invenção, sua variante ou fragmento do mesmo, possui ainda uma atividade hemolítica mínima. Em uma realização, a presente invenção fornece um polipeptídeo purificado que compreende a SEQ ID NO: 4, uma variante de SEQ ID NO: 4 que possui pelo menos 15%, ou seja, pelo menos 20%, 30%, 40%, 50%, 70% ou mais, por exemplo, 80%, ou 90%, de identidade de seqüência de aminoácido com a seqüência SEQ ID NO: 4, ou um fragmento do mesmo, que possui pelo menos 15 aminoácidos contíguos, em que o polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo, possui atividade antimicrobiana.

Desta forma, a presente invenção fornece ainda uma molécula de ácido nucléico isolada, bem como um vetor de expressão, que codifica um polipeptídeo antimicrobiano da invenção, sua variante ou fragmento do mesmo;

uma célula isolada que contém a mencionada molécula de ácido nucléico e/ou o vetor de expressão; uma composição que contém uma molécula de ácido nucléico ou um polipeptídeo da invenção, sua variante ou fragmento do mesmo; e um artigo manufaturado que contém uma molécula de ácido nucléico ou um polipeptídeo da invenção, sua variante ou fragmento do mesmo. A presente invenção fornece adicionalmente um método de produção de um polipeptídeo antimicrobiano, sua variante ou fragmento do mesmo, bem como um método de redução ou inibição do crescimento de um microorganismo, utilizando uma molécula de ácido nucléico isolada que codifica um polipeptídeo antimicrobiano, sua variante ou fragmento do mesmo, ou um polipeptídeo antimicrobiano, sua variante ou fragmento do mesmo.

Em uma realização, a presente invenção fornece uma molécula de ácido nucléico isolada, que inclui uma seqüência de nucleotídeos que possui pelo menos 70%, por exemplo, 80%, 90%, 95% ou 100%, de identidade de seqüência de ácido nucléico à seqüência SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, ou uma variante degenerada da mesma.

Em outra realização, a presente invenção fornece uma molécula de ácido nucléico isolada, que possui uma seqüência de nucleotídeo que se hibridiza sob condições altamente estringentes, ou condições moderadamente estringentes, à sonda de hibridização que possui uma seqüência de nucleotídeo que é complementar a região de codificação da SEQ ID NO: 3, ou um fragmento da mesma, que apresenta pelo menos 15 nucleotídeos, por exemplo, pelo menos 100 nucleotídeos de comprimento.

Em uma realização, a presente invenção fornece uma molécula de ácido nucléico isolada, que possui uma seqüência de nucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui a SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 4, ou um fragmento de SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 4, que tem pelo menos 15 aminoácidos de comprimento, e possui atividade antimicrobiana. Em algumas

realizações, o fragmento de SEQ ID NO: 2 possui pelo menos 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ou mais do que 50 aminoácidos de comprimento. Em outra realização, o fragmento de SEQ ID NO: 4 possui pelo menos 20, 25, 30, mais do que 30 aminoácidos de comprimento. Em algumas realizações, o fragmento
5 possui atividade antimicrobiana, e/ou ele é imunogênico, imunorregulatório ou ambos, imunogênico e imunorregulatório.

Em outra realização, a presente invenção fornece um vetor de expressão que contém uma molécula de ácido nucléico que codifica o polipeptídeo da presente invenção, sua variante ou fragmento do mesmo. Em
10 outra realização, a presente invenção fornece uma célula isolada que contém a molécula de ácido nucléico da presente invenção, por exemplo, um operacionalmente ligado a uma seqüência de controle de expressão. Em algumas realizações, a célula isolada expressa o polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo. Em uma realização, o polipeptídeo, sua variante ou
15 fragmento do mesmo, é purificado a partir de célula ou meio celular.

Em outra realização, a presente invenção fornece um polipeptídeo purificado que é biologicamente ativo e possui uma seqüência de aminoácidos de pelo menos 15, por exemplo, 20, resíduos consecutivos da SEQ ID NO: 2, que é pelo menos 15 % idêntica à SEQ ID NO: 4; ou se liga a um anticorpo que
20 liga especificamente SEQ ID NO: 4. Em algumas realizações, o polipeptídeo possui a SEQ ID NO: 2 ou 4. Em algumas realizações, o polipeptídeo possui a SEQ ID NO: 2 ou 4. Em algumas realizações, o polipeptídeo possui 1, 2, 3, 4, 5, ou 10, ou mais, por exemplo, 20 substituições de aminoácidos conservativas relativas à SEQ ID NO: 4.

25 Em outra realização, a presente invenção fornece uma composição que compreende o polipeptídeo da invenção, sua variante ou fragmento do mesmo. Em algumas realizações, a composição compreende adicionalmente um carreador farmacologicamente aceitável ou um aditivo

alimentício.

Em outra realização, a presente invenção fornece um método para a redução ou inibição do crescimento ou sobrevivência de um micróbio. O método inclui colocar o micróbio em contato com o polipeptídeo da presente invenção, sua variante ou fragmento do mesmo, ou com uma composição que
5 compreende o polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo, ou uma molécula de ácido nucléico que codifica o polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo.

Em outra realização, a presente invenção fornece um método de
10 redução ou inibição do crescimento ou sobrevivência de um micróbio em um vertebrado, tal como mamífero, peixe ou pássaro, ou em um meio, tal como meio aquoso ou fechado, capaz de suportar o desenvolvimento ou sobrevivência de um micróbio. O método inclui colocar o vertebrado ou meio em contato com uma quantidade eficaz de um polipeptídeo da invenção, sua
15 variante ou fragmento do mesmo, ou uma molécula de ácido nucléico que codifica o mencionado polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo.

Em outra realização da presente invenção, é fornecido um método de tratamento de uma doença por intoxicação alimentar (*food-borne illness*) ou uma doença sexualmente transmissível, tal como sífilis, clamídia, gonorréia,
20 tricomoníase ou sapinho. O método inclui a administração de uma quantidade eficaz de um polipeptídeo da presente invenção, sua variante ou fragmento do mesmo, ou uma molécula de ácido nucléico que codifica o mencionado polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo, a um vertebrado.

Em uma realização, a presente invenção fornece um método de
25 redução de contaminação microbiana dos alimentos, ou aumento de vida útil de um um alimento perecível, utilizando uma quantidade eficaz de um polipeptídeo da presente invenção, sua variante ou fragmento do mesmo.

Em uma realização adicional, a presente invenção fornece um

artigo manufaturado que inclui um recipiente e o polipeptídeo da invenção, sua variante ou fragmento do mesmo, ou uma molécula de ácido nucléico que codifica o mencionado polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo. Em uma realização, o artigo manufaturado compreende material de embalagem e, contido no material de embalagem, o polipeptídeo da presente invenção, sua variante ou fragmento do mesmo, ou uma molécula de ácido nucléico que codifica o mencionado polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo, em que o material de embalagem compreende uma etiqueta que indica que o polipeptídeo da invenção, sua variante ou fragmento do mesmo, ou a molécula de ácido nucléico que codifica o mencionado polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo, pode ser utilizado para o tratamento de uma intoxicação alimentar (*food-borne illness*) ou uma doença sexualmente transmissível, tal como sífilis, clamídia, gonorréia, tricomoníase ou sapinho.

Em outra realização, a presente invenção fornece um anticorpo purificado que se liga especificamente à SEQ ID No 4.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1 – Identificação de catelicidina canina. (A) cDNA amplificado de medula óssea de cachorro, humano e porco utilizando RT-PCR com primers degenerados. Amostras de humano e porco foram utilizadas como controles positivos. (B) cDNA total (SEQ ID NO: 1) e seqüência de peptídeo prevista (SEQ ID NO: 2) de catelicidina canina. Códons de início e de parada na seqüência de cDNA estão em negrito. A região de codificação está no formato de códon triplo, e as regiões não-traduzidas estão em casos reduzidos. O peptídeo sinal previsto (29 aminoácidos N-terminal) está em itálico e indicado por uma seta.

Figura 2 – Perfil de expressão tissular de catelicidina canina. RT-PCR de uma etapa foi realizado utilizando 400 ng de RNA em 25 mL reações por 40 ciclos utilizando primers específico de gene. Fragmentos de DNA

de folha β). As duas colunas da direita ilustram vistas frontais e posteriores das superfícies do peptídeo acessíveis por solvente. Resíduos ácidos (aniônicos) estão coloridos em vermelho, básicos (catiônicos) estão coloridos em azul, e hidrofóbicos estão em amarelo.

5 Figura 7 – Efeito do cloreto de sódio na atividade antimicrobiana de K9CATH. O método de micro diluição em caldo foi utilizado para determinar o MIC de cBD contra duas linhagens de bactérias, *E. coli* gram-negativas (ATCC 25922) e *L. monocytogenes* gram-positivas (ATCC 19115), em diversas concentrações de sal. A concentração final de sódio da mistura bactericida foi
10 ajustada para 15, 30, 50, 140, e 300 mM com NaCl. β -defensina canino, um peptídeo antimicrobiano sensível a sal, foi utilizado para comparação. Todos os testes foram realizados em triplicata.

 Figura 8 – Ligação de LPS por catelicidina canina. Os testes foram realizados através do uso de um kit de teste de *Limulus amoebocyte*
15 *lisato* (LALA) cromogênico quantitativo (QCL-1000 kit, BioWhittaker, Walkersville, MD, USA), conforme previamente descrito (47). Painel direito – Os dados foram também representados por um gráfico de Hill (*hill plot*), que exibiu um coeficiente de 4,49. Os dados representam a média dos valores em duplicata de dois experimentos independentes.

20 Figura 9 – Atividade hemolítica de catelicidina canina. Os testes foram realizados com células vermelhas de galinha, conforme previamente descrito (49). Os dados exibidos representam a média dos valores em duplicata de dois experimentos independentes.

 Figura 10 – Filogenia molecular de catelicidinas. Valores de
25 *bootstrap* são indicados nas ramificações. Apenas uma topologia é exibida. Nota-se que K9CATH está separada de todas as outras seqüências de mamíferos. MEGA version 3.1 software (The Pennsylvania State University, University Park, PA) foi utilizado para análises.

Figura 11 – Efeito antiparasitário de K9CATH. O efeito antiparasitário de K9CATH é estável ao tempo. Existe uma relação inversa entre a concentração de K9CATH e a motilidade parasite (baixa motilidade é indicativa de alta mortalidade parasita), indicando que o efeito antiparasitário é dependente da concentração. A 100 μ M de K9CATH, a concentração mais alta testada, cerca de 80% das culturas parasitas foram mortas (exibido na figura como 20% de parasitas móveis).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

DEFINIÇÕES

10 O termo “ácido nucléico”, da forma utilizada no presente, refere-se a um polímero de ácidos nucléicos de deoxinucléico ribose, bem como ácidos nucléicos de ribose. O termo inclui moléculas lineares, bem como moléculas circulares covalentemente fechadas. Este termo inclui moléculas de fita simples, bem como moléculas de fita dupla.

15 O termo “isolado”, da forma utilizada no presente com relação a uma molécula de ácido nucléico, indica que a molécula de ácido nucléico é livre de seqüências de ácido nucléico não relacionadas, ou seja, seqüências de ácido nucléico que codifica outros genes, ou envolvidas na expressão destes outros genes, que flanqueiam suas extremidades 5' e 3' no genoma de ocorrência natural do organismo do qual o ácido nucléico da presente invenção é derivado. Desta forma, um “ácido nucléico isolado” da presente invenção possui uma estrutura que é diferente daquela de qualquer ácido nucléico de ocorrência natural, ou daquela de qualquer fragmento de um ácido nucléico genômico de ocorrência natural, transpondo mais de três genes separados.

25 Assim, o termo “molécula de ácido nucléico isolada” inclui, por exemplo, (1) uma molécula de DNA que possui a seqüência de parte de uma molécula de DNA genômica de ocorrência natural, mas não é flanqueada por ambas as seqüências de codificação que flanqueiam aquela parte da molécula no

genoma do organismo no qual ocorre naturalmente; (2) um ácido nucléico incorporado em um vetor ou no DNA genômico de um eucarioto ou procaríoto de forma tal que a molécula resultante não seja idêntica a qualquer DNA genômico ou vetor de ocorrência natural; (3) uma molécula separada, tal como cDNA, um fragmento genômico, um fragmento produzido por reação em cadeia de polimerase (PCR), ou um fragmento de restrição; e (4) uma seqüência de nucleotídeo recombinante que é parte de um gene híbrido, por exemplo, um gene que codifica uma proteína de fusão. Especificamente, estão excluídos desta definição, ácidos nucléicos presentes na mistura de (1) moléculas de DNA, (2) células transfectadas, e (3) clones de células, por exemplo, os que ocorrem na biblioteca de DNA, tal como biblioteca de cDNA ou de DNA genômico.

O termo “purificado” com relação a um polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo, indica que o polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo, é substancialmente livre de componentes naturalmente associados, que são componentes que acompanham o mesmo no seu estado natural. Um polipeptídeo quimicamente sintetizado, um produzido através do uso da tecnologia de DNA recombinante, ou um produzido em um sistema celular diferente do sistema celular do qual o polipeptídeo da presente invenção naturalmente se origina, é substancialmente livre de seus componentes naturalmente associados. O termo “polipeptídeo purificado” não engloba os polipeptídeos separados em uma coluna de um gel de proteína no qual diversos polipeptídeos não-relacionados foram separados. No geral, um polipeptídeo da presente invenção, sua variante ou fragmento do mesmo, pode constituir pelo menos cerca de 25% em peso de uma amostra que contém o polipeptídeo da presente invenção, e normalmente constitui pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 % de uma amostra, particularmente, pelo menos cerca de 95 % da

amostra, ou 99 % ou mais.

A expressão “fragmento biologicamente ativo”, conforme utilizada no presente com referência ao polipeptídeo da invenção ou sua variante, indica um fragmento que possui pelo menos 15 a 20 aminoácidos contíguos da seqüência exibida na SEQ ID NO: 4, que também (1) possui atividade antimicrobiana e/ou (2) é imunogênica, imunorreguladora, ou tanto imunogênica quanto imunorreguladora.

O termo “polipeptídeo”, da forma utilizada no presente, significa um polímero composto de pelo menos 15 aminoácidos, sem levar em consideração modificações pós-traducionais, tais como metilação, glicosilação ou fosforilação. A frase “polipeptídeo antimicrobiano da invenção”, ou “um polipeptídeo da invenção”, bem como o termo “K9CATH”, referem-se a um polipeptídeo de catelicidina canina, bem como um derivado do mesmo.

Da forma utilizada no presente, a expressão “atividade antimicrobiana” significa atividade microbicida e/ou microbiostática contra uma ou mais bactérias, fungos, vírus ou protozoários. Atividade microbicida refere-se à habilidade de matar ou causar dano irreversível ao microorganismo alvo. Atividade microbiostática refere-se à habilidade de inibir o crescimento ou capacidade proliferativa de um microorganismo alvo, sem necessariamente matar ou causar dano irreversível ao mesmo.

O termo “imunogênico” indica que o polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo, é capaz de induzir a produção de anticorpos específicos para um polipeptídeo que possui a seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO: 4. A expressão “que se liga especificamente” ou o termo “específico”, referente ao anticorpo, indica que o anticorpo se liga com pelo menos 50 % ou maior afinidade, preferencialmente, cerca de 75 % ou maior afinidade, e, de preferência, cerca de 90% ou maior afinidade, a um polipeptídeo de SEQ ID NO: 4, do que a um polipeptídeo que possui menos de 80% de identidade à

SEQ ID NO: 4.

O termo "imunorregulatório" indica que o polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo, não afeta ou regula a função normal, tal como a celularidade, do sistema imune em um animal não estimulado, mas afeta ou regula o sistema imune que foi alterado por uma doença. Exemplos não limitativos de tal regulação incluem a inibição da reação de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH), inibição da capacidade de resposta de células imunes, e inibição da produção de anticorpo em resposta a desafio antigênico.

Da forma utilizada no presente, o termo "inibir" indica uma redução em qualquer quantidade, incluindo, sem se limitar, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou mais do que 95 % de redução, tal como, 100 % de redução.

O termo "quantidade terapeuticamente eficaz", indica a quantidade de um composto ou combinação de compostos que trata a doença; melhora, atenua ou elimina um ou mais sintomas de uma doença particular; ou previne ou retarda o princípio de um ou mais sintomas da doença.

A frase "um meio capaz de suportar crescimento" de um micróbio, inclui um material gasoso, líquido ou sólido, em que, ou mediante o qual, uma bactéria, vírus, fungo ou protozoário pode sobreviver ou se propagar. O mencionado meio inclui um tecido ou fluido corporal de um vertebrado tal como humano, peixe, galinha ou outro pássaro; um líquido tal como água ou uma solução aquosa, tal como solução de lente de contato ou solução de lavagem de olho; um alimento, tal como alimento de colheita e produto alimentício, tal como um extrato, congelado ou alimento desidratado, ou outro produto alimentício processado; alimento pré-embalado, tal como queijo, frango ou outras carnes; e um objeto, tal como a superfície de um instrumento utilizado,

por exemplo, para preparar alimentos ou para a realização de uma cirurgia; e um gás tal como aquele utilizado para anestesia na preparação para cirurgia.

A menos que especificado de outra forma, todas as técnicas e termos científicos utilizados no presente possuem o significado comumente compreendido por um técnico no assunto. Embora métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos no presente possam ser utilizados para a prática da invenção, materiais e métodos apropriados são descritos abaixo. Todas as publicações, pedidos de patentes, patentes e outras referências mencionadas no presente são incorporadas integralmente à presente invenção como referência. Designações de aminoácidos podem incluir o nome completo, designações de três letras e designações de uma letra, conforme comumente compreendido por um técnico no assunto. Em caso de conflito, o presente relatório descritivo, incluindo definições, irá controlar. Adicionalmente, os materiais, métodos e exemplos são meramente ilustrativos, e não limitativos.

Outras características e vantagens da presente invenção serão aparentes a partir da descrição detalhada a seguir e das reivindicações.

POLIPEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DA INVENÇÃO, SUAS VARIANTES E FRAGMENTOS

DO MESMO

Catelicidinas são polipeptídeos catiônicos que possuem peptídeos sinal e pró-regiões no N-terminal altamente conservados (domínios de catelina), e domínios antimicrobianos C-terminal altamente heterogêneos (Zanetti, J. Leukoc. Biol., 75:39 (2004); Bals et al., Cell Mol. Life Sci., 60:711 (2003); Zaiou et al, J. Invest. Dermatol., 120:810 (2003)). Os peptídeos de catelicidina de defesa do hospedeiro representam um componente proeminente da capacidade antimicrobiana de neutrófilos, macrófagos e células tronco (Agerberth et al., Blood, 96:3086 (2000); Larrick et al., J. Immunol., 152:231 (1994); Niyonsaba et al., Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy, 2:224 (2003)), e

também representam elementos chave nos mecanismos de defesa inerentes das células epiteliais do pulmão, bexiga urinária, intestinos, mucosa oral, pele e testículos (Zaiou et al., J. Mol. Med., 80:549 (2002); Gennaro et al., Biopolymers, 55:31 (2000)).

5 A presente invenção é baseada na descoberta de uma catelicidina canina que possui amplo espectro de atividade antimicrobiana, incluindo, sem limitação, atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, protozoários, bem como levedura. Assim, a presente invenção fornece um polipeptídeo antimicrobiano de catelicidina canina, seu fragmento ou uma
10 variante do mesmo, uma molécula de ácido nucléico isolada e um vetor de expressão que possui a molécula de ácido nucléico isolada, que codifica um polipeptídeo de catelicidina canina da presente invenção, sua variante ou um fragmento do mesmo, uma célula isolada que contém a mencionada molécula de ácido nucléico e/ou um vetor de expressão, uma composição que contém
15 um polipeptídeo de catelicidina canina da invenção, sua variante ou um fragmento do mesmo, e um artigo manufaturado que contém o mencionado polipeptídeo da invenção, sua variante ou fragmento do mesmo, ou um ácido nucléico que codifica o mesmo. A presente invenção também fornece um método de produção de polipeptídeos de catelicidina caninos, suas variantes
20 ou fragmentos dos mesmos, um método de inibição do crescimento de um microorganismo, utilizando um polipeptídeo antimicrobiano da invenção, sua variante ou fragmento do mesmo, ou uma molécula de ácido nucléico que codifica o mesmo, e um método de tratamento de uma infecção microbiana em um vertebrado, com o polipeptídeo antimicrobiano da invenção, sua variante ou
25 fragmento do mesmo, ou uma molécula de ácido nucléico que codifica o mesmo. Um polipeptídeo da invenção, sua variante ou fragmento do mesmo pode ser obtido através do isolamento de uma célula que expressa o polipeptídeo da invenção, sua variante ou fragmento do mesmo, pode ser

quimicamente sintetizado, ou pode ser expresso a partir de uma molécula de ácido nucléico recombinante.

Em uma realização, a presente invenção fornece um polipeptídeo que possui um amplo espectro de atividade antimicrobiana. Em uma segunda realização, a presente invenção fornece um polipeptídeo de catelicidina canina purificado, por exemplo, um polipeptídeo que possui a SEQ ID NO: 2 ou 4. Um polipeptídeo de catelicidina canina da invenção, sua variante ou fragmento do mesmo possui amplo espectro de atividade antimicrobiana. O termo “amplo espectro”, da forma utilizada no presente, refere-se à capacidade de reduzir ou inibir a sobrevivência ou crescimento de diversos microorganismos eucariotos e procariotos, incluindo, sem limitação incluindo: bactérias gram-positivas e gram-negativas, leveduras e protozoários. Exemplos de bactéria gram-positiva inclui, sem limitação, membros do gênero *Listeria* e *Staphylococcus*. Exemplos de bactérias gram-negativas incluem, sem limitação, membros do gênero *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Treponema*, *Chlamydia*, e *Neisseria*. Exemplos de leveduras incluem, sem limitação, membros do gênero *Candida*. Exemplos de protozoários incluem, sem limitação, os membros do gênero *Trichomonas*. O polipeptídeo de catelicidina da presente invenção possui atividade antimicrobiana contra diversos microorganismos, incluindo, sem se limitar, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma canigenitalium* and *Ureaplasma urealyticum*; *Candida albicans*; *Treponema pallidum*, *Chlamydia trachomatis* e *Trichomonas vaginalis*.

Uma variante de um polipeptídeo da presente invenção pode apresentar uma seqüência específica, idêntica a SEQ ID NO: 4, e possui atividade antimicrobiana, ou é imunogênica, ou ambos. O termo “variante” inclui

polipeptídeos que possuem uma seqüência de aminoácido que possui pelo menos 53% de identidade de seqüência àquela de SEQ ID NO: 4.

Da forma utilizada no presente, o termo “% de identidade” ou “identidade de seqüência” refere-se à relação entre duas ou mais seqüências de polipeptídeo, bem como duas ou mais seqüências de polinucleotídeo, denominadas uma seqüência referência e uma seqüência de interesse a ser comparada com a seqüência referência. A identidade de seqüência é determinada através de comparação da seqüência de interesse com a seqüência de referência, após as seqüências terem sido opcionalmente alinhadas para a produção de um grau mais alto de similaridade de seqüência, conforme determinado pela comparação entre unidades destas seqüências. Mediante o mencionado alinhamento, a identidade de seqüência é determinada com base em posição por posição, por exemplo, as seqüências são “idênticas” em uma determinada posição se, naquela posição, os nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos são idênticos. O número total da mencionada identidade de posição é, em seguida, dividido pelo número total de nucleotídeos ou resíduos na seqüência referência, para geral uma % de identidade de seqüência.

A identidade de seqüência pode ser facilmente calculada através de métodos conhecidos, incluindo, sem se limitar, os métodos descritos em: *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, New York (1988); *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A.M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinge, G., Academic Press (1987); *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); e Carillo et al., *Applied Math.*, 48:1073 (1988), os ensinamentos dos quais encontram-se incorporados ao presente como referência.

Métodos preferidos para se determinar a identidade de seqüências são designados para gerar uma maior comparação entre as seqüências testadas. Métodos para se determinar a identidade de seqüência são codificados em programas de computador disponíveis que determinam a
5 identidade de seqüência entre seqüências determinadas. Exemplos destes programas incluem, mas sem se limitar, o pacote do programa GCG (Devereux, et al., *Nucleic Acids Research*, 12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN e FASTA (Altschul et al., *J. Molec. Biol.*, 215:403 (1990)). O programa BLASTX é disponível publicamente por NCBI e outras fontes (BLAST Manual, Altschul et
10 al., NCVINLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul et al., *J. Molec. Biol.*, 215:403 (1990), os ensinamentos do qual são incorporados ao presente como referência). Os mencionados programas alinham as seqüências de forma satisfatória, utilizando pesos de intervalos com lacunas para a produção do nível mais elevado de identidade de seqüência entre a seqüência de interesse
15 e de referência.

Por exemplo, para um polipeptídeo que possui uma seqüência de interesse de aminoácidos que possui pelo menos 95% de identidade de seqüência com a seqüência de aminoácido de referência, espera-se que a seqüência de interesse de aminoácido do polipeptídeo seja idêntica à
20 seqüência de referência, exceto que a seqüência de interesse de polipeptídeo pode incluir até 5 alterações de aminoácidos por cada 100 aminoácidos da seqüência de aminoácidos de referência. Em outras palavras, para se obter uma seqüência de interesse de polipeptídeo que possui pelo menos 95% de identidade de seqüência com a seqüência de aminoácido de referência, até 5%
25 dos resíduos de aminoácidos na seqüência de referência pode ser deletado ou substituído por outro aminoácido, ou um número de aminoácidos de até 5% do número total de resíduos de aminoácidos na seqüência de referência pode ser inserido na seqüência de referência. Estas alterações da seqüência de

referência podem ocorrer nas posições amino- ou carbóxi-terminal da seqüência de aminoácidos de referência ou em qualquer lugar entre as mencionadas posições terminais, intercaladas tanto individualmente entre os resíduos na seqüência de referência, ou em um ou mais grupos contíguos na seqüência de referência. Preferencialmente, as posições de resíduos que não são idênticas diferem por substituições de aminoácidos conservativas. Entretanto, substituições conservativas não estão incluídas como uma combinação quando é feita a determinação da identidade de seqüência.

Um polipeptídeo da presente invenção pode apresentar uma seqüência de aminoácido que possui mais do que 52% de identidade com a SEQ ID NO: 4, por exemplo, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 97% de identidade com a SEQ ID NO: 4.

A mencionada variação na seqüência pode ser dividida a substituições de aminoácidos que não afetam de forma significativa (a) a estrutura da cadeia principal do peptídeo na área de substituição, (b) a carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio alvo, ou (c) o volume da cadeia lateral. Resíduos de aminoácidos de ocorrência natural são divididos em grupos baseados nas propriedades das cadeias laterais:

- (1) hidrofóbicos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofílicos neutros: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) resíduos que influenciam a orientação da cadeia: gly, pro; e
- (6) aromáticos; trp, tyr, phe.

A substituição de um aminoácido na seqüência de polipeptídeo com outro de um tipo similar, conforme definidos acima, é denominada como

substituição de aminoácido conservativa. Conforme será apreciado por técnicos no assunto, as classificações acima não são absolutas. Diversos aminoácidos exibem mais de uma propriedade característica, e pode, portanto, ser incluída em mais de uma categoria. Por exemplo, tirosina possui tanto um anel aromático não-polar quanto um grupo hidroxila polar. Desta forma, a tirosina possui diversas características que poderia ser descrita como não-polar ou ácidas. Entretanto, o anel não-polar é dominante e, desta forma, a tirosina é geralmente considerada como sendo hidrofóbica. De forma similar, além de ser capaz de formar pontes dissulfeto, a cisteína apresenta também um caráter não-polar. Desta forma, enquanto não estritamente classificado como um aminoácido hidrofóbico ou não-polar, em muitos casos, a cisteína pode ser utilizada para conferir hidrofobicidade ou não-polaridade ao peptídeo.

O polipeptídeo da presente invenção pode apresentar uma seqüência de aminoácido que corresponde à SEQ ID NO: 4 com 1 a 9 substituições de aminoácidos conservativas, contanto que o polipeptídeo apresente a atividade antimicrobiana da SEQ ID NO: 4 e seja imunogênico, conforme definido no presente.

Variações na seqüência do polipeptídeo da presente invenção pode ainda ocorrer a partir de substituições não-conservativas. Substituições não-conservativas envolvem a troca de um membro de uma das classes descritas acima para um membro de outra classe. A mencionada variante pode possuir substituições de aminoácidos em resíduos de aminoácidos não-essenciais, ou seja, resíduos que podem ser alterados ou deletados na seqüência do tipo selvagem sem perder a atividade antimicrobiana. Os mencionados resíduos não-essenciais podem ser identificados através do uso de métodos descritos no presente, ou métodos conhecidos na técnica, tal como mutagênese de sítio específico ou a geração de mutantes de deleção/truncação, seguido pela determinação da atividade biológica e comparação com a seqüência do tipo selvagem, conforme descrito a seguir. Desta

forma, quando as substituições são introduzidas as variantes resultantes podem ser testadas para se confirmar ou determinar seus níveis de atividade biológica.

O termo variante também inclui uma variante alélica da catelicidina canina de SEQ ID NO: 2 ou 4. Uma variante alélica resulta do polimorfismo genético que existe naturalmente na população canina. Polimorfismo genético e um exemplo de método para a identificação de uma variante alélica de um polipeptídeo da presente invenção são descritos abaixo na sessão de ácidos nucléicos.

Um polipeptídeo da presente invenção pode ser um fragmento de SEQ ID NO: 4, bem como um fragmento de uma variante da SEQ ID NO: 4, que possui atividade antimicrobiana ou é imunogênica. O termo "fragmento", quando utilizado para descrever um polipeptídeo de acordo com a presente invenção, refere-se a um segmento de pelo menos 15 aminoácidos contíguos da seqüência de referência, tal como, SEQ ID NO: 4 ou sua seqüência variante. Um fragmento apresenta pelo menos um aminoácido a menos de comprimento quando comparado a seqüência de aminoácido de seqüência completa exibida na SEQ ID NO: 4.

Conseqüentemente, o fragmento da SEQ ID NO: 4 pode apresentar atividade antimicrobiana contra um ou mais microorganismos contra os quais a SEQ ID NO: 4 é ativa. A atividade antimicrobiana pode ser microbicida ou microbiostática, e pode ter 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % ou mais do que 90 % da atividade da SEQ ID NO: 4 contra um ou mais de, por exemplo, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma canigenitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Candida albicans*, *Treponema pallidum*, *Chlamydia trachomatis* e *Trichomonas vaginalis*.

Desta forma, uma variante ou seqüência da SEQ ID NO: 4 pode apresentar o mesmo perfil de atividade antimicrobiana da SEQ ID NO: 4, por

exemplo, ela possui o mesmo espectro de atividade da SEQ ID NO: 4, no qual ela é ativa contra o mesmo grupo de organismos, em particular, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis*,
 5 *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma canigenitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Candida albicans*, *Treponema pallidum*, *Chlamydia trachomatis* e *Trichomonas vaginalis*. Métodos para a determinação da atividade contra um ou mais microorganismos são descritos no presente ou conhecidos pelos técnicos no assunto.

10 Exemplos não-limitativos de fragmentos da SEQ ID NO: 4, bem como outros polipeptídeos da presente invenção, são fornecidos na tabela 1.

TABELA 1

SEQ ID NO	Seqüência
4	RLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS
6	LKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS
8	KELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS
10	ELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS
12	LITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS
14	ITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS
16	RLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQP
18	RLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPR
20	RLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPRE
22	RLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREE
24	RLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEK
26	DRLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS
28	IDRLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS
30	KIDRLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS
32	KKIDRLKELTTTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS

Um polipeptídeo da presente invenção inclui ainda um polipeptídeo que se liga especificamente a um anticorpo que, por sua vez, se liga especificamente a um polipeptídeo que possui a seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO: 4. Métodos para a produção de um anticorpo que se liga especificamente a um polipeptídeo que possui a seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO: 4 são conhecidos pelos técnicos no assunto. Métodos para a determinação de se um anticorpo se liga a um antígeno selecionado, são também conhecidos pelos técnicos no assunto.

DERIVADOS

Um polipeptídeo da presente invenção, sua variante ou fragmento do mesmo pode também ser uma proteína de fusão na qual o polipeptídeo da presente invenção, sua variante ou fragmento do mesmo, tal como a SEQ ID NO: 4, é adicionalmente unida a um aminoácido adicional não-relacionado tal como marca de poli-histidina, proteína A, proteína fluorescente verde, glutationa-S-transferase (GST), uma seqüência sinal heteróloga para secreção (tal como gp67, o sinal secretório phoA, proteína A), ou outros domínios de aminoácido funcionais que facilitam a purificação, detecção ou outras propriedades úteis. Em uma proteína de fusão da presente invenção, o polipeptídeo heterólogo não-relacionado pode estar ligado ao amino- ou carbóxi-terminal do polipeptídeo antimicrobiano da invenção, sua variante ou fragmento do mesmo. Um exemplo de método para a geração de um polipeptídeo de fusão é discutido mais abaixo, na sessão de ácidos nucléicos.

Um polipeptídeo da presente invenção pode incluir um ou mais aminoácidos de ocorrência não-natural, uma ou mais proteogenia (por exemplo, o aminoácido pode estar incorporado em uma proteína na célula através de uma via metabólica) ou aminoácidos não-proteogênico, tal que o polipeptídeo derivado resultante possui uma estabilidade estendida, atividade amplificada ou outra propriedade útil quando comparado ao polipeptídeo não-

modificado correspondente.

Desta forma, referência da presente invenção a aminoácidos inclui, por exemplo, (L)-aminoácidos proteogênicos de ocorrência natural, bem como (D)-aminoácidos, aminoácidos quimicamente modificados tais como aminoácidos análogos, aminoácidos não-proteogênicos de ocorrência natural tal como norleucina, e compostos quimicamente sintetizados que possuem propriedades conhecidas no estado da técnica como sendo características de um aminoácido. O termo aminoácido também inclui aminoácidos que não são codificados pelo código genético, tal como, por exemplo, beta-alanina (beta-Ala), ou outros ômega-aminoácidos, tal como 3-aminopropiônico, 2,3-diaminopropiônico (2,3-diaP), 4-aminobutírico e similares, ácido alfa-aminoisobutírico (Aib), sarcosina (Sar), ornitina (Orn), citrulina (Cit), t-butilalanina (t-BuA), t-butilglicina (t-BuG), N-metilsoleucina (N-Melle), fenilglicina (Phg), e ciclohexilalanina (Cha), norleucina (Nle), 2-naftilalanina (2-Nal); ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico (Tic); beta-2-tienilalanina (Thi); sulfóxido de metionina (MSO); homoarginina (Har); fosfoserina; fosfotreonina; fosfotirosina; hidroxiprolina; gama-carboxiglutamato; ácido hipúrico; ácido octahidroindol-2-carboxílico; estatina; penicilamina, alfa-metilalanina, para-benzoil-fenilalanina; hidroxiprolina, carboxiglutamato e propargilglicina. Outras modificações incluem a redução de grupos cisteinil tiol com 2-mercaptoetanol e carboximetilado com iodoacetamida, conforme descrito por Lambden et al. (1981).

Um polipeptídeo de acordo com a presente invenção pode ainda incluir, sem limitação, um polipeptídeo que possui uma modificação química, tal como PEGilação (ou seja, acoplamento covalente ao polietilenoglicol), alquilação, acilação, carbamilação, iodinação, esterificação, amidação, redução, proteção, ou qualquer outra modificação conhecida para aprimorar sua estabilidade e/ou biodisponibilidade. Formil-metionina, piroglutamina e

trimetil-alanina podem ser substituídas no resíduo N-terminal do polipeptídeo. Outras modificações amino-terminal incluem modificações de aminooxipentano (vide Simmons et al., *Science*, 276:276 (1997)).

O termo derivado também inclui um polipeptídeo no qual uma ou
5 mais ligações amidas (-CO-NH-) foram substituídas com outras ligações tais como -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂CH₂, -CH=CH- (cis e trans), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- e -CH₂SO-. Esta substituição pode ser realizada a partir de métodos conhecidos no estado da técnica (vide, por exemplo, Spatola, *Vega Data Vol. 1, issue 3*, (1983); Spatola, in *Chemistry and Biochemistry of Amino*
10 *Acids Peptides and Proteins*, Weinstein, ed., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983); Morley, *Trends Pharm. Sci.* pp. 463 468 (1980); Hudson et al., *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 14:177 (1979); Spatola et al., *Life Sci.*, 38:1243 (1986); Hann, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1:307 (1982); Almquist et al., *J. Med. Chem.*, 23:1392 (1980); Jennings-White et al., *Tetrahedron Lett.*, 23:2533 (1982);
15 Szelke et al., EP 45665 (1982); Holladay et al., *Tetrahedron Lett.*, 24:4401 (1983); and Hruby, *Life Sci.*, 31:189 (1982)). O mencionado polipeptídeo derivado pode incluir, sem limitação, um ou mais aminoácidos modificados, por exemplo, hidroxiprolina, carboxiglutamato, ou aqueles discutidos acima, bem como aminoácidos que não são ligados pelo peptídeo. Um polipeptídeo
20 derivado também inclui um polipeptídeo no qual uma ou mais ligações amida no polipeptídeo de referência (-CO-NH-) foram substituídas por outra ligação, tal como -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂CH₂, -CH=CH- (cis e trans), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- e -CH₂SO-. Esta substituição pode ser realizada por métodos conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Spatola, *Vega Data Vol. 1, Issue 3*,
25 (1983); Spatola, in *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids Peptides and Proteins*, Weinstein, ed., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983); Morley, *Trends Pharm. Sci.* pp. 463 468 (1980); Hudson et al.; *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 14:177 (1979); Spatola et al., *Life Sci.*, 38:1243 (1986); Hann, *J. Chem. Soc.*

técnica. Um método para se preparar derivados que são peptídeos ciclizados (vide EP 471.453 (ligações amida); EP 467.701 (pontes dissulfeto); EPA 467.699 (ligações tioéter)). Outras modificações são discutidas em Jameson et al. (*Nature*, 368:744 (1994)); US 4.992.463; e US 5.091.396. Por exemplo, para

5 peptídeos ciclizados por oxidação de grupos cisteínas tiol livres, o peptídeo (0,1 mg mL⁻¹) é reagido por 1 hora a 0°C com iodo (1 mM em metanol) e a oxidação é então realizada com tiosulfato de sódio. A mistura é submetida a HPLC de fase reversa em uma coluna Zorbax C8 semi-preparada, seguida por filtração em gel em uma coluna Zorbax GF250. Dois picos que são separados pela

10 etapa de filtração em gel foram adicionalmente analisados por espectroscopia de massa, utilizando um analisador de tempo de voo de massa por dessorção de plasma *Applied Biosystems Biolon 20 Biopolymer*. O primeiro pico é resolvido por análise de massa em duas espécies, um peptídeo de monômero parcialmente protegido e um peptídeo dimérico. O material é testado para

15 grupos tióis livres de cisteínas com reagente Ellman's [5,5-ditio-bis(ácido 2-nitrobenzóico); Sigma] na concentração mais alta do peptídeo antes da saturação (20 mg mL⁻¹). Este pico representa o peptídeo cíclico e é armazenado a pH 4,0 a -20°C até ser utilizado (vide Tarn &Lu (1989)).

Amidas do polipeptídeo podem ainda ser preparadas por técnica

20 bem conhecidas no estado da técnica para a conversão de um grupo ácido carboxílico ou precursor do mesmo, em uma amida. Um método preferido para a formação de amida no grupo carboxila C-terminal é a clivagem do peptídeo de um suporte sólido com uma amina apropriada, ou a clivagem na presença de um álcool, gerando um éster, seguida pela aminólise com a amina desejada.

25 Derivados N-acila de um grupo amino do polipeptídeo da presente invenção podem ser preparados pelo uso de um aminoácido N-acila protegido para a condensação final, ou por acilação de um peptídeo protegido ou não-protégido. Derivados de O-acila podem ser preparados, por exemplo, pela

acilação de um peptídeo hidróxi livre ou uma resina de peptídeo. A acilação pode ser realizada pelo uso de reagentes de acilação padrões, tal como haletos de acila, anidridos, acil imidazóis, e similares. Tanto a N-acilação quanto O-acilação podem ser realizadas ao mesmo tempo, se desejado.

5 Sais de grupos carboxilas de um polipeptídeo da presente invenção podem ser preparados de modo usual, colocando o polipeptídeo em contato com um ou mais equivalentes de uma base desejada, tal como, por exemplo, uma base hidróxido metálico, tal como hidróxido de sódio; uma base de carbonato ou bicarbonato de metal, tal como, por exemplo, carbonato de
10 sódio ou bicarbonato de sódio; ou uma base amina tal com, por exemplo, trietilamina, trietanolamina, e similares.

 Sais de adição de ácido do polipeptídeo ou polipeptídeo variante, ou dos resíduos amino do peptídeo ou peptídeo variante, podem ser preparados a partir do contato do peptídeo ou amina com um ou mais
15 equivalentes do ácido orgânico ou inorgânico desejado, tal como, por exemplo, ácido hidrocloreídrico. Ésteres dos grupos carboxilas de peptídeos podem ainda ser preparados por qualquer dos métodos usualmente utilizados no estado da técnica.

 Um polipeptídeo de acordo com a presente invenção pode ainda
20 ser produzido através da expressão de ácidos nucléicos recombinantes, conforme descrito abaixo na sessão de vetores de expressão e células hospedeiras. Quando o polipeptídeo da presente invenção é expresso em uma célula recombinante, é necessário purificar o peptídeo recombinante de outras proteínas ou polipeptídeos celulares para se obter preparações que são
25 substancialmente homogêneas, como o polipeptídeo recombinante da presente invenção. Por exemplo, o meio de cultura ou lisato pode ser centrifugado para se remover resíduos celulares particulados. A membrana e as frações de proteínas solúveis são então separadas. O polipeptídeo da presente invenção

pode então ser purificado a partir da fração de proteína solúvel. Alternativamente, o polipeptídeo da presente invenção pode ser purificado a partir da fração insolúvel, ou seja, corpos retráteis (vide, por exemplo, a patente US 4.518.526), se necessário. O polipeptídeo da presente invenção pode ser purificado a partir de polipeptídeos e proteínas de membrana ou solúveis contaminantes, a partir de fracionamento em colunas de imunoafinidade ou de troca iônica; precipitação em etanol; HPLC de fase reversa; cromatografia em sílica ou em uma resina de troca aniônica, tal como DEAE; cromatografia de focalização (*chromatofocusing*); SDS-PAGE; precipitação em sulfato de amônia; filtração em gel utilizando, por exemplo, Sephadex G-75; ou cromatografia de afinidade ao ligante, e similares.

Se expresso como um polipeptídeo de fusão, o polipeptídeo de fusão pode ser purificado a partir de métodos específicos para a porção catelicidina do polipeptídeo de fusão. Por exemplo, se o polipeptídeo de fusão for um polipeptídeo de fusão marcado com histidina, resina Ni-NTA pode ser empregada para a purificação do polipeptídeo de fusão.

O polipeptídeo da presente invenção pode ainda ser preparado a partir de reações de transcrição e tradução *in vitro*. Um cassete de expressão pode ser empregado para gerar transcritos específicos do gene que são subsequentemente traduzidos *in vitro*, de forma a resultar em uma preparação substancialmente homogênea do polipeptídeo da presente invenção. A construção de vetores para uso em reações de transcrição/tradução *in vitro*, bem como as metodologias para estas reações, são bem conhecidas no estado da técnica.

25

MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLÉICO DA PRESENTE INVENÇÃO

A presente invenção fornece ainda moléculas de ácido nucléico isoladas que codificam um polipeptídeo de catelicidina canina, sua variante ou fragmento do mesmo. Assim, uma molécula de ácido nucléico de acordo com a

presente invenção pode codificar um polipeptídeo que possui uma seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ou 4, uma seqüência de aminoácido de uma variante de SEQ ID NO: 4, ou fragmento do mesmo. Um exemplo de molécula de ácido nucléico da presente invenção que pode codificar um polipeptídeo que possui uma seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 2 ou 4, é um ácido nucléico que possui a seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 1 ou 3. Exemplos não-limitativos de moléculas de ácido nucléico da presente invenção incluem as seguintes:

TABLE 2

SEQ ID NO	Seqüência
3	cggctgaa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcgaaaag attaggagaa ttggccagag aatcaaggat tttttaaga atcttcagcc cagggaggag aagtcctaa
5	ctgaa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcgaaaag attaggagaa ttggccagag aatcaaggat tttttaaga atcttcagcc cagggaggag aagtcctaa
7	aa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcgaaaag attaggagaa ttggccagag aatcaaggat tttttaaga atcttcagcc cagggaggag aagtcctaa
9	gagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcgaaaag attaggagaa ttggccagag aatcaaggat tttttaaga atcttcagcc cagggaggag aagtcctaa
11	ctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcgaaaag attaggagaa ttggccagag aatcaaggat tttttaaga atcttcagcc cagggaggag aagtcctaa
13	atc acgacagggg ggcagaagat tggcgaaaag attaggagaa ttggccagag aatcaaggat tttttaaga atcttcagcc cagggaggag aagtcctaa

SEQ ID NO	Seqüência
15	cggctgaa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcгааааg attaggagaa ttggccagag aatcaaggat tttttaaga atcttcagcc c
17	cggctgaa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcгааааg attaggagaa ttggccagag aatcaaggat tttttaaga atcttcagcc cagg
19	cggctgaa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcгааааg attaggagaa ttggccagag aatcaaggat tttttaaga atcttcagcc cagggag
21	cggctgaa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcгааааg attaggagaa ttggccagag aatcaaggat tttttaaga atcttcagcc cagggaggag
23	cggctgaa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcгааааg attaggagaa ttggccagag aatcaaggat tttttaaga atcttcagcc cagggaggag aag
25	g accggctgaa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcгааааg attaggagaa ttggccagag aatcaaggat tttttaaga atcttcagcc cagggaggag aagtcctaa
27	attg accggctgaa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcгааааg attaggagaa ttggccagag aatcaaggat tttttaaga atcttcagcc cagggaggag aagtcctaa
29	aaaattg accggctgaa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcгааааg attaggagaa ttggccagag aatcaaggat tttttaaga atcttcagcc cagggaggag aagtcctaa
31	aagaaaattg accggctgaa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcгааааg attaggagaa ttggccagag aatcaaggat tttttaaga atcttcagcc cagggaggag aagtcctaa

Uma molécula de ácido nucléico que codifica uma variante de polipeptídeo de catelicidina canina inclui uma variante degenerada, bem como uma variante alélica.

O termo “variante degenerada”, quando utilizada no presente para descrever um ácido nucléico, indica que, como resultado da degeneração do código genético, o ácido nucléico possui uma seqüência de nucleotídeos diferente das SEQ ID NO: 1 ou 3, mas ainda codifica um polipeptídeo que possui a seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 ou 4, respectivamente. Uma variante degenerada inclui uma molécula de ácido nucléico que possui uma seqüência que reflete a preferência de uso do códon em um sistema de expressão de células hospedeiras selecionado. Desta forma, uma variante de ácido nucléico que é designada para refletir a preferência de uso do códon de uma célula hospedeira particular, não exibe alterações ao nível de aminoácido.

O termo “variante alélica”, da forma utilizada no presente para descrever um ácido nucléico da presente invenção, significa que, como um resultado do polimorfismo genético, o ácido nucléico que é uma variante alélica da SEQ ID NO: 1 ou 3 difere da seqüência da SEQ ID NO: 1 ou 3 de forma que o polipeptídeo codificado difere da SEQ ID NO: 2 ou 4, respectivamente. O polimorfismo genético existe entre indivíduos de uma população, tal como uma população de cachorros, devido a uma variação alélica natural, e leva a alterações na seqüência de aminoácido de um polipeptídeo particular na população, tal como uma população de cachorros. A mencionada variação alélica natural resulta, tipicamente, em uma variação de 1 a 5 % na seqüência de nucleotídeo de um dado gene. Da forma utilizada no presente, o termo “gene” refere-se a uma molécula de ácido nucléico que compreende uma estrutura de leitura aberta (*open reading frame*) que codifica um polipeptídeo da presente invenção. Um alelo é um, de um grupo de genes que ocorre alternativamente em um *locus* genético específico. Uma variante alélica pode ser identificada por (1) uso de sondas de hibridização da presente invenção (conforme discutido acima) para identificar e isolar o mesmo lócus genético em uma variedade indivíduos caninos e, então (2) seqüenciamento do gene que

codifica catelicidina canina em um número de indivíduos diferentes, em uma população canina. Qualquer e todas estas variações de nucleotídeos e polimorfismos de aminoácidos resultantes, ou variações que são o resultado de variação alélica natural e que não altera a atividade funcional, estão incluídas no escopo de proteção da presente invenção.

Uma variante de ácido nucléico ainda inclui um ácido nucléico que codifica um polipeptídeo que possui uma seqüência de aminoácidos que é pelo menos 53% idêntica à SEQ ID NO: 4. Desta forma, a variante de ácido nucléico pode codificar um polipeptídeo que possui uma seqüência de aminoácidos que é pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 97% idêntica à SEQ ID NO: 4.

Exemplos destas variantes de ácido nucléico incluem os ácidos nucléicos que possuem seqüências de nucleotídeos de pelo menos 70%, preferencialmente, pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou mais do que 95% de identidade com a SEQ ID NO: 1 ou 3.

Uma molécula de ácido nucléico da presente invenção pode ainda apresentar uma seqüência de nucleotídeos que se hibridiza, sob condições altamente estridentes ou condições moderadamente estridentes, a uma seqüência de ácido nucléico que codifica a SEQ ID NO: 4 ou sua seqüência complementar. Um exemplo da mencionada molécula de ácido nucléico é uma que se hibridiza sob condições altamente estridentes ou condições moderadamente estridentes, a uma sonda de hibridização, que apresenta uma seqüência de nucleotídeo complementar à SEQ ID NO: 1 ou 3.

O termo "hibridiza" significa a formação de uma dupla estável entre uma primeira molécula de ácido nucléico e uma segunda molécula de ácido nucléico sob uma condição particular. A estabilidade da dupla depende da condição da hibridização, que é definida pela temperatura, força iônica, e a

presença de outros compostos, tais como solventes orgânicos. Geralmente, quanto menor a concentração de sal e maior a temperatura de lavagem, mais estrigente será a condição de hibridização/lavagem. A estringência pode ainda ser ajustada através da alteração das concentrações de sais, SDS ou componentes orgânicos, enquanto a temperatura de lavagem e hibridização é mantida a 65°C. Sob as condições altamente estridentes ou de alta estringência, apenas ácido nucléicos que possuem 95% a 100% de bases complementares, irão formar duplas estáveis. Sob condições de estringência moderada ou moderadamente estrigente, apenas ácidos nucléicos que possuem pelo menos 75% de seqüências complementares formarão duplas estáveis.

Condições de estringência alta ou moderada refere-se a hibridização em 6X cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) a 45°C, seguida pela lavagem em 0,2 X SSC, 0,1% SDS, a 48°C ou 65°C, respectivamente.

Uma molécula de ácido nucléico de acordo com a presente invenção pode ainda ser um fragmento de SEQ ID NO: 1 ou 3 que (1) é suficiente para uso como uma sonda de hibridização, para identificar moléculas de ácido nucléico que codificam um polipeptídeo da presente invenção, ou (2) é apropriado para uso como um primer para a reação em cadeia de polimerase (PCR) para a amplificação ou mutação de moléculas de ácido nucléico. O mencionado fragmento compreende tipicamente, uma região de seqüência de nucleotídeo que se hibridiza sob condições estridentes a uma fita *sense* ou *antisense* de um ácido nucléico que possui a seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 1 ou 3, e não hibridizará sob condições estridentes a ácidos nucléicos não-relacionados, conforme discutido acima. Exemplos destes fragmentos incluem, sem limitação, SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 e 33, exibidas na tabela 2.

Uma molécula de ácido nucléico de acordo com a presente

invenção pode ainda ser modificada na unidade base, unidade açúcar, ou na estrutura fosfato para aprimorar, por exemplo, a estabilidade, hibridização ou solubilidade da molécula. Por exemplo, quando utilizados como uma sonda ou primer, os ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção podem
5 compreender um grupo de marca tal como um radioisótopo, um composto fluorescente, uma enzima ou um co-fator de enzima, um agente de clivagem ativado por hibridização, ou um agente de ligação ativado por hibridização. A mencionada marca pode ser incorporada para facilitar o transporte através da membrana celular ou para facilitar a detecção. Ácidos nucléicos de acordo com
10 a presente invenção podem ainda ser operacionalmente ligados a uma seqüência de controle da expressão, conforme descrito abaixo.

MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS QUE CODIFICAM CATELICIDINAS

Uma molécula de ácido nucléico de acordo com a presente invenção, tal como aquela que possui a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID
15 NO: 1 ou 3, pode ser isolada a partir do uso de técnicas padrões de biologia molecular e a informação da seqüência fornecida pela presente invenção.

Fontes de seqüências de nucleotídeos que codificam catelicidina, seu fragmento ou uma variante da mesma, ou o ácido nucléico complementar à mesma, incluem RNA, ou DNA genômico ou cDNA de qualquer tecido canino,
20 tal como a partir de fluido fisiológico ou tecido. Outras fontes de moléculas de DNA de acordo com a presente invenção incluem bibliotecas genômicas ou de cDNA derivadas de um cachorro. Adicionalmente, as moléculas de DNA da presente invenção podem ainda ser preparadas *in vitro*, tal como, através da síntese de um oligonucleotídeo de cerca de 215, de preferência, cerca de 100,
25 mais preferencialmente, cerca de 50, nucleotídeos de comprimento, ou a partir da sub-clonagem de uma porção de um segmento de DNA que codifica catelicidina canina.

Uma molécula de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo um

polipeptídeo de acordo com a presente invenção pode ser identificada e isolada através do uso de métodos padrões, conforme descritos em Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989). Por exemplo, PCR com transcriptase reversa (RT-PCR) pode ser empregada para
5 isolar e clonar cDNAs de catelicidina. Um primer que é complementar ao RNA que codifica catelicidina canina, e preferencialmente hibridiza a dois terços de RNA da extremidade 3', pode ser empregado como um primer na reação de transcriptase reversa, para preparar cDNAs de fita simples a partir do RNA isolado que contém as seqüências de RNA de interesse. O RNA pode ser
10 isolado a partir de métodos conhecidos no estado da técnica, tal como utilizando o reagente TRIZOL™ (GIBCO-BRL/Life Technologies, Gaithersburg, Maryland). Os cDNAs de fita simples resultantes são então amplificados em reações de PCR.

“Reação em cadeia de polimerase” ou “PCR” refere-se a um
15 procedimento ou técnica em que quantidades de um fragmento previamente selecionado de ácido nucléico, RNA e/ou DNA, são amplificados conforme descrito na patente US 4.683.195. Geralmente, a informação da seqüência das extremidades da região de interesse ou adjacentes, é empregada para desenhar os primers de oligonucleotídeos que compreendem pelo menos 7 a 8
20 nucleotídeos. Os mencionados primers serão idênticos ou similares à seqüência da fita oposta do modelo a ser amplificado. O PCR pode ser utilizado para amplificar seqüências de RNA específicas, seqüências de DNA específicas do DNA genômico total, e cDNA transcrito a partir de RNA celular total, bacteriófago ou seqüências de plasmídeo, e similares. Vide, por exemplo,
25 Mullis et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51:263 (1987); Ertich, ed., PCR TECHNOLOGY, (Stockton Press, New York, 1989). Desta forma, realizações de clonagem baseadas em PCR são realizadas mediante seqüências conservadas deduzidas a partir de alinhamentos do gene

relacionado ou seqüências de polipeptídeos. Entretanto, outros métodos baseados na amplificação, conhecidos no estado da técnica, podem ainda ser empregados, incluindo, mas sem limitar-se, replicação de seqüência específica auto-sustentada (*self-sustained sequence-specific replication*) (3SR) (Gebinoga et al., Eur. J. Biochem., 235:256 (1996); Fahy et al., PCR Methods Appl, 1:25 (1991); Guatelli et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A., 87:1874 (1990)), amplificação baseada em seqüência de ácido nucléico (NASBA) (Compton, Nature, 350:91 (1991)), amplificação de deslocamento de fita (SDA) (Walker et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A., 89:392 (1992); Walker et al., Nucl. Acid Res., 20:1691 (1992)), ciclização de sondas (Landgren, Trends in Gen., 9:199 (1993)), ou uma Q beta replicase, sistema de amplificação baseado em RNA polimerase Sp6, T7, ou T3. Vide, por exemplo, as patentes US 5.622.820, 5.629.153, 5.532.126, 5.573.914 e 5.514.545.

Os *primers* são produzidos para corresponder à regiões altamente conservadas das seqüências de peptídeos ou nucleotídeos que foram identificadas e comparadas para gerar os primers, tal como por uma comparação de seqüência de outros genes de catelicidina. Um primer é preparado sendo previsto a se anelar à fita *antisense*, e o outro primer preparado irá anelar à fita *sense*, de uma molécula de DNA que codifica catelicidina canina.

Os produtos de cada reação de PCR são separados através de um gel de agarose e todos os produtos amplificados de forma consistentes são purificados com gel e clonados diretamente em um vetor apropriado, tal como um vetor de plasmídeo conhecido. Os plasmídeos resultantes são submetidos à endonucleases de restrição e seqüenciamento dideoxi de DNAs de plasmídeo de fita dupla. Alternativamente, o fragmento purificado no gel pode ser diretamente seqüenciado.

Bibliotecas de cDNA ou de DNA genômico podem ser

selecionadas através do uso de um procedimento de hibridização de colônia. Geralmente, cada placa de microtítulo é replicada em papéis filtro de nitrocelulose em duplicata, e colônias são deixadas crescer a 37°C por 14 a 16 horas em Ágar L contendo 50 µg/mL. As colônias são lisadas e o DNA fixado ao filtro através de um tratamento seqüencial por 5 minutos com 500 mM NaOH, 1,5M NaCl, e são lavadas duas vezes por 5 minutos, cada vez com 5 x de citrato salino padrão (SSC). Os filtros são secos ao ar e aquecido a 80°C por 2 horas. Os filtros em duplicata são previamente hibridizados a 42°C por 6 a 8 horas com 10 mL por filtro de tampão de hibridização de DNA (5 x SSC, pH 7,0, 5 x de solução de Denhardt (polivinilpirrolidona, mais Ficoll e albumina de soro bovino; 1 x = 0,02% de cada), 50 mM de tampão de fosfato de sódio a pH 7,0, 0,2% SDS, 20 µg/mL Poly U, e 50 µg/mL de DNA de esperma de salmão desnaturado).

As amostras podem ser hibridizadas com sondas quinase sob condições que dependem da estringência desejada. Condições de estringência moderadamente típicas empregam uma temperatura a 42°C por 24 a 36 horas com 1 a 5 mL/filtro de tampão de hibridização de DNA contendo a sonda. Para estringência mais alta, altas temperaturas e curtos períodos são empregados. Geralmente, os filtros são lavados quatro vezes por 30 minutos cada vez a 37°C com 2 x SSC, 0,2 % SDS e 50 mM de tampão de fosfato de sódio a pH 7, então são lavados duas vezes com 2 x SSC e 0,2 % SDS, secos ao ar, e então são auto radiografados a -70°C por 2 a 3 dias.

A recuperação ou o isolamento de um dado fragmento de DNA a partir de uma digestão de restrição pode empregar separação da digestão em um gel de poliacrilamida ou agarose através de eletroforese, identificação do fragmento de interesse por comparação de sua mobilidade com a mobilidade dos fragmentos de DNA marcadores, de peso molecular conhecido, remoção da sessão de gel contendo o fragmento desejado e separação do gel do DNA.

Vide Lawn *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 9:6103 (1981), e Goeddel *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 8, 4057 (1980).

Conseqüentemente, a partir do uso de todo ou parte da SEQ ID NO: 3 como uma sonda de hibridização, uma molécula de ácido nucléico da presente invenção pode ser isolada a partir de técnicas de clonagem e hibridização padrões. Uma molécula de ácido nucléico de acordo com a presente invenção pode ser amplificada a partir do uso de cDNA, mRNA ou DNA genômico como um modelo e primers de oligonucleotídeos apropriados de acordo com técnicas de amplificação por PCR conhecidas. O ácido nucléico amplificado desta forma pode ser clonado em um vetor apropriado e caracterizado por análise de seqüência de DNA. Oligonucleotídeos que correspondem a todo ou parte de uma molécula de ácido nucléico da presente invenção podem ser preparados através de técnicas sintéticas padrão, tal como utilizando um sintetizador de DNA automatizado.

Um ácido nucléico que codifica um “fragmento biologicamente ativo” de um polipeptídeo de acordo com a presente invenção pode ser preparado através do isolamento de uma porção de qualquer das SEQ ID NO: 1, tal como SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 e 33 que codifica um polipeptídeo que possui uma atividade biológica, expressando o fragmento codificado pelo polipeptídeo, tal como por expressão recombinante *in vitro*, e determinando a atividade da porção codificada do polipeptídeo a partir do uso de métodos descritos no presente ou conhecidos no estado da técnica.

MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE VARIANTES DA SEQÜÊNCIA DE ÁCIDO NUCLÉICO DE CATELICIDINA

Moléculas de ácido nucléico que codificam variantes de seqüência de aminoácido de catelicidina canina são preparadas a partir de uma série de métodos conhecidos no estado da técnica. Os mencionados métodos incluem,

mas sem se limitar, isolamento de uma fonte natural (no caso de variantes de seqüência de aminoácido de ocorrência natural ou variantes alélicas), ou a partir da preparação por mutagênese mediada por oligonucleotídeo (ou sítio-dirigida), mutagênese por PCR, e mutagênese por cassete, de uma variante preparada anteriormente ou uma versão não-variante de catelicidina canina.

A mutagênese mediada por oligonucleotídeo é um método preferido para a preparação de variantes de substituição de aminoácidos de catelicidina canina. A mencionada técnica é bem conhecida no estado da técnica, conforme descrito por Adelman *et al.*, *DNA*, 2:183 (1983). Em resumo, DNA de catelicidina canina é alterado através da hibridização de um oligonucleotídeo que codifica a mutação desejada ao modelo de DNA, onde o modelo é a forma de fita simples de um plasmídeo ou bacteriófago, que contém a seqüência de DNA de catelicidina canina nativa ou não-alterada. Após a hibridização, a DNA polimerase é utilizada para sintetizar uma segunda fita completa complementar ao modelo que irá, então, incorporar o primer de oligonucleotídeo, e irá codificar para a alteração selecionada no DNA de catelicidina canina.

Geralmente, os oligonucleotídeos utilizados apresentam pelo menos 25 nucleotídeos de comprimento. Um oligonucleotídeo ideal irá apresentar de 12 a 15 nucleotídeos que são completamente complementares ao modelo, no mesmo lado dos nucleotídeos que codificam para a mutação. Esta realização assegura que o oligonucleotídeo irá hibridizar de forma apropriada à molécula de DNA modelo de fita simples. Os oligonucleotídeos são facilmente sintetizados a partir do uso de técnicas conhecidas no estado da técnica, tal como as descritas por Crea *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:5765 (1978).

O modelo de DNA pode ser gerado pelos vetores que são tanto derivados de vetores M13 de bacteriófagos (os vetores comercialmente

disponíveis M13mp18 e M13mp19 são apropriados), quanto os vetores que contém uma origem de replicação de fago de fita simples, conforme descrito por Viera *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). Desta forma, o DNA que deseje-se inserir a mutação pode ser inserido em um destes vetores para gerar um modelo de fita simples. A produção de um modelo de fita simples está descrita nas sessões 4.21 a 4.41 de Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989).

Alternativamente, o modelo de DNA de fita simples pode ser gerado a partir da desnaturação de um DNA de plasmídeo (ou outro) de fita dupla a partir de técnicas padrões.

Para a alteração da seqüência de DNA nativo (para gerar variantes de seqüência de aminoácido, por exemplo), o oligonucleotídeo é hibridizado ao modelo de fita simples sob condições apropriadas de hibridização. Uma enzima de polimerização de DNA, normalmente o fragmento Klenow da DNA polimerase I, é então adicionado para sintetizar a fita complementar do modelo, utilizando o oligonucleotídeo como um primer para a síntese. A molécula heteroduplex é então formada, sendo que uma fita de DNA codifica a forma mutante de catelicidina canina, e a outra fita (o modelo original) codifica a seqüência de catelicidina canina nativa, não-alterada. A mencionada molécula heteroduplex é então transformada em uma célula hospedeira apropriada, normalmente um procarioto, tal como *E. coli* JM101. Após as células serem crescidas, elas são colocadas em placas de agarose e selecionadas a partir do uso de primers de oligonucleotídeo rediomarcados com 32-fosfato, de forma a identificar as colônias de bactérias que apresentam o DNA mutado. A região mutada é então removida e colocada em um vetor apropriado para a produção de um peptídeo ou polipeptídeo, geralmente um vetor de expressão do tipo tipicamente empregado para a transformação de um hospedeiro apropriado.

O método descrito acima pode ser modificado de forma que uma molécula homoduplex é criada, onde ambas as fitas do plasmídeo contém a mutação. As modificações que podem ser realizadas são as seguintes: O oligonucleotídeo de fita simples é anelado ao modelo de fita simples, conforme descrito acima. A mistura de três deoxiribonucleotídeos, desoxiriboadenosina (dATP), desoxiriboguanosina (dGTP), e desoxiribotimidina (dTTP), é combinada com uma tiodesoxiribocitosina modificada denominada dCTP-(α S) (que pode ser obtida por Amersham Corporation). A mencionada mistura é adicionada ao complexo de modelo-oligonucleotídeo. Mediante a adição da DNA polimerase à esta mistura, uma fita de DNA idêntica ao modelo, exceto pelas bases mutadas, é gerada. Adicionalmente, esta nova fita de DNA irá conter dCTP-(α S) no lugar de dCTP, que serve para proteger a mesma de digestão por endonucleases de restrição.

Na seqüência, a fita modelo do heteroduplex de dupla fita é cortada com uma enzima de restrição apropriada, a fita modelo pode ser digerida com ExoIII nuclease ou outra nuclease apropriada passado a região que contém o(s) sítio(s) a ser mutagenizado. A reação é então interrompida para gerar uma molécula que é apenas parcialmente de fita simples. Um homoduplex de DNA de fita dupla completo é então formado a partir do uso de uma DNA polimerase na presença dos quatro deoxiribonucleotídeos trifosfatos, ATP, e DNA ligase. A mencionada molécula homoduplex pode então ser transformada em uma célula hospedeira apropriada tal como *E. coli* JM101.

Por exemplo, uma realização preferida da presente invenção é uma molécula de DNA isolada e purificada que compreende o ácido nucléico que codifica catelicidina canina que possui a SEQ ID NO:4, em que o segmento de DNA compreende a SEQ ID NO:3, ou variantes da SEQ ID NO:3, apresentando substituições de nucleotídeos que são "silenciosas". Ou seja, quando substituições de nucleotídeos silenciosas estão presentes em um

códon, o mesmo aminoácido é codificado pelo códon com a substituição de nucleotídeo, tal como é codificado pelo códon sem a substituição. Por exemplo, valina é codificada pelos códons GTT, GTC, GTA e GTG. Uma variante da SEQ ID NO. 1 no quarto códon na forma do polipeptídeo (GTT na SEQ ID NO: 5 1) inclui a substituição de GTC, GTA ou GTG por GTT. Outras substituições de nucleotídeos "silenciosas" na SEQ ID NO:3 que podem codificar um polipeptídeo que corresponde a SEQ ID NO:4 podem ser conferidas por referência na Figura 3 e página D1 no apêndice D de Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989). Substituições de nucleotídeos 10 podem ser introduzidas em segmentos de DNA por métodos bem conhecidos no estado da técnica. Vide, por exemplo, Sambrook *et al.*, *supra*. Desta forma, moléculas de ácido nucléico que codificam outras catelicidinas caninas podem ser modificadas de forma similar. Assim, moléculas de ácido nucléico que codificam pelo menos uma porção de catelicidina canina, ou um complemento 15 das mesmas, podem ser modificadas de forma a gerar moléculas de ácido nucléico de acordo com a presente invenção, apresentando substituições de nucleotídeos silenciosas, ou gerando moléculas de ácido nucléico que possuem substituições de nucleotídeos que resultam em substituições de aminoácidos.

20

VETORES DE EXPRESSÃO E CÉLULAS HOSPEDEIRAS

Um ácido nucléico de acordo com a presente invenção pode ainda estar na forma de um vetor de expressão, no qual um ácido nucléico que codifica um polipeptídeo da presente invenção é operacionalmente ligado a uma seqüência de controle da expressão. O termo "vetor" refere-se a uma 25 molécula de ácido nucléico capaz de transportar outro ácido nucléico ao qual está ligado. Um exemplo de vetor é um "plasmídeo", uma molécula de DNA de fita dupla circular na qual, moléculas de DNA adicionais podem ser ligadas. Outro exemplo é um vetor viral no qual segmentos adicionais de DNA podem

ser ligados no genoma viral. Determinados vetores são capazes de realizar uma replicação autônoma na célula hospedeira na qual foram inseridos, tal como vetores bacterianos que possuem uma origem bacteriana de replicação e vetores epissomais de mamíferos, enquanto outros vetores, tal como vetores não-epissomais de mamíferos, são integrados no genoma da célula hospedeira mediante introdução na célula hospedeira, e então se replica junto com o mencionado genoma. Determinados vetores, em partículas vetores de expressão, são capazes de direcionar a expressão dos genes aos quais são operacionalmente ligados.

O vetor de expressão de acordo com a presente invenção compreende um ácido nucléico de acordo com a presente invenção em uma forma apropriada para a expressão do ácido nucléico na célula hospedeira. O vetor de expressão inclui uma ou mais seqüências regulatórias, selecionadas com base na célula hospedeira a ser utilizada para a expressão, operacionalmente ligadas à seqüência de ácido nucléico a ser expressa.

O termo “operacionalmente ligada”, da forma utilizada na presente invenção, indica que uma seqüência codificadora e uma seqüência regulatória, tal como um promotor, operador, amplificador, ou outra seqüência de controle de expressão, estão conectadas de forma tal que permite a expressão da seqüência codificadora quando as moléculas apropriadas, tais como proteínas ativadoras da transcrição, são ligadas à seqüência regulatória. Desta forma, “operacionalmente ligada” indica que a seqüência de nucleotídeo de interesse, tal como a seqüência que codifica o polipeptídeo da presente invenção, está ligada à seqüência(s) regulatória(s) de forma que permite a expressão da seqüência de nucleotídeo, por exemplo, em uma célula hospedeira, quando o vetor é introduzido na célula hospedeira, ou em um sistema de transcrição/tradução *in vitro*.

O termo “seqüências regulatórias” inclui, sem se limitar,

promotores, operadores, amplificadores e outros elementos de controle de expressão, tais como sinais de poliadenilação. Seqüências regulatórias são bem conhecidas no estado da técnica e podem direcionar a expressão constitutiva de um ácido nucléico da presente invenção em diversos tipos de célula hospedeira, ou apenas em determinadas células hospedeiras (tal como as seqüências regulatórias tecido-específicas). A escolha e o desenho de um vetor de expressão dependem de fatores que incluem o nível de expressão do polipeptídeo da presente invenção e o sistema de expressão a ser utilizado, por exemplo, a célula hospedeira, ou seja, procariotos ou eucariotos (mamíferos, leveduras), ou o sistema de transcrição/tradução *in vitro* utilizado, por exemplo, sistema T7.

A presente invenção fornece ainda uma célula hospedeira na qual um vetores de expressão recombinante foi introduzido. O termo "célula hospedeira" refere-se a populações de células biologicamente puras, homogêneas bem caracterizadas, que podem ser procariotas ou eucariotas. As células eucariotas podem ser de origem de mamífero, bem como de origem vegetal, de insetos, de leveduras ou de fungos. As células eucariotas podem ser neoplásicas ou "imortalizadas" *in vitro* a partir de métodos bem conhecidos no estado da técnica, tal como células primárias. As células hospedeiras podem ser procariotas, preferencialmente de origem bacteriana. Hospedeiros procariotos mais freqüentemente são representados por diversas linhagens de *E. coli*. Entretanto, outras linhagens microbianas podem ainda ser utilizadas, tal como bacilos, por exemplo, *Bacillus subtilis*, diversas espécies de *Pseudomonas*, ou outras linhagens bacterianas. O termo "célula hospedeira" refere-se a célula específica na qual o vetores de expressão é introduzido, bem como a progênie ou progênie potencial desta célula. A mencionada progênie pode ser idêntica à célula parental, ou pode conter modificações que ocorrem nas gerações subseqüentes, devido a mutações e influências ambientais.

Vetores de expressão podem ser introduzidos em células hospedeiras a partir de técnicas de transformação ou transfecção convencionais incluindo, sem se limitar, co-precipitação em cloreto de cálcio ou fosfato de cálcio, transfecção mediada por DEAE-dextran, lipofecção, eletroporação, ou qualquer método comercialmente disponível para a introdução de ácidos nucleicos na célula.

Os termos “transformada” ou “transfectada”, da forma utilizada no presente, incluem qualquer célula hospedeira ou linhagem celular que apresentam o genoma alterado ou aumentado pela presença de pelo menos uma seqüência de DNA previamente selecionada, sendo mencionado DNA também denominado no estado da técnica de engenharia genética, como “DNA heterólogo”, “DNA recombinante”, “DNA exógeno”, “preparado por engenharia genética”, “não nativo” ou “DNA exógeno”, em que a mencionada molécula de DNA foi isolada e introduzida no genoma da célula hospedeira ou linhagem celular através de processos de engenharia genética. As células hospedeiras da presente invenção são tipicamente produzidas a partir de transfecção com uma seqüência de DNA em um vetor de expressão de plasmídeo, um vetor de expressão viral ou uma seqüência de DNA linear isolada. Preferencialmente, o DNA transfectado é uma seqüência de DNA recombinante integrada ao cromossomo, que compreende um gene que codifica um polipeptídeo da presente invenção ou seu complemento, em que a célula hospedeira pode ou não expressar níveis significativos de catelicidina autóloga ou “nativa”.

Para confirmar a presença da seqüência de DNA previamente selecionada na célula hospedeira, diversos testes podem ser realizados. Os mencionados testes incluem, por exemplo, testes de “biologia molecular” bem conhecidos pelos técnicos no assunto, tal como *Southern* e *Northern blotting*, RT-PCR e PCR; “testes bioquímicos”, tal como a detecção da presença ou ausência do polipeptídeo da presente invenção, tal como a partir de meios

imunológicos (ELISAs e Western blots) ou a partir de testes descritos na presente invenção.

COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E ARTIGOS MANUFATURADOS

Em uma realização, a presente invenção fornece uma
5 composição farmacêutica que compreende um polipeptídeo da presente invenção, sua variante ou fragmento do mesmo, ou uma molécula de ácido nucléico do mesmo. Para a preparação de uma composição farmacêutica, um polipeptídeo de acordo com a presente invenção, sua variante ou fragmento do mesmo, ou uma molécula de ácido nucléico do mesmo, é sintetizado ou obtido
10 de outra forma, purificado de acordo com a necessidade ou conforme desejado, e então liofilizado e estabilizado. O polipeptídeo de acordo com a presente invenção, sua variante ou fragmento do mesmo, ou uma molécula de ácido nucléico do mesmo pode, então, ser ajustado a uma concentração apropriada e, então, ser combinado com outros agentes ou veículos
15 farmacêuticamente aceitáveis. Por “farmacêuticamente aceitável” entende-se um veículo, diluente, excipiente e/ou sal que é compatível com os outros ingredientes da formulação, e não são prejudiciais ao paciente.

Formulações farmacêuticas que compreendem um polipeptídeo terapêutico da presente invenção, sua variante ou fragmento do mesmo,
20 podem ser preparadas através de métodos bem conhecidos no estado da técnica utilizando ingredientes bem conhecidos e prontamente disponíveis. Por exemplo, o polipeptídeo pode ser formulado com excipientes, diluentes ou veículos comuns, e formados em tabletes, cápsulas, soluções, suspensões, pós, aerossóis e similares. Exemplos de excipientes, diluentes, e veículos que
25 são apropriados para as mencionadas formulações incluem tampões, bem como cargas e espessantes, tal como amido, celulose, açúcares, manitol e derivados silícicos. Agentes de ligação podem ainda ser incluídos, tais como carboximetil celulose, hidroximetilcelulose, hidroxipropil metilcelulose e outros

derivados de celulose, alginatos, gelatina, e polivinil-pirrolidona.

Agentes umidificantes podem ser incluídos como glicerol, agentes de desintegração como carbonato de cálcio e bicarbonato de cálcio. Agentes de retardo da dissolução podem também ser adicionados, como a parafina.

5 Aceleradores da reabsorção tais como compostos de amônio quaternário podem ainda ser incluídos. Agentes ativos de superfície tais como cetil álcool e monoestearato de glicerol podem ser incluídos. Veículos de adsorção tais como caolino e bentonita podem ser adicionados. Lubrificantes, tais como talco, estearato de cálcio e magnésio, e polietil glicóis sólidos podem ser

10 adicionalmente incluídos. Conservantes podem ainda ser adicionados. As composições de acordo com a presente invenção podem adicionalmente conter agentes espessantes, tais como celulose e/ou derivados de celulose. Adicionalmente, as composições da presente invenção podem ainda apresentar gomas, tais como xantana, goma guar ou goma carbo, ou goma

15 arábica, ou alternativamente polietileno glicóis, bentonas e montmorilonitas, e similares.

Para administração oral, um polipeptídeo de acordo com a presente invenção, sua variante ou fragmento do mesmo pode estar presente como um pó, uma formulação granular, uma solução, uma suspensão, uma

20 emulsão, ou em um polímero sintético ou natural ou resina para a digestão de ingredientes ativos a partir de uma goma de mascar. O polipeptídeo ativo pode ainda se apresentar como um bolus, electuário ou pasta. As formulações podem, quando apropriado, ser convenientemente apresentadas na forma de dosagens unitárias discretas e podem ser preparadas a partir de métodos bem

25 conhecidos no estado da técnica farmacêutico, incluindo as etapas de mistura do agente terapêutico com um veículo líquido, matrizes sólidas, veículos semi-sólidos, veículos sólidos finamente divididos ou suas combinações, e então, se necessário, realiza-se a introdução ou modelagem do produto no sistema de

fornecimento desejado. Os ingredientes ativos totais presentes nas mencionadas formulações incluem de 0,1 to 99,9% em peso da formulação.

Tabletes ou pílulas que contém o polipeptídeo da presente invenção, sua variante ou fragmento do mesmo, podem incluir agentes de tamponamento, tais como carbonato de cálcio, óxido de magnésio e carbonato de magnésio. Pílulas e tabletes podem ainda incluir ingredientes inativos tais como celulose, amido pré-gelatinizado, dióxido de silicone, hidroxipropil metilcelulose, estearato de magnésio, celulose microcristalina, amido, talco, dióxido de titânio, ácido benzóico, ácido cítrico, amido de milho, óleo mineral, polipropileno glicol, fosfato de sódio, estearato de zinco, e similares. Cápsulas de gelatina moles ou rígidas que contém pelo menos um polipeptídeo de acordo com a presente invenção podem conter ingredientes inativos, tais como gelatina, celulose microcristalina, sulfato de lauril sódico, amido, talco, dióxido de titânio e similares, bem como veículos líquidos tais como polietileno glicóis (PEGs) e óleo vegetal. Adicionalmente, tabletes ou pílulas de revestimento entérico que contém um ou mais polipeptídeos de acordo com a presente invenção são designados como resistentes a desintegração no estômago e dissolve-se em ambientes mais neutros a alcalinos, como o duodeno.

O polipeptídeo terapêutico da presente invenção, sua variante ou fragmento do mesmo, administrado oralmente, pode ser formulado para uma liberação sustentada. Neste caso, um polipeptídeo de acordo com a presente invenção pode ser revestido, micro-encapsulado (vide WO 94/ 07529, e patente US 4.962.091), ou colocado de outra forma sobre um dispositivo de liberação sustentada. Uma formulação de liberação sustentada pode ser designada para liberar o polipeptídeo ativo, por exemplo, em uma parte específica do trato intestinal ou respiratório, possivelmente, ao longo de um período de tempo. Revestimentos, envelopes e matrizes protetoras podem ser produzidas, por exemplo, a partir de substâncias poliméricas, tais como polilactídeo-glicolatos,

lipossomos, microemulsões, micropartículas, nanopartículas, ou ceras. Os mencionados revestimentos, envelopes, e matrizes protetoras são úteis para o revestimento de dispositivos implantados no organismo, tais como, endoprótese expansível tubular (*stents*), cateteres, tubo de diálise peritoneal, dispositivos de drenagem e similares.

Um polipeptídeo de acordo com a presente invenção, sua variante ou fragmento do mesmo, pode ser formulado como elixir ou soluções para a administração oral conveniente ou como soluções apropriadas para administração parenteral, por exemplo, através de via intramuscular, subcutânea, intraperitoneal ou intravenosa. Uma formulação farmacêutica de um peptídeo terapêutico de acordo com a presente invenção pode ainda apresentar-se na forma de uma solução ou dispersão aquosa ou anidra, ou alternativamente a forma de uma emulsão ou suspensão ou pomada.

Desta forma, o polipeptídeo de acordo com a presente invenção, sua variante ou fragmento do mesmo, ou uma molécula de ácido nucléico pode, portanto, ser formulada a partir da administração parenteral (tal como injeção, por exemplo, injeção de *bolus* ou infusão contínua) e pode se apresentar na forma de dose unitária em ampolas, seringas previamente carregadas, recipientes de infusão de volume pequeno ou recipiente de múltiplas doses. Conforme descrito acima, conservantes podem ser adicionados para ajudar a manter a vida durante o armazenamento da forma de dosagem. O polipeptídeo ativo e outros ingredientes podem formar suspensões, soluções, ou emulsões em veículos aquosos ou oleosos, e podem conter agentes de formulação tais como agentes de suspensão, estabilizantes e/ou dispersantes. Alternativamente, o polipeptídeo ativo e outros ingredientes podem estar na forma de pó, obtidos a partir de isolamento asséptico de sólido estéril, ou a partir de liofilização da solução, para constituição com um veículo apropriado, tal como água livre de pirógeno, estéril, antes do uso.

Estas formulações podem conter veículos farmacologicamente aceitáveis, veículos e adjuvantes que são bem conhecidos na técnica. É possível, por exemplo, preparar soluções usando-se um ou mais solventes orgânicos que são aceitáveis do ponto de vista fisiológico, escolhidos, em
5 adição à água, de solventes tais como acetona, etanol, álcool isopropílico, éteres glicólicos tais como os produtos vendidos sob o nome "Dowanol", poliglicólicos e polietileno glicólicos, C₁-C₄-alquil ésteres de ácidos de cadeia curta, etil e isopropil lactato, ácidos graxos triglicéridos tais como produtos vendidos sob o nome "Migliol", isopropil miristato, óleos vegetais animais e minerais e
10 polisiloxanos.

É possível adicionar, se necessário, ingredientes adicionais escolhidos de antioxidantes, surfactantes, outros conservantes, formação de filmes, agentes queratolíticos ou comedolíticos, perfumes, aromatizantes e corantes. Antioxidantes tais como t-butilhidroquinona, hidroxianisola butilada,
15 hidroxitolueno butilado e α -tocoferol e seus derivados podem ser adicionados.

Em alguns exemplos de realização, o variante ou fragmento de polipeptídeo, são formulados como um microbicida, que é administrado topicamente ou às superfícies mucosas, como a vagina, o reto, olhos, nariz e boca. Para uma administração tópica, os agentes terapêuticos podem ser
20 formulados como é conhecido na técnica, para direcionar aplicação para uma área alvo. Formas principalmente condicionadas para aplicação tópica levam a forma, por exemplo, de cremes, leites, géis, dispersão ou microemulsões, loções espessas para uma maior ou menor extensão, *pads* impregnados, pomadas ou bastões, formulações em aerossol (tal como sprays ou espumas),
25 sabões, detergentes, loções ou pedaços de sabão. Assim, em um exemplo de realização, um polipeptídeo da invenção pode ser formulado como um creme vaginal ou um microbicida a ser aplicado topicamente. Outras formas convencionais para este propósito incluem curativos de ferimentos, cremes,

loções, pastas, geléias, sprays e aerossóis. Dessa forma, os agentes terapêuticos da invenção podem ser entregues via adesivos ou atadura para administração dérmica. Alternativamente, os polipeptídeos, ligantes e/ou ácidos nucléicos podem ser formulados para ser parte de um polímero adesivo, tal como poliacrilato ou copolímero acrilato/vinil acetato. Para aplicações de longo prazo pode ser desejável usar lâminas de apoio respirável e/ou microporosa, de modo que a hidratação e amaciamento da pele possam ser minimizadas. A camada de apoio pode ser de qualquer espessura desejável para que forneça as funções de proteção e suporte desejáveis. Uma espessura adequada será geralmente de cerca de 10 a aproximadamente 200 microns.

Pomadas e cremes podem, por exemplo, ser formulados com uma base aquosa ou oleosa com a adição de espessura adequada e/ou agentes gelificantes. Loções podem ser formuladas com uma base aquosa ou oleosa e irão geralmente conter um ou mais agentes emulsificantes, agentes estabilizantes, agentes dispersantes, agentes de suspensão, agentes espessantes ou agentes corantes. Os agentes terapêuticos podem também ser entregues via iontoforese, por exemplo, como divulgado nas patentes US 4.140.122; 4.383.529; ou 4.051.842. A porcentagem em peso de um agente terapêutico da presente invenção em uma formulação tópica irá depender de vários fatores, mas geralmente será de 0,01% a 95% do total em peso da formulação, e tipicamente 0,1-85% em peso.

Soluções em gotas, tais como colírios para os olhos ou solução nasal, podem ser formuladas com um ou mais agentes terapêuticos em uma base aquosa ou não aquosa que compreendem um ou mais agentes dispersantes, agentes solubilizantes ou agentes de suspensão. *Sprays* líquidos são convenientemente entregues por meio de embalagens pressurizadas. Soluções em gotas podem ser entregues via um simples frasco com tampa conta gotas, ou via um frasco plástico adaptado para entregar conteúdos

líquidos na forma de gotas via um fechamento especialmente moldado.

O polipeptídeo da presente invenção, seu variante ou fragmento do mesmo podem também ser formulados para administração tópica na boca ou garganta. Por exemplo, os ingredientes ativos podem ser formulados como
5 um comprimido que também compreende uma base aromatizada, usualmente sacarose e acácia ou tragacanto, pastilhas que compreendem a composição em uma base inerte tal como gelatina e glicerina ou sacarose e acácia, e enxaguatórios bucais que compreendem a composição da presente invenção em um veículo líquido adequado.

10 As formulações farmacêuticas da presente invenção podem incluir como ingredientes opcionais, veículos farmaceuticamente aceitáveis, diluentes, solubilizantes ou agentes emulsificantes, e sais dos tipos que estão disponíveis na técnica. Exemplos de tais substâncias incluem soluções salinas normais, tais como soluções salinas fisiologicamente tamponadas e água. Exemplos
15 específicos não limitantes dos veículos e/ou diluentes que são úteis nas formulações farmacêuticas da presente invenção incluem água e soluções salinas tamponadas fisiologicamente aceitáveis tais como soluções salinas tamponadas com fosfato pH 7,0 - 8,0.

O polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo da invenção
20 podem também ser administrados no trato respiratório. Dessa forma, a presente invenção também fornece formulações farmacêuticas em aerossol e formas de dosagem para uso nos métodos da invenção. Em geral, tais formas de dosagem compreendem uma quantidade eficaz de pelo menos um dos agentes da invenção para tratar ou prevenir sintomas clínicos de um câncer
25 específico, tumor, indicação ou doença relacionada. Qualquer atenuação estatisticamente significativa de um ou mais sintomas da infecção que foi tratada de acordo com o método da presente invenção é considerado como sendo um tratamento de tal infecção dentro do escopo da invenção.

Alternativamente, para administração por inalação ou insuflação, a composição pode levar a forma de um pó seco, por exemplo, uma mistura em pó dos agentes terapêuticos e base em pó adequada tal como lactose ou amido. A composição em pó pode ser apresentada em uma forma de unidade
5 de dosagem, por exemplo, cápsulas ou cartuchos, ou, por exemplo, gelatina ou pacotes de bolhas pelos quais o pó pode ser administrado com o apoio de um inalador, insuflador ou um inalador de medida de dose (ver, por exemplo, o inalador medidor de dose pressurizado (MDI) e o inalador de pó seco divulgado em Newman, S. P. em *Aerosols and the Lung*, Clarke, S. W. e Davia, D.
10 edições., páginas. 197-224, Butterworths, Londres, Inglaterra, 1984).

Um polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo, ou uma molécula de ácido nucléico da presente invenção podem também ser administrados em uma solução aquosa quando administrada em um aerossol ou forma inalada. Dessa forma, outras formulações farmacêuticas podem
15 compreender, por exemplo, uma solução salina tamponada fisiologicamente aceitável contendo entre aproximadamente 0,001 mg/ml e aproximadamente 100 mg/ml de um ou mais dos peptídeos da presente invenção específicos para a indicação ou doença a ser tratada. Aerossóis secos na forma de polipeptídeo sólido finamente dividido, ligante ou partículas de ácido nucléico
20 que não são dissolvidas ou suspensas em um líquido são também úteis na prática da presente invenção. Polipeptídeos da presente invenção podem ser formulados como talco e compreendem partículas finamente divididas que possuem uma medida de tamanho de partícula entre aproximadamente 1 a 5 μm , alternativamente entre 2 e 3 μm . Partículas finamente divididas podem ser
25 preparadas por pulverização e filtração de tela, usando-se técnicas bem conhecidas. As partículas podem ser administradas por inalação de uma quantidade pré-determinada do material finamente dividido, que pode estar na forma de um pó. Será apreciado que o conteúdo da unidade do ingrediente

ativo ou ingrediente contido em uma dose aerossol individual de cada forma de dosagem não precise ser constituído de uma quantidade eficaz para tratar a infecção específica, indicação ou doença desde que a quantidade eficaz necessária possa ser alcançada por administração de uma pluralidade de unidades de dosagem. Além disso, a quantidade eficaz pode ser alcançada usando-se menos que a dose na forma de dosagem, tanto individualmente como em uma série de administrações.

Para administração no trato respiratório superior (nasal) ou inferior por inalação, os agentes terapêuticos da invenção são convenientemente entregues por meio de um nebulizador ou uma embalagem pressurizada ou outros meios convenientes de entrega de um spray aerossol. Embalagens pressurizadas podem compreender um propulsor adequado tal como diclorodifluormetano, triclorofluormetano, diclorotetrafluoretano, dióxido de carbono ou outros gases adequados. No caso de um aerossol pressurizado, a unidade de dosagem pode ser determinada pelo fornecimento de uma válvula para entregar uma quantidade medida. Nebulizadores incluem, mas não são limitados por aquelas descritos nas patentes US 4.624.251; US 3.703.173; US 3.561.444 e US 4.635.627. Sistemas de entrega por aerossol do tipo divulgado no presente estão disponíveis por meio de numerosas fontes comerciais incluindo Fisons Corporation (Bedford, Mass.), Schering Corp. (Kenilworth, NJ) e American Pharmoseal Co., (Valencia, CA). Para administração intra-nasal, o agente terapêutico pode também ser administrado via soluções nasais, um *spray* líquido, tal como um frasco plástico atomizador ou inalador com medida de dose. Típicos atomizadores são o Mistometer (Wintrop) e o Medihaler (Riker).

O polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo da invenção, ou molécula de ácido nucléico da invenção podem também ser usados em combinação com outros agentes terapêuticos, por exemplo,

analgésicos, agente antiviral, agentes antimicrobianos, agentes anti-câncer, agentes anti-inflamatórios, agentes anti-histamínicos, broncodilatadores e combinações apropriadas destes, se para as condições descritas ou alguma outra condição.

5 A invenção fornece também um artigo manufaturado que compreende uma composição farmacêutica ou polipeptídeo da invenção rotulado para a utilização em inibir o crescimento de um microorganismo ou rotulado para utilização no tratamento de uma doença de origem alimentar ou uma doença sexualmente transmissível, tais como as descritas neste documento. Tal inclui um artigo manufaturado compreende um frasco contendo 10 uma composição farmacêutica ou polipeptídeo da invenção, bem como fragmentos, variantes ou derivados deste, e instruções de utilização de tais composições ou polipeptídeo para o tratamento de uma doença de origem alimentar ou doença sexualmente transmissível. As instruções podem estar sob 15 a forma de uma bula incluída com material da embalagem ou impresso no material da embalagem.

DIVERSAS COMPOSIÇÕES E ARTIGOS MANUFATURADOS

Em um exemplo de realização, a invenção fornece um artigo manufaturado que inclui a composição contendo um polipeptídeo, sua variante 20 ou fragmento do mesmo, ou uma molécula de ácidos nucléico deste, da invenção.

Esses artigos podem ser materiais para embalagens alimentares. Exemplos não limitantes incluem invólucros; plástico flexível; papelão rígido, papel, madeira e produtos em caixas; papéis flexíveis, por exemplo, sacos; 25 rígido metais em latas e tambores; flexível metais, por exemplo, lâminas de alumínio; laminados ou multi-camadas, que combinam papel, plástico e alumínio, garrafas e frascos de vidro, garrafas e frascos de plástico. Um peptídeo ou composição da invenção pode ser incorporado em materiais para

embalagens alimentares durante a fabricação dos materiais da embalagem. O peptídeo ou composição pode ser incorporado na matriz do material da embalagem ou pode ser aplicado como um revestimento interno da superfície do material de embalagem.

5 Os artigos que podem incluir um variante ou fragmento do polipeptídeo da invenção pode ser um alimento fresco ou transformado, ou item alimentício pré-embalado. Exemplos não limitantes incluem conservas, alimentos congelados, alimentos desidratados, carne embalada, alimentos parcialmente preparados, alimentos e misturas secas prontas para servir.

10 Uma composição que inclua um polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo, ou uma molécula de ácidos nucléico da invenção, pode estar sob a forma de uma solução encapsulada em pó ou *spray* contendo um polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo, ou uma molécula de ácidos nucléico da a invenção. Uma composição compreendendo um polipeptídeo da
15 invenção pode incluir um complemento alimentar tal como outro agente antimicrobiano, um antioxidante, uma corante natural ou artificial, um aromatizante natural ou artificial ou melhorador de sabor, agente de branqueamento, um agente quelante, um aditivo nutriente, um agente espessante ou agente estabilizante, ou qualquer combinação dos mesmos. O
20 aditivo alimentício pode ser propionato de cálcio, propil galato, peróxidos, ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, tiamina, riboflavina, niacina, lecitina, acesulfame-K, ácido acético, peróxido de acetona, ácido adípico, ágar, fosfato potássio de alumínio, sulfato de amônio, amilase, annatto extrato, ácido ascórbico, ascorbil palmitato, aspartame, benzaldeído, peróxido benzoílo, beta-
25 caroteno, butil-hidroxianisolo (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), biotina, bromato de potássio, cafeína, cloreto de cálcio, cálcio caseinato, iodato de cálcio, pantotenato de cálcio, fosfato de cálcio, propionato de cálcio sacarina, silicato de cálcio, cálcio estearoil lactilato, sulfato de cálcio, carboximetilcelulose, goma

da semente de alfarroba, carragenina, algas carrageen, cera de carnaúba, goma de celulose (carboximetil celulose), dióxido de cloro, ácido cítrico, cobalamina, cianocobalamina, xarope de milho, xarope de milho sólido, dextrina, dextrose, glicose, e diglicerídeos e monoglicerídeos, fosfato 5 dipotássico, EDTA dissódico, guanilato dissódico, inosinato dissódico, ácido etilenodiamino tetracético (FD & C amarelo # 5), amarelo FD & C # 6, lactato férrico, óxido de ferro, fosfato férrico, férrico de sódio, sulfato de ferro, flúor, folacina ou ácido fólico, frutose (levulose), ácido fumárico, fungaril protease, furceleran, gelatina, glicose, glicerina/glicerol, monoestearato de glicerol, goma 10 guar, goma árabe, heptil parabeno, frutose alta, ácido clorídrico, água oxigenada, proteínas vegetais hidrolisadas, invertase, açúcar invertido, iodo, citrato isopropílico, L-cisteína, lactalbumina, ácido láctico, *Lactobacillus bulgaricus*, lactose, lecitina, levulos, licorice, farinha de sementes de alfarroba, carbonato de magnésio, ácido málico, manitol, metil antranilato, fosfato 15 monocálcico, monoglicerídeos, glutamato monossódico, monoestearato, nitratos e nitritos, noz moscada, oxistearina, álcool pantoténico, metil parabenos, propil parabenos, heptil parabenos, petrolato, ácido fosfórico, polidextrose, polissorbato 60, polissorbato 80, potássio sulfato alumínio, bissulfito de potássio, bromato de potássio, carbonato de potássio, citrato de 20 potássio, iodato de potássio, metabisulfito de potássio, fosfato de potássio, sorbato de potássio, propionatos, ácido propiônico, galato de propila, propilenoglicol, pirofosfatos, quinina, sacarina, cloreto de sódio, nitrato de potássio, pirofosfato ácido de sódio de silício, alginato de sódio, fosfato de alumínio sódico, ascorbato de sódio, benzoato de sódio, bicarbonato de sódio, 25 bissulfito de sódio, caseinato de sódio, citrato de sódio, eritorbato de sódio, metabissulfito de sódio, nitratos e nitritos de sódio, fosfato de sódio, propionato de sódio, pirofosfato de sódio, silicoaluminato de sódio, estearoil lactato de sódio, sulfito e bissulfito de sódio, estearoil fumarato de sódio, tripolifosfato de

sódio, sorbatos / ácido sórbico, sorbitol, proteína de soja, cloreto estano, fécula e amido modificado, sacarose, sacarose poliéster, sulfitos, açúcar, dióxido de enxofre, taninos, ácido tânico, ácido tartárico, proteínas vegetais texturizadas, dióxido de titânio, tocoferóis, goma de tragacanto, fosfato 5 tricálcico, baunilha, vanilina, etilvanilina, vinagre, vitamina C, vitamina D, vitamina E, soro do leite, goma xantana, ou qualquer combinação destes.

Outros artigos manufaturados podem incluir um dispositivo terapeuticamente útil como um anel vaginal, um preservativo, uma gaze ou um dispositivo terapêutico semelhante. O dispositivo possui uma quantidade 10 terapeuticamente eficaz de uma composição farmacêutica para controlar o crescimento ou sobrevivência do microrganismo. O dispositivo pode ser embalado em um kit, juntamente com instruções de utilização. A composição farmacêutica inclui, pelo menos, um variante ou fragmento de polipeptídeo da presente invenção, em uma quantidade terapeuticamente eficaz na qual a 15 infecção é controlada.

MÉTODOS DA INVENÇÃO

Uma molécula de ácidos nucleicos e/ou célula hospedeira da invenção pode ser usada para produzir um polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo, da invenção. Assim, a invenção fornece um método para 20 produzir um variante ou fragmento de polipeptídeo, utilizando as moléculas de ácido nucleico e célula hospedeira da invenção. O método compreende em cultivar a célula hospedeira na qual uma molécula do ácido nucleico da invenção tenha sido introduzida em um meio adequado no qual o variante ou fragmento do polipeptídeo é produzido. O método pode adicionalmente 25 envolver a purificação do variante ou fragmento de polipeptídeo a partir do meio ou da célula hospedeira.

Outras utilizações da molécula de ácidos nucleico da invenção incluem a utilização como sondas de hibridização ou *primers* para a detecção,

identificação ou para gerar uma codificação de ácidos nucleicos do polipeptídeo da invenção. Métodos para detectar, identificar e gerar ácidos nucleicos da invenção são conhecidos no estado da técnica e são também aqui descritas. Estes métodos incluem, sem se limitar a, técnicas de hibridização de ácidos nucleicos, por exemplo, *southern* e *northern hybridization*, seleção de bibliotecas em hibridação de placas ou colônias; PCR e seqüenciamento de ácidos nucleicos.

Um polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo da invenção também pode ser utilizado como um imunógeno para gerar anticorpos específicos. O termo "anticorpos" refere-se a uma molécula imunoglobulina, por exemplo, um anticorpo monoclonal, e uma porção imunologicamente ativa da molécula de imunoglobulina. Um anticorpo monoclonal é uma população de moléculas anticorpo que se liga especificamente a um epítopo específico do antígeno. Porções imunologicamente ativas da molécula de imunoglobulina incluem fragmentos F(ab) e F(ab')₂. Tanto a extensão completa do polipeptídeo da SEQ ID No: 2 ou um fragmento biologicamente ativo, tais como SEQ ID No: 4 podem ser usados para gerar um anticorpo específico. Um anticorpo dirigido contra um polipeptídeo da invenção é um anticorpo específico e, como tal, irá se ligar com uma afinidade de 50% ou mais, de preferência cerca de 75% ou mais, e de preferência, uma afinidade de cerca de 90% ou mais, a um polipeptídeo de SEQ ID No: 4 do que para um polipeptídeo que possui menos de 10% de identidade com a SEQ ID No: 4.

O polipeptídeo imunogênico, variante ou fragmento deste, da presente invenção compreende de, pelo menos, 20, e de preferência 30, 40, 50, 60 ou mais de 60, resíduos contíguos de aminoácido da seqüência de aminoácidos SEQ ID No: 2 ou 4 que englobam um epítopo do polipeptídeo no qual um anticorpo contra o epítopo leva a formação de um complexo imune-específico com o polipeptídeo.

Métodos de gerar anticorpos são bem conhecidos no estado da técnica. Por exemplo, um anticorpo policlonal pode ser preparado pela imunização de mamífero adequado com um polipeptídeo ou fragmento imunogênico purificado da invenção. O mamífero pode ser, por exemplo, um coelho, cabra ou rato. O polipeptídeo ou fragmento antigênico pode ser expresso utilizando tecnologia de DNA recombinante, preparado por síntese química, ou purificado utilizando técnicas padrões de purificação de proteínas. No momento oportuno após a imunização, as moléculas de anticorpo podem ser isoladas do mamífero, por exemplo, a partir do sangue ou outros fluidos do mamífero, e adicionalmente purificadas utilizando técnicas padrões que incluem, sem se limitar a, precipitação utilizando sulfato de amônio, cromatografia de filtração em gel, cromatografia de troca iônica ou cromatografia por afinidade utilizando a proteína A. Além disso, as células produtoras de anticorpos do mamífero podem ser isoladas e utilizadas para preparar células de hibridoma que secretam anticorpos monoclonais específicos para um polipeptídeo da invenção. Técnicas de preparação de anticorpos monoclonais de células de hibridoma secretoras são conhecidas no estado da arte. Vide, por exemplo, Kohler e Milstein, *Nature*, 256:495 (1975) e Kozbor *et al. Immunol Today*, 4:72 (1983). Os anticorpos monoclonais podem também ser preparados utilizando outros métodos conhecidos no estado da técnica, como, por exemplo, a expressão de uma molécula de DNA recombinante, ou seleção de uma biblioteca de imunoglobulina combinatória recombinante utilizando um polipeptídeo da invenção. Assim, a invenção fornece também um método de produção de um anticorpo que compreende a imunização de animais não humanos com um fragmento imunogênico da SEQ ID No: 2 ou 4.

Os anticorpos assim gerados podem ser utilizados para identificar e purificar polipeptídeos da invenção, inclusive identificando os polipeptídeos

da invenção que são variantes alélicas da SEQ ID No: 2 ou 4.

Um polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo, ou uma molécula de ácido nucléico deste, da invenção pode ser usado como um agente microbicida ou microbiostático como acima descrito. Este pode ser usado para reduzir ou inibir o crescimento ou sobrevivência de um microrganismo. O termo "inibir" inclui qualquer diminuição na quantidade detectável, por exemplo, 5%, 10%, 20%, 40% ou mais de 40%, e pode ser determinado pela contagem como, por exemplo, uma cultura bacteriana ou título viral, ou pela avaliação de um ou mais sintomas associados à infecção pelo microrganismo. Os sintomas associados à infecção por um microrganismo, tais como uma bactéria, fungo ou protozoários são conhecidos por aqueles conhecedores do assunto. Estes sintomas são exclusivos para um determinado microrganismo infeccioso e as condições resultantes. Condições contra os quais um polipeptídeo da invenção pode ser utilizado incluem, mas sem se limitar a, doenças de origem alimentar e de doenças sexualmente transmissíveis (DST).

Microorganismos contra os quais um polipeptídeo da invenção é ativo inclui células procarióticas e eucarióticas, tais como, bactérias gram-negativas e bactérias gram-positivas, leveduras e protozoários. Exemplos não limitantes incluem a *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma canigenitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Candida albicans*, *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum* ou *Chlamydia trachomatis*, ou organismos de deterioração. Exemplos de concentração inibitória mínima (MIC) de um polipeptídeo da invenção contra *Neisseria gonorrhoeae* (ATCC10150) e *Ureaplasma canigenitalium* (ATCC51252) são MIC's de, pelo menos, cerca de 0,25 µM, mais preferencialmente, pelo menos,

cerca de 0,10 μM , e mais preferencialmente, cerca de 0,06 μM . Outros exemplos do MIC's de um polipeptídeo da invenção contra vários microrganismos estão resumidos na Tabela 4. A atividade antimicrobiana da MIC refere-se a inibição completa do crescimento de um microorganismo, tal como avaliado à olho nu, após um período de incubação selecionado. O método utilizado para determinar o MIC é o estabelecido em Sang *et al.*, *Infection and Immunity*, 2611-20 (maio de 2005).

Um "vertebrado" inclui, sem de limitar a, um peixe, um anfíbio, um pássaro, bem como um mamífero. Assim, um vertebrado pode ser um cão, gato, vaca, cavalos, ovelhas, macaco, chimpanzé, gorila, rato, porco, galinha, peixes e humanos. Assim, em um exemplo de realização, a invenção fornece um método para limitar a transmissão de uma infecção bacteriana entre os vertebrados. Em outro exemplo de realização, a invenção fornece um método para tratar as infecções microbianas em vertebrados. A infecção bacteriana pode resultar em uma infecção cutânea, uma doença causada pela alimentação ou doença sexualmente transmissível. Exemplos não-limitantes incluem gonorréia, sífilis, clamídia, intoxicação alimentar, candidíase, pneumonia, bronquite, lesões orais, tricomoníase, sapinho vaginal ou oral. Assim, a invenção fornece também um método para tratar doenças associadas com a infecções causadas por nenhum dos microorganismo acima identificados.

Métodos de redução ou de inibir a sobrevivência ou o crescimento de uma microorganismo envolve a exposição do microorganismo com uma quantidade eficaz de um polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo, ou uma molécula de ácido nucléico deste, da invenção. Uma composição que possa suportar o crescimento ou sobrevivência dos microrganismos pode ser exposta com uma quantidade eficaz do polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo, ou uma molécula de ácido nucléico deste, da presente invenção em

varias maneiras. Por exemplo, se a composição é um item alimentar, o polipeptídeo da invenção podem ser adicionado diretamente ao alimento, poderá ser incorporada na matriz do material da embalagem ou pode ser revestido no material da embalagem, caso em que o polipeptídeo pode ser dispensado durante o armazenamento, após a dissolução do material de encapsulamento, em contato com a umidade ou a uma determinada temperatura. Se a composição é um fluido, o polipeptídeo da invenção pode ser adicionado diretamente aos fluidos corporais.

Um vertebrado pode ser exposto ao polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo, ou uma molécula de ácido nucléico deste, em uma variedade de formas, incluindo, sem se limitar a, a administração utilizando a seguinte via: via oral, parenteral (incluindo subcutânea, endovenosa, intramuscular, intraperitoneal), retal, vaginal, dérmica, transdérmica (tópica), transmucosa, intratorácica, intrapulmonares e via intranasal (respiratórias). Os meios de administração podem ser feitos por injeção, utilizando uma bomba ou qualquer outro mecanismo adequado.

Um polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo, ou uma molécula de ácido nucléico deste, da presente invenção pode ser administrado a um vertebrados em uma única dose, em doses múltiplas, de uma forma continuada ou intermitente, dependendo, por exemplo, da condição fisiológica do beneficiário, se o objetivo da administração é terapêutico ou profilático, e outros fatores conhecidos pelos médicos qualificados. A administração do peptídeo da invenção pode ser essencialmente contínua ao longo de um período de tempo pré-selecionado ou podem ser com uma série de doses espaçadas. A administração local e sistêmica é contemplada.

A dosagem a ser administrada a um vertebrado pode ser qualquer quantidade adequada para reduzir ou prevenir infecções ou para o tratamento de pelo menos um dos sintomas associados à infecção. Alguns fatores que

determinam dosagens adequadas são bem conhecidos para aqueles hábeis na técnica e podem ser abordadas com experimentação de rotina. Por exemplo, determinação físico-químicas, toxicológicas e propriedades farmacocinéticas podem ser feitas usando ensaios químicas e biológicos padrões pelo do uso de técnicas de modelos matemáticos conhecido nas técnicas química, farmacológica e toxicológica. A utilidade terapêutica e o esquema posológico podem ser extrapolados a partir dos resultados de tais técnicas e através do uso adequado de modelos farmacocinéticos e/ou farmacodinâmicos. Outros fatores irão depender de cada paciente, incluindo idade, condição física, tamanho, peso, a condição de ser tratada, a gravidade do estado, e qualquer tratamento concomitante. A dosagem dependerá também do agente escolhido e se é uma prevenção ou tratamento a ser alcançado, e se o agente é quimicamente modificado. Esses fatores podem ser facilmente determinados pelo médico.

15 A quantidade exata a ser administrada a um vertebrado será da responsabilidade do médico atendente. No entanto, para alcançar o(s) efeito(s) desejado(s), um agente da invenção, ou uma combinação, pode ser administrada como dose única ou dividida, por exemplo, podem ser administrados em dosagens de pelo menos aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 500 to 750 mg/kg, de pelo menos aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 300 a 500 mg/kg, de pelo menos aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 a 300 mg/kg ou pelo menos aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 a 100 mg/kg do peso corporal, embora outras dosagens podem fornecer resultados benéficos.

25 O peso absoluto de um dado polipeptídeo, sua variante ou fragmento deste da invenção incluído em uma unidade de dose pode variar amplamente. Por exemplo, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2 g, ou aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 mg, de pelo menos um

polipeptídeo da invenção, ou uma pluralidade de polipeptídeos podem ser administrados. Alternativamente, a unidade de dosagem pode variar de aproximadamente 0,01 g a aproximadamente 50 g, de aproximadamente 0,01 g a aproximadamente 35 g, de aproximadamente 0,1 g a aproximadamente 25 g, 5 de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 12 g, de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 8 g, de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 4 g, de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 2 g.

Doses diárias do polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo da presente invenção podem também variar. Tais doses diárias podem 10 variar, por exemplo, de aproximadamente 0,1 g/dia a aproximadamente 50 g/dia, de aproximadamente 0,1 g/dia a aproximadamente 25 g/dia, de aproximadamente 0,1 g/dia a aproximadamente 12 g/dia, de aproximadamente 0,5 g/dia a aproximadamente 8 g/dia, de aproximadamente 0,5 g/dia a aproximadamente 4 g/dia, e de aproximadamente 0,5 g/dia a aproximadamente 15 2 g/dia.

Um polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo da presente invenção, ou uma molécula de ácido nucléico da invenção pode ser usada isoladamente ou em combinação com um segundo medicamento. O segundo medicamento pode ser um medicamento conhecido como um agente 20 antibacteriano tal como, β -lactâmicos, ou outros antibióticos macrólídicos, por exemplo, Azitromicina, Doxiciclina, Tetraciclina e Eritromicina; um agente antifúngico como clotrimazol, nistatina, fluconazol, cetoconazol, anfotericina B, caspofungina ou voriconazol; um agente eficaz contra um protozoário, como, por exemplo, Metronidazol ou tinidazol. O segundo medicamento também pode 25 ser um agente antiviral como o Abacavir, Aciclovir, Amantadina, Didanosina, Emtricitabina, Enfuvirtide, Entecavir, Ganciclovir, Gardasil, Lamivudina, Nevirapina, Nelfinavir, Oseltamivir, Ribavirina, Rimantadine, Ritonavir, Stavudine, Valaciclovir, Vidarabine, Zalcitabina e Zidovudina. A quantidade

eficaz do segundo medicamento irá seguir as recomendações do fabricante do segundo medicamento, do julgamento do médico e será guiado pelos protocolos e fatores administrativos para a quantidade e dosagem, tal como indicado em *Physicians Desk Reference*.

5 A eficácia do método de tratamento pode ser avaliada monitorando o vertebrado pelo controle dos sinais ou sintomas da infecção bacteriana, como foi referido anteriormente, bem como a determinação da presença e/ou quantidade de microorganismos presentes no sangue, por exemplo, o número de células, usando métodos conhecidos no estado da
10 técnica, incluindo, sem se limitar a, reação em cadeia da polimerase, amplificação mediada pela transcrição ou cultivo de células.

A invenção também será adicionalmente descrita por referência pelos seguintes exemplos, que não têm a intenção limitar o escopo da invenção descrito nas reivindicações.

15

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

IDENTIFICAÇÃO E CLONAGEM DO GENE K9CATH

A identificação do cDNA do K9CATH foi estabelecido pela exploração no Centro Nacional de Informação sobre Biotecnologia *GenBank*TM.
20 As seqüências complementares de DNA humano hCAP18/LL-37 (*GenBank*TM Número NM004345), catelicidina 1 bovina (NM174825), e suína PR-39 (L23825), foram alinhados, e um par *primers* degenerados foram projetados especificamente para a seqüência conservada que codifica a pré- região dos polipeptídeos correspondentes. *Primers* (direto, 5'-
25 TCACTGKTGCTYCTGCTGCT-3' (SEQ ID No: 39), e reverso, 5'-TGGCCTGGTYSARGGTSACTGT-3' (SEQ ID No: 40); onde Y = C ou T, K = G ou T, S = C ou G, e R = A ou G) correspondem às posições 40-59 e 241-262, respectivamente (Tabela 3), relativa ao códon de início da tradução do gene

humano.

TABELA 3

PRIMERS DE RACE E RT-PCR PARA K9CATH

Nome do <i>Primer</i>	Seqüência (SEQ ID No)	Local no cDNA(nt)	Tamanho do produto (bp)	Número de acesso GenBank™
<i>Primers RACE</i>				
<i>Primer</i> direto exterior	5'-TCACTQKTGCTYCTGCTGCT-3' (SEQ ID No: 39)	180-199		NM004345
<i>Primer</i> reverso exterior	5'-TGGCCTGGTYSARGGTSACTGT-3' (SEQ ID No: 40)	493-472	293	NM004345
<i>Primer</i> direto interior	5'-CCTTAGCTACAGGGAGGCTGTG-3' (SEQ ID No: 41)	133-154		AY392089
<i>Primer</i> reverso interior	5'-GACTGTCCCTTCACACTGTTTCAC-3' (SEQ ID No: 42)	373-350	241	AY392089

Utilizando os *primers* desenhados e o RNA total dos tecidos rastreados como modelo, uma única reação de RT-PCR de uma etapa (*AccessQuicfc™ RT-PCR system, Promega*) foi realizado produzindo um fragmento de cDNA do K9CATH. O produto da amplificação foi seqüenciado com um Analisador de DNA ABI3700 no *K-State Sequencing and Genotyping Facility* (Manhattan, KS) e confirmado por codificar uma fase aberta de leitura (OFR) com homologia a catelicidinas conhecidas. Para se obter o cDNA de comprimento completo, foi utilizado um protocolo de amplificação rápida das extremidades de cDNA (RACE) modificado, o qual seleciona mRNAs 5'-capped não-truncados (Kit Ambion, FirstChoice™ RLM-RACE). O 5'-RACE foi obtido por transcrição reversa do RNA total (de medula óssea, baço e testículos independentemente), seguida por duas rodadas de *aninhados* PCR com *primers* correspondente ao da seqüência adaptadora 5'-final e dois *primers*

reversos alinhados (ou seja, o referido *primer* verso mencionado, e o *primer* reverso interno 5'-GACTGTCCCTTCACACTGTTTCAC-3' (SEQ ID No: 42)).

A mesma estratégia foi utilizada para 3'-RACE com *primers nested* correspondentes ao adaptador 3'-final e dois *primers* reversos (ou seja, o *primer* acima referido e o *primer* direto interior 5'-CCTTAGCTACAGGGAGGCTGTG-3' (SEQ ID No: 41)) (Tabela 3). Os produtos da PCR *nested* foram purificados com um kit de purificação de PCR baseado em uma coluna (Qiagen), e clonados em plasmídeos usando o kit *pGEM®-T Easy Vector System* (Promega). Uma seqüência 5'-ou 3'- de cDNA RACE foi gerada a partir de seqüenciamento de pelo menos cinco clones. O comprimento total do cDNA foi então gerado pela ligação das seqüências 5'- e 3'- e deleção da região de adaptação e região de sobreposição. A eficiência do procedimento de RT foi padronizada com a garantia de níveis comparáveis do gene de controle interno (*house-keeping*) GAPDH, amplificado pelo PCR.

Com base nas seqüências de domínios de catelinas altamente conservadas, um conjunto de *primers* foi criado, pelo alinhamento das seqüências de catelicidinas humana, bovina e suína. Este conjunto de *primers* amplificou com sucesso as seqüências de catelicidinas humana, suína, e células de medula óssea de cães. A banda amplificada a partir de medula óssea de cães apresentou uma dimensão semelhante aos da banda de humanos LL-37 e suínos PR-39 (Fig. 1A). A seqüência do produto de amplificação do cDNA a partir do mRNA da medula óssea de cão mostraram mais de 80% de similaridade coma as regiões da catelicidinas em eqüinos, suínos e humanos (Agerberth *et al.*, *Blood*, 96:3086 (2000); Scocchi *et al.*, *FEBS Lett* ., 417:311 (1997); Scott *et al.*, *J. Immunol.*, 169:3883 (2002)). Usando *primers* gene específicos baseados na seqüência de cDNA de cão, a seqüência de cDNA de comprimento total putativa da catelicidina de cão foi identificada. A lista completa da seqüência de cDNA e do peptídeo traduzido da

catelicidina de cão são exibidos na Fig. 1B. A molécula de cDNA canina tem o tamanho de 630 pb com regiões curtas 3'-5'- não traduzidas, e é principalmente ocupada por uma região de codificação de 519 pb. O cDNA codifica um peptídeo de 172 resíduos de aminoácido. A predição do Sinal Computacional com IP e PSORT (ExpPASy, <http://au.expasy.org/tools/#proteoma>) indica que um peptídeo sinal de 29- aminoácidos está localizado em seu N-terminal.

EXEMPLO 2

EXPRESSÃO TECIDUAL DE K9CATH

Para determinar a expressão de mRNA do K9CATH, foram coletadas amostras de tecido de cães clinicamente saudáveis e os procedimentos seguintes foram aprovados pelo Comitê Institucional de Uso e Cuidados de Animais da Universidade do Estado do Kansas. Todas as amostras foram colocadas em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta e armazenadas a -135 °C até o momento de sua utilização. Todos os cães tiveram um exame clínico completo e um exame de rotina, incluindo exames hematológicos e bioquímicos do sangue, urinálise antes da coleta do tecido. Todos os resultados clínicos laboratoriais estavam dentro dos limites normais. O RNA de medula óssea Humana foi adquirido da Clontech (Palo Alto, Califórnia), o RNA de medula óssea suína foi obtida (Wu *et al.*, *Infect. Immun.*, 68:5552 (2000)). O RNA total foi extraído com *TRI Reagent* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), após a moagem dos tecidos congelados em nitrogênio líquido.

Uma RT-PCR de uma etapa foi utilizada para detectar a expressão de mRNA do K9CATH [30]. Resumidamente, o RNA total foi tratado com DNase I RQ1 livre de RNase (Promega) para eliminar qualquer contaminação de DNA genômico. As amostras de RNA (250 ng) foram então utilizadas 25 µL em uma mistura de reação de RT-PCR com uma concentração de 0,1 µM de cada *primer* direto e reverso (ou seja, os *primers nested* genes específicos utilizados nas reações de RACE). Um RT-PCR de uma etapa

convencional foi realizado utilizando uma kit *AccessQuick™ RT-PCR System* (Promega). A síntese de DNA complementar e a pré-desnaturação foram realizadas durante o 1 ciclo a 48 °C durante 45 minutos e a 95 °C durante 3 minutos; a amplificação foi realizada por 40 (K9CATH) ou 25 (gliceraldeído 3-
5 fosfato desidrogenase, GAPDH) ciclos a 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos e 72 °C durante 30 segundos, com uma etapa de extensão final realizada a 72 °C por 10 minutos em uma mistura de reação de 25 µL. Após a amplificação, 10 µL de cada mistura de reação foi analisada por eletroforese em gel agarose 1,5%, e as bandas foram visualizadas após a
10 coloração com brometo de etídio.

Assim, a expressão de mRNA do K9CATH em tecidos de cães saudáveis foi avaliada semi quantitativamente pela análise de RT-PCR. Tal como demonstrado na Figura. 2, a catelicidina era predominantemente expressa em células precursoras mielóide (medula óssea), e em menor
15 quantidade, no baço, fígado e testículos. Uma expressão mínima do K9CATH foi detectada em tecidos saudáveis do pulmão, rim e intestino. O produto de amplificação de RT-PCR a partir de medula óssea, baço, fígado, e testículos foram clonados no vetor pGEM®-T Easy Vector, como descrito anteriormente para os produtos de RACE, e o seqüenciamento. Todas as bandas
20 amplificadas foram confirmadas por serem a mesma molécula de catelicidina como no Exemplo 1.

EXEMPLO 3

ORGANIZAÇÃO DO GENE *CATHEK9CATU* CANINO

A dedução da seqüência de aminoácidos do K9CATH foi utilizada
25 para pesquisar a seqüência genômica canina traduzida em base de dados; não redundante (RN), com seqüência genômica de alto rendimento (HTG), e pela estratégia de “*Whole Genome Shotgun Sequencing*” (WGS), utilizando o programa TBLASTN (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215:403 (1990)) com as

configurações padrões no site da *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Para obter a estrutura do gene K9CATH, as seqüências genômicas contendo o gene canino foram recuperadas a partir do GenBank e comparadas com sua seqüência de cDNA, utilizando o Programa Spidey sobre website do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Ostell/Spidey>). A localização cromossômica do gene K9CATH foi revelada através da utilização do Programa *Map Viewer Program* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>).

Uma pesquisa da seqüência do peptídeo K9CATH que foi prevista através de todas as seqüências do genoma canino atualmente disponíveis no GenBank identificou duas seqüências WGS: AAEX02021310, que continha toda a seqüência K9CATH e AACN010698115, que incluía apenas 67 dos 126 resíduos de aminoácidos. A seqüência WGS AAEX02021310 foi, portanto, utilizada para o alinhamento com o a seqüência de cDNA K9CATH de comprimento total para a obtenção da estrutura do gene utilizando o programa *Spidey*. Assim como demonstrado na Figura. 4, a fase aberta de leitura para o K9CATH foi separada por três *íntrons* de 627, 137, e 575 pb, respectivamente, o que é rememorativo de outros genes de catelicidina de mamíferos (Niyonsaba *et al.*, *Curr. Drug Metas Inflamm. Allergy*, 2:224(2003); Niyonsaba *et al.*, *Immunology*, 106:20 (2002); Gennaro *et al.*, *Biopolymers*, 55:31 (2000)). A seqüência putativa madura é codificada pelo último *exon*, enquanto os três primeiros *exons* codificam o sinal e pró-seqüências. Esta organização de gene está bem conservada entre todas as espécies de mamíferos investigado (Tomasinsig *et al.*, *Curr. Proteic Pept. Sci.*, 6:23(2005); Gennaro *et al.*, *Biopolymers*, 55:31 (2000)). O gene K9CATH foi localizado no cromossomo 20 utilizando o Programa *Map Viewer program* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>). A duração de cada *exon* e *íntron* está indicado na Fig. 4; as seqüências de aminoácidos codificados por cada *exon*

também são exibidas. Quatro cisteínas na região da pró-catelina estão sublinhadas e seqüência peptídica madura do antimicrobiano está sublinhada em negrito. A seqüência de nucleotídeos da catelicidina canina foi registrada na base de dados GenBank™ sob o número AY392089. Nota-se que as bordas de
5 *exon-intron* da catelicidinas também estão altamente conservadas entre as espécies de mamíferos (dados não apresentados).

EXEMPLO 4

SÍNTESE DO POLIPEPTÍDEO K9CATH

Um peptídeo consistindo de 38 aminoácidos do C-terminal do
10 K9CATH maduro foi quimicamente sintetizado (BioMer Technology, Concord CA.). A seqüência deste peptídeo, designada SEQ ID No: 4, é a seguinte: RLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS. As moléculas sintéticas eluídas em um único pico no RP-HPLC e foi confirmada por espectroscopia de massa. A pureza final do peptídeo foi > 99%, com um peso molecular de
15 4512,1. O peptídeo foi liofilizado e dissolvido em ácido acético 0,01% a 2 mL (cerca de 0,5 mM) como uma solução de estoque e armazenados a -135 °C até o momento de sua utilização. A concentração do peptídeo foi determinada usando o kit de ensaio de proteína BCA (Pierce Inc., Rockford, IL). Albumina humana estéril (Sigma Aldrich) foi adicionada à solução a fim de se obter uma
20 concentração final de peptídeos de 0,1% antes de ensaios antimicrobianos.

EXEMPLO 5

ANÁLISE ESTRUTURAL DO K9CATH

Para se determinar a estrutura secundária do K9CATH em ambientes que mimetizam a membrana, experimentos de dicroísmo circular
25 foram realizados em um espectropolarímetro Jasco-715. Espectros foram adquiridos utilizando uma espessura da célula de (*path-length cell*) 0,1 centímetros sobre um intervalo de 190-250 nm; Soulages *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276:34162 (2001)). Espectros foram coletados a 25 °C cada uma com 1 nm

com 2 segundo de tempos médio por ponto e 1 nm banda de passagem. O peptídeo foi medido em 50 mM de tampão fosfato de potássio em diferentes concentrações de trifluoroetanol (TFE) (10%, 20%, 40% e 60%) ou micelas SDS (0,25% e 0,5%), bem como, sem TFE. A média de resíduos com elipticidade (MRE) foi expressa como $[\theta]_{MRE}$ (deg.cm².dmol⁻¹). O conteúdo α -hélise foi estimado a partir da dicróica mínima a 222 nm (Chen *et al.*, *Biochemistry*, 13:3350 (1974)). A espectroscopia CD mensurada revelou que K9CATH adotou uma conformação enovelada totalmente aleatória, sem uma conformação de estrutura helicoidal em solução aquosa. O peptídeo, no entanto, mostrou um aprimoramento da conformação helicoidal com o aumento da concentração do agente indutor de hélice TFE, exibindo 72% de helicidade em 60% de TFE (Fig. 5). De forma similar, em um ambiente mimético lipídico, K9CATH adotou uma estrutura com um teor helicoidal de 30%, na presença de 0,1% SDS.

Também foram gerados modelos estruturais para o peptídeo catelicidina via modelo de homologia. A estrutura alvo foi predita através de um alinhamento por uma NMR solução estrutura do CAP18 (Chen *et al.*, *FEBS Lett.*, 370:46 (1995)). A seqüência de alinhamento inicial para estes dois sistemas foi realizada através do programa *Clustal-W* (Thompson *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 22:4673 (1994)), utilizando uma matriz de substituição Blosum 30, com um valor arbitrado de penalidade para a abertura (*gap-opening penalty*) de 10 e um valore arbitrado de penalidade para extensão (*gap-extension penalty*) de 0,1. O alinhamento resultante e a estrutura do peptídeo CAP18 tridimensional foram então processados pelo programa *Modeller* (Sanchez *et al.*, *Meth. Mol. Biol.*, 143:97 (2000) para produzir uma predição estrutural para a catelicidina alvo. O padrão de *Modeller* para simular os ciclos de anelamento foram usados para o refinamento estrutural. Análise da estrutura secundária do peptídeo e das características da superfície foi conduzida sobre as estruturas

resultantes via SYBYL (SYBYL® 6.9.2, TRIPOS Inc., St. Louis, MO), e a predição da estrutura secundária foi validada usando o programa PSIPRED (McGuffin *et al.*, *Bioinformatics*, 16:404 (2000)).

A estrutura da K9CATH foi predita através do alinhamento com
5 uma estrutura de solução RMN do Cap18 (PDB ID: Hyp). Os motivos chaves
estão preservados no alinhamento da seqüência do coelho e estruturas
K9CATH, sobretudo no sentido da porção central da seqüência α -hélice
observada no coelho (Fig. 6A). Isto proporciona razoável confiança de que
grande parte da estrutura canina deveria adotar uma estrutura helicoidal
10 semelhante (Fig. 6B), próximo ao demonstrado no painel superior da figura. 6A.
Uma comparação do modelo de superfície de coelho e canino é demonstrada
através de uma representação tridimensional na Fig. 6A e B. Também foi
notado que dentro das porções helicoidais alinhadas da catelicidina do coelho e
do cão, existe uma diferença substancial no perfil eletrostático líquido: a
15 estrutura do coelho tem 13 resíduos básicos e apenas um ácido (carga líquida
de +12 em pH=7), enquanto que no cão o peptídeo tem nove resíduos básico e
três resíduos ácidos (carga líquida de apenas +6). Esta distinção poderá levar a
diferenças sensíveis nas preferências ambientais e potenciais associações
intermoleculares destas duas catelicidinas. Finalmente, para a estrutura da
20 catelicidina canina representada na Fig. 6A e B, observa-se que 7 resíduos C-
terminal (QPREEKS) não estão presentes no modelo de coelho observado não
conservando o padrão de oscilação polar/ hidrofóbico, mas são de certa forma
coletivamente muito polares. Quando unidos, o K9CATH apresentaram
características comuns a uma variedade de peptídeos antimicrobianos como
25 uma carga positiva em um pH neutro e uma estrutura helicoidal.

Em suma, a análise estrutural do K9CATH foi realizada utilizando
dicroísmo circular (CD) e análise estrutural tri-dimensional computacional. O
dobramento do K9CATH assume uma conformação α -helicoidal, que é mais

comum entre o arranjo espacial natural dos peptídeos antimicrobianos (Gennaro *et al.*, *Biopolimers*, 55:31 (2000)), incluindo o peptídeo de catelicidina. O que apóia esta alegação é a característica de oscilação entre resíduos hidrofóbicos e polares com uma frequência proporcional à 10/3 torção α -

5 helicoidal. Tal como demonstrado na representação tridimensional exibida na Fig. 6, essa oscilação leva à formação de lados da hélice hidrofóbicos e polares justapostas: uma característica estrutural que sugere que as interações lipofílicas / hidrofóbicas podem conduzir estes peptídeos a se agregar com moléculas similares ou a superfície de uma membrana, utilizando os seus lados

10 hidrofóbicos para a ligação intermolecular e expondo os seus lados polares para fora para interações com solvente favoráveis. A análise preliminar sugere que o K9CATH poderia ser mais condescendente por tal comportamento por força de uma superfície hidrofóbica que é mais pura e contínua do que a do coelho. É possível, no entanto, que um resíduo que obviamente interrompa a

15 continuidade hidrofóbica na catelicidina do coelho (ou seja, a lisina na posição 14) pode em vez de participar efetivamente de uma ponte de sal num intermolecular associativa, que não está disponível para a catelicidina canina. A única característica estrutural da K9CATH é a presença de sete resíduos de aminoácidos extra localizados no C-terminal. Pelo fato desses aminoácidos

20 serem coletivamente muito polares, não há provas evidentes que sugerem que estes resíduos devem perpetuar a estrutura helicoidal presentes nos primeiros 31 resíduos da estrutura, é mais razoável supor que o C-terminal será exposto e solvente e igualmente um pouco desordenada (Fig. 6B). Estudos CD prévios têm mostrado que o conteúdo de peptídeos catelicidina α -helicoidal varia entre

25 30-90%, dependendo do microambiente (por exemplo, a presença de um agente indutor de α -hélice) e da origem do peptídeo [12]. Do mesmo modo, o presente estudo CD mostrou um teor de K9CATH α -helicoidal variando de 42% para 72% na presença de 20% e 60% de TFE respectivamente. Além disso, em

um ambiente próximo a um estado fisiológico (ou seja, mimetizando lipídico), o conteúdo de um K9CATH helicoidal foi menor, mas ainda dentro do intervalo que relatado a partir de outras catelicidinas de mamíferos. Combinando os resultados a partir da análise estrutural tridimensional e dos estudos CD, pode-se assim, concluir que K9CATH-indutível possui uma estrutura helicoidal. Uma vez que catelicidinas mais lineares são predominantemente α -helicoidais na natureza, isto sugere que o amplo espectro antimicrobiano destes peptídeos está diretamente relacionado com a estrutura α -helicoidal, o que pode facilitar a interação destes peptídeos antimicrobianos endógenos com membranas bacterianas, resultando em uma rápida eliminação dos microorganismos patogênicos (Zanetti, J. *Leukoc. Biol.*, 75:39 (2004); Gennaro *et al.*, *Biopolimers*, 55:31 (2000); Zanetti *et al.*, *Curr. Pharm. Des.*, 8:779 (2002); Ramanathan *et al.*, *Microbes Infect.*, 4:361 (2002); Oren *et al.*, *Biopolimers*, 47:451 (1998)).

EXEMPLO 6

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO K9CATH

A atividade antimicrobiana do K9CATH contra um largo espectro de microrganismos foi avaliado. O peptídeo antimicrobiano K9CATH utilizado nos ensaios representa a seqüência de aminoácidos preditos para o peptídeo maduro codificado pela região do *exon* 4 (o local de clivagem na catelicidina humana foi utilizado para prever o local de clivagem da catelicidina canina).

Os microrganismos avaliados foram: *Candida albicans* ATCC 11006 e 14053, *Escherichia coli* ATCC 25922, 700336, 700378, e BAA-457, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Listeria monocytogenes* ATCC 19155, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311, *Staphylococcus aureus* ATCC 10832, *Ureaplasma canigenitalimn* ATCC 51252, e *Ureaplasma urealyticum* ATCC 27619. A *C. albicans* foi cultivada overnight (a

35 °C) em ágar batata dextrose e conduzida de acordo com as normas NCCSL (Pfaller *et al.*, Manual NCCLS #M27-A2, 6ª ed., Wayne, PA (2002)). O *U. canigenitalium* e *U. urealyticum* foram armazenados a -20 °C em caldo uréia 10B (por especificações ATCC) e descongeladas a 5 °C antes do ensaio.

5 Todas as outras bactérias foram mantidas em ágar soja tripticase (Difco, Detroit, MI) plaqueadas a 37 °C. Bactérias de fase logarítmica média foram cultivadas pela transferência de uma única colônia de célula em caldo soja tripticase (Difco), seguido pela incubação e homogeneização de 3 horas a 37 °C. O sedimento bacteriano foi obtido após centrifugação durante 10 minutos a

10 4 °C a 900 x g, e depois lavado, seguido pela suspensão em 10 mM de tampão fosfato de sódio (PB, pH 7,4, [Na⁺] = 17,83 mM). Foram determinadas as concentrações bacterianas iniciais (Ferraro *et al.*, Manual NCCLS #M7-A6, 6ª ed., Wayne, PA (2003)). As primeiras populações bacterianas de 10⁸ UFC/ml foram obtidas em uma densidade óptica (DO) de 0,1 a 600 nm. As *C. albicans*

15 foram suspensas em 10 mM PB em uma escala de McFarland de 0,5 para uma primeira 10⁸ UFC/ml seguindo as normas NCCLS (Pfaller *et al.*, Manual NCCLS # M27-A2, 6ª ed., Wayne, PA (2002)), exceto quando recomendado, 0,85% de solução salina foi substituída com 10 mM PB. Todas as diluições seriadas microbianas foram realizadas em PB 10 mM para se obter a diluição de

20 trabalho de 10³ ufc/ml.

Um método de microdiluição em caldo modificado (Pfaller *et al.*, Manual NCCLS # M27-A2, 6ª ed., Wayne, PA (2002); Ferraro *et al.*, Manual NCCLS # M7-A6, 6ª ed., Wayne, PA (2003)) foi usado para determinar a atividade antimicrobiana do K9CATH (Sang *et al.*, *Infect. Immun.*, 73:2611

25 (2005)). Resumidamente, 50 µL do estoque de trabalho do K9CATH foram adicionados aos poços de uma placa de microtitulação no qual 25 µL de PB de sódio 30 mM (pH 7,4, [Na⁺] = 53,49 mM), 25 µL de H₂O, e 50 µL da suspensão microbiana foram previamente combinados. As placas de microtitulação foram

incubadas a 37 °C durante 2 horas em uma incubadora sob agitação (100 RPM), seguida pela adição de 150 µL do caldo nutritivo correspondente. Atividade antimicrobiana foi determinada pela instituição da concentração inibitória mínima (MIC), definida como a concentração mínima que foi capaz de impedir o crescimento microbiano, indicado pela ausência de turbidez ou mudança de cor no médio (caldo uréia 10B) após 24 horas de incubação a 37 °C. Uma suspensão de gonorréia tratada (50 µL) foi plaqueada em ágar chocolate, e a MIC foi definida como a concentração mínima no qual as colônias não se desenvolviam após 24 horas de incubação a 37 °C em 5% de CO₂. Isto foi feito porque a *N. gonorrhoeae* não mostrar turbidez como evidência de crescimento em caldo GC e também devido à sua elevada atividade autolítica em meio líquido. Para determinar o efeito do sal na atividade antimicrobiana do K9CATH, duas bactérias representantes foram utilizadas, incluindo a gram-negativa *E. coli* ATCC 25922 e a gram-positivas *L. monocytogenes* ATCC 19115. A concentração final de sódio da mistura bactericida foi ajustada para 15, 30, 50, 140 e 300 mM com NaCl. Além disso, o efeito dos lipopolissacarídeos (*E. coli* O111:B4 LPS; Sigma), na atividade do K9CATH contra a *E. coli* foi avaliada em 0,01, 0,1, 1, e 10 µg/mL. O efeito do soro fetal bovino (FBS) a 10, 20, 30, 40, 50, e 75% foi avaliado em 140 mM de NaCl. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Assim, para se determinar a atividade antimicrobiana do K9CATH, um peptídeo de 38 aminoácidos correspondente a seqüência predita de aminoácido maduro de comprimento total foi sintetizado quimicamente e a seqüência foi utilizada para todos os ensaios antimicrobianos. O K9CATH matou efetivamente as bactérias gram-positivas e gram-negativas, leveduras e *Ureaplasma spp.* A sua ampla atividade antimicrobiana foi comparável à que foi relatada por outros peptídeos catelicidinas sintéticas ou naturais (Bals *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci, USA.*, 95;9541 (1998); Skerlavaj *et al.*, *J. Biol. Chem.* ,

271:28375 (1996); Yu *et al.*, *J. Pept. Res.*, 60:1 (2002); Murakami *et al.*, *J. Immunol.*, 172:3070 (2004); Shin *et al.*, *Biochem . Biophys. Res. Commun.*, 285:1046 (2001)) (Tabela 4).

TABELA 4

5

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO K9CATH

MICROORGANISMO	ATCC	MIC (µM)
<i>Candida albicans</i>	11006	44,33
<i>Candida albicans</i> (hematogênica)	14053	11,08
<i>Escherichia coli</i>	25922	1,11
<i>Escherichia coli</i>	700336	1,11
<i>Escherichia coli</i>	700378	1,11
<i>Escherichia coli</i>	BAA-457	1,11
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	1,11
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	1,11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10145	1,11
<i>Salmonella Enteritidis</i>	13076	0,44
<i>Salmonella Typhimurium</i>	13311	1,11
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	10150	0,06
<i>Staphylococcus aureus</i>	10832	44,33
<i>Listeria monocytogenes</i>	19115	0,44
<i>Ureaplasma canigenitalium</i>	51252	0,06
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	27619	44,33

A MIC foi determinada com um método de micro diluição em caldo adaptado do NCCLS

A MIC do K9CATH para a *C. albicans* foi maior do que aqueles relatados para catelicidinas de bovinos e ovinos, BMAP-27 e SMAP-29 [16,49], respectivamente, e menor do que o relatado para o LL-37 humano (Gennaro *et al.*, *Biopolimers*, 55:31 (2000); Murakami *et al.*, *J. Immunol.*, 172:3070 (2004)). Da

mesma forma, a catelicidina canina sintética foi mais eficaz para matar *C. albicans* isoladas de origem hematogênica quando comparada com as *C. albicans* isoladas do epitélio vaginal, sugerindo fortemente que o K9CATH exerce os seus amplos efeitos antimicrobiano em grau sistêmico. Interessantemente, as duas bactérias *N. gonorrhoeae* e *Ureaplasma canigelitalium* que causam doenças sexualmente transmissíveis, foram mortas com concentrações mais baixas do peptídeo antimicrobiano documentado relatados até o momento (0.0625 μ M), incluindo a recém identificada β -defensina derivada de testículo de cães (Sang *et al.*, *Infect. Immun.*, 73:2611 (2005)). A *Salmonella enteritidis* e *typhimurhim* (bactérias comumente implicados em casos de intoxicação alimentar-) também foram mortas eficazmente pelo K9CATH. A este respeito, a atividade antimicrobiana do K9CATH estava de acordo com a de seus congêneres mamíferos (Gennaro *et al.*, *Biopolimers*, 55:31 (2000); Skerlavaj *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:28375 (1996); Yu *et al.*, *J. Pept. Res.*, 60:1 (2002); Shin *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 285:1046 (2001)). A sensibilidade da *Pseudomonas aeruginosa* ao K9CATH foi comparável à catelicidina dos murinos (Yu *et al.*, *J. Pept. Res.*, 60:1 (2002)), bovinos (Skerlavaj *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:28375 (1996)) e ovinos (Shin *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 285:1046 (2001)), mas três vezes mais ativa do que a LL-37 humana. Inversamente, o *S. aureus*, um importante agente patogênico epidérmico, foi inibido em uma concentração mais elevada (50 μ M), o que sugere que a atividade antimicrobiana do K9CATH incide em uma escala sistêmica e, em menor quantidade na pele. No entanto, a catelicidina humana (LL-37) inibiu o *S. aureus* na pele de forma comparável a uma concentração (> 64 μ M) (Murakami *et al.*, *J. Immunol.*, 172:3070 (2004); Murakami *et al.*, *J. Dent. Res.*, 81:845 (2002)).

A atividade bactericida do K9CATH foi independente da concentração de sal (15 a 300 μ M) do microambiente utilizado no ensaio *in vitro* contra a *E. coli* e *L. monocytogenes* (Fig. 7). Este achado contrasta com a relatada atividade sensível ao sal da catelicidina humana (LL-37) e bovina

(BMAP-27) (Gennaro *et al.*, *Biopolimers*, 55:31 (2000); Skerlavaj *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:28375 (1996); Yu *et al.*, *J. Pept. Res*, 60:1 (2002); Murakami *et al.*, *J. Immunol.*, 172:3070 (2004)). Além disso, os dados atuais mostraram que soro (soro bovino fetal) diminui de 20 a 150 vezes a atividade do K9CATH
5 contra a *E. coli*, em um intervalo de 5 a 75% de FBS (Tabela 5).

TABELA 5**SUSCEPTIBILIDADE DA *E. COLI* AO K9CATH SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÃO**

SÉRICAS DE SORO	
FBS^a	MIC^b (µM) <i>E. coli</i> ATCC 25922
0	1,25
5	12,5
10	12,5
20	50
30	200
50	200
75	200

^a FBS: Soro bovino fetal

^b MIC: concentração inibitória mínima: concentração mínima na qual o microrganismo o crescimento é impedido.

O LPS não afetou a atividade anti *E. coli* em uma concentração
10 mais baixa (0,01 µg/mL), mas o MIC aumentou 60 vezes, quando o LPS foi utilizado em uma variação de 0,1 a 10 µg/mL (Tabela 6).

TABELA 6**SUSCEPTIBILIDADE DA *E. COLI* AO K9CATH SOB A INFLUÊNCIA DO LPS**

LPS^a (µg/mL)	MIC^b µM)
	<i>E. coli</i> ATCC 25922
0	1.25
0.01	1.25
0.1	75
1	75
10	75

^a LPS: Lipopolissacarídeo da *E. coli* O111:B84

^b MIC: concentração inibitória mínima: concentração mínima na qual o microrganismo o crescimento é impedido.

EXEMPLO 7

ENSAIO DE LIGAÇÃO DO LPS

A ligação do LPS ao K9CATH foi mensurada pelo ensaio de cinética cromogênica do *Limulus amoebocyte* lisado (LAL) (kit Kinetic-QCL 1000; BioWhittaker, Walkersville, MD) (Turner *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42:2206 (1998); Tack *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 269:1181 (2002)). Resumidamente, 25 µL do peptídeo diluído em série foi adicionado em duplicata para 25 µL do polissacarídeo da *E. coli* O111:B4 (LPS) contendo 0,5 unidades/mL de endotoxina, e incubadas durante 30 minutos a 37 °C. Após a adição de 50 µL do reagente *Limulus amoebocyte* lisado e 100 µL do substrato cromogênico, AC-Ile-Glu-Ala-Arg-*p*-nitroanilida, a densidade óptica a 405 nm foi mensurada a 10 e 16 minutos com um leitor de microplacas (Modelo Elx800, Bio-Tek, Winooski, VT), após incubação. A porcentagem de LPS ligado foi calculado como $[(\Delta D1 - (\Delta D2 - \Delta D3)) / \Delta D1] \times 100$, onde $\Delta D1$ representa a diferença de densidade óptica entre as amostras de 10 e 16 min contendo apenas LPS, $\Delta D2$ representa a diferença de densidade óptica entre as amostras de 10 e 16 minutos contendo diferentes concentrações de LPS e K9CATH, e $\Delta D3$ representa a diferença de densidade óptica entre as amostras 10 e 16 minutos contendo diferentes concentrações de peptídeo sem LPS. O gráfico de Hill foi realizado (Turner *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42:2206 (1998); Tack *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 269:1181 (2002)) pela plotagem da concentração de \log_{10} K9CATH contra $\log_{10} [F_1 / (1,0 - F_1)]$, onde F_1 era a inibição fracionada da atividade de ligação do LPS.

Os resultados indicam que o K9CATH foi capaz de ligar-se a LPS com 50% das ligações ocorrendo em, aproximadamente 10,6 µM (Fig. 8, painel esquerdo). A típica forma sigmoidal da catelicidina canino de ligação isoterma indica uma cooperatividade. Quando os dados foram colocados nos gráficos em um código Hill que mostrou um coeficiente de 4,49 (Fig. 8, painel direito), a

ligação do LPS ao K9CATH é altamente favorável. Essa característica também foi encontrada em algumas outras catelicidinas, tais como a LL-37 humano /hCAP-18 (Turner *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42:2206 (1998)) e SMAP-29 de ovinos (Tack *et al.* *Eur. J. Biochem.*, 269:1181 (2002)).

5

EXEMPLO 8

ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO K9CATH

A atividade hemolítica do K9CATH foi determinada (Skerlavag, *FEBS Lett.*, 463:58 (1999); Yu *et al.*, *J. Pept. Res.*, 60:1 (2002)). Resumidamente, 4 ml de sangue canino foram coletados em tubos de coleta de sangue contendo EDTA (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Todo o sangue foi então centrifugado a 10000 x g por 1 minuto em temperatura ambiente. O plasma foi descartado (sobrenadante) e hemácias foram lavadas duas vezes com PBS, e re-suspensas a 0,5% (vol/vol), em solução PBS, e 90 µL foi colocado em placas de microtitulação de 96 poços. Diferentes concentrações de K9CATH dissolvido em 0,01% em ácido acético foram adicionadas em duplicatas para as células de cães a 37 °C durante 2 horas. Após a centrifugação (8000 x g), durante 10 minutos, os sobrenadantes foram transferidos para uma nova placa de microtitulação de 96 poços e monitorado pela medição da absorbância a 405 nm para a hemoglobina liberada. Os controles para 0% e 100% de hemólise consistiram de células suspensas no PBS e em apenas 1,0% de Triton X-100, respectivamente. A porcentagem de hemólise (%) foi calculado como $[(OD_{415nm, 1\%Triton-X100} - OD_{415nm, apenas\ PBS}) / (OD_{415nm, 1\%Triton-X100} - OD_{415nm, apenas\ PBS})] \times 100$. O segmento N-terminal de 18 aminoácidos do peptídeo 28 antimicrobiano mielóide da espécie bovina (BMAP-28₍₁₋₁₈₎) (Skerlavaj *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:28375 (1996); Yu *et al.*, *J. Pept. Res.*, 60:1 (2002); Risso *et al.*, *Cell. Immunol.*, 189:107 (1998)) foi usado como controle positivo. Para avaliar a atividade hemolítica *in vitro* do K9CATH de outras espécies, os glóbulos vermelhos e galinhas e seres humanos foram

tratados com K9CATH seguindo o mesmo protocolo listado acima.

A atividade hemolítica do K9CATH foi determinada utilizando eritrócitos de cães, humanos e galinhas. Tal como demonstrado na figura. 9, o K9CATH exibiu uma atividade hemolítica insignificante, lisando < 5% das hemácias em 100 μ M nestas três espécies. O BMAP-28⁽¹⁻¹⁸⁾ (ou seja, o peptídeo N-terminal da catelicidina da espécie bovina BMAP-28) foi usado como um controle e causou hemólise em cerca de 20%, 25% e 30% dos eritrócitos de galinha, cachorro e humano, respectivamente em 100 μ M, o que é consistente com os relatos anteriores (Skerlavaj *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:28375 (1996)). O K9CATH exibiu uma atividade hemolítica *in vitro* 10-20 vezes menor contra os eritrócitos de cachorro e galinha quando comparado ao BMAP-18.

EXEMPLO 9

ALINHAMENTO DA K9CATH COM OUTRAS CATELICIDINAS

Usando CLUSTAL-W, a seqüência predita dos aminoácidos K9CATH foi alinhada a seis catelicidinas de mamíferos de diferentes espécies com um pré-proregião altamente conservada (Fig. 3).

A catelicidina canina, K9CATH, tem um peptídeo sinal, um domínio da catelicidina, e um peptídeo maduro de 29, 103 e 38 resíduos de aminoácidos, respectivamente. O K9CATH também tem preservado a presença e a posição idêntica de quatro cisteínas incorporadas a seqüência da proregião, o que é uma característica altamente conservada da família do peptídeo catelicidina. Imagina-se que este motivo clássico de quatro cisteínas estabiliza o domínio da catelina pelas duas pontes de dissulfeto entre os resíduos cisteína C85-C96 e C107-C124 (Vide Fig. 3).

A catelicidina canina exibe uma similaridade > 80%, quando comparado com a região do domínio N-terminal da catelina de todas as catelicidinas listadas. Além disso, a similaridade global entre estas catelicidinas

de mamíferos foi de aproximadamente 70%; no entanto, a região C-terminal do peptídeo antimicrobiano maduro de todas as catelicidinas listadas exibiu uma seqüência altamente variável. O suposto peptídeo maduro K9CATH (SEQ ID No: 4) mostra maior semelhança de 46% com o LL-37 humano (SEQ ID No: 33), e uma identidade muito menor (<10%) com outras espécies (SEQ ID No: 33-38). Ao contrário a PR-39 de suínos (SEQ ID No: 38) ou CATH2 bovina (SEQ ID No: 34), que são peptídeos antimicrobianos ricos em prolina, o K9CATH possui apenas uma prolina na sua seqüência antimicrobiana (Pestonjamas *et al.*, *Peptides*. 22: 1643 (2001); Castiglioni *et al.*, *Cytogenet. Cell Genet.*, 75:240 (1996); Zhang *et al.*, *Vet. Res.*, 31:277 (2000)).

EXEMPLO 10

ANÁLISE FILOGENÉTICA

Uma árvore condensada de agrupamento de vizinhos (NJ - *neighbor-joining*) (Fig. 10) foi construída a partir de correção de Poisson das distâncias de cDNA das seqüências pré-proregião obtidas a partir da 39 catelicidinas relatadas. Foi utilizada no estudo, a eliminação de ramos de baixa significância (valores de estimativa de variância (*Bootstrap*) de 1000 repetições menores que 50%) para formar a árvore condensada multi ramificada. MEGA (versão 3,1, *The Pennsylvania State University*, PA).

Uma árvore condensada multi ramificada foi gerada que enfatizou a porção dos ramos padrão confiáveis sem considerar a exata distância entre cada peptídeo. Os comprimentos dos ramos da árvore não estão condensados proporcionalmente ao número de nucleotídeos ou substituições de aminoácidos, pois a presente análise foi baseada na topologia. Desta forma, a reconstrução filogenética do K9CATH colocado em um distinto *cluster* genético, separada de todas as outras seqüências de mamíferos. Porque o K9CATH parece ser um gene de catelicidina único, e pode ser sugerido que pertence a espécies de monocatelicidina de cães onde existe uma duplicação deste gene

ancestral na história evolutiva destes carnívoros. Todas as espécies de monocatelícidinas estudadas até agora, expressam o gene único de catelícidina com uma α -hélice (Thomasinsig *et al.*, *Curr. Protein Pept. Sci.*, 6:23 (2005)).

EXEMPLO 11

5 EFEITO DO K9CATH SOBRE O *TRICHOMONAS*

O *Trichomonas vaginalis* cepa T1 (isolado clinicamente e relatado por Tai em 1993, foi cultivado em meio TYM suplementado com 10% de soro de cavalo inativado por calor, 10 U de penicilina, 10 μ g de estreptomicina, 180 μ M de Sulfato ferroso de amônio e 28 μ M ácido sulfosalicílico. Os parasitas
10 foram transferidos diariamente (cerca de 1×10^6 parasitas em 10 mL de meio TYM).

Tratamento de parasitas com a catelícidina canina (K9CATH) resultou em um efeito imediato, bem como estável sobre a motilidade e viabilidade do parasita (Figura 11). Na maior concentração testada (100 μ M de
15 K9CATH), cerca de 80% dos parasitas na cultura foram mortos. O K9CATH em 50 μ M e 25 μ M teve um efeito modesto sobre a viabilidade do parasita, enquanto o K9CATH inferior a 12,5 μ M teve efeito insignificante sobre a viabilidade do parasita.

EXEMPLO 12

20 RESUMO

O K9CATH mata efetivamente bactérias responsáveis por doenças sexualmente transmissíveis com a mais alta potência reportada por qualquer peptídeo antimicrobiano natural ou sintético, incluindo todos os análogos da protegrina estudado até o momento (Ostberg *et al.*, *Peptides*.
25 26:197 (2005)). As DSTs de origem bacterianas têm sido documentadas apenas esporadicamente em cães, bem como a ligação entre os agentes patogênicos e a doença clínica relatada permanece controversa (Carmichael *et al.*, *Cornell Vet*, 78:63 (1988); Doig *et al.*, *Can. J. Comp. Med.*, 45:233 (1981);

Harasawa *et al.*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43:640 (1993)). Estes resultados mostram claramente uma capacidade antimicrobiana superior do recém-identificado K9CATH contra agentes patogênicos das doenças sexualmente transmissíveis nos seres humanos. A *N. gonorrhoeae* infra regula a expressão do peptídeo antimicrobiana humano LL-37 (Bergman *et al.*, *Cell Microbiol.*, 7:1009 (2005)) e tem sido relatado por ser resistentes a peptídeos antimicrobianos catiônicos como a polimixina B (Tzeng *et al.*, *J. Bacteriol.*, 187:5387 (2005)). A atividade antimicrobiana do K9CATH contra a *N. gonorrhoeae* é de aproximadamente 4 a 8 vezes maior do que as catelicidinas naturais mais potentes já relatadas (incluindo todos os análogos sintéticos) (Ostberg *et al.*, *Peptides* 26:197 (2005)). Uma atividade semelhante foi observada contra o *Ureaplasma canigenitalium*, que tem sido indicado como um dos agentes causadores da doença sexualmente transmissível em cães.

A atividade antimicrobiana do K9CATH não mostrou qualquer dependência de sal (Fig. 7), que pode ser outro recurso pelo qual esta catelicidina canina assegura um grau mais elevado de potência, reforçando a resistência do peptídeo para diferentes condições ambientais. O K9CATH também não foi afetado pelo tratamento com LPS em 0,01 µg/ml, enquanto que um aumento do MIC a 60 µM foi observado em 0,1 e 10 µg/mL, sugerindo que o peptídeo neutraliza a endotoxina por uma ligação aparentemente irreversível. Um cenário especulativo poderia ser que a porção do K9CATH de 7 aminoácidos do C-terminal altamente polar não-enovelado (Fig. 6B) pode funcionar como uma âncora físico-química para segurar a endotoxina levando à eliminação de componentes microbianos potencialmente prejudiciais. Compatível com outros relatos (Bartlett *et al.*, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 23:606 (2004); Ciornei *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49:2845 (2005)), uma diminuição significativa na atividade do K9CATH contra a *E.coli* foi detectada com um aumento na concentração de soro (Tabela 5). Este pode ser um

mecanismo através do qual as células do animal hospedeiro asseguram a proteção contra os potenciais efeitos citotóxicos devido à presença da catelicidina no sangue.

Uma característica única do K9CATH é a notável baixa atividade hemolítica em toda a três espécies (cães, galinhas e humanos). O SMAP-29, um dos peptídeos catelicidinas mais potentes identificados até hoje (Gennaro *et al.*, *Biopolimers*, 55:31 (2000); Travis *et al.*, *Infect. Immunol.*, 68:2748 (2000)) provoca 67% hemólise no homem a uma concentração de 80 μ M (Skerlavaj *et al.*, *FEBS Lett.*, 463:58 (1999)). Em contrapartida, os presentes estudos demonstraram que o K9CATH exibe apenas uma hemólise mínima (<5%) dos eritrócitos humanos na mesma concentração. Não obstante o fato de outras catelicidinas (por exemplo, CAP-18) (Shin *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 275:904 (2000) mostrarem apenas uma atividade hemolítica mínima, desconhece-se se esta característica persiste em diferentes espécies como é o caso do peptídeo K9CATH (Fig. 9).

Em resumo, um novo peptídeo catelicidina de mamífero, K9CATH, de células precursoras mielóide de cão foi identificado. O K9CATH exibe ampla atividade antimicrobiana não só contra as bactérias gram-positivas (*Listeria monocytogenes*, e *Staphylococcus aureus*), gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* sorotipo *Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella Enteritidis* e *Neisseria gonorrhoeae*), e leveduras (*Candida albicans*), mas também contra um parasita (como, *Trichomonas vaginalis*). A atividade antimicrobiana do K9CATH foi particularmente potente contra agentes patogênicos associados a doenças sexualmente transmissíveis, especificamente contra a *Neisseria gonorrhoeae*, que poderia fornecer um modelo *in vivo* útil para estudos de mecanismos mais profundos relevantes para o papel desta molécula de defesa do sistema de inato do hospedeiro. Os presentes dados sugerem que o K9CATH pode ser

uma molécula efetora central envolvida nos mecanismos de defesa inato no cão. Além disso, as características específicas do peptídeo antimicrobiano pode apontar até mesmo no sentido mais amplo aplicações dada a amplitude da capacidade de matar dos compostos e sua resistência única para diferentes condições de micro-ambientes bioquímicos.

REFERÊNCIAS

- [1] Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J Leukoc Biol* 2004;75:39-48.
- [2] Boman HG. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med* 2003;254:197-215.
- [3] Tomasinsig L, Zanetti M. The cathelicidins—structure, function and evolution. *Curr Protein Pept Sci* 2005;6:23-34.
- [4] Zaiou M, Gallo R. Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics. *Journal of Molecular Medicine* 2002;80:549-61.
- [5] Bals R, Wilson JM. Cathelicidins family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:711-20.
- [6] Zanetti M, Del Sal G, Storici P, et al. The cDNA of the neutrophil antibiotic Bac5 predicts a pro-sequence homologous to a cysteine proteinase inhibitor that is common to other neutrophil antibiotics. *J Biol Chem* 1993;268:522-6.
- [7] Zaiou M, Nizet V, Gallo RL. Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *J Invest Dermatol* 2003;120:810-6.
- [8] Agerberth B, Charo J, Werr J, et al. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 2000;96:3086-93.
- [9] Larrick JW, Hirata M, Zheng H, et al. A novel granulocyte-derived peptide with lipopolysaccharide-neutralizing activity. *J Immunol*

1994;152:231-40.

[10] Niyonsaba F, Hirata M, Ogawa H, et al. Epithelial cell-derived antibacterial peptides human beta-defensins and cathelicidin: multifunctional activities on mast cells. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2003;2:224-31.

5 [11] Niyonsaba F, Iwabuchi K, Someya A, et al. A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. *Immunology* 2002;106:20-6.

[12] Gennaro R, Zanetti M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers* 10 2000;55:31-49.

[13] Zhao C, Nguyen T, Boo LM, et al. RL-37, an alpha-helical antimicrobial peptide of the rhesus monkey. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2695-702.

[14] Bals R, Lang C, Weiner DJ, et al. Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) mucosal antimicrobial peptides are close homologues of human molecules. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:370-5.

[15] Bals R, Wang X, Zasloff M, et al. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci USA* 20 1998;95:9541-6.

[16] Skerlavaj B, Gennaro R, Bagella L, et al. Biological characterization of two novel cathelicidin-derived peptides and identification of structural requirements for their antimicrobial and cell lytic activities. *J Biol Chem* 1996;271:28375-81.

25 [17] Scocchi M, Wang S, Zanetti M. Structural organization of the bovine cathelicidin gene family and identification of a novel member. *FEBS Lett* 1997;417:311-5.

[18] Shamova O, Brogden KA, Zhao C, et al. Purification and

properties of proline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocytes. *Infect Immun* 1999;67:4106-11.

[19] Bagella L, Scocchi M, Zanetti M. cDNA sequences of three sheep myeloid cathelicidins. *FEBS Lett* 1995;376:225-8.

5 [20] Zanetti M, Storici P, Tossi A, et al. Molecular cloning and chemical synthesis of a novel antibacterial peptide derived from pig myeloid cells. *J Biol Chem* 1994;269:7855-8.

[21] Vunnam S, Juvvadi P, Merrifield RB. Synthesis and antibacterial action of cecropin and proline-arginine-rich peptides from pig
10 intestine. *J Pept Res* 1997;49:59-66.

[22] Scocchi M, Bontempo D, Boscolo S, et al. Novel cathelicidins in horse leukocytes(I). *FEBS Lett* 1999;457:459-64.

[23] Skerlavaj B, Scocchi M, Gennaro R, et al. Structural and functional analysis of horse cathelicidin peptides. *Antimicrob Agents Chemother*
15 2001;45:715-22.

[24] Pestonjamas VK, Huttner KH, Gallo RL. Processing site and gene structure for the murine antimicrobial peptide *CRAMP*. *Peptides* 2001
;22:1643-50.

[25] Termen S, Tollin M, Olsson B, et al. Phylogeny, processing
20 and expression of the rat cathelicidin rCRAMP: a model for innate antimicrobial peptides. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:536-49.

[26] Nagaoka I, Hirota S, Niyonsaba F, et al. Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP 18 and CAP11 inhibit the expression of TNF-alpha by blocking the binding of LPS to CD14(+) cells. *J Immunol* 2001;167:3329-38.

25 [27] evy O, Weiss J, Zarembek K, et al. Antibacterial 15-kDa protein isoforms (pi 5s) are members of a novel family of leukocyte proteins. *J Biol Chem* 1993;268:6058-63.

[28] Zanetti M. The Role of Cathelicidins in the Innate Host

Defenses of Mammals. *Current Issues in Molecular Biology* 2005;7:179-96.

[29] Wu H, Zhang G, Minton JE, et al. Regulation of cathelicidin gene expression: induction by lipopolysaccharide, interleukin-6, retinoic acid, and *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection. *Infect Immun* 5 2000;68:5552-8.

[30] Sang Y, Ortega MT, Blecha F, et al. Molecular Cloning and Characterization of Three {beta}-Defensins from Canine Tests. *Infection and Immunity* 2005;73:2611-20.

[31] Altschul SF, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment 10 search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403-10.

[32] Soulages JL, Axrese EL, Chetty PS, et al. Essential role of the conformational flexibility of helices 1 and 5 on the lipid binding activity of apolipoprotein-III. *J Biol Chem* 2001;276:34162-6.

[33] Chen YH, Yang JT, Chau KH. Determination of the helix and 15 beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry* 1974;13:3350-9.

[34] Chen C, Brock R, Luh F, et al. The solution structure of the active domain of CAP18—a lipopolysaccharide binding protein from rabbit leukocytes. *FEBS Lett* 1995;370:46-52.

[35] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: 20 improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673-80.

[36] Sanchez R, Sali A. Comparative protein structure modeling. 25 Introduction and practical examples with modeller. *Methods Mol Biol* 2000;143:97-129.

[37] McGuffm LJ, Bryson K, Jones DT. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 2000;16:404-5.

[38] Pfaller MA, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, et al. Manual NCCLS. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; segunda edição aprovada. Documento NCCLS M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Pensilvânia 19087-1898, USA. NCCLS 2002;22.

[39] Ferraro MJ, Wikler MA, Craig WA, et al. Manual NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Sexta edição aprovada. Documento NCCLS M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pensilvânia 19087-1898 USA, 2003. NCCLS 2003 ;23.

[40] Turner J, Cho Y, Dinh NN, et al. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2206-14.

[41] Tack BF, Sawai MV, Kearney WR, et al. SMAP-29 has two LPS-binding sites and a central hinge. *Eur J Biochem* 2002;269:1181-9.

[42] Skerlavaj B, Benincasa M, Risso A, et al. SMAP-29: a potent antibacterial and antifungal peptide from sheep leukocytes. *FEBS Lett* 1999;463:58-62.

[43] Yu K, Park K, Kang SW, et al. Solution structure of a cathelicidin-derived antimicrobial peptide, CRAMP as determined by NMR spectroscopy. *J Pept Res* 2002;60:1-9.

[44] Risso A, Zanetti M, Gennaro R. Cytotoxicity and apoptosis mediated by two peptides of innate immunity. *Cell Immunol* 1998;189:107-15.

[45] Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, et al. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J Immunol* 2002;169:3883-91.

[46] Castiglioni B, Scocchi M, Zanetti M, et al. Six antimicrobial peptide genes of the cathelicidin family map to bovine chromosome 22q24 by

fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1996;75:240-2.

[47] Zhang G, Ross CR, Blecha F. Porcine antimicrobial peptides: new prospects for ancient molecules of host defense. *Vet Res* 2000;31:277-96.

[48] Murakami M, Lopez-Garcia B, Braff M, et al. Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense. *J Immunol* 2004;172:3070-7.

[49] Shin SY, Park EJ, Yang ST, et al. Structure-activity analysis of SMAP-29, a sheep leukocytes-derived antimicrobial peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285:1046-51.

[50] Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA, et al. Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. *J Dent Res* 2002;81:845-50.

[51] Ostberg N, Kaznessis Y. Protegrin structure-activity relationships: using homology models of synthetic sequences to determine structural characteristics important for activity. *Peptides* 2005;26:197-206.

[52] Zanetti M, Gennaro R, Skerlavaj B, et al. Cathelicidin peptides as candidates for a novel class of antimicrobials. *Curr Pharm Des* 2002;8:779-93.

[53] Ramanathan B, Davis EG, Ross CR, et al. Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes Infect* 2002;4:361-72.

[54] Oren Z, Shai Y. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 1998;47:451-63.

[55] Sorensen OE, Follin P, Johnsen AH, et al. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* 2001;97:3951-9.

[56] Carmichael LE, Joubert JC. Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. *Cornell Vet* 1988;78:63-73.

[57] Doig PA, Ruhnke HL, Bosu WT. The genital Mycoplasma and Ureaplasma flora of healthy and diseased dogs. *Can J Comp Med* 1981 ;45:233-8.

[58] Harasawa R, Imada Y, Kotani H, et al. Ureaplasma
5 canigenitalium sp. nov., isolated from dogs, hit *J Syst Bacteriol* 1993;43:640-4.

[59] Bergman P, Johansson L, Asp V, et al. Neisseria gonorrhoeae downregulates expression of the human antimicrobial peptide LL-37. *Cell Microbiol* 2005;7:1009-17.

[60] Tzeng YL, Ambrose KD, Zughaier S, et al. Cationic
10 antimicrobial peptide resistance in Neisseria meningitidis. *J Bacteriol* 2005;187:5387-96.

[61] Bartlett KH, McCray PB, Jr., Thorne PS. Reduction in the bactericidal activity of selected cathelicidin peptides by bovine calf serum or exogenous endotoxin. *J Antimicrob Agents* 2004;23:606-12.

[62] Ciornei CD, Sigurdardottir T, Schmidtchen A, et al.
15 Antimicrobial and chemoattractant activity, lipopolysaccharide neutralization, cytotoxicity, and inhibition by serum of analogs of human cathelicidin LL-37. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2845-50.

[63] Travis SM, Anderson NN, Forsyth WR, et al. Bactericidal
20 activity of mammalian cathelicidin-derived peptides. *Infect Immun* 2000;68:2748-55.

[64] Shin SY, Kang SW, Lee DG, et al. CRAMP analogues having potent antibiotic activity against bacterial, fungal, and tumor cells without hemolytic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:904-9.

25 Todas as patentes e publicações aqui referenciadas ou mencionadas são incorporadas ao presente pela referência à mesma extensão como esta estivesse sido incorporada pela referência em sua totalidade ou estabelecida ao presente na sua totalidade.

Os métodos específicos e composições descritas neste documento são representativos e não pretendem limitar o escopo da invenção. Outros objetos, aspectos, exemplos de realizações irão ocorrer para aqueles conhecedores no estado da técnica mediante as considerações desta especificação, e é enquadrada no âmbito do espírito da invenção, tal como 5 definido pelo escopo das reivindicações. Será facilmente perceptível para um especialista no assunto que varias substituições e modificações podem ser feitas para a invenção aqui divulgada sem se afastar do escopo e espírito da invenção.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Kansas State University Research Foundation

Tonatiuh Melgarejo

Frank Blecha

Yongming Sang

Maria Teresa Ortega

<120> Peptídeos de Catelicidina Antimicrobianos

<130> 2399.002W01

<150> US 60/754,878

<151> 29-12-2005

<160> 46

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 630

<212> DNA

<213> *Canis familiaris*

<400> 1

```

ggagagactt gcaggctgag aggagggaga cttggggacc atggagaccc agaaggacag 60
cccctccctg gggcgggtggt cactgttgct actgctgctg ggcctggtga tcactccggc 120
tgcctcccgg gcccttagct acagggaggc tgtgctccgt gctgtgaatg gcttcaacca 180
gcggtcctcg gaggagaatc tctaccgtct cctgcagctg aactcacagc ccaagggaga 240
tgaggatcca aacatcccaa agcctgtgag cttcacagtg aaggagactg tgtgtcccaa 300
gacgacacag cagcctctgg agcagtgtgg tttcaaggac aatgggctgg tgaacagtg 360
tgaagggaca gtcacctctg acgaggacac gggctacttt gacctcaact gtgattcaat 420
cctgcaagtc aagaaaattg accggctgaa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat 480
tggcgaaaag attaggagaa ttggccagag aatcaaggat tttttaaga atcttcagcc 540
cagggaggag aagtctaag ggcctgcttt gccctggctt aggcttctg accctgaaaa 600
ataaattttt gtgaaagcaa aaaaaaaaaa 630

```

<210> 2

<211> 172

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 2

Met Glu Thr Gln Lys Asp Ser Pro Ser Leu Gly Arg Trp Ser Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Gly Leu Val Ile Thr Pro Ala Ala Ser Arg Ala Leu
 20 25 30
 Ser Tyr Arg Glu Ala Val Leu Arg Ala Val Asn Gly Phe Asn Gln Arg
 35 40 45
 Ser Ser Glu Glu Asn Leu Tyr Arg Leu Leu Gln Leu Asn Ser Gln Pro
 50 55 60
 Lys Gly Asp Glu Asp Pro Asn Ile Pro Lys Pro Val Ser Phe Thr Val
 65 70 75 80
 Lys Glu Thr Val Cys Pro Lys Thr Thr Gln Gln Pro Leu Glu Gln Cys
 85 90 95
 Gly Phe Lys Asp Asn Gly Leu Val Lys Gln Cys Glu Gly Thr Val Ile
 100 105 110
 Leu Asp Glu Asp Thr Gly Tyr Phe Asp Leu Asn Cys Asp Ser Ile Leu
 115 120 125
 Gln Val Lys Lys Ile Asp Arg Leu Lys Glu Leu Ile Thr Thr Gly Gly
 130 135 140
 Gln Lys Ile Gly Glu Lys Ile Arg Arg Ile Gly Gln Arg Ile Lys Asp
 145 150 155 160
 Phe Phe Lys Asn Leu Gln Pro Arg Glu Glu Lys Ser
 165 170

<210> 3

<211> 117

<212> DNA

<213> *Canis familiaris*

<400> 3

cggctgaaag agctcatcac gacagggggg cagaagattg gcgaaaagat taggagaatt 60
 ggccagagaa tcaaggattt ttttaagaat cttcagccca gggaggagaa gtcctaa 117

<210> 4

<211> 38

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 4

Arg Leu Lys Glu Leu Ile Thr Thr Gly Gly Gln Lys Ile Gly Glu Lys
 1 5 10 15
 Ile Arg Arg Ile Gly Gln Arg Ile Lys Asp Phe Phe Lys Asn Leu Gln
 20 25 30
 Pro Arg Glu Glu Lys Ser
 35

<210> 5

<211> 114

<212> DNA

<213> *Canis familiaris*

<400> 5

ctgaaagagc tcatcacgac aggggggcag aagattggcg aaaagattag gagaattggc 60
cagagaatca aggatTTTTT taagaatcctt cagcccaggg aggagaagtc ctaa 114

<210> 6

<211> 37

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 6

Leu Lys Glu Leu Ile Thr Thr Gly Gly Gln Lys Ile Gly Glu Lys Ile
1 5 10 15
Arg Arg Ile Gly Gln Arg Ile Lys Asp Phe Phe Lys Asn Leu Gln Pro
20 25 30
Arg Glu Glu Lys Ser
35

<210> 7

<211> 111

<212> DNA

<213> *Canis familiaris*

<400> 7

aaagagctca tcacgacagg ggggcagaag attggcgaaa agattaggag aattggccag 60
agaatcaagg atTTTTTTaa gaatcttcag cccaggagg agaagtccta a 111

<210> 8

<211> 36

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 8

Lys Glu Leu Ile Thr Thr Gly Gly Gln Lys Ile Gly Glu Lys Ile Arg
1 5 10 15
Arg Ile Gly Gln Arg Ile Lys Asp Phe Phe Lys Asn Leu Gln Pro Arg
20 25 30
Glu Glu Lys Ser
35

<210> 9

<211> 108

<212> DNA

<213> *Canis familiaris*

<400> 9

gagctcatca cgacaggggg gcagaagatt ggcgaaaaga ttaggagaat tggccagaga 60
atcaaggatt tttttaagaa tcttcagccc agggaggaga agtcctaa 108

<210> 10

<211> 35

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 10

Glu Leu Ile Thr Thr Gly Gly Gln Lys Ile Gly Glu Lys Ile Arg Arg
1 5 10 15
Ile Gly Gln Arg Ile Lys Asp Phe Phe Lys Asn Leu Gln Pro Arg Glu
20 25 30
Glu Lys Ser
35

<210> 11

<211> 105

<212> DNA

<213> *Canis familiaris*

<400> 11

ctcatcacga caggggggca gaagattggc gaaaagatta ggagaattgg ccagagaatc 60
aaggattttt ttaagaatct tcagcccagg gaggagaagt cctaa 105

<210> 12

<211> 34

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 12

Leu Ile Thr Thr Gly Gly Gln Lys Ile Gly Glu Lys Ile Arg Arg Ile
1 5 10 15
Gly Gln Arg Ile Lys Asp Phe Phe Lys Asn Leu Gln Pro Arg Glu Glu
20 25 30
Lys Ser

<210> 13

<211> 102

<212> DNA

<213> *Canis familiaris*

<400> 13

atcacgacag gggggcagaa gattggcgaa aagattagga gaattggcca gagaatcaag 60
gattttttta agaatcttca gcccaggag gagaagtcct aa 102

<210> 14

<211> 33

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 14

Ile	Thr	Thr	Gly	Gly	Gln	Lys	Ile	Gly	Glu	Lys	Ile	Arg	Arg	Ile	Gly
1				5					10					15	
Gln	Arg	Ile	Lys	Asp	Phe	Phe	Lys	Asn	Leu	Gln	Pro	Arg	Glu	Glu	Lys
			20					25					30		
Ser															

<210> 15

<211> 99

<212> DNA

<213> *Canis familiaris*

<400> 15

cggctgaaag agctcatcac gacagggggg cagaagattg gcgaaaagat taggagaatt 60
ggccagagaa tcaaggattt ttttaagaat cttcagccc 99

<210> 16

<211> 33

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 16

Arg	Leu	Lys	Glu	Leu	Ile	Thr	Thr	Gly	Gly	Gln	Lys	Ile	Gly	Glu	Lys
1				5					10					15	
Ile	Arg	Arg	Ile	Gly	Gln	Arg	Ile	Lys	Asp	Phe	Phe	Lys	Asn	Leu	Gln
			20					25					30		
Pro															

<210> 17

<211> 102

<212> DNA

<213> *Canis familiaris*

<400> 17

cggctgaaag agctcatcac gacagggggg cagaagattg gcgaaaagat taggagaatt 60
ggccagagaa tcaaggattt ttttaagaat cttcagccca gg 102

<210> 18

<211> 34

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 18

Arg	Leu	Lys	Glu	Leu	Ile	Thr	Thr	Gly	Gly	Gln	Lys	Ile	Gly	Glu	Lys
1				5					10					15	
Ile	Arg	Arg	Ile	Gly	Gln	Arg	Ile	Lys	Asp	Phe	Phe	Lys	Asn	Leu	Gln
			20					25					30		
Pro	Arg														

<210> 19

<211> 105

<212> DNA

<213> *Canis familiaris*

<400> 19

cggctgaaag agctcatcac gacagggggg cagaagattg gcgaaaagat taggagaatt 60
ggccagagaa tcaaggattt ttttaagaat cttcagccca gggag 105

<210> 20

<211> 35

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 20

Arg	Leu	Lys	Glu	Leu	Ile	Thr	Thr	Gly	Gly	Gln	Lys	Ile	Gly	Glu	Lys
1				5					10					15	
Ile	Arg	Arg	Ile	Gly	Gln	Arg	Ile	Lys	Asp	Phe	Phe	Lys	Asn	Leu	Gln
			20					25					30		
Pro	Arg	Glu													
			35												

<210> 21

<211> 108

<212> DNA

<213> *Canis familiaris*

<400> 21

cggctgaaag agctcatcac gacagggggg cagaagattg gcgaaaagat taggagaatt 60
ggccagagaa tcaaggattt ttttaagaat cttcagccca gggaggag 108

<210> 22

<211> 36

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 22

Arg	Leu	Lys	Glu	Leu	Ile	Thr	Thr	Gly	Gly	Gln	Lys	Ile	Gly	Glu	Lys
1				5					10					15	
Ile	Arg	Arg	Ile	Gly	Gln	Arg	Ile	Lys	Asp	Phe	Phe	Lys	Asn	Leu	Gln
			20					25					30		
Pro	Arg	Glu	Glu												
			35												

<210> 23

<211> 111

<212> DNA

<213> *Canis familiaris*

<400> 23

cggctgaaag agctcatcac gacagggggg cagaagattg gcgaaaagat taggagaatt 60
ggccagagaa tcaaggattt ttttaagaat cttcagccca gggaggagaa g 111

<210> 24

<211> 37

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 24

Arg	Leu	Lys	Glu	Leu	Ile	Thr	Thr	Gly	Gly	Gln	Lys	Ile	Gly	Glu	Lys
1				5					10					15	
Ile	Arg	Arg	Ile	Gly	Gln	Arg	Ile	Lys	Asp	Phe	Phe	Lys	Asn	Leu	Gln
			20					25					30		
Pro	Arg	Glu	Glu	Lys											
			35												

<210> 25

<211> 120

<212> DNA

<213> *Canis familiaris*

<400> 25

gaccggctga aagagctcat cacgacaggg gggcagaaga ttggcgaaaa gattaggaga 60
attggccaga gaatcaagga tttttttaag aatcttcagc ccagggagga gaagtcctaa 120

<210> 26

<211> 39

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 26

Asp	Arg	Leu	Lys	Glu	Leu	Ile	Thr	Thr	Gly	Gly	Gln	Lys	Ile	Gly	Glu
1			5						10					15	
Lys	Ile	Arg	Arg	Ile	Gly	Gln	Arg	Ile	Lys	Asp	Phe	Phe	Lys	Asn	Leu
		20					25						30		
Gln	Pro	Arg	Glu	Glu	Lys	Ser									
			35												

<210> 27

<211> 123

<212> DNA

<213> *Canis familiaris*

<400> 27

attgaccggc tgaagagct catcacgaca ggggggcaga agattggcga aaagattagg 60
agaattggcc agagaatcaa ggattttttt aagaatcttc agcccagga ggagaagtcc 120
taa 123

<210> 28

<211> 40

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 28

Ile	Asp	Arg	Leu	Lys	Glu	Leu	Ile	Thr	Thr	Gly	Gly	Gln	Lys	Ile	Gly
1				5						10				15	
Glu	Lys	Ile	Arg	Arg	Ile	Gly	Gln	Arg	Ile	Lys	Asp	Phe	Phe	Lys	Asn
			20					25						30	
Leu	Gln	Pro	Arg	Glu	Glu	Lys	Ser								
			35				40								

<210> 29

<211> 126

<212> DNA

<213> *Canis familiaris*

<400> 29

aaaattgacc ggctgaaaga gctcatcacc acaggggggc agaagattgg cgaaaagatt 60
 aggagaattg gccagagaat caaggatttt ttttaagaatc ttcagcccag ggaggagaag 120
 tcctaa 126

<210> 30

<211> 41

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 30

Lys	Ile	Asp	Arg	Leu	Lys	Glu	Leu	Ile	Thr	Thr	Gly	Gly	Gln	Lys	Ile
1				5					10					15	
Gly	Glu	Lys	Ile	Arg	Arg	Ile	Gly	Gln	Arg	Ile	Lys	Asp	Phe	Phe	Lys
			20					25					30		
Asn	Leu	Gln	Pro	Arg	Glu	Glu	Lys	Ser							
		35					40								

<210> 31

<211> 129

<212> DNA

<213> *Canis familiaris*

<400> 31

aagaaaattg accggctgaa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcgaaaag 60
 attaggagaa ttggccagag aatcaaggat tttttaaga atcttcagcc caggaggag 120
 aagtcctaa 129

<210> 32

<211> 42

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 32

Lys	Lys	Ile	Asp	Arg	Leu	Lys	Glu	Leu	Ile	Thr	Thr	Gly	Gly	Gln	Lys
1				5					10					15	
Ile	Gly	Glu	Lys	Ile	Arg	Arg	Ile	Gly	Gln	Arg	Ile	Lys	Asp	Phe	Phe
			20					25					30		
Lys	Asn	Leu	Gln	Pro	Arg	Glu	Glu	Lys	Ser						
		35					40								

<210> 33

<211> 170

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 33

```

Met Lys Thr Gln Arg Asp Gly His Ser Leu Gly Arg Trp Ser Leu Val
 1                    5                10                15
Leu Leu Leu Leu Gly Leu Val Met Pro Leu Ala Ile Ile Ala Gln Val
      20                    25                30
Leu Ser Tyr Lys Glu Ala Val Leu Arg Ala Ile Asp Gly Ile Asn Gln
      35                    40                45
Arg Ser Ser Asp Ala Asn Leu Tyr Arg Leu Leu Asp Leu Asp Pro Arg
      50                    55                60
Pro Thr Met Asp Gly Asp Pro Asp Thr Pro Lys Pro Val Ser Phe Thr
      65                    70                75                80
Val Lys Glu Thr Val Cys Pro Arg Thr Thr Gln Gln Ser Pro Glu Asp
      85                    90                95
Cys Asp Phe Lys Lys Asp Gly Leu Val Lys Arg Cys Met Gly Thr Val
      100                    105                110
Thr Leu Asn Gln Ala Arg Gly Ser Phe Asp Ile Ser Cys Asp Lys Asp
      115                    120                125
Asn Lys Arg Phe Ala Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu
      130                    135                140
Lys Ile Gly Lys Glu Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe
      145                    150                155                160
Leu Arg Asn Leu Val Pro Arg Thr Glu Ser
      165                    170

```

<210> 34

<211> 157

<212> PRT

<213> *Equus caballus*

<400> 34

```

Met Glu Thr Gln Arg Asp Ser Cys Ser Leu Gly Arg Trp Ser Leu Leu
 1                    5                10                15
Leu Leu Leu Leu Gly Leu Val Ile Pro Leu Ala Thr Thr Gln Thr Leu
      20                    25                30
Ser Tyr Lys Glu Ala Val Leu Arg Ala Val Asp Gly Leu Asn Gln Arg
      35                    40                45
Ser Ser Asp Glu Asn Leu Tyr Arg Leu Leu Glu Leu Asp Pro Leu Pro
      50                    55                60

```

Lys Glu Asp Glu Asp Pro Asp Thr Pro Lys Pro Val Ser Phe Thr Val
 65 70 75 80
 Lys Glu Thr Val Cys Pro Arg Thr Thr Gln Gln Pro Leu Glu Glu Cys
 85 90 95
 Asp Phe Lys Glu Asn Gly Leu Val Lys Gln Cys Val Gly Thr Val Val
 100 105 110
 Leu Asp Pro Ala Lys Asp Tyr Phe Asp Ile Ser Cys Asp Lys Pro Gln
 115 120 125
 Pro Ile Lys Arg Arg His Trp Phe Pro Leu Ser Phe Gln Glu Phe Leu
 130 135 140
 Glu Gln Leu Arg Arg Phe Arg Asp Gln Leu Pro Phe Pro
 145 150 155

<210> 35

<211> 155

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

<400> 35

Met Glu Thr Pro Arg Ala Ser Leu Ser Leu Gly Arg Trp Ser Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Gly Leu Ala Leu Pro Ser Ala Ser Ala Gln Ala Leu
 20 25 30
 Ser Tyr Arg Glu Ala Val Leu Arg Ala Val Asp Gln Leu Asn Glu Gln
 35 40 45
 Ser Ser Glu Pro Asn Ile Tyr Arg Leu Leu Glu Leu Asp Gln Pro Pro
 50 55 60
 Gln Asp Asp Glu Asp Pro Asp Ser Pro Lys Arg Val Ser Phe Arg Val
 65 70 75 80
 Lys Glu Thr Val Cys Ser Arg Thr Thr Gln Gln Pro Pro Glu Gln Cys
 85 90 95
 Asp Phe Lys Glu Asn Gly Leu Leu Lys Arg Cys Glu Gly Thr Val Thr
 100 105 110
 Leu Asp Gln Val Arg Gly Asn Phe Asp Ile Thr Cys Asn Asn His Gln
 115 120 125
 Ser Ile Arg Ile Thr Lys Gln Pro Trp Ala Pro Pro Gln Ala Ala Arg
 130 135 140
 Leu Cys Arg Ile Val Val Ile Arg Val Cys Arg
 145 150 155

<210> 36

<211> 165

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

<400> 36

Met Glu Thr Gln Arg Ala Ser Phe Ser Leu Gly Arg Ser Ser Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Gly Leu Val Val Pro Ser Ala Ser Ala Gln Asp Leu
 20 25 30
 Ser Tyr Arg Glu Ala Val Leu Arg Ala Val Asp Gln Phe Asn Glu Arg
 35 40 45
 Ser Ser Glu Ala Asn Leu Tyr Arg Leu Leu Glu Leu Asp Pro Pro Pro
 50 55 60
 Glu Gln Asp Val Glu His Pro Gly Ala Arg Lys Pro Val Ser Phe Thr
 65 70 75 80
 Val Lys Glu Thr Val Cys Pro Arg Thr Thr Pro Gln Pro Pro Glu Gln
 85 90 95
 Cys Asp Phe Lys Glu Asn Gly Leu Val Lys Gln Cys Val Gly Thr Val
 100 105 110
 Thr Arg Tyr Trp Ile Arg Gly Asp Phe Asp Ile Thr Cys Asn Asn Ile
 115 120 125
 Gln Ser Ala Gly Leu Phe Arg Arg Leu Arg Asp Ser Ile Arg Arg Gly
 130 135 140
 Gln Gln Lys Ile Leu Glu Lys Ala Arg Arg Ile Gly Glu Arg Ile Lys
 145 150 155 160
 Asp Ile Phe Arg Gly
 165

<210> 37

<211> 167

<212> PRT

<213> *Sus scrofa*

<400> 37

Met Glu Thr Gln Arg Ala Ser Leu Cys Leu Gly Arg Trp Ser Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Ala Leu Val Val Pro Ser Ala Ser Ala Gln Ala Leu
 20 25 30
 Ser Tyr Arg Glu Ala Val Leu Arg Ala Val Asp Arg Leu Asn Glu Gln
 35 40 45
 Ser Ser Glu Ala Asn Leu Tyr Arg Leu Leu Glu Leu Asp Gln Pro Pro
 50 55 60
 Lys Ala Asp Glu Asp Pro Gly Thr Pro Lys Pro Val Ser Phe Thr Val
 65 70 75 80
 Lys Glu Thr Val Cys Pro Arg Pro Thr Trp Arg Pro Pro Glu Leu Cys
 85 90 95

Asp Phe Lys Glu Asn Gly Arg Val Lys Gln Cys Val Gly Thr Val Thr
 100 105 110
 Leu Asp Gln Ile Lys Asp Pro Leu Asp Ile Thr Cys Asn Glu Ile Gln
 115 120 125
 Ser Val Gly Leu Leu Ser Arg Leu Arg Asp Phe Leu Ser Asp Arg Gly
 130 135 140
 Arg Arg Leu Gly Glu Lys Ile Glu Arg Ile Gly Gln Lys Ile Lys Asp
 145 150 155 160
 Leu Ser Glu Phe Phe Gln Ser
 165

<210> 38

<211> 172

<212> PRT

<213> *Sus scrofa*

<400> 38

Met Glu Thr Gln Arg Ala Ser Leu Cys Leu Gly Arg Trp Ser Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Gly Leu Val Val Pro Ser Ala Ser Ala Gln Ala Leu
 20 25 30
 Ser Tyr Arg Glu Ala Val Leu Arg Ala Val Asp Arg Leu Asn Glu Gln
 35 40 45
 Ser Ser Glu Ala Asn Leu Tyr Arg Leu Leu Glu Leu Asp Gln Pro Pro
 50 55 60
 Lys Ala Asp Glu Asp Pro Gly Thr Pro Lys Pro Val Ser Phe Thr Val
 65 70 75 80
 Lys Glu Thr Val Cys Pro Arg Pro Thr Arg Gln Pro Pro Glu Leu Cys
 85 90 95
 Asp Phe Lys Glu Asn Gly Arg Val Lys Gln Cys Val Gly Thr Val Thr
 100 105 110
 Leu Asn Pro Ser Ile His Ser Leu Asp Ile Ser Cys Asn Glu Ile Gln
 115 120 125
 Ser Val Arg Arg Arg Pro Arg Pro Pro Tyr Leu Pro Arg Pro Arg Pro
 130 135 140
 Pro Pro Phe Phe Pro Pro Arg Leu Pro Pro Arg Ile Pro Pro Gly Phe
 145 150 155 160
 Pro Pro Arg Phe Pro Pro Arg Phe Pro Gly Lys Arg
 165 170

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> sequência Artificial

<220>

<223> um primer sintético

<220>

<221> misc_diferença

<222> 7

<223> n = G ou T

<220>

<221> misc_diferença

<222> 12

<223> n = C ou T

<400> 39

tcactgntgc tntgctgct

20

<210> 40

<211> 22

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> um primer sintético

<220>

<221> misc_diferença

<222> 10

<223> n = C ou T

<220>

<221> misc_diferença

<222> 11

<223> n = C ou G

<220>

<221> misc_diferença

<222> 13

<223> n = A ou G

<220>

<221> misc_diferença

<222> 17

<223> n = C ou G

<400> 40
 tggcctggtn nanggtnact gt 22

<210> 41
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> *Canis familiaris*

<400> 41
 ccttagctac agggaggctg tg 22

<210> 42
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> *Canis familiaris*

<400> 42
 gactgtccct tcacactggt tcac 24

<210> 43
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

<400> 43
 Met Glu Thr Gln Lys Asp Ser Pro Ser Leu Gly Arg Trp Ser Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Gly Leu Val Ile Thr Pro Ala Ala Ser Arg Ala Leu
 20 25 30
 Ser Tyr Arg Glu Ala Val Leu Arg Ala Val Asn Gly Phe Asn Gln Arg
 35 40 45
 Ser Ser Glu Glu Asn Leu Tyr Arg Leu Leu Gln Leu Asn Ser Gln Pro
 50 55 60
 Lys Gly
 65

<210> 44
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

<400> 44

Asp Glu Asp Pro Asn Ile Pro Lys Pro Val Ser Phe Thr Val Lys Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Cys Pro Lys Thr Thr Gln Gln Pro Leu Glu Gln Cys Gly Phe
 20 25 30
 Lys Asp Asn Gly
 35

<210> 45

<211> 24

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 45

Leu Val Lys Gln Cys Glu Gly Thr Val Ile Leu Asp Glu Asp Thr Gly
 1 5 10 15
 Tyr Phe Asp Leu Asn Cys Asp Ser
 20

<210> 46

<211> 46

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 46

Ile Leu Gln Val Lys Lys Ile Asp Arg Leu Lys Glu Leu Ile Thr Thr
 1 5 10 15
 Gly Gly Gln Lys Ile Gly Glu Lys Ile Arg Arg Ile Gly Gln Arg Ile
 20 25 30
 Lys Asp Phe Phe Lys Asn Leu Gln Pro Arg Glu Glu Lys Ser
 35 40 45

REIVINDICAÇÕES

1. POLIPEPTÍDEO PURIFICADO, caracterizado pelo fato de que compreende a SEQ ID No: 4, uma variante da SEQ ID No: 4 com pelo menos 80% de identidade de seqüência de aminoácido com a SEQ ID No: 4,
5 ou um fragmento deste, com pelo menos 15 aminoácidos contíguos, em que o polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo possui atividade antimicrobiana.
2. POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende a SEQ ID No: 4, uma variante da
10 SEQ ID No: 4 com pelo menos 80% de identidade de seqüência com a SEQ ID No: 4, ou um fragmento deste com pelo menos 15 aminoácidos contíguos.
3. POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a variante possui pelo menos 90% de identidade de seqüência de aminoácido com a SEQ ID No: 4.
- 15 4. POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a variante possui de 1 a 4 substituições de aminoácido conservadoras.
5. POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o fragmento compreende pelo menos 25
20 aminoácidos contíguos da SEQ ID NO: 4.
6. MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLÉICO ISOLADA, caracterizada pelo fato de que compreende um segmento de ácido nucléico que codifica o polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo, conforme descrito em uma das reivindicações de 1 a 5.
- 25 7. MOLÉCULA, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o segmento de ácido nucléico codifica um polipeptídeo que compreende a SEQ ID No: 4.
8. MOLÉCULA, de acordo com a reivindicação 7,

caracterizada pelo fato de que o segmento de ácido nucléico codifica um polipeptídeo que compreende a SEQ ID No: 2.

5 9. MOLÉCULA, de acordo com uma das reivindicações 6 a 8, caracterizada pelo fato de que o segmento de ácido nucléico está operacionalmente ligado a um promotor.

10 10. MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLÉICO ISOLADA, caracterizada pelo fato de que compreende uma seqüência de nucleotídeos que é de pelo menos 100 nucleotídeos de comprimento, e que hibridiza a SEQ ID No: 3 ou o seu complemento sob condições moderadamente estridentes ou sob condições extremamente estridentes.

11. MOLÉCULA, de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que hibridiza sob condições extremamente estridentes a SEQ ID No: 3 ou seu complemento.

15 12. MOLÉCULA, de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que é marcada de forma que possa ser detectada.

13. CÉLULA ISOLADA, caracterizada pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucléico conforme descrita em uma das reivindicações 6 a 9.

20 14. MÉTODO PARA PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO, caracterizado pelo fato de que compreende a cultura de células isoladas, conforme descritas na reivindicação 13, de forma a resultar na expressão do polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo.

25 15. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a purificação do polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo, a partir da célula ou do meio da célula.

16. COMPOSIÇÃO, caracterizada pelo fato de que compreende o polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo, conforme descritos em uma das reivindicações 1 a 5.

17. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente um veículo farmacêuticamente aceitável ou um aditivo alimentício.

18. MÉTODO PARA INIBIR O CRESCIMENTO MICROBIANO, 5 caracterizado pelo fato de que compreende colocar o microorganismo em contato com uma quantidade eficaz do polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo, conforme descrito em uma das reivindicações 1 a 5, ou com a composição conforme descrita em uma das reivindicações 16 ou 17.

19. MÉTODO PARA INIBIR O CRESCIMENTO MICROBIANO, 10 em um vertebrado ou em um meio capaz de sustentar o crescimento ou sobrevivência microbiana, caracterizado pelo fato de que compreende colocar o vertebrado ou meio em contato com uma quantidade eficaz do polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo, conforme descrito em uma das reivindicações 1 a 5, da molécula de ácido nucléico, conforme descrita na 15 reivindicação 9, ou da composição conforme descrita em uma das reivindicações 16 ou 17.

20. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 18 ou 19, caracterizado pelo fato de que é inibido o crescimento de uma bactéria gram-positiva, bactéria gram-negativa, levedura ou um protozoário.

21. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 18 ou 20 19, caracterizado pelo fato de que o micróbio é o agente causador de uma doença de origem alimentar ou de uma doença sexualmente transmissível.

22. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado 25 pelo fato de que a doença é sífilis, clamídia, gonorréia, tricomoníase ou sapinho.

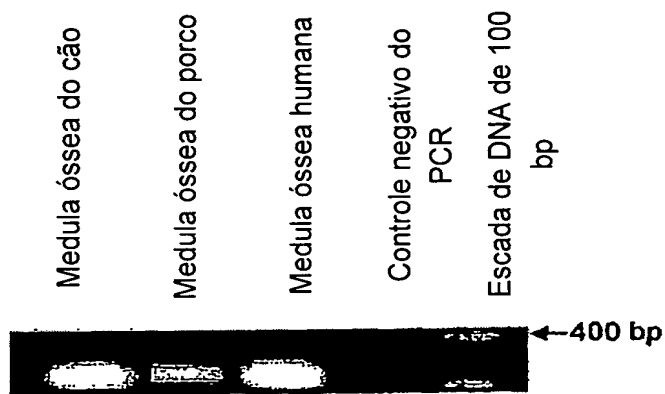
23. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 18 ou 19, caracterizado pelo fato de que o micróbio é *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella*

typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma canigenitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Candida albicans* ou *Trichomonas vaginalis*.

24. ARTIGO MANUFATURADO, caracterizado pelo fato de que
5 compreende o polipeptídeo, sua variante ou fragmento do mesmo, conforme descrito em uma das reivindicações 1 a 5, ou a composição conforme descrita em uma das reivindicações 16 ou 17.

25. ANTICORPO PURIFICADO, caracterizado pelo fato de que se liga especificamente a SEQ ID No: 4.

A



B

```

1 ggagagacttgcaggctgagaggaggagacttggggaccATG GAG ACC
1 M E T
50 CAG AAG GAC AGC CCC TCC CTG GGG CGG TGG TCA CTG TTG
4 Q K D S P S L G R W S L L
89 CTA CTG CTG CTG GGC CTG GTG ATC ACT CCG GCT GCC TCC
17 L L L L G L V I T P A A S ↑
128 CGG GCC CTT AGC TAC AGG GAG GCT GTG CTC CGT GCT GTG
30 R A L S Y R E A V L R A V
167 AAT GGC TTC AAC CAG CGG TCC TCG GAG GAG AAT CTC TAC
43 N G F N Q R S S E E N L Y
206 CGT CTC CTG CAG CTG AAC TCA CAG CCC AAG GGA GAT GAG
56 R L L A Q L N S Q P K G D E
245 GAT CCA AAC ATC CCA AAG CCT GTG AGC TTC ACA GTG AAG
69 D P N I P K P V S T F T V K
284 GAG ACT GTG TGT CCC AAG ACG ACA CAG CAG CCT CTG GAG
82 E T V C P K T T Q Q P L E
323 CAG TGT GGT TTC AAG GAC AAT GGG CTG GTG AAA CAG TGT
95 Q C G F K D N G L V K Q C
362 GAA GGG ACA GTC ATC CTG GAC GAG CAC ACG GGC TAC TTT
108 E G T V I L D E D T G Y F
401 GAC CTC AAC TGT GAT TCA ATC CTG CAA GTC AAG AAA ATT
121 D L N C D S I L Q V K K I
440 GAC CGG CTG AAA GAG CTC ATC ACG ACA GGG GGG CAG AAG
134 D R L K E L I T T G G Q Q K
479 ATT GGC GAA AAG ATT AGG AGA ATT GGC CAG AGA ATC AAG
147 I G E K I R R I G Q R I K
518 GAT TTT TTT AAG AAT CTT CAG CCC AGG GAG GAG AAG TCC
160 D F F K N L Q P R E E K S
557 TAAgggcctgctttgccttggttaggcttctggaccctgaaaaataaatt
608 tttgtgaaagcaaaaaaaaaaaaaa
    
```

Fig. 1

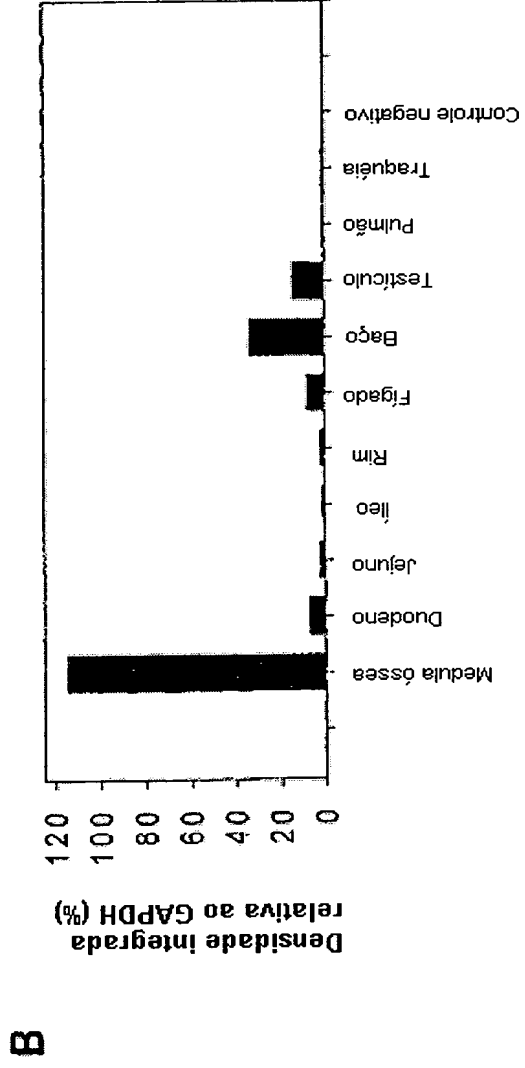
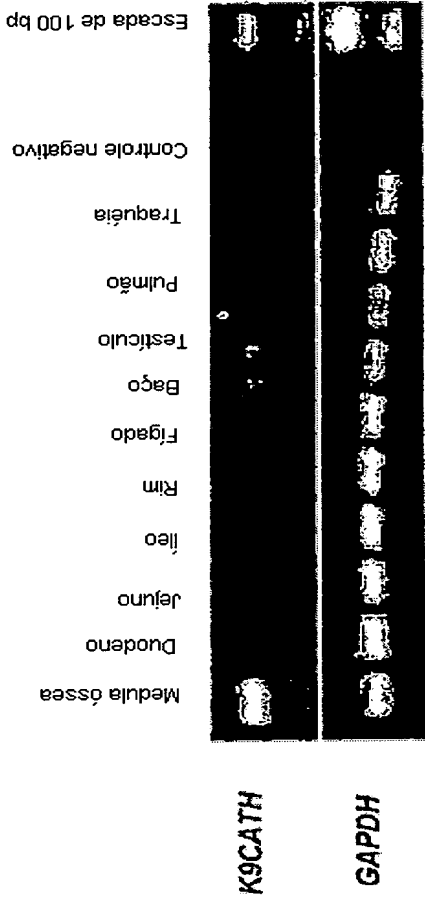


Fig. 2

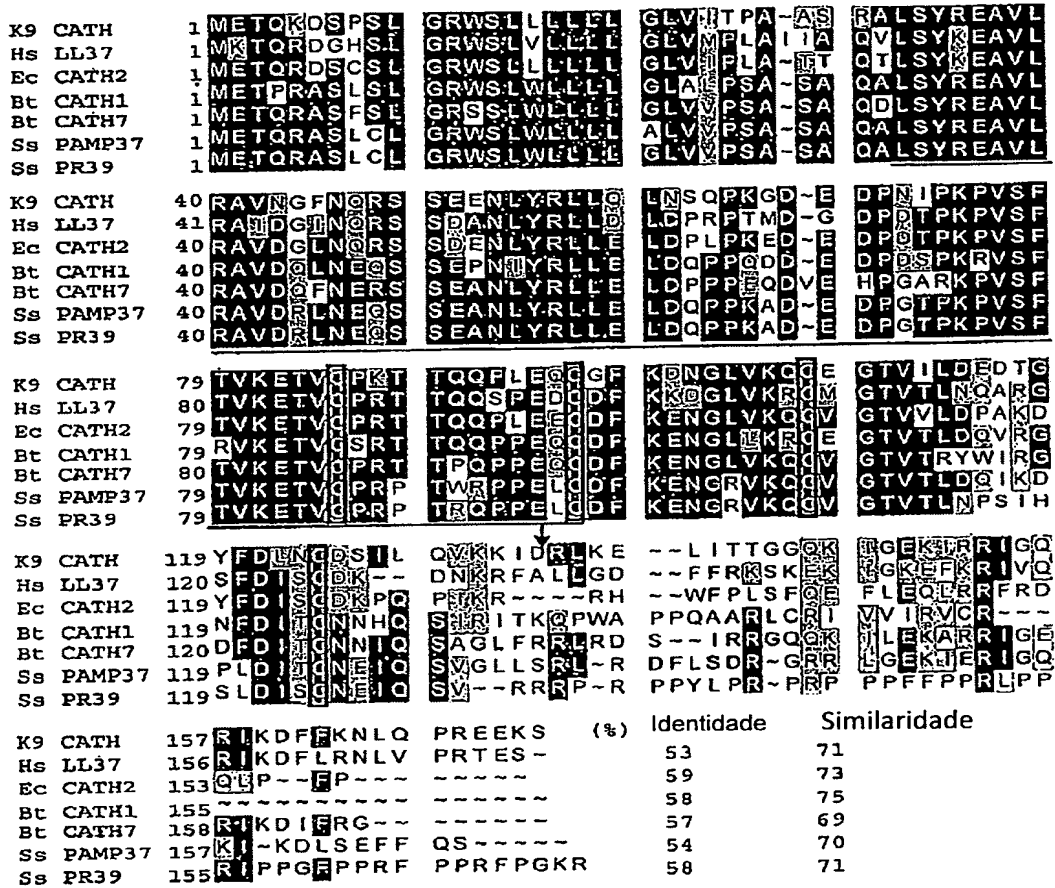
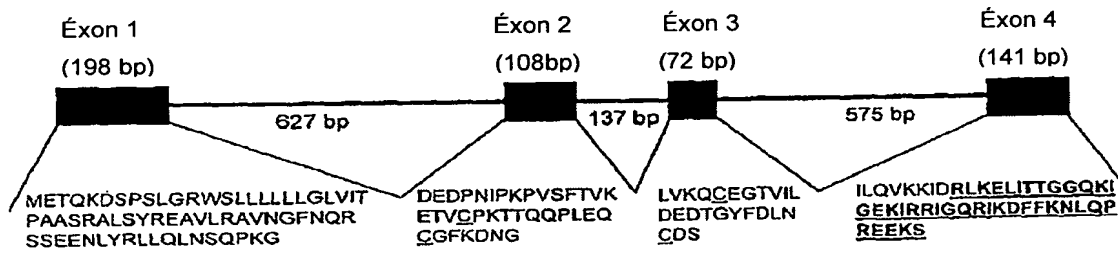
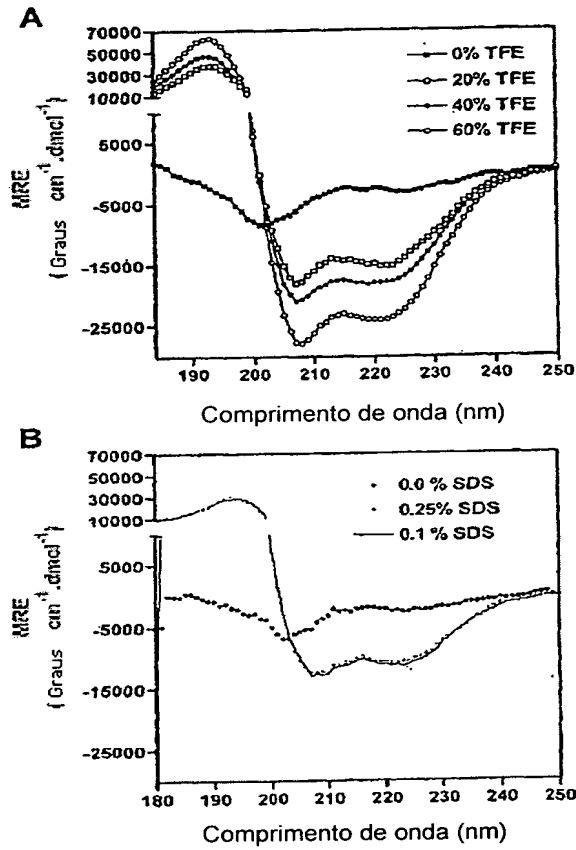


Fig. 3

**Fig. 4**



	0% SDS (Tampão)	0.1% SDS	0.25% SDS
Conteúdo da α -hélice	0	~29.%	29 %
[TFE]	0% (Tampão)	20%	40%
Conteúdo da α - Hélice	0	42 %	52%
			60% 72%

Fig. 5

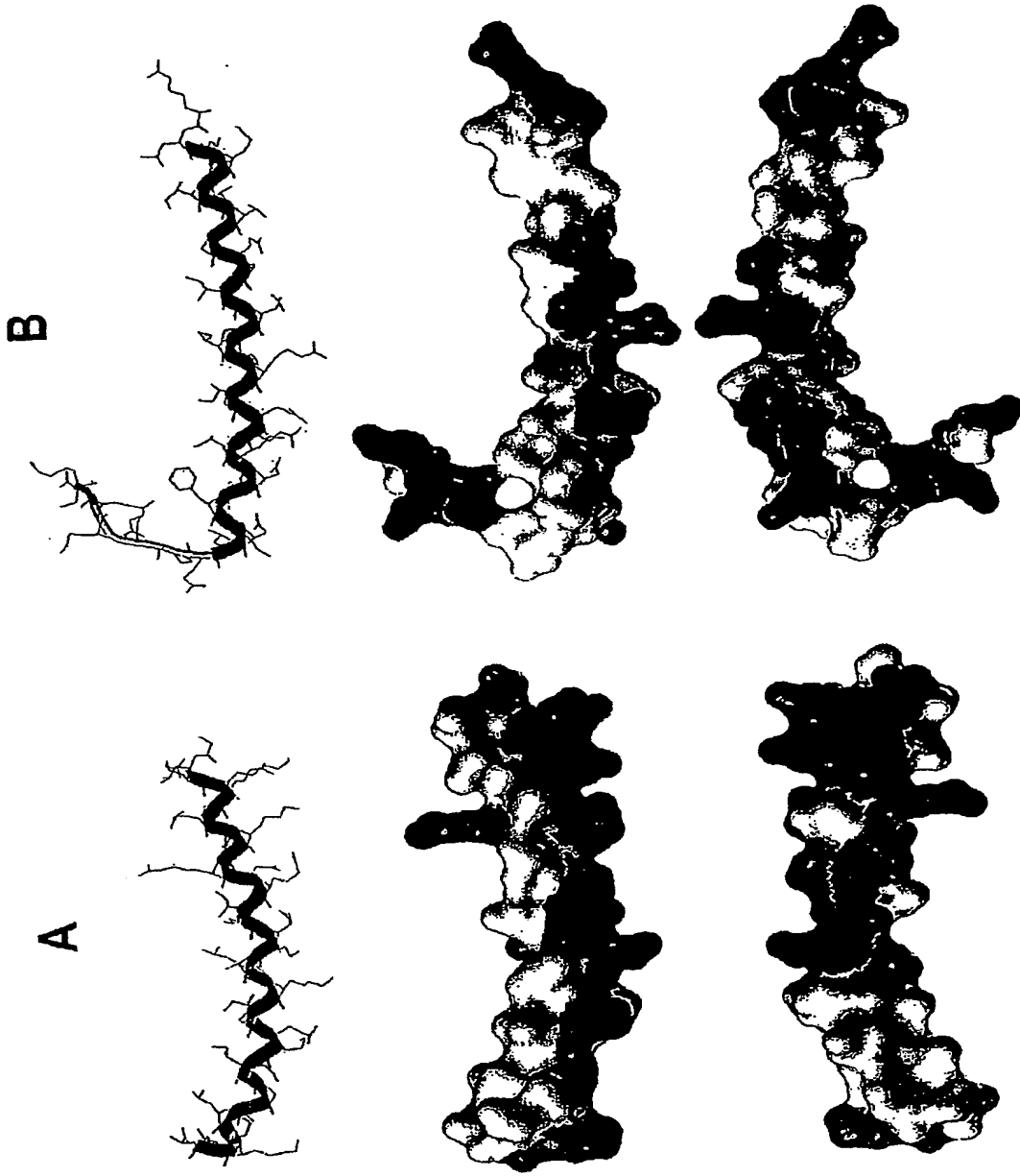


Fig. 6

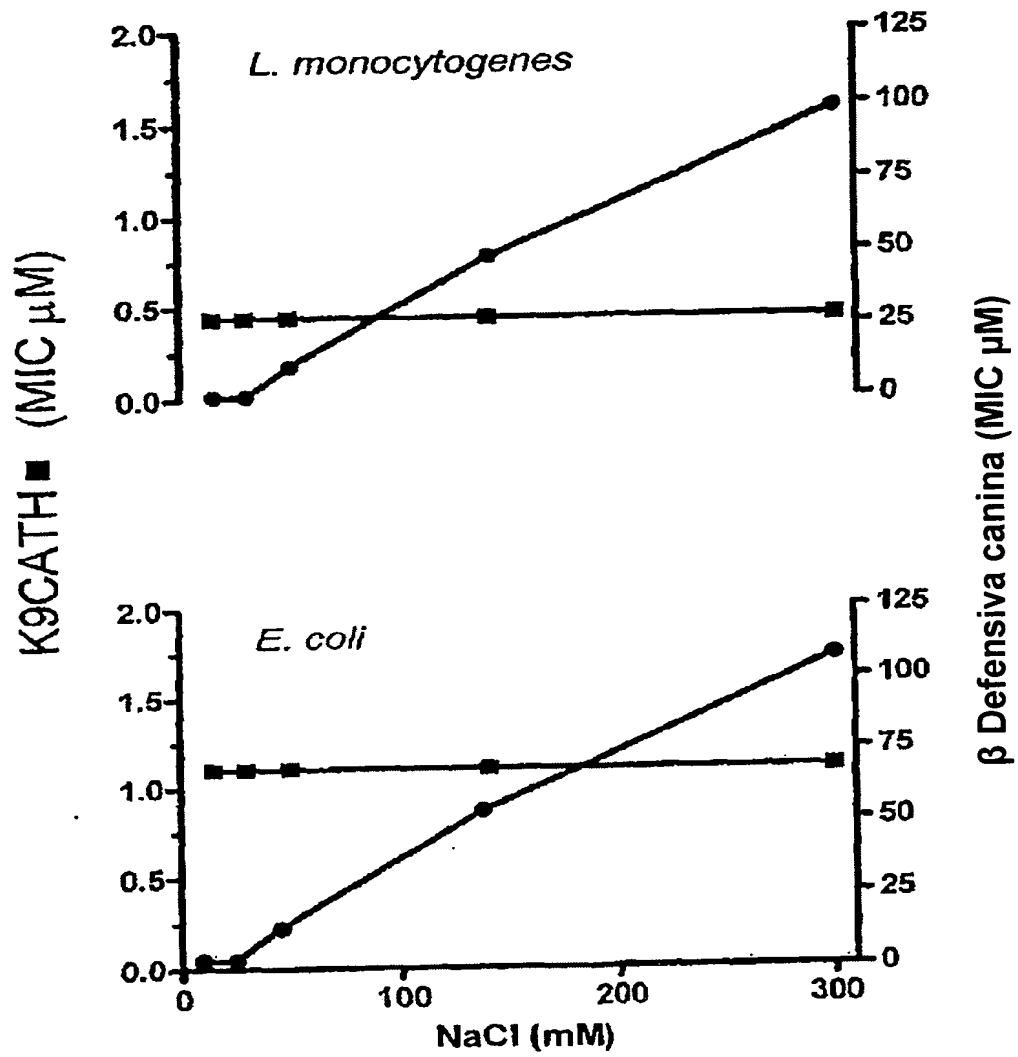
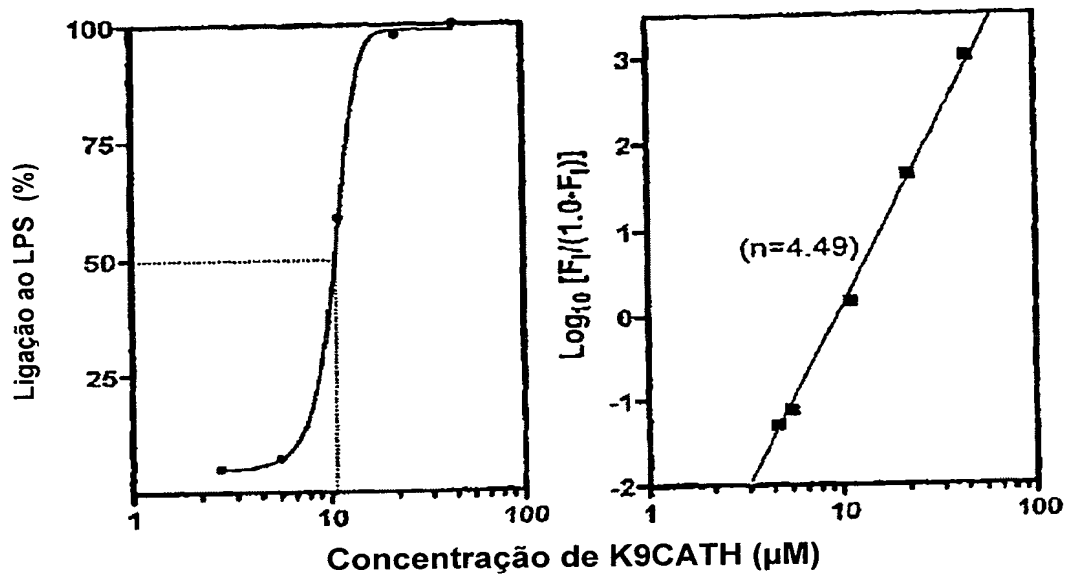


Fig. 7

**Fig. 8**

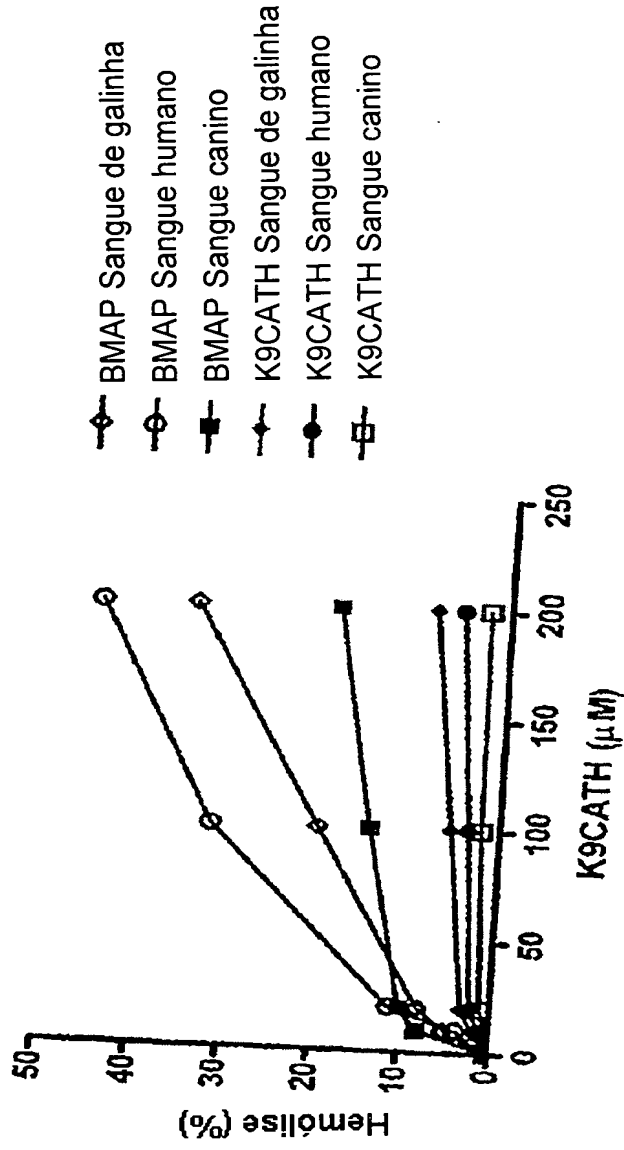
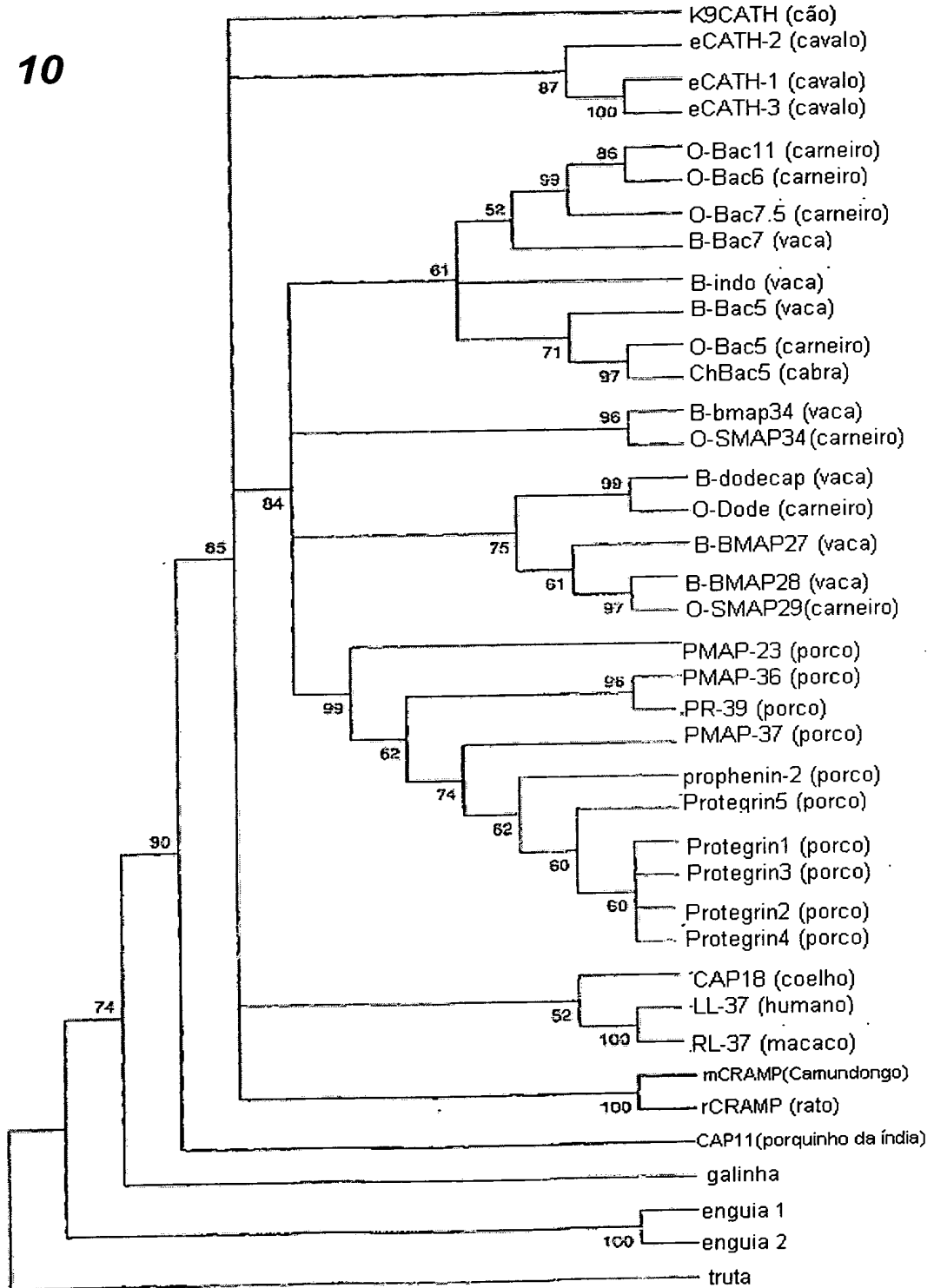
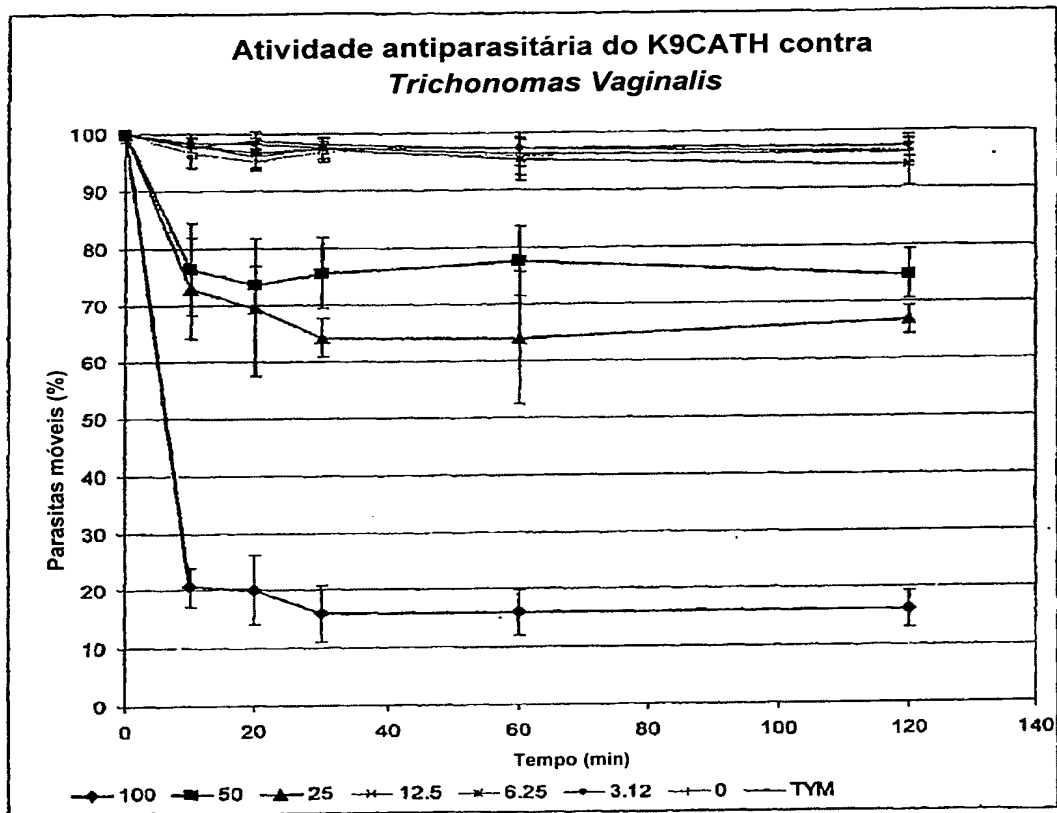


Fig. 9

Fig. 10



**Fig. 11**

RESUMO

**“POLIPEPTÍDEO PURIFICADO, MOLÉCULAS DE ÁCIDO NÚCLÉICO
ISOLADA, CÉLULA ISOLADA, MÉTODO PARA PRODUZIR UM
POLIPEPTÍDEO, COMPOSIÇÃO, MÉTODOS PARA INIBIR O
5 CRESCIMENTO MICROBIANO, ARTIGO MANUFATURADO E ANTICORPO
PURIFICADO”**

A invenção refere-se aos polipeptídeos antimicrobianos catelicidina relacionado a um peptídeo de 38 aminoácidos tendo a SEQ ID No: 4. A invenção fornece polipeptídeos que possui atividade antimicrobiana de
10 amplo espectro, ácidos nucleicos e expressão de vetores que codificam esses polipeptídeos, bem como células hospedeiras e métodos para reduzir a sobrevivência de um micróbio. Além disso, a invenção fornece também composições, bem como artigos manufaturados, que compreendem um polipeptídeo antimicrobiano de amplo espectro.