

(11) Número de Publicação: **PT 1601769 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 15/12 (2006.01) **A61K 38/17** (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01) **A01H 4/00** (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2004.03.05	(73) Titular(es): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE(CNRS) 3, RUE MICHEL ANGE F-75794 PARIS CEDEX 16 FR UNIVERSITE DE PERPIGNAN FR
(30) Prioridade(s): 2003.03.05 FR 0302714	
(43) Data de publicação do pedido: 2005.12.07	
(45) Data e BPI da concessão: 2007.05.09 059/2007	(72) Inventor(es): GUILLAUME MITTA FR RICHARD GALINIER FR BERNARD BANAIGS FR ERIC LASSERRE FR
	(74) Mandatário: JOSÉ LUÍS FAZENDA ARNAUT DUARTE RUA SOUSA MARTINS, Nº 10 1050-218 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO DENOMINADO PAPILOSINA, GENE QUE CODIFICA O REFERIDO PEPTÍDEO, VECTOR, ORGANISMO TRANSFORMADO E COMPOSIÇÃO QUE O CONTÉM**

(57) Resumo:

RESUMO**“PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO DENOMINADO PAPILOSINA, GENE QUE
CODIFICA O REFERIDO PEPTÍDEO, VECTOR, ORGANISMO
TRANSFORMADO E COMPOSIÇÃO QUE O CONTÉM”**

A presente invenção refere-se a um peptídeo antimicrobiano, a partir daqui denominado papilosina, isolado a partir de um invertebrado marinho, em que a sequência de aminoácidos é a seguinte: GFWKKVGSAAWGGVKAAAKGAAVGGLNALAKHIQ, seus derivados, seus fragmentos e um polipeptídeo que o compreende. A presente invenção refere-se igualmente a organismos hospedeiros transformados e capazes de produzir o peptídeo da invenção, tais como microrganismos, células animais, células vegetais e plantas. A presente invenção refere-se por fim a uma composição antimicrobiana contendo o peptídeo da invenção.

DESCRIÇÃO

**"PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO DENOMINADO PAPILOSINA, GENE QUE
CODIFICA O REFERIDO PEPTÍDEO, VECTOR, ORGANISMO
TRANSFORMADO E COMPOSIÇÃO QUE O CONTÉM"**

A presente invenção refere-se a um novo peptídeo antimicrobiano, de aqui em diante denominado papilosina, identificado e purificado a partir de um extracto de um invertebrado marinho.

Numerosas doenças (tuberculose, pneumonias, patologias urinárias,...), apesar de bem controladas após o surgimento dos antibióticos, constituem nos dias de hoje patologias reemergentes, de prognóstico frequentemente fatal, como consequência da ineficácia dos antibióticos clássicos.

Com efeito, outrora um flagelo implacável, a tuberculose (provocada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*) tinha regredido nos últimos quarenta anos nos países industrializados, graças ao melhoramento das condições sociais e à aplicação de um tratamento antibiótico eficaz. Ela reapareceu sob uma forma mais virulenta em meados dos anos de 1980 em vários países, nomeadamente em França e nos Estados Unidos. As "novas" formas do bacilo são resistentes aos antibióticos clássicos

(estreptomicina, isobiazida, rifampicina), assim como outros antibióticos recentemente eficazes.

De igual modo, as infecções ditas nosocomiais frequentemente contraídas no ambiente hospitalar são as mais frequentemente muito difíceis de controlar devido às suas resistências aos antibióticos disponíveis. 20 a 25% dos Pneumococos isolados no ambiente hospitalar em França revelaram-se muito resistentes aos antibióticos da família dos macrolidos e 20 a 49% dos *Staphylococcus aureus* isolados no hospital nos EUA são resistentes à meticilina.

A existência e o aparecimento constante de bactérias cada vez mais resistentes aos antibióticos induzem uma pesquisa importante por parte da indústria farmacêutica e torna absolutamente necessária a descoberta de novas famílias de antibióticos.

O biótipo marinho é considerado como o mais rico em habitats diferentes do globo, mas igualmente como o menos conhecido dos cientistas. Ele é assim o berço pré-biótico do nosso planeta (3 milhões de anos de evolução). Isto tem por consequência uma diversidade de espécies, de sistemas de organização, de formas e de soluções adaptativas. Esta biodiversidade é a fonte de uma quimiodiversidade, uma fonte potencial de compostos naturais novos. As investigações já conduziram à descoberta de substâncias notáveis, tanto pelas suas estruturas como pelas suas actividades biológicas. Muitos milhares de

substâncias estão hoje relatadas: mais de 150 publicações, derivadas de novos metabolitos secundários, surgem anualmente desde há mais de dez anos. Alguns destes metabolitos são objecto de ensaios clínicos ou já estão comercializados. Outros compostos, como as toxinas de microrganismos marinhos (ciguatoxina, brevetoxina, saxitoxina ou tetrodotoxina) são ferramentas de escolha em neurofisiologia e, em particular, no estudo de canais iónicos.

Presentemente, mais de metade das moléculas de origem marinha susceptíveis de serem utilizadas no domínio da saúde destina-se ao tratamento do cancro. Em vinte e cinco anos, de 1970 a 1995, mais de 130 substâncias marinhas foram certificadas no mundo pelas suas propriedades terapêuticas.

Curiosamente, o domínio dos antibióticos foi um pouco esquecido. A pesquisa de novos peptídeos antibióticos nos invertebrados marinhos só foi abordada muito recentemente. Os peptídeos antimicrobianos são moléculas em que o alvo é a membrana bacteriana. Por consequência, para adquirir uma resistência em relação a este tipo de moléculas, os microrganismos devem alterar a composição e organização dos seus lípidos membranares. Esta solução, difícil do ponto de vista evolutivo, explica porque é que a resistência dos microrganismos em relação a este tipo de antibióticos é raramente referenciada.

Deste modo, os trabalhos dos requerentes permitiram colocar em evidência e purificar um novo peptídeo antibiótico, posteriormente denominado papilosina, tendo em consideração o facto de não apresentar nenhuma homologia de estrutura primária em relação a outras moléculas descritas na literatura e que foi purificado a partir de uma espécie de tunicado, a ascídia solitária *Halocynthia papillosa* na qual este tipo de molécula nunca tinha sido pesquisado. A actividade antimicrobiana da papilosina foi avaliada no laboratório: trata-se de uma molécula bacteriolítica activa sobre as bactérias Gram positivas e Gram negativas. Esta molécula é particularmente interessante devido ao seu modo de acção particular. Com efeito, este último não permite induzir resistência por parte dos alvos bacterianos.

Nas sequências peptídicas relatadas em seguida, os aminoácidos são representados pelo seu código de uma letra, mas podem ser também representados pelo seu código de três letras segundo a nomenclatura abaixo.

A	Ala	alanina
C	Cys	cisteína
D	Asp	ácido aspártico
E	Glu	ácido glutâmico
F	Phe	fenilalanina
G	Gly	glicina
H	His	histidina
I	Ile	isoleucina

K	Lys	lisina
L	Leu	leucina
M	Met	metionina
N	Asn	asparagina
P	Pro	prolina
Q	Gln	glutamina
R	Arg	arginina
S	Ser	serina
T	Thr	treonina
V	Val	valina
W	Trp	triptofano
Y	Tyr	tirosina

A presente invenção refere-se assim a um peptídeo isolado de 34 aminoácidos cuja sequência de aminoácidos é a seguinte: GFWKKVGSAAWGGVKAAAKGAAVGGLNALAKHIQ (SEQ ID N° 1, na lista de sequências em anexo), seus derivados e seus fragmentos.

A título de «derivados» do peptídeo da invenção, podem citar-se os peptídeos que apresentam uma modificação pós-tradução e/ou uma modificação química, em particular uma glicosilação, uma amidação, uma acilação, uma acetilação, uma metilação do mesmo modo que os peptídeos que comportam um grupo protector. Entende-se por "grupo protector", de acordo com a presente invenção, qualquer grupo que permita evitar a degradação do peptídeo da invenção.

Os derivados do peptídeo da invenção podem igualmente ser aqueles em que um ou vários aminoácidos são enantiómeros, diastereoisómeros, aminoácidos naturais de conformação D, aminoácidos raros, nomeadamente hidroxiprolina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, 6-N metilisina, N-etilglicina, N-metilglicina, N-etilasparagina, alo-isoleucina, N-metilisoleucina, N-metilvalina, piroglutamina, ácido aminobutírico e aminoácidos sintéticos, nomeadamente ornitina, norleucina, norvalina, ciclo-hexilalanina e aminoácidos ómega. A invenção cobre igualmente os retropeptídeos e os retro-inverso-peptídeos, do mesmo modo que os peptídeos nos quais a cadeia lateral de um ou vários aminoácidos é substituída pelos grupos que não modificam a actividade antimicrobiana do peptídeo da invenção.

A título de «derivado» do peptídeo da invenção, incluem-se igualmente os peptídeos de apresentam 70%, 75%, 80%, 85%, 90% e/ou 95% de identidade com o peptídeo da sequência SEQ ID N° 1, da lista de sequências em anexo.

A título de «fragmentos» do peptídeo da invenção, entendem-se fragmentos de menos de 7 aminoácidos que apresentam uma actividade antibacteriana. A actividade antimicrobiana dos derivados e dos fragmentos do peptídeo da invenção pode ser colocada em evidência graças aos testes *in vitro* aqui descritos abaixo nos exemplos.

A invenção refere-se também a um polipeptídeo isolado compreendendo o peptídeo da invenção. A invenção compreende mais particularmente um polipeptídeo compreendendo o peptídeo da invenção do qual uma e/ou outra das extremidades do respectivo peptídeo, compreendendo um ou vários aminoácidos necessários à sua expressão e/ou ao seu direccionamento num organismo hospedeiro. O polipeptídeo da invenção pode apresentar um peptídeo sinal ou de trânsito de modo a dirigir a secreção do peptídeo ou polipeptídeo da invenção num organismo hospedeiro.

O peptídeo, seus derivados e seus fragmentos, tal como os polipeptídeos da invenção podem ser sintetizados quimicamente de acordo com as técnicas conhecidas do especialista na técnica.

A invenção refere-se igualmente a um polinucleótido isolado caracterizado por codificar o peptídeo ou um polipeptídeo da invenção. Entende-se por "polinucleótido", de acordo com a invenção, uma sequência nucleica de tipo ADN ou ARN, de um modo preferido ADN, nomeadamente de cadeia dupla. O especialista na técnica conhecendo o código genético e a sequência de aminoácidos do peptídeo da invenção consegue isolar um polinucleótido codificando o peptídeo da invenção por rastreio de bibliotecas de ácidos nucleicos utilizando um ou vários oligonucleótidos deduzidos a partir da sequência de aminoácidos do peptídeo da invenção. O especialista na técnica tem igualmente à sua disposição as ferramentas informáticas capazes de, a partir de uma sequência de

aminoácidos, fornecer a sequência nucleotídica correspondente (Proteína em código reverso).

A invenção refere-se igualmente a polinucleótidos isolados que compreendem modificações ao nível de um ou vários nucleótidos resultantes da degenerescência do código genético e que codificam para uma mesma sequência de aminoácidos do peptídeo da invenção.

A invenção cobre igualmente os polinucleótidos isolados codificando o peptídeo ou um polipeptídeo da invenção e capazes de hibridarem nas condições de restringência com o referido peptídeo ou com os referidos polipeptídeos. Entende-se por «condições de restringência», de acordo com a presente invenção, as condições referidas por Sambrook *et al.* (Molecular Cloning, 1989, Noland C. ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

A invenção cobre igualmente as sequências nucleotídicas complementares dos polinucleótidos isolados definidos abaixo, assim como os ARN correspondentes.

A presente invenção refere-se igualmente a um vector de clonagem e/ou de expressão caracterizado por conter um polinucleótido de acordo com a invenção para transformar um organismo hospedeiro e expressar neste último o peptídeo ou um polipeptídeo da invenção. De modo vantajoso, o vector de clonagem e/ou de expressão pode conter, outro polinucleótido codificando um peptídeo ou um

polipeptídeo da invenção, pelo menos um elemento escolhido a partir do grupo de promotores constitutivos, promotores indutíveis, elementos terminadores.

De um modo preferido, o referido vector compreende, ligado entre eles de um modo operacional, um promotor, um polinucleótido codificando o peptídeo ou um polipeptídeo da invenção e um elemento terminador. Entende-se por "ligado entre eles de modo operacional", de acordo com a invenção, os elementos ligados entre eles de modo a que o funcionamento de um dos elementos seja afectado pelo de um outro. A título de exemplo, um promotor é ligado de um modo operacional a uma sequência codificante assim que seja capaz de afectar a expressão deste último. Os elementos reguladores da transcrição, da tradução e da maturação dos peptídeos que o vector pode compreender são conhecidos do especialista na técnica e este último é capaz de os escolher em função do organismo hospedeiro no qual a expressão ou a clonagem irão ser realizadas.

O vector da invenção é escolhido vantajosamente de entre um plasmídeo, um cosmídeo, um bacteriófago e um vírus, em particular um baculovírus. De um modo preferido, o peptídeo da invenção é um vector de replicação autónoma comportando os elementos que permitem a sua manutenção e a sua replicação do organismo hospedeiro como uma origem de replicação.

Por outro lado, o vector pode comportar elementos que permitem a sua selecção no organismo hospedeiro como, por exemplo, um gene de resistência a um antibiótico ou um gene de selecção que assegurem a complementação com o respectivo gene removido ao nível do genoma do organismo hospedeiro. Tais vectores de clonagem e/ou de expressão são bem conhecidos do especialista na técnica e estão amplamente descritos na literatura.

A invenção refere-se igualmente um organismo hospedeiro caracterizado por ser transformado com o auxílio de um vector da invenção. Por «organismo hospedeiro», de acordo com a presente invenção, entende-se todo o organismo mono ou pluricelular, inferior ou superior, no qual um polinucleótido da invenção é introduzido para a produção de um peptídeo ou de um polipeptídeo da invenção. Especialista na técnica conhece diferentes métodos para introduzir, de forma eficaz um polinucleótido num organismo hospedeiro de modo a que, no organismo hospedeiro, o peptídeo ou polipeptídeo codificado pelo referido polinucleótido seja produzido. A título de exemplo e de modo não exaustivo, este método pode ser uma electroporação, uma lipofecção, uma transformação biológica de um vegetal utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, etc...

De acordo com uma forma preferida da invenção, o organismo hospedeiro é um microrganismo tal como uma levedura, uma bactéria ou um fungo. A transformação desses microrganismos permite produzir o peptídeo da invenção à

escala semi-industrial ou industrial. O especialista na técnica conhece tais microrganismos e sabe como transformá-los sem necessidade de um esforço inventivo.

De acordo com uma outra forma da invenção, o organismo hospedeiro é uma célula animal tal como uma célula de mamífero.

De acordo com uma outra forma da invenção, o organismo hospedeiro é uma célula vegetal ou uma planta. Por «célula vegetal» entende-se, de acordo com a presente invenção, toda a célula proveniente de uma planta podendo constituir tecidos indiferenciados, tais como caules, tecidos diferenciados, tais como embriões, partes de plantas, plantas ou sementes. Por «planta», entende-se, de acordo com a invenção, todo o organismo multicelular diferenciado capaz de fotossíntese, em particular monocotiledónias ou dicotiledónias, mais particularmente, plantas de cultura destinadas ou não à alimentação animal ou humana.

Por consequência, o organismo hospedeiro de acordo com a invenção é seleccionado entre microrganismos, células animais, células vegetais e plantas.

O peptídeo da invenção é igualmente útil para conferir às plantas uma característica de resistência a doenças microbianas. A invenção refere-se, deste modo, igualmente a uma célula vegetal resistente a doenças microbianas compreendendo um polinucleótido da invenção e

expressando o peptídeo ou um polipeptídeo da invenção. A invenção refere-se igualmente a uma planta compreendendo pelo menos uma célula vegetal resistente a doenças microbianas, tal como definido acima.

Finalmente, a invenção visa rentabilizar as propriedades antimicrobianas do peptídeo da invenção para prevenir e/ou tratar as infecções microbianas tanto para o homem como para o animal ou as plantas. No âmbito da presente invenção, entende-se por «propriedades antimicrobianas», bem como propriedades antibacterianas ou propriedades antifúngicas. A invenção refere-se, deste modo, vantajosamente à utilização do peptídeo da invenção a título de medicamento em terapia humana e animal. Refere-se igualmente à utilização do peptídeo da invenção para o tratamento de plantas contra as infecções microbianas, aplicando o referido peptídeo directamente sobre as plantas. A presente invenção refere-se, deste modo, à utilização de um peptídeo ou de um polipeptídeo da invenção como agente antimicrobiano e, mais particularmente como agente antibacteriano activo contra as bactérias Gram positivas e contra as bactérias Gram negativas. A presente invenção refere-se igualmente à utilização de um peptídeo ou de um polipeptídeo da invenção para a preparação de uma composição antimicrobiana e, mais particularmente, antibacteriana destinada a lutar contra as bactérias Gram positivas e as bactérias Gram negativas.

A invenção refere-se ainda a uma composição antimicrobiana compreendendo como agente activo o peptídeo da invenção ou um polipeptídeo da invenção vantajosamente associado na referida composição a um veículo aceitável. A composição actua mais particularmente contra as bactérias Gram positivas e as bactérias Gram negativas. A composição antimicrobiana da invenção pode ainda compreender um outro princípio activo tal como um outro agente antimicrobiano.

Por "veículo" entende-se, de acordo com a presente invenção, toda a substância que é adicionada ao peptídeo ou ao polipeptídeo da invenção para favorecer o seu transporte, evitar a sua degradação substancial na referida composição e preservar as suas propriedades antimicrobianas. O veículo é seleccionado em função do tipo de aplicação da composição. Nomeadamente, uma vez que a composição é aplicada numa utilização farmacêutica em saúde humana e animal, o especialista na técnica seleccionará o veículo farmacêuticamente aceitável adaptado à via de administração da composição farmacêutica da invenção.

Deste modo, as composições farmacêuticas de acordo com a invenção são constituídas por, pelo menos, o peptídeo ou o polipeptídeo da invenção sob a forma livre ou sob a forma de um sal de adição com um ácido farmacêuticamente aceitável, no estado puro ou sob a forma de uma composição na qual está associado a qualquer outro produto farmacêuticamente compatível. As composições farmacêuticas

de acordo com a invenção podem ser empregues por via oral, parentérica, rectal ou tópica.

A título de composições sólidas para administração oral, podem utilizar-se comprimidos, pílulas, pós, etc... em que o peptídeo ou o polipeptídeo da invenção são misturados com um ou vários diluentes inertes classicamente utilizados, e eventualmente com outras substâncias, tais como, por exemplo um lubrificante, um corante, um revestimento, etc....

A título de composições líquidas para administração oral ou ocular, podem utilizar-se suspensões, soluções, emulsões, xaropes farmacêuticamente aceitáveis contendo diluentes inertes classicamente utilizados e, eventualmente, outras substâncias, como produtos humidificantes, edulcorantes, espessantes, etc....

As composições estéreis para administração parentérica podem ser soluções aquosas ou não, suspensões ou emulsões. Como solvente ou veículo, pode empregar-se água, propilenoglicol, óleos vegetais ou outros solventes orgânicos convenientes. Estas composições podem igualmente conter adjuvantes, como agentes humidificantes, isotonzantes, emulsificantes, etc....

As composições para a administração tópica podem ser, por exemplo, cremes, loções, colírios, gotas nasais ou oculares ou aerossol.

Quando a composição antimicrobiana da invenção é reservada para uma utilização agroquímica, o veículo é um veículo agroquimicamente aceitável adaptado a uma administração sobre as plantas ou à proximidade das plantas sem as degradar.

Nas composições antimicrobianas objecto da presente invenção, a quantidade de peptídeo ou de polipeptídeo objecto da invenção utilizado vantajosamente está compreendida entre 0,1 e 50 μM , de acordo com as aplicações. Contudo, é evidente que o especialista na técnica saberá adaptar esta quantidade em função do tipo de composições antimicrobianas *i. e.*, composições farmacêuticas ou composições agroquímicas e em função do modo de administração das referidas composições.

A presente invenção refere-se igualmente a um método para prevenir e/ou tratar uma infecção microbiana e, mais particularmente, uma infecção bacteriana provocada tanto por bactérias Gram positivas como Gram negativas. O presente método compreende a administração a um indivíduo de uma quantidade eficaz de um peptídeo, de um polipeptídeo, de um polinucleótido ou de uma composição de acordo com a presente invenção. Por «indivíduo», entende-se, no âmbito da presente invenção, qualquer animal ou qualquer ser humano ao qual foi diagnosticada uma infecção microbiana, mas igualmente qualquer animal ou qualquer ser humano susceptível de sofrer dessa infecção.

Os exemplos que se seguem permitem ilustrar a presente invenção e não devem ser interpretados como limitantes da sua utilização. Estes exemplos fazem mais particularmente referência à caracterização da papilosina, sua purificação e sua actividade antibacteriana.

I. Isolamento da papilosina.

A caracterização bioquímica desta molécula está completa. A papilosina foi isolada a partir de células circulantes (hemócitos) de ascídia. Ela foi purificada por cromatografia líquida de elevado desempenho (HPLC) seguindo a sua actividade através de testes realizados *in vitro* ao longo do protocolo de purificação.

I. 1. Isolamento a partir de hemócitos de ascídias.

A recolha de hemolinfa foi efectuada, após lavagem em etanol de ascídias (eliminação de mucilagens), por secção ao nível do pé. A separação dos dois compartimentos sanguíneos (o plasma e os hemócitos) faz-se por centrifugação de hemolinfa (1000 g durante 10 minutos). São assim obtidos hemócitos no sedimento.

O sedimento celular é homogeneizado em 10 volumes de ácido acético a 2 M utilizando um homogeneizador, após o homogenato ser deixado durante 12 horas sob agitação a 4 °C. De seguida, este homogenato é centrifugado a 10 000 g durante 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante é agora submetido

a um primeiro fraccionamento numa coluna Sep-Pak C18 de fase inversa (Sep-Pak Vac 12cc, Waters Corporação, USA, ref: WAT036915). O sobrenadante é aplicado na coluna e são eluídas três fracções de polaridade decrescente graças a 3 soluções preparadas a partir de água ultrapura (EUP) e acetonitrilo (ACN, HPLC Grau para Gradiente, ACROS Organics, ref: 32573-0025) são adicionados ácido trifluoroacético a 0,05% (TFA, Fluka Chemika, ref: 91707):

ACN a 10% + EUP a 90% + TFA a 0,05%

ACN a 60% + EUP a 40% + TFA a 0,05%

ACN a 80% + EUP a 20% + TFA a 0,05%

Os extractos hemocitários são assim separados em três fracções. Estas diferentes fracções são de seguida congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, liofilizadas e ressuspensa em 1 mL de EUP adicionado com TFA a 0,05%. É realizada seguidamente uma centrifugação (10 000g, 20 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). O sobrenadante constitui o material que será utilizado para a HPLC.

I. 2. Purificação por HPLC.

Todas as etapas de purificação são efectuadas com um HPLC de tipo Waters (modelo 1525 HPLC Binary Pump) equipado com um detector espectrofotométrico (modelo 2487 Dual λ absorbance detector, Waters), um forno termoestabilizado com efeito Peltier (modelo 560-CIL, Cluzeau

info labo) e ligado a um sistema de aquisição dos dados (programa informático Breeze). As moléculas eluídas da coluna são analisadas ao nível do detector de UV em dois comprimentos de onda (224 e 280 nm).

A primeira etapa de HPLC é aplicada à fracção Sep-Pak 60% que contém a papilosina. A eluição é realizada em fase inversa numa coluna Sephasil C18 (250*4,6mm, Waters, ref: WAT054275) seguindo um gradiente binário linear: ACN e EUP adicionados com TFA a 0,05%. O gradiente varia de 2% a 72% de ACN ao longo de um tempo de 90 minutos, o débito aplicado é de 1 mL/minuto.

As fracções eluídas são detectadas pela visualização de picos de absorvência no monitor e são recolhidas em tubos de polietileno (tubos de baixa ligação Minisorp, Merck eurolab, ref: 13183.01). Estas fracções são a seguir congeladas, liofilizadas e recolocadas em EUP TFA 0,05%.

Estas são a seguir testadas quanto às suas actividades antibacterianas. A fracção contendo a papilosina é submetida a uma última etapa de purificação efectuada em fase reversa numa coluna Sephasil C8 (150*2.1mm, Waters, ref.: WAT056955). O gradiente de eluição utilizado inclui a percentagem de eluição da fracção respectiva como a etapa de separação precedente (29% ACN): a janela de eluição está situada entre as

percentagens de acetonitrilo de -5% a + 5% em relação à percentagem eluição obtida anteriormente.

Além disso, é efectuado um intervalo de gradiente ao longo do tempo (10% em 40 minutos) a fim de obter uma separação mais fina. Esta segunda etapa de HPLC permite a obtenção do produto puro. A eluição é efectuada em 40 minutos, com um débito de 0,3 mL/minuto, com um gradiente binário linear: ACN/TFA e EUP/TFA.

II. Caracterização da papilosina.

II.1. Testes de actividade antibacteriana ao longo das etapas de purificação.

Os testes de actividades antibacterianas, que permitem seguir a actividade biológica ao longo das etapas de purificação, são realizadas em microplacas (96 poços, Becton Dickinson, USA, ref: 18572). As diferentes fracções recolhidas após a separação (Sep-Pak ou HPLC) são congeladas, liofilizadas depois colocadas em EUP/TFA.

Estas são depois depositadas numa proporção de 10 µL em cada poço da microplaca e é-lhes adicionado 100 µL de cultura bacteriana (*E. coli*) em meio Poor Broth (1% bactotripton, 0,5% de NaCl, pH 7,5) em que a densidade óptica (DO) é levada a 0,001. Tudo é colocado sob agitação (250 rpm) a 37°C durante 12 horas.

II.2. Caracterização bioquímica da papilosina.

Após purificação, uma combinação de técnicas de espectrometria de massa e de degradação de Edman, permitiu ao Requerente obter a caracterização bioquímica completa deste peptídeo. Trata-se de um peptídeo de 34 aminoácidos em que a sequência segue:

GFWKVGSAAWGGVKAAAKGAAVGGLNALAKHIQ (SEQ ID N° 1 na listagem de sequências em anexo). Este peptídeo é uma molécula catiónica (ponto isoelétrico estimado: 10,60) que se estrutura provavelmente em hélice α anfipática como sugerem as previsões de estrutura secundária.

II.3. Actividade antibacteriana da papilosina.

Para determinar o espectro de actividade da papilosina, foram realizados testes complementares. A concentração mínima de (MBC) para cada estirpe bacteriana testada é determinada da forma seguinte: o peptídeo é dissolvido numa solução contendo 0,01% de ácido acético e 0,2% de albumina de soro bovino (BSA); depois foram preparadas diluições seriadas de 2 em 2, na mesma solução 0,01% de ácido acético e 0,2% de BSA. São incubados 10 μ L de cada diluição em placas de 96 poços estéreis (Becton Dickinson, USA, ref: 18572) na presença de 100 μ L de uma suspensão de bactérias preparada com uma densidade óptica de 0,001 a 600 nm em meio de Mueller Hinton (MHB, SIGMA, ref: M-9677).

O crescimento bacteriano é controlado após 18 horas de incubação sob agitação. A MBC é determinada intervalando o conteúdo dos três primeiros poços onde não é observado qualquer crescimento bacteriano; este intervalo é feito sobre caixas de Petri contendo um agar preparado a partir do meio de Mueller Hinton. Estas caixas são a seguir incubadas durante 18 horas. A MBC corresponde à concentração mais baixa em peptídeo para a qual nenhuma colónia bacteriana é observada nas caixas incubadas. A tabela 1 dá o espectro de actividade da molécula. Em resumo, a papilosina possui uma actividade bacteriolítica potente sobre as bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Tabela 1:

Espectro da actividade da papilosina

(Valores de MBC expressos em μM)

Bactéria	MBC
Bactérias Gram positivas	
<i>M. luteus</i>	0,125-0,25
<i>S. aureus</i>	0,5-1
Bactérias Gram negativas	
<i>E. coli</i> DH5a	0,25-0,5

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Centre National de la Recherche Scientifique
 Université de Perpignan

<120> Peptídeo antimicrobiano denominado papilosina, gene que codifica o referido peptídeo, vector, organismo transformado e composição que o contém

<130> 30807/PCT

<140> PCT/FR04/XXXXX

<141> 2004-03-05

<150> FR03/02714

<151> 2003-03-05

<160> 1

<170> PatentIn versão 3.1

<210> 1

<211> 34

<212> PRT

<213> *Halocynthia papillosa*

<220>

<221> PEPTÍDEO

<222> (1)..(34)

<223> Sequência de aminoácidos da papilosina

<400> 1

Gly Phe Trp Lys Lys Val Gly Ser Ala Ala Trp Gly Gly Val Lys Ala
1 5 10 15

Ala Ala Lys Gly Ala Ala Val Gly Gly Leu Asn Ala Leu Ala Lys His
20 25 30

Ile Gln

Lisboa, 3 de Agosto de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Peptídeo isolado cuja sequência de aminoácidos é a seguinte: GFWKKVGSAAWGGVKAAAKGAAVGGLN-ALAKHIQ (SEQ ID N°. 1 na lista de sequências em anexo), seus derivados apresentando pelo menos 70% de identidade com a sequência acima, seus derivados apresentando uma glicosilação, uma amidação, uma acilação, uma acetilação, uma metilação ou contendo um grupo protector e fragmentos do referido peptídeo com pelo menos 7 aminoácidos, apresentando os referidos derivados e fragmentos uma actividade antimicrobiana.

2. Polipeptídeo isolado compreendendo um peptídeo de acordo com a reivindicação 1.

3. Polinucleótido isolado **caracterizado por** codificar um peptídeo de acordo com a reivindicação 1 ou um polipeptídeo de acordo com a reivindicação 2.

4. Vector de clonagem e/ou de expressão **caracterizado por** conter um polinucleótido de acordo com a reivindicação 3.

5. Vector de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado por** conter por outro lado, pelo menos um elemento seleccionado no grupo dos promotores

constitutivos, dos promotores indutíveis, dos elementos terminadores.

6. Vector de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 ou 5, **caracterizado por** comportar elementos que permitem a sua manutenção e a sua replicação num organismo hospedeiro.

7. Organismo hospedeiro transformado com o auxílio de um vector de acordo com uma das reivindicações 4 a 6.

8. Organismo hospedeiro, com excepção do ser humano, no qual um polinucleótido de acordo com a reivindicação 3 é introduzido para a produção de um peptídeo de acordo com a reivindicação 1 ou de um polipeptídeo de acordo com a reivindicação 2.

9. Organismo hospedeiro de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 ou 8, **caracterizado por** ser seleccionado entre microrganismos, células animais, células vegetais e plantas.

10. Célula vegetal resistente a doenças antimicrobianas compreendendo um polinucleótido de acordo com a reivindicação 3 e expressando um peptídeo de acordo com a reivindicação 1 ou um polipeptídeo de acordo com a reivindicação 2.

11. Planta **caracterizada por** compreender pelo menos uma célula vegetal de acordo com a reivindicação 10.

12. Utilização de um peptídeo de acordo com a reivindicação 1 ou de um polipeptídeo de acordo com a reivindicação 2 para a preparação de uma composição antimicrobiana, mais particularmente, antibacteriana destinada a lutar contra as bactérias Gram positivas e as bactérias Gram negativas.

13. Composição antimicrobiana compreendendo como agente activo um peptídeo de acordo com a reivindicação 1 ou um polipeptídeo de acordo com a reivindicação 2, vantajosamente associado a um veículo aceitável na referida composição.

Lisboa, 03 de Agosto de 2007