



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112021004792-1 A2



(22) Data do Depósito: 14/09/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 03/08/2021

(54) Título: PROTEÍNA PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS

(51) Int. Cl.: A61K 38/16; C07K 14/47; A61P 19/02; A61P 29/00.

(30) Prioridade Unionista: 16/09/2018 IN 201821009667.

(71) Depositante(es): UNICHEM LABORATORIES LTD.

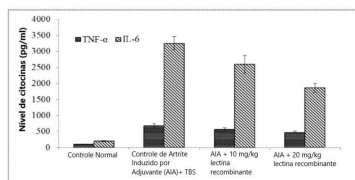
(72) Inventor(es): DHANANJAY SATHE; SUDEEP KUMAR; MAMATA KATDARE.

(86) Pedido PCT: PCT IB2019057757 de 14/09/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/074984 de 16/04/2020

(85) Data da Fase Nacional: 15/03/2021

(57) Resumo: PROTEÍNA PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS. A presente invenção se refere a uma lectina para uso no tratamento, redução da progressão e cura de inflamações em um indivíduo em necessidade. Também são descritas composições farmacêuticas compreendendo a referida lectina. A lectina pode compreender uma sequência de aminoácidos tendo a sequência da SEQ ID NO: 1 ou pelo menos 60% de homologia com a SEQ ID NO: 1.



PROTEÍNA PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS PATENTE RELACIONADOS

[0001] É reivindicado o benefício do Pedido de Patente Provisório Indiano nº 201821009667, depositado em 16 de setembro de 2019, seu conteúdo sendo aqui incorporado por referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] A presente invenção se refere ao uso de proteínas lectinas para prevenção, tratamento e cura de inflamações, incluindo doenças inflamatórias.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0003] A inflamação contribui para proteger o tecido lesionado contra outras infecções, desencadeando uma rede multifatorial de sinais químicos que iniciam o processo de cicatrização. Isso envolve a ativação e a migração de células sanguíneas importantes (neutrófilos, monócitos e eosinófilos) para o local da lesão. As células (macrófagos, mastócitos, células endoteliais e células de Schwann) secretam citocinas e fatores de crescimento específicos necessários para a regeneração do nervo e, eventualmente, resulta na reconstituição do microambiente normal.

[0004] A inflamação associada à cicatrização de feridas (inflamação normal) geralmente é autolimitada; entretanto, a desregulação de qualquer um dos fatores convergentes pode levar a anormalidades e, em último caso, a patologêses caracterizadas por inflamação aguda ou crônica. A inflamação crônica é uma inflamação de longo prazo e pode durar vários meses e até anos, enquanto a inflamação aguda é aquela que começa rapidamente e se torna grave em um curto espaço de tempo. As inflamações crônicas incluem psoríase / artrite psoriática, artrite reumatoide (RA), hepatite ativa, asma e doença inflamatória intestinal, que precisam ser bem administradas e tratadas a tempo. Os danos causados por inflamações crônicas são irreversíveis e altamente dolorosos.

[0005] Atualmente, os medicamentos usados para tratar algumas das doenças inflamatórias variam dependendo do tipo de doença. Os medicamentos comumente usados incluem:

os analgésicos ajudam a reduzir a dor, mas não têm efeito sobre a inflamação. Os exemplos incluem acetaminofeno (Tylenol, outros), tramadol (Ultram, Ultracet, outros) e narcóticos contendo oxicodona (Percocet, Oxycontin, outros) ou hidrocodona (Norco, Vicoprofen, outros). Os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs) reduzem tanto a dor quanto a inflamação. Os NSAIDs incluem ibuprofeno (Advil, Motrin IB, outros) e naproxeno sódico (Aleve). Vários cremes e pomadas contrairritantes contêm mentol ou capsaicina. Os medicamentos anti-reumáticos modificadores de doença (DMARDs) são frequentemente usados para tratar a artrite reumatoide. Os DMARDs desaceleram ou impedem o sistema imunológico de atacar as articulações. Os exemplos incluem metotrexato (Trexall) e hidroxicloroquina (Plaquenil). Uma nova subcategoria de DMARDs, conhecida como “inibidores de JAK”, bloqueia as vias da Janus quinase, ou JAK, que estão envolvidas na resposta imunológica do corpo. O tofacitinibe pertence a essa classe. Diferente dos medicamentos biológicos, ele pode ser tomado por via oral. Normalmente usados em conjunto com DMARDs, os modificadores de resposta biológica são fármacos geneticamente modificados que têm como alvo várias moléculas de proteína que são envolvidas na resposta imune. Eles são inibidores de células B/T, moduladores seletivos da coestimulação. Exemplos incluem etanercepte (Enbrel), certolizumabe (Cimzia), Rituximabe (Rituxan) e infliximabe (Remicade). Os corticosteroides, como prednisona e cortisona, reduzem a inflamação e suprimem o sistema imunológico.

[0006] Os medicamentos podem ser acompanhados de terapia (física, quente e fria), perda de peso, aparelhos ortopédicos, exercícios, neuroestimulação elétrica transcutânea (TENS) e cirurgia. No entanto, cada um dos medicamentos mencionados acima tem seus próprios efeitos colaterais. Portanto, os medicamentos biológicos continuam sendo a escolha. Esses fármacos são um subconjunto de DMARDs. Os medicamentos biológicos podem funcionar mais rapidamente do que os DMARDs tradicionais, e são injetados ou administrados por infusão. Como eles visam etapas específicas do processo inflamatório, eles não eliminam toda a resposta imunológica, como fazem alguns outros tratamentos de doenças inflamatórias. Em muitas pessoas com doenças inflamatórias, um medicamento biológico pode retardar, modificar ou

interromper a doença, mesmo quando outros tratamentos não ajudaram muito. Hoje existem poucos medicamentos biológicos aprovados para o tratamento de doenças inflamatórias. Eles são muito caros e raramente disponíveis devido à menor produção e alta demanda. Assim, existe uma necessidade não atendida de fornecer uma opção para o tratamento de doenças inflamatórias, em que a opção seja altamente específica para sua ação, seja econômica e atenda de forma eficaz às necessidades do mercado.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[0007] Portanto, um objetivo da presente invenção é fornecer um medicamento biológico altamente específico e eficaz para o tratamento de doenças inflamatórias.

[0008] Ainda outro objetivo da invenção é fornecer um método econômico e eficaz de tratamento de doenças inflamatórias.

[0009] Outro objetivo da presente invenção é fornecer proteína recombinante para o tratamento de doenças inflamatórias.

[0010] Ainda outro objetivo da presente invenção é fornecer um método de tratamento de doenças inflamatórias que use proteína recombinante.

[0011] Ainda outro objetivo da invenção é fornecer um método para curar ou reduzir o efeito de doenças inflamatórias em indivíduos que sofrem dessas doenças.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0012] De acordo com um primeiro aspecto da presente invenção, é fornecida uma proteína lectina para uso no tratamento ou prevenção de inflamações em um indivíduo.

[0013] As lectinas são proteínas de ligação a carboidratos altamente específicas, macromoléculas que são altamente específicas para as porções de açúcar de outras moléculas. As lectinas fazem o reconhecimento em nível celular e molecular e desempenham vários papéis nos fenômenos de reconhecimento biológico que envolvem células, carboidratos e proteínas. Elas são proteínas divalentes ou polivalentes de ligação a carboidrato que se ligam e precipitam glicoproteínas e aglutinam as hemácias do sangue. Verifica-se que as lectinas encontradas nos animais

são mais frequentemente auxiliares nas interações das células, enquanto as lectinas das plantas são conhecidas por afastar potenciais predadores ou agentes patogênicos.

[0014] As lectinas purificadas são importantes em um ambiente clínico porque são usadas para a tipagem sanguínea. Alguns dos glicolipídeos e glicoproteínas nas hemácias de um indivíduo podem ser identificados por lectinas. Muitas lectinas são usadas como biomarcadores, indicando a detecção precoce de crescimento maligno, ou como indutores de autofagia, enquanto outras lectinas também mostram a capacidade de inibir o crescimento canceroso por meio da apoptose. Devido à proliferação desregulada de células, algumas das porções de carboidratos são expressas como um antígeno em células cancerosas. As lectinas são usadas como um agente de entrega de fármacos na terapia para cânceres porque elas se ligam especificamente aos tumores malignos. Além disso, como as lectinas também modulam as vias associadas ao câncer, elas têm potencial como agentes diagnósticos e terapêuticos para o câncer.

[0015] Existem vários antígenos aos quais as lectinas se ligam e que foram caracterizados na superfície das células cancerosas; a maioria dos antígenos é específica para um tipo particular de câncer e a ligação da lectina a esses antígenos pode resultar na inibição do crescimento canceroso por meio da indução da apoptose nas células cancerosas. Atualmente, a maioria das lectinas disponíveis comercialmente é de plantas e outros eucariotas.

[0016] A lectina de *Sclerotium rolfsii* (SRL) é uma lectina que foi isolada dos corpos escleróticos do fungo fitopatogênico de solo *S. rolfsii*. Mostrou-se que a SRL se liga a células humanas de câncer de cólon, de câncer de ovário e leucêmicas.

[0017] Surpreendentemente, os presentes inventores verificaram agora que as lectinas são úteis no tratamento de inflamações.

[0018] De acordo com um segundo aspecto da invenção, é fornecida uma composição farmacêutica compreendendo uma proteína lectina e um diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

[0019] De acordo com um terceiro aspecto da invenção, é fornecido um método de tratamento ou prevenção de inflamações em um indivíduo, o método

compreendendo administrar ao indivíduo uma lectina, ou a composição farmacêutica do segundo aspecto da invenção.

[0020] A lectina pode compreender uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60% de homologia com a SEQ ID NO: 1. Em algumas formas de realização, a lectina pode compreender uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60% de homologia com a SEQ ID NO: 2, 3 ou 4. Em algumas formas de realização, a lectina compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de homologia com a SEQ ID NO: 1. Em algumas formas de realização, a lectina compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1, 2, 3 ou 4. A lectina pode ser recombinante.

[0021] Em outro aspecto, a presente invenção diz respeito ao método de tratamento de doenças inflamatórias usando a proteína lectina que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1, ou uma proteína lectina tendo pelo menos 60% de homologia com a SEQ ID NO: 1.

[0022] A presente invenção se refere ainda à proteína lectina tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1, ou uma proteína lectina tendo pelo menos de 60% de homologia com a SEQ ID NO: 1 para uso no tratamento de doenças inflamatórias em um indivíduo.

[0023] Em outro aspecto, a presente invenção diz respeito a um método de prevenir ou o aparecimento ou a progressão de doenças inflamatórias em um indivíduo, usando a proteína lectina que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 ou a proteína lectina tendo pelo menos 60% de homologia com a SEQ ID NO: 1.

[0024] A presente invenção se refere também a um método de cura ou redução do efeito de doenças inflamatórias em um indivíduo, usando a proteína lectina tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 ou uma proteína lectina tendo pelo menos 60% de homologia com a SEQ ID NO: 1.

[0025] A presente invenção se refere ainda à proteína lectina tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1, ou uma proteína lectina tendo pelo menos 60% de homologia com a SEQ ID NO: 1, para uso na cura, prevenção da progressão de, ou redução do efeito de doenças inflamatórias em um indivíduo.

[0026] Em ainda outro aspecto, a presente invenção diz respeito ao método de tratamento de artrite em um indivíduo usando a proteína lectina tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1, ou uma proteína lectina tendo pelo menos 60% de homologia com a SEQ ID NO: 1.

[0027] A presente invenção se refere ainda à proteína lectina tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1, ou uma proteína lectina tendo pelo menos 60% de homologia com a SEQ ID NO: 1 para uso no tratamento de artrite em um indivíduo.

[0028] Em um aspecto adicional, a presente invenção diz respeito a um método de prevenir ou o aparecimento ou a progressão de artrite em um indivíduo usando a proteína lectina tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1, ou uma proteína lectina tendo pelo menos 60% de homologia com a SEQ ID NO: 1.

[0029] A presente invenção se refere também a um método de cura ou redução do efeito da artrite em um indivíduo usando a proteína lectina tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 ou uma proteína lectina tendo pelo menos 60% de homologia com a SEQ ID NO: 1.

[0030] A presente invenção se refere ainda à proteína lectina tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1, ou uma proteína lectina tendo pelo menos 60% de homologia com a SEQ ID NO: 1, para uso na cura ou prevenção da progressão de, ou redução do efeito da artrite em um indivíduo.

[0031] A presente invenção também se refere a um método de tratamento de doenças inflamatórias. O método compreende a administração da proteína lectina tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 ou uma proteína lectina tendo pelo menos 60% de homologia com a SEQ ID NO: 1. A proteína lectina pode ser administrada em uma quantidade na faixa de cerca de 1 mg a 50 mg/kg de peso corporal do indivíduo. A proteína lectina pode ser administrada da forma como se apresenta ou em uma forma farmacologicamente aceitável.

[0032] A proteína lectina tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1, ou uma proteína lectina tendo pelo menos 60% de homologia com a SEQ ID NO: 1 pode ser administrada ao indivíduo por injeção da solução ou suspensão por via

intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutânea, intradérmica, por injeção de depósito, intratecal, transdérmica, sublingual ou por métodos orais, tópicos ou de inalação.

[0033] O termo “lectina”, conforme aqui utilizado, se refere a uma proteína de ligação a carboidratos.

[0034] O termo “proteína”, tal como aqui utilizado, se refere a um polímero de resíduos de aminoácidos.

[0035] O termo “aminoácido”, como aqui utilizado, se refere a aminoácidos sintéticos e de ocorrência natural, bem como análogos de aminoácidos e miméticos de aminoácidos que têm uma função semelhante aos aminoácidos de ocorrência natural. Os aminoácidos de ocorrência natural são aqueles codificados pelo código genético e incluem os aminoácidos proteinogênicos (ou seja, os aminoácidos que são incorporados biossinteticamente a proteínas durante a tradução nas células). Os aminoácidos de ocorrência natural também incluem aqueles modificados após a tradução nas células. Os aminoácidos sintéticos incluem aminoácidos não canônicos, como a selenocisteína e a pirrolisina. Normalmente, os aminoácidos sintéticos não são aminoácidos proteinogênicos.

[0036] Deve ser entendido que os aminoácidos podem ser agrupados de acordo com diferentes propriedades bioquímicas. Exemplos incluem: os aminoácidos polares, os aminoácidos não polares, os aminoácidos ácidos e os aminoácidos básicos. Em uma forma de realização, o aminoácido utilizado para a modificação de aminoácidos é pelo menos um selecionado do grupo constituído por, mas não limitado a: polar, não polar, ácido, básico, selenocisteína, pirrolisina e não canônico.

[0037] Os termos “homologia” e “homólogo”, conforme usados neste documento, se referem a duas ou mais entidades referenciadas que compartilham pelo menos uma identidade parcial em relação a uma determinada região ou parte. Áreas, regiões ou domínios de homologia ou identidade se referem a uma parte de duas ou mais entidades referenciadas que compartilham homologia ou identidade, ou são as mesmas. Assim, quando duas sequências são idênticas em relação a uma ou mais regiões de sequência, elas compartilham identidade nessas regiões. Homologia

substancial se refere a uma molécula que é estruturalmente ou funcionalmente conservada, de tal forma que tem ou é prevista para ter pelo menos uma estrutura ou função parcial de uma ou mais estruturas ou funções (por exemplo, uma função ou atividade biológica) da molécula de referência, ou uma região ou parte relevante/correspondente da molécula de referência com a qual compartilha homologia.

[0038] Em uma forma de realização, o percentual de “homologia” entre duas sequências é determinado usando-se o algoritmo BLSTP com parâmetros convencionais (Altschul *et al. Nucleic Acids Res.* 01 de setembro de 1997; 25(17):3389-402). Em particular, o algoritmo BLAST pode ser acessado na internet usando o endereço virtual URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Em uma forma de realização alternativa, para alinhamentos de sequência em geral, o percentual de homologia entre duas sequências é determinado usando-se o algoritmo EMBOSS Needle, utilizando os parâmetros convencionais. Em particular, o algoritmo EMBOSS Needle pode ser acessado na internet usando o endereço virtual URL: https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/.

[0039] Salvo indicação em contrário, o termo “homologia” é usado alternadamente com o termo “identidade de sequência” no presente relatório descritivo.

[0040] A inflamação geralmente apresenta sintomas de manchas vermelhas, inchadas e quentes no corpo. No entanto, a inflamação pode ocorrer sem qualquer sintoma evidente. A inflamação pode ser detectada medindo-se a proteína C reativa de alta sensibilidade e a contagem de leucócitos do sangue. Essas podem ser medidas com um teste sanguíneo.

[0041] A proteína C reativa (PCR), uma proteína no sangue, é um dos melhores indicadores de inflamação, visto que os níveis de PCR aumentam na medida em que a inflamação aumenta. Em algumas formas de realização, o termo “inflamação” significa que um indivíduo tem sangue com uma concentração de proteína C reativa de pelo menos 1,0 mg/L, pelo menos 3,0 mg/L ou pelo menos 10,0 mg/L.

[0042] Uma alta concentração de leucócitos no sangue pode indicar infecção, estresse, inflamação, trauma, alergia ou determinadas doenças.

[0043] A faixa normal de contagem de leucócitos para adultos é geralmente de 4.000 a 10.500 células por mL de sangue. Acima de 10,500 é considerado alto. Em algumas formas de realização, o termo “inflamação” significa que um indivíduo tem uma contagem de leucócitos no sangue de pelo menos 10.500 células por mL.

[0044] A insulina é um hormônio produzido e armazenado pelo pâncreas, que ajuda a regular os níveis de glicose no sangue. A resistência à insulina é a capacidade mais baixa de responder aos efeitos da insulina. Como resultado, o corpo produz quantidades adicionais de insulina, o que aumenta os processos inflamatórios no corpo. A faixa clínica é de 2,6 a 24,9 $\mu\text{IU/mL}$; a faixa ideal é de 1,0 a 5,0 $\mu\text{IU/mL}$.

[0045] Em algumas formas de realização, o termo “inflamação” significa que um indivíduo tem um nível de insulina de pelo menos 5,0 $\mu\text{IU/mL}$ ou pelo menos 24,9 $\mu\text{IU/mL}$.

[0046] A hemoglobina A1C (HbA1c) fornece a quantidade média de glicose no sangue, ou açúcar no sangue, nos 3 meses anteriores (a vida das hemácias é de 3 meses). A hemoglobina A1c (ou hemoglobina glicada) se forma no sangue quando a glicose se liga à hemoglobina, a proteína nas hemácias que transporta o oxigênio. Quanto maior o nível de glicose no sangue, mais hemoglobina glicada se forma. O açúcar sanguíneo cronicamente elevado reage com enzimas e outras moléculas de proteína para criar Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs). Os AGEs são altamente inflamatórios e danificam o tecido por todo o corpo. Isso resulta em complicações neurológicas e cardiovasculares que são comuns com o diabetes. A faixa clínica é de 4,8% a 5,6%; a faixa ideal é de 4,5% a 5,2%. Os níveis de HbA1c são normalmente medidos como um percentual de hemoglobina glicada em comparação com a hemoglobina não glicada ou como uma unidade adimensional.

[0047] Em algumas formas de realização, o termo “inflamação” significa que um indivíduo tem um nível de HbA1c de pelo menos 5,2% ou pelo menos 5,6%.

[0048] A ferritina é uma proteína das células sanguíneas que armazena ferro. Baixos níveis de ferritina indicam deficiência de ferro, o que causa anemia, uma

redução do número de hemácias. Assim como a CRP, a ferritina é um reagente de fase aguda. Isso torna um teste de ferritina útil na detecção de um processo de doença crônica. Níveis elevados de ferritina podem indicar inflamação. A faixa clínica: de 30 a 400 ng/mL; o intervalo ideal para mulheres é (de 10 a 300 ng/mL) e para homens (de 23 a 336 ng/mL).

[0049] Em algumas formas de realização, o termo “inflamação” significa que um indivíduo tem um nível de ferritina de pelo menos 200 ng/mL, pelo menos 300 ng/mL ou pelo menos 336 ng/mL.

[0050] A Amplitude de Distribuição das Hemácias (RDW) é um teste excelente para detectar a inflamação no corpo. A RDW é um “preditor consistente” do risco de mortalidade por todas as causas e infecção da corrente sanguínea. A RDW reflete a inflamação geral e o estresse oxidativo. A RDW é uma expressão da variação no tamanho das hemácias que compõem a população total de hemácias em um indivíduo. O tamanho de um vaso sanguíneo tem muito a ver com a maturação das células sanguíneas e isso depende de agentes metilantes, como o folato e a B12. A faixa clínica é de 12,3 a 15,4%; a faixa ideal é de 11,6 a 15%.

[0051] Em algumas formas de realização, o termo “inflamação” significa que um indivíduo tem uma amplitude de distribuição das hemácias de pelo menos 15% ou pelo menos 15,1%.

[0052] O fator reumatoide é um anticorpo que atua contra o componente sanguíneo gama-globulina. A faixa clínica é de 20 IU/mL ou maior; a faixa ideal é de 0 a 20 IU/mL.

[0053] Em algumas formas de realização, o termo “inflamação” significa que um indivíduo tem um nível do fator reumatoide de pelo menos 20 IU/mL.

[0054] Tanto as células T quanto os macrófagos secretam a IL-6 como parte da resposta inflamatória, de modo que a IL-6 elevada em um indivíduo pode indicar inflamação sistêmica.

BREVE DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS ANEXAS

[0055] SEQ ID NO: 1: representa a sequência nativa de aminoácidos da lectina de *S. rolfsii*.

[0056] SEQ ID NO: 2: representa uma variante da sequência de aminoácidos da lectina de *S. rolfsii* (relatada como Rec-2 no Documento WO 2010/095143).

[0057] SEQ ID NO: 3: representa uma variante da sequência de aminoácidos da lectina de *S. rolfsii* (relatada como Rec-3 no Documento WO 2010/095143).

[0058] SEQ ID NO: 4: representa uma variante da sequência de aminoácidos da lectina de *S. rolfsii* (relatada no Documento WO 2014/203261).

[0059] SEQ ID NO: 1 tem a seguinte sequência:

TYKITVRVYQTNPNAFFHPVEKTVWKYANGGTWTITDDQHVLTMGGSGTSGTLRFHADNGESFT
ATFGVHNYKRWCDIVTNLAADETGMVINQQYYSQKNREEARERQLSNYE VKNAKGRNFEIVYTE
AEGNDLHANLIIG

[0060] SEQ ID NO: 2 tem a seguinte sequência:

TYKITVRVYQTNPDAFFHPVEKTVWKYANGGTWTITDDQHVLTMGGSGTSGTLRFHADNGESFT
ATFGVHNYKRWCDIVTNLAADETGMVINQQYYSQKNREEARERQLSNYQVKNKGRNFQIVYTE
AEGNDLHANLIIG

[0061] SEQ ID NO: 3 tem a seguinte sequência:

VYKITVRVYQTNPDAFFHPVEKTVWKYANGGTW⁵ITDDQHVLTMGGSGTSGTLRFHADNGESFT
ATFGVHNYKRWCDIVTNLAADETGMVINQQYYSQKNREEARERQLSNYQVKNKGRNFQIVYTE
AEGNDLHANLIIG

[0062] SEQ ID NO: 4 tem a seguinte sequência:

VYKITVRVYQTNPDAFFHPVEKTVWKYADGGTW⁵ITDDQHVLTMGGSGTSGTLRFHADNGESFT
ATFGVH¹DKRWCDIVT¹DLAADETGMVINQ¹EYYSEK¹DREEARERQ¹NSNYEVK¹DAKGRNFEIVYTEA
EGNDLHAD¹LIIG

[0063] As diferenças na sequência das SEQ ID NOs: 2-4 em comparação com a sequência da SEQ ID NO: 1 foram sublinhadas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0064] A presente invenção fornece uma lectina para uso no tratamento ou prevenção de inflamações em um indivíduo em necessidade.

[0065] A lectina pode ser de ocorrência natural. Em uma forma de realização da presente invenção, a lectina é derivada do grupo constituído por, mas não limitado a, fungos e plantas. Em algumas formas de realização, a lectina é derivada de um

fungo fitopatogênico de solo, como *S. rolfsii*. Por “derivada de”, entende-se que a lectina pode ser isolada de seu ambiente nativo, ou que a lectina compreende uma sequência de aminoácidos idêntica ou semelhante a uma sequência nativa. A lectina pode compreender uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60% 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de homologia com a sequência nativa. A lectina pode ser isolada de *S. rolfsii*.

[0066] A lectina pode compreender uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60% de homologia com a SEQ ID NO: 1. Em algumas formas de realização, a lectina pode compreender uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60% de homologia com a SEQ ID NO: 2, 3 ou 4. Em algumas formas de realizações, a sequência de aminoácidos tem pelo menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de homologia com a SEQ ID NO: 1. Em algumas formas de realizações, a sequência de aminoácidos tem pelo menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de homologia com a SEQ ID NO: 2, 3 ou 4.

[0067] A SEQ ID NO: 2 tem 98% de homologia com a SEQ ID NO: 1. A SEQ ID NO: 3 tem 96% de homologia com a SEQ ID NO: 1. A SEQ ID NO: 4 tem 91% de homologia com a SEQ ID NO: 1.

[0068] Em algumas formas de realização, a lectina compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo composto pela SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4.

[0069] A lectina pode ser recombinante, ou ela pode ser sintetizada *de novo*. No presente relatório descritivo, o termo “recombinante” significa que o gene da lectina é transferido para uma célula hospedeira (como bactérias ou leveduras), e o gene é, então, expresso para produzir a lectina. Os métodos de preparação de proteínas recombinantes serão bem conhecidos para os qualificados na arte. Por exemplo, pode ser fornecida uma molécula de DNA recombinante, como um vetor plasmídeo ou viral, compreendendo uma sequência de ácidos nucleicos que codifica a lectina. A sequência de ácidos nucleicos pode estar ligada de modo operativo a um promotor capaz de controlar a expressão da lectina em uma célula hospedeira adequada. A molécula de DNA recombinante pode ser inserida em uma célula

hospedeira adequada usando métodos conhecidos na arte, por exemplo, por transformação. Células hospedeiras adequadas incluem as células procarióticas (por exemplo, *E. coli*) e tanto as células eucarióticas inferiores (por exemplo, células de levedura) quanto as células eucarióticas superiores. A célula hospedeira pode, então, ser cultivada em condições apropriadas, sendo expressa a lectina recombinante. A lectina recombinante pode, assim, ser obtida por isolamento como um produto de expressão da célula hospedeira. As proteínas recombinantes podem ser purificadas por técnicas convencionais conhecidas na arte, normalmente métodos cromatográficos convencionais.

[0070] A lectina pode ter pelo menos uma atividade anti-inflamatória.

[0071] Em algumas formas de realização, a lectina é capaz de inibir ou reduzir a secreção de uma citocina inflamatória.

[0072] Como é conhecido na arte, as citocinas são pequenas proteínas envolvidas na sinalização de células. As citocinas incluem quimiocinas, interferons, interleucinas, linfocinas e fatores de necrose tumoral (TNF). Conforme aqui utilizado, “interleucina” (IL) inclui IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-26, IL-23, IL-20 e IL-15.

[0073] A lectina pode ser capaz de inibir ou reduzir a secreção de uma ou mais citocinas inflamatórias selecionadas dentre IL-8, IL-6, TNF- α , IL-1- β , IFN- γ e GM-CSF.

[0074] A capacidade de uma lectina de inibir ou reduzir a secreção de citocinas inflamatórias pode ser determinada utilizando técnicas convencionais, incluindo os métodos descritos neste documento. Por exemplo, o nível de uma citocina inflamatória secretada após um estímulo inflamatório (por exemplo, IFN- γ ou LPS) na presença da lectina pode ser determinado e comparado ao nível da citocina secretada após o estímulo inflamatório na ausência da lectina. Os níveis de citocinas em amostras como sobrenadantes da cultura de células (para estudos *in vitro*) ou amostras de soro (para estudos *in vivo*) podem ser determinados utilizando técnicas convencionais como o ELISA. Em algumas formas de realização, a lectina é capaz de reduzir a secreção de uma citocina inflamatória em 5 a 50%, 10 a 40%, 15 a 35% ou 20 a 30%.

[0075] Em algumas formas de realização, a lectina é capaz de reduzir o nível de proteína C reativa (CRP) no sangue. O nível de CRP no sangue pode ser determinado usando técnicas convencionais, como as descritas aqui. Por exemplo, a lectina pode ser capaz de reduzir o nível de CRP no sangue em pelo menos 2%, pelo menos 5% ou pelo menos 10% por 10 mg/kg de lectina administrada a um indivíduo, em comparação a um indivíduo de controle ao qual a lectina não foi administrada.

[0076] Em algumas formas de realização, a lectina é capaz de estimular (ou seja, aumentar) a atividade da Fosfatase Alcalina (ALP) e/ou os níveis de colágeno. Os níveis da ALP, por exemplo, nos lisados de células, podem ser determinados por ensaios conhecidos, como o ensaio do Fosfato de p-Nitrofenila (PNPP). Os níveis de colágeno, por exemplo, nos lisados de células, também podem ser determinados utilizando ensaios conhecidos, como o ensaio à base do corante Sircoll. A lectina pode ser capaz de aumentar o nível de atividade da ALP em 5 a 50% ou 10 a 40%, em relação a um controle adequado que não foi tratado com a lectina. A lectina pode ser capaz de aumentar o nível de colágeno em 2 a 50% ou 3 a 40%, em relação a um controle adequado que não foi tratado com a lectina.

[0077] Conforme aqui utilizado, o termo “inflamação” está relacionado a qualquer tipo de resposta imunológica inflamatória em um indivíduo. A inflamação pode estar associada a uma doença inflamatória crônica, ou pode ser inflamação aguda.

[0078] A inflamação crônica é uma inflamação de longo prazo e pode durar vários meses e até anos, enquanto a inflamação aguda é aquela que começa rapidamente e se torna grave em um curto espaço de tempo. As inflamações crônicas incluem psoríase / artrite psoriática, artrite reumatoide (RA), hepatite ativa, asma e doença inflamatória intestinal, que precisam ser bem administradas e tratadas a tempo. Os danos causados por inflamações crônicas são irreversíveis e altamente dolorosos.

[0079] Os termos “inflamações crônicas” e “doenças inflamatórias crônicas” são usados de forma alternada ao longo deste documento.

[0080] Em algumas formas de realização o indivíduo tem uma doença inflamatória crônica. Vantajosamente, a proteína lectina pode ser usada no tratamento ou prevenção de uma doença inflamatória crônica no indivíduo.

[0081] A doença inflamatória crônica pode ser psoríase, artrite psoriática, artrite reumatoide (RA), hepatite ativa, asma, doença inflamatória intestinal (como doença de Crohn, colite ou síndrome do intestino irritável (IBS)), arterite temporal, dermatite atópica, lúpus sistêmico, esclerose múltipla ou sarcoidose.

[0082] Em algumas formas de realização, a doença inflamatória crônica é a artrite reumatoide (RA).

[0083] A artrite reumatoide pode ser medida ou diagnosticada utilizando os fatores a seguir.

[0084] Anticorpo antinuclear (ANA) - comumente encontrado no sangue das pessoas com lúpus, os ANAs (anticorpos anormais contra os núcleos das células) também podem sugerir a presença de polimiosite, esclerodermia, síndrome de Sjogren, doença mista do tecido conjuntivo ou artrite reumatoide. Testes para detectar subconjuntos específicos desses anticorpos podem ser usados para confirmar o diagnóstico de uma doença em particular ou uma forma de artrite.

[0085] Em algumas formas de realização, um indivíduo é considerado como tendo artrite reumatoide se o indivíduo tem níveis detectáveis de anticorpo antinuclear.

[0086] Fator reumatoide (RF) - concebido para detectar e medir o nível de um anticorpo que age contra o componente sanguíneo gama-globulina, este teste é muitas vezes positivo nas pessoas com artrite reumatoide. Níveis de 20 UI/mL ou mais são considerados indicativos de doença.

[0087] Em algumas formas de realização, um indivíduo é considerado como tendo artrite reumatoide se o indivíduo tem um nível do fator reumatoide de pelo menos 20 IU/mL.

[0088] Peptídeo citrulinado anticíclico (anti-CCP) - também chamado anticorpos antiproteína cutrulinada (ACPA), este teste (como o teste para o fator reumatoide) procura a presença de um autoanticorpo específico que está presente em

aproximadamente 60 a 80% das pessoas com RA. Embora a maioria dos pacientes com anticorpos anti-CCP também seja positivo para o fator reumatoide, o anticorpo RF pode ocorrer em pacientes com muitas outras condições, incluindo uma infecção. O anti-CCP é mais específico para o RA e está se tornando o teste preferido.

[0089] Em algumas formas de realização, um indivíduo é considerado como tendo artrite reumatoide, se o indivíduo tiver níveis detectáveis de anticorpos antiproteína citrulinada superiores a 20 unidades por mililitro (u/ml).

[0090] Ácido úrico - medindo-se o nível de ácido úrico no sangue, este teste ajuda no diagnóstico da gota, uma condição que ocorre quando o excesso de ácido úrico cristaliza e forma depósitos nas articulações e outros tecidos, causando inflamação e dor intensa. Os níveis normais de ácido úrico são de 2,4 a 6,0 mg/dL no sexo feminino e de 3,4 a 7,0 mg/dl no sexo masculino.

[0091] Em algumas formas de realização, um indivíduo é considerado como tendo artrite reumatoide se o indivíduo tiver níveis de ácido úrico de pelo menos 6,0 mg/dL, ou pelo menos 7,0 mg/dL.

[0092] Tipagem de tecido HLA - este teste, que detecta a presença de determinados marcadores genéticos no sangue, pode muitas vezes confirmar um diagnóstico de espondilite anquilosante (uma doença que envolve inflamação da coluna vertebral e da articulação sacroilíaca) ou artrite reativa (uma doença que envolve inflamação da uretra, olhos e articulações). O marcador genético HLA-B27 está quase sempre presente nas pessoas com qualquer uma dessas doenças.

[0093] Em algumas formas de realização, um indivíduo é considerado como tendo artrite reumatoide se o indivíduo tiver o marcador genético HLA-B27.

[0094] Taxa de sedimentação de eritrócitos - também denominada ESR ou “taxa de sedimentação”, este teste mede a rapidez com que as hemácias se aderem, caem e se depositam (como sedimentos) no fundo de um tubo de vidro ao longo de uma hora. Quanto maior a taxa de sedimentação, maior a quantidade de inflamação. Essa taxa de sedimentação é medida pela distância percorrida para que os eritrócitos caiam no tubo em uma hora. O intervalo normal é de 0 a 29 mm/h para

mulheres e de 0 a 20 mm/h para homens. Existem muitas condições que podem causar uma ESR elevada, incluindo uma infecção ou anemia.

[0095] Em algumas formas de realização, um indivíduo é considerado como tendo artrite reumatoide se o indivíduo tiver uma taxa de sedimentação de pelo menos 20 mm/h, ou pelo menos 29 mm/h.

[0096] Proteína C reativa - este teste, também chamado de CRP, é outro teste sanguíneo que mede a inflamação em todo o corpo. Ele mede uma substância produzida pelo fígado que aumenta na presença de inflamação.

[0097] Em algumas formas de realização, um indivíduo é considerado como tendo artrite reumatoide se o indivíduo tiver sangue com uma concentração de proteína C reativa de pelo menos 1,0 mg/L, pelo menos 3,0 mg/L ou pelo menos 10,0 mg/L.

[0098] Sorologia da doença de Lyme - este teste detecta uma resposta imune ao agente infeccioso que causa a doença de Lyme e, portanto, pode ser usado para confirmar o diagnóstico da doença.

[0099] Em algumas formas de realização, o indivíduo tem inflamação aguda. Vantajosamente, a proteína lectina pode ser usada no tratamento ou prevenção da inflamação aguda em um indivíduo.

[0100] A inflamação aguda pode ser causada por uma reação alérgica, exposição do indivíduo a um produto químico ou radiação, infecção ou trauma. A infecção pode ser bacteriana, viral, fúngica ou parasitária.

[0101] Será entendido que o termo “tratamento” compreende substancialmente a cura (ou seja, a eliminação) da inflamação ou de uma doença inflamatória crônica subjacente, ou a redução (permanente ou temporária) dos sintomas associados à inflamação. Esses sintomas podem incluir inchaço, dor, comichão, calor, vermelhidão (por exemplo, da pele), perda de função (por exemplo, das articulações ou membros) e dificuldade de respiração.

[0102] Será entendido que o termo “prevenção” pode incluir a prevenção do início da inflamação, a prevenção ou a desaceleração da progressão da inflamação ou de uma doença inflamatória crônica subjacente.

[0103] O tratamento ou prevenção pode incluir a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz da lectina ao indivíduo. Em algumas formas de realização, a lectina é administrada a uma dose de 0,1 a 1000 mg/kg, de 0,5 a 100 mg/kg ou de 1 a 50 mg/kg. Estará dentro das capacidades da pessoa qualificada determinar uma quantidade de lectina a ser administrada de acordo com a natureza da condição que está sendo tratada e o indivíduo.

[0104] A presente invenção, portanto, também fornece uma composição farmacêutica compreendendo uma proteína lectina e um diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável. Diluentes e excipientes exemplificativos incluem água esterilizada, solução salina fisiológica e/ou tampão farmacêuticamente aceitável.

[0105] A presente invenção fornece ainda um método de tratamento ou prevenção de inflamações em um indivíduo, o método compreendendo administrar uma lectina, ou uma composição farmacêutica como aqui descrita ao indivíduo.

[0106] A administração da lectina ou da composição pode ser feita por qualquer via adequada, incluindo, entre outras, injeção (incluindo a intravenosa (bolus ou infusão), intra-arterial, intraperitoneal, subcutânea (bolus ou infusão), intraventricular, intramuscular ou subaracnoide), ingestão oral (por exemplo, de um comprimido, gel, pastilha ou líquido), inalação, tópica, via uma mucosa (como a mucosa oral, nasal ou retal), por administração na forma de um spray, comprimido, adesivo transdérmico, implante subcutâneo ou sob a forma de supositório.

[0107] Em algumas formas de realização, uma lectina (como uma lectina tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1, 2, 3 ou 4) ou uma composição farmacêutica como descrita neste documento é administrada ao indivíduo por via enteral, parenteral ou tópica. A lectina ou a composição farmacêutica pode ser administrada como forma de dosagem sólida (por exemplo, comprimido ou cápsula), um pó liofilizado, um líquido (por exemplo, solução ou suspensão), um semi-sólido ou qualquer outra forma conhecida pelo versado na técnica. A lectina ou a composição farmacêutica pode ser administrada ao indivíduo injetando-se uma solução ou suspensão por via intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutânea ou

intradérmica, por injeção de depósito, ou ela pode ser administrada por via intratecal, transdérmica, sublingual ou por métodos orais, tópicos ou inalatórios.

[0108] O indivíduo pode ser um indivíduo mamífero. Em algumas formas de realização, o indivíduo é um ser humano. Em particular, o indivíduo pode ser um indivíduo humano que sofre ou busca prevenção contra inflamação ou doença inflamatória.

DESCRIÇÃO DOS DESENHOS E TABELAS

[0109] A invenção será, agora, descrita por referência às Figuras e Tabelas a seguir, nas quais:

Figura 1: efeito de uma lectina recombinante sobre a inibição de citocinas inflamatórias em um estudo *in vivo*, utilizando um modelo de camundongo com liberação de citocinas induzida por LPS;

Figura 2: efeito de uma lectina recombinante sobre o inchaço da pata utilizando um modelo de camundongo com Artrite Induzida por Adjuvante (AIA);

Figura 3: efeito de uma lectina recombinante sobre a destruição óssea usando um modelo de camundongo com Artrite Induzida por Adjuvante (AIA);

Figura 4: efeito de uma lectina recombinante sobre a inibição do nível de CRP e IL-6 usando um modelo de camundongo com Artrite Induzida por Adjuvante (AIA);

Tabela 1: efeito de uma lectina recombinante sobre a secreção de citocinas em uma linhagem de células sinoviais humanas (SW982) após 24 horas;

Tabela 2: efeito de uma lectina recombinante sobre a secreção de citocinas em esplenóticos murinos após 48 horas;

Tabela 3: efeito da SEQ ID NO: 2 sobre a secreção de citocinas em uma linhagem de células de macrófagos murinos (RAW264.7) após 24 horas;

Tabela 4. efeito da SEQ ID NO: 2 sobre a atividade do ALP e os níveis de colágeno em uma linhagem de células de osteoblastos (MG-63) após 5 dias.

[0110] As doenças inflamatórias são doenças causadas pelo comprometimento do sistema imunológico. As doenças inflamatórias podem ser doença inflamatória crônica ou doença inflamatória aguda. As doenças inflamatórias incluem artrite, psoríase, arterite temporal, dermatite, doença inflamatória intestinal (IBS), lúpus

sistêmico, hepatite, asma, reações alérgicas, sarcoidose e doenças semelhantes, como entendido pelo técnico no assunto.

[0111] As principais vias de sinalização que desempenham um papel importante na patogênese da inflamação são: MAPK/EGFR/Ras/Raf, receptor canabinoide 2 (CNR2), IL-4/STAT, PI3K/AKT/FOXO3, TNF- α /JNK, NLRP3 e NLRP1, *PTPN22*, *PADI4*, *STAT4*, *TRAF1-C5* e *TNFAIP3*, MyD88, IRAKs e TRAF6.

[0112] A presente invenção se refere ao tratamento de doenças inflamatórias utilizando uma lectina, como a lectina tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1, 2, 3 ou 4. A presente invenção se refere a um método para a prevenção de, o aparecimento de ou a progressão de doenças inflamatórias no indivíduo utilizando uma lectina, como uma lectina tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1, 2, 3 ou 4. Ela se refere ainda a um método para curar ou reduzir o efeito das doenças inflamatórias no indivíduo utilizando uma lectina, como uma lectina tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1, 2, 3 ou 4.

[0113] A presente invenção se refere ao método de tratamento de artrite em um indivíduo utilizando uma lectina tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 ou suas homólogas. A invenção também se refere a uma lectina tendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 ou suas homólogas utilizadas no tratamento da artrite em um indivíduo. A presente invenção se refere a um método para a prevenção do aparecimento ou da progressão de artrite no indivíduo, utilizando uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 ou suas homólogas. Ainda, a presente invenção se refere a um método para curar ou reduzir o efeito da artrite em um indivíduo, utilizando uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 ou suas homólogas.

[0114] O pedido de patente anterior da depositante, o Documento 350/MOM/2009, revela uma lectina recombinante com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1, tendo elevada especificidade de ligação ao antígeno do carboidrato (Gal β 1-3GalNAc- α -O-Ser/Thr). As lectinas são conhecidas geralmente por causar a inflamação. No entanto, para sua surpresa, os presentes inventores verificaram que a lectina com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1, 2, 3 ou 4 é anti-inflamatória.

O estudo detalhado confirmou a eficácia da lectina recombinante com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 em relação à artrite. O aspecto inovador e inventivo da presente invenção é o uso de uma lectina, como a lectina recombinante com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2, na prevenção, cura ou redução da proliferação de inflamações, como a que causa artrite.

[0115] O efeito de uma lectina recombinante tendo a sequência da SEQ ID NO: 2 sobre a modulação das principais vias de sinalização que desempenham um papel importante na patogênese da inflamação foi avaliado em ensaios baseados em células. A lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 mostrou inibição das vias de sinalização que são vias essenciais na patogênese da inflamação relacionada à artrite. Esses resultados, detalhados abaixo, sugerem o possível efeito eficaz das lectinas, como a lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2, na inflamação relacionada à artrite.

[0116] Os estudos *in vitro* de uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 demonstraram forte atividade anti-inflamatória pela inibição das citocinas pró-inflamatórias e inibição das vias de sinalização que desempenham um papel fundamental na patogênese da inflamação. Também estimulou a atividade da ALP e os níveis de colágeno nas células de osteoblastos humanos, reforçando seu potencial anti-inflamatório.

[0117] Os fibroblastos sinoviais produzem níveis excessivos de citocinas inflamatórias que destroem a cartilagem e os ossos na articulação artrítica inflamada. Uma linhagem de células de sinoviócitos humanos é caracterizada pela expressão de citocinas inflamatórias. Foram realizados ensaios *in vitro* baseados em células em linhagens de células de sinoviócitos humanos utilizando uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 para avaliar seu efeito sobre a secreção de citocinas inflamatórias, como interleucinas, interferons, fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos, (GM-CSF), PI3K δ/γ e TNF- α , contra a estimulação de IFN- γ . Avaliou-se também o efeito da utilização de uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 em um ensaio *in vitro* de indução de LPS baseado em células sobre os esplenócitos murinos de células

imunológicas, e um ensaio *in vitro* de estimulação de IFN- γ baseado em células sobre a linhagem de células de macrófagos murinos RAW264.7. Uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 inibiu significativamente a secreção de citocinas inflamatórias. A secreção de IL-8 e IL-6 foi inibida em 10% a 30% e 20% a 50%, respectivamente, nas células sinoviais contra a estimulação do interferon gama (IFN- γ) (Tabela 1). Da mesma forma, uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 inibiu a secreção de TNF- α e IL-1- β em 15 a 35% e 20 a 32%, respectivamente, nos esplenócitos estimulados com LPS (Tabela 2). A inibição da secreção de TNF- α em uma linhagem de células de macrófagos murinos (RAW264.7) estimulada com IFN- γ foi de 5 a 30% (Tabela 3). Os resultados demonstraram que uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 inibe as principais citocinas inflamatórias em uma linhagem de células sinoviais, bem como células imunológicas.

[0118] Uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 foi avaliada quanto a seu efeito sobre a estimulação de marcadores ósseos, como a atividade da Fosfatase Alcalina (ALP) e os níveis de colágeno em uma linhagem de células de osteoblastos humanos. Uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 estimulou a atividade da ALP nos osteoblastos em 10% a 45% em relação ao controle. Uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 também estimulou os níveis de colágeno em 3% a 50% em comparação ao controle (Tabela 4).

[0119] Uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 também foi testada quanto a seu efeito sobre a inibição de citocinas inflamatórias em um *estudo in vivo*, utilizando um modelo de camundongo de liberação de citocinas induzida por LPS. Os ratos foram tratados com lipopolissacarídeo (LPS) apenas (50 μ g/animal) e LPS (50 μ g/animal), juntamente com uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 (5 a 50 mg/kg de peso corporal). A dosagem da lectina recombinante tendo a sequência da SEQ ID NO: 2 foi realizada 1 hora antes da injeção de LPS. Os animais de controle normais receberam TBS (solução salina tamponada com tris), com volume de dose de 5 mL/kg.

Todas as doses foram administradas por via intraperitoneal. Foi observada a secreção excessiva de TNF- α ($675,7 \pm 76,6$ pg/mL) e IL-6 ($3256,0 \pm 203,1$ pg/mL) no soro sanguíneo quando a LPS isolada foi injetada. Uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 inibiu significativamente a secreção de citocinas (Figura 1). Em particular, a lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 inibiu a secreção de TNF- α em até 30% ($471,8 \pm 48,3$ pg/ml) a uma concentração de cerca de 20 mg/kg de peso corporal, respectivamente. Da mesma forma, a secreção de IL-6 foi inibida até 43% ($1866,2 \pm 139,3$ pg/ml) à concentração de cerca de 20 mg/kg de peso corporal.

[0120] O efeito da lectina recombinante tendo a sequência da SEQ ID NO: 2 foi testado ainda em um modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA) em ratos. Os animais foram injetados com uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 intraperitonealmente, a uma concentração de 20 mg/kg de peso corporal por 21 dias (do dia 8 ao dia 28 dia após a injeção de adjuvante). O tratamento com a lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 reduziu significativamente a espessura da pata e do tornozelo em comparação aos animais com artrite induzida por adjuvante tratados com veículo (Figura 2). A pontuação da radiografia da articulação do tornozelo dos animais com artrite induzida por adjuvante e tratados com veículo mostrou acentuada destruição dos ossos quando comparados aos animais de controle normais. A melhora significativa da destruição óssea foi evidente nos animais tratados com a lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 (Figura 3). O grupo com artrite induzida por adjuvante e tratado com veículo apresentou diminuição significativa na amplitude articular quando comparado ao grupo de controle normal. Os animais tratados com cerca de 20 mg/kg de uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2, de forma dependente da dose, tiveram aumento da mobilidade das articulações com a melhora percentual de até 34,2%, respectivamente. O efeito se mostrou dependente da dose, pois as doses mais baixas de lectina recombinante apresentaram menor melhora na mobilidade das articulações. Além disso, o tratamento com a lectina recombinante mostrou níveis reduzidos de ácido úrico sérico em comparação

aos animais com artrite induzida por adjuvante e tratados com veículos, até 22%. A proteína C reativa (CRP) é produzida pelo fígado e pode ser encontrada no sangue. Geralmente, assim como as citocinas, os níveis de CRP no sangue também aumentam em resposta à inflamação. Os animais com artrite induzida por adjuvante e tratados com adjuvante apresentaram níveis séricos aumentados de CRP e de IL-6. Foi observada uma redução significativa nos níveis de CRP nos animais tratados com a lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 (Figura 4). A presente invenção demonstra que a lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 reduz significativamente a progressão e a gravidade da artrite de forma dependente da dose no modelo de rato com artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund (FCA). A presente invenção fornece, assim, um método de tratamento de doenças inflamatórias utilizando uma lectina tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 ou suas homólogas. Ela pode ser utilizada no método de tratamento, prevenção do início ou progressão de, ou para curar, reduzir o efeito de doenças inflamatórias em um indivíduo.

[0121] O método pode compreender a administração de uma lectina tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 ou suas homólogas na faixa de cerca de 1 mg a 50 mg/kg de peso corporal do indivíduo, em que a lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 é administrada como se encontra ou na forma farmacologicamente aceitável.

[0122] Uma faixa preferida de uma lectina recombinante tendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 ou suas homólogas é de cerca de 5 mg a 30 mg/kg de peso corporal do indivíduo. Uma faixa com maior preferência de uma lectina recombinante tendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 ou suas homólogas é de cerca de 5 mg a 20 mg/kg de peso corporal do indivíduo.

[0123] Um efeito antiartrite de uma lectina recombinante tendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 é de pelo menos 10% até 100%.

EXEMPLOS

[0124] Os exemplos a seguir são dados para demonstrar o melhor modo de desempenho da invenção. Os exemplos não limitam a invenção de forma alguma.

EXEMPLO 1:

[0125] Foi conduzido um estudo para avaliar o efeito de uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 sobre a secreção de citocinas inflamatórias (IL-8 e IL-6) em uma linhagem de células de sinoviócitos humanos (SW982). A lectina recombinante mostrou inibição da secreção das citocinas inflamatórias da linhagem de células.

[0126] As células de sinoviócitos humanos (SW982) foram, primeiro, cultivadas durante 24 horas e privadas de soro por 6 horas, seguidas de tratamento das células com a lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2, a concentrações não citotóxicas (de 1 ng/ml a 1000 ng/ml) com o estímulo inflamatório (100 ng/ml IFN- γ) por mais 24 horas. Os níveis de citocinas (IL-6 e IL-8) nos sobrenadantes foram determinados por ELISA. O efeito inibitório da lectina recombinante sobre a secreção de citocinas foi calculado da seguinte forma:

$$\% \text{ de inibição de citocinas: } [(A-B)/A] * 100$$

em que:

A = concentração de citocinas em células de controle (IFN- γ apenas)

B = concentração de citocina em células tratadas (lectina recombinante + IFN- γ)

[0127] Verificou-se que a lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 inibiu a secreção de IL-8 das células sinoviais (SW982) contra a estimulação de IFN- γ (de 11,2% a 27,9%) e inibiu a secreção de IL-6 das células sinoviais (SW982) contra a estimulação de IFN- γ (de 23,7% a 49,4%).

EXEMPLO 2:

[0128] Outro estudo foi conduzido para determinar o efeito de uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 sobre a secreção das citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1- β) das células imunológicas (esplenócitos murinos e a linhagem de células de macrófagos murinos (RAW264.7)).

[0129] Os esplenócitos foram isolados dos camundongos C57BL/6 e tratados com uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2, a concentrações não citotóxicas (de 1 ng/ml a 1000 ng/ml) juntamente com 25 ng/ml de LPS por 48 horas.

[0130] As células RAW264.7 foram cultivadas durante 24 horas e privadas de soro por mais 24 horas, seguidas de tratamento conjunto das células com uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2, a concentrações não citotóxicas (de 1 ng/ml a 500 ng/ml) e o estímulo inflamatório IFN- γ (100 ng/ml IFN- γ) por 24 horas. Os níveis de citocinas (TNF- α e IL-1- β) nos sobrenadantes foram determinados por ELISA.

[0131] O efeito inibitório da lectina recombinante sobre a secreção de citocinas foi calculado da seguinte forma:

$$\% \text{ de inibição de citocinas: } [(A-B)/A] * 100$$

em que:

A = concentração de citocinas em células de controle (LPS ou IFN- γ apenas)

B = concentração de citocina em células tratadas (lectina recombinante + LPS ou IFN- γ)

[0132] Verificou-se que, nos esplenócitos murinos, a lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 demonstrou inibição da secreção de citocinas dos esplenócitos contra a estimulação de LPS (TNF- α de 17,2% a 32,9% e IL-1- β de 23,5% a 30,4%).

[0133] Nos macrófagos murinos (RAW264.7), a lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 inibiu a secreção de TNF- α dos macrófagos (RAW264.7) contra a estimulação de LPS (de 6,1% a 26,5%).

EXEMPLO 3:

[0134] Foi conduzido outro estudo para determinar o efeito de uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 sobre os marcadores ósseos (ALP e colágeno) em uma linhagem de células de osteoblastos humanos (MG-63). Primeiro, as células MG-63 foram cultivadas por 24 horas e privadas de soro por mais 24 horas, seguidas de tratamento das células com uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 em concentrações não citotóxicas (de 1 ng/ml a 1000 ng/ml) por 5 dias. A atividade de ALP em lisados de células foi determinada por um ensaio baseado em PnPP. Os níveis de colágeno nos lisados de células foram determinados por um ensaio com base no corante Sircoll. A lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 aumentou a

atividade da ALP (de 11% a 42,8%) e os níveis de colágeno (de 3,2% a 45,3%) na linhagem de células de osteoblastos humanos (MG-63).

EXEMPLO 4:

[0135] Foi conduzido outro estudo para considerar o efeito de uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 sobre as principais vias de sinalização que desempenham um papel importante na patogênese da Artrite Reumatoide.

[0136] O efeito de uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 sobre a modulação das principais vias de sinalização foi determinado em ensaios baseados em células utilizando as tecnologias Geneblazer e Tango.

[0137] Verificou-se que a lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 inibiu as seguintes vias: MAPK/EGFR/Ras/Raf, receptor canabinoide 2 (CNR2), IL-4/STAT, PI3K/AKT/FOXO3 e TNF- α /JNK, reforçando ainda mais o papel sugerido da lectina tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 ou suas homólogas em seu favor no caso da artrite reumatoide.

EXPERIÊNCIAS IN VIVO**EXEMPLO 5:**

[0138] Outro estudo foi conduzido para verificar o efeito de uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 sobre as citocinas inflamatórias (TNF- α e IL6) em um modelo de liberação de citocina induzida por LPS em camundongos.

[0139] Trinta (30) camundongos fêmeas C56BL6 foram randomizados com base no peso corporal e divididos em cinco grupos (n = 6). Para os grupos que receberam LPS (G2), uma dose única de 50 μ g/animal de LPS foi injetada intraperitonealmente (IP). Para os grupos que recebem uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 a 10 e 20 mg/kg + LPS, (G3 e G4), uma única injeção IP de 10 e 20 mg/kg da lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 foi administrada 1 h antes da injeção com LPS. Para o grupo da Dexametasona (G5), 1 mg/kg + LPS, uma única injeção de 1 mg/kg de dexametasona foi administrada

1 h min antes da injeção do LPS. Os animais de controle normais (G1) receberam TBS intraperitonealmente com volume de dose de 5 mL/kg.

[0140] O sangue foi colhido 90 minutos após o tratamento com LPS e foi centrifugado para coleta do soro. As amostras de soro foram armazenadas a -80 °C. Os níveis de TNF- α e IL-6 no soro foram medidos utilizando-se um kit ELISA.

NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS

[0141] O TNF- α foi de $102,3 \pm 9,2$ pg/ml no soro dos camundongos tratados com TBS, enquanto a concentração de IL-6 no soro dos camundongos tratados com TBS foi de $204,0 \pm 14,3$ pg/ml.

[0142] Observou-se aumento significativo do nível sérico de TNF- α no grupo LPS em 90 minutos, para uma média de $675,7 \pm 76,6$ pg/mL. Isso foi inibido pela lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 a $566,2 \pm 52,3$ e $471,8 \pm 48,3$ pg/mL para 10 mg/kg e 20 mg/kg, respectivamente, dando uma redução percentual de 16,2% e 30,2%, respectivamente.

[0143] Observou-se um aumento significativo do nível sérico de IL-6 no grupo LPS em 90 minutos, para uma média de $3256,0 \pm 203,1$ pg/mL. Isso foi inibido pela lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 a $2601,3 \pm 268,2$ e $1866,2 \pm 139,3$ pg/mL para 10 mg/kg e 20 mg/kg, respectivamente, dando uma redução percentual de 20,1% e 42,7%, respectivamente.

[0144] Em resumo, fica demonstrado que a lectina tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 ou suas homólogas tem uma promissora atividade anti-inflamatória devido à sua capacidade de suprimir as citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-6 em um modelo de inflamação de camundongo induzida por LPS.

EXEMPLO 6:

[0145] Foi conduzido outro estudo para verificar o efeito de uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 sobre um modelo de artrite induzida por adjuvante em ratos.

[0146] A artrite por adjuvante foi induzida pela injeção de 100 μ L (0,5 mg) de *Mycobacterium butyricum* dessecada - Adjuvante Completo de Freund (CFA) (Chondrex) na pata esquerda traseira (Dia 0) de 34 ratos. No Dia 0 do experimento, 24

animais foram selecionados, randomizados e distribuídos em quatro grupos de 6 animais cada.

[0147] Os grupos foram os seguintes:

G1: Controle Normal

G2: controle de artrite induzida por adjuvante (AIA) + TBS

G3: AIA + lectina recombinante a 10 mg/Kg

G4: AIA + lectina recombinante a 20 mg/Kg

G5: AIA + dexametasona a 0,5 mg/kg

[0148] Uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos do composto da SEQ ID NO: 2 foi administrada de 8 a 28 dias para dois grupos (G3 e G4) após a injeção de adjuvante, um total de 21 dias de tratamento. Os grupos de controle foram administrados da seguinte forma: os animais de controle normais (G1, n = 6) foram injetados com 100 µL de óleo de parafina na pata esquerda traseira no Dia 0 e, em seguida, dosados nos Dias 8 a 28 com Solução Salina Tamponada com Tris, 5 mL/kg, IP. Outro grupo de controle recebeu o Adjuvante Completo de Freund (CFA) no Dia 0, seguido da injeção intraperitoneal de Solução Salina Tamponada com Tris nos Dias 8 a 28 (G2). Para os grupos que receberam a lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2, a injeção IP de 10 e 20 mg/kg do fármaco (G3 e G4, respectivamente) foi administrada diariamente por 21 dias (Dias 8 a 28). Para o grupo da Dexametasona (G5), uma injeção de 0,5 mg/kg de dexametasona foi administrada diariamente por 21 dias (Dias 8 a 28) após CFA no Dia 0.

[0149] A espessura da pata foi medida por um micrômetro Digimatic (Mitutoyo). Também foi registrada a amplitude articular do tornozelo em grau. No Dia 28 após a injeção de adjuvante e no Dia 21 após o tratamento, o sangue total foi coletado dos animais e centrifugado para separar o soro. As amostras de soro foram armazenadas a -80 °C. O ácido úrico sérico, a proteína C reativa (CRP) e a IL-6 foram medidos com os kits mencionados abaixo.

Nome do Kit	Fabricante	Catálogo nº
Kit ELISA de Proteína C Reativa (CRP) em Ratos	CUSABIO	CSB-E07922r

Kit ELISA de Interleucina 6 (IL-6) em Ratos	CUSABIO	CSB-E04640r
Kit ELISA de Ácido Úrico (UA) em Ratos	MYBIOSOURCE	MBS9346935

AVALIAÇÃO DA DESTRUIÇÃO ARTICULAR (AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA):

[0150] No dia do término (Dia 28), o membro traseiro foi seccionado abaixo da articulação do quadril. Radiografias foram realizadas do membro traseiro. A gravidade dos danos ósseos nas radiografias foi avaliada pela classificação de periostite e destruição óssea.

[0151] A radiografia do membro traseiro do grupo com artrite induzida por adjuvante e tratado com o veículo (G2) mostrou desorganização grave (periostite e destruição) do osso na tíbia distal, tarso, metatarso e calcâneo. Vinte e um (21) dias de injeção intraperitoneal de 20 mg/kg de uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 amenizaram moderadamente essa periostite e a destruição óssea (G4), ao passo que 10 mg/kg de uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 apresentaram um efeito evidente (G3). Dexametasona a 0,5 mg/kg, IP, mostrou uma melhora significativa (G5).

EFEITO DE UMA LECTINA RECOMBINANTE TENDO A SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA SEQ ID NO: 2 SOBRE A RADIOGRAFIA ÓSSEA DO TORNOZELO EM MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE EM RATOS

[0152] A radiografia da articulação do tornozelo dos animais com artrite induzida por adjuvante e tratados com veículo (G2) mostrou acentuada destruição dos ossos em comparação aos animais normais (G1). Vinte e um (21) dias de uma injeção IP de 10 mg/kg e 20 mg/kg (G3 e G4) de uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 amenizaram essa destruição óssea de forma leve a moderada. Dexametasona a 0,5 mg/kg, IP, mostrou uma melhora significativa (G5).

EFEITO DE UMA LECTINA RECOMBINANTE TENDO A SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA SEQ ID NO: 2 SOBRE A AMPLITUDE ARTICULAR (MOBILIDADE ARTICULAR) EM UM MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE EM RATOS

[0153] O grupo com artrite induzida por adjuvante e tratado com veículo (G2) apresentou uma diminuição significativa na amplitude articular quando comparado ao grupo de controle normal (G1). Vinte e um (21) dias de uma injeção intraperitoneal de 10 mg/kg e 20 mg/kg de uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 (G3 e G4) aumentaram a mobilidade articular de forma dependente da dose com um percentual de melhora de até 7,9% e 34,2%, respectivamente. Dexametasona a 0,5 mg/kg mostrou uma melhora significativa (G5) de 61,8%.

EFEITOS INIBITÓRIOS DE UMA LECTINA RECOMBINANTE TENDO A SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA SEQ ID NO: 2 SOBRE A ESPESSURA DA PATA E TORNOZELO EM UM MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE EM RATOS

[0154] O grupo com artrite induzida por adjuvante e tratado com veículo (G2) mostrou um aumento significativo na espessura da pata e do tornozelo. Vinte e um (21) dias de injeção intraperitoneal de 20 mg/kg de uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 reduziram significativamente o inchaço da pata e do tornozelo (G4), ao passo que 10 mg/kg apresentaram efeito insatisfatório (G3). Dexametasona a 0,5 mg/kg, IP, mostrou uma melhora significativa (G5).

EFEITO DE UMA LECTINA RECOMBINANTE TENDO A SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA SEQ ID NO: 2 SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE ÁCIDO ÚRICO EM UM MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE EM RATOS

[0155] A dexametasona reduziu significativamente o nível sérico de ácido úrico (G5) em ratos com artrite induzida por adjuvante. Vinte e um (21) dias de uma injeção intraperitoneal de uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO. 2 a 10 mg/kg e 20 mg/kg (G3 e G4) diminuíram de forma dependente da dose o nível de ácido úrico com um percentual de redução de 11,0% e 22,0%, respectivamente.

[0156] EFEITO DE UMA LECTINA RECOMBINANTE TENDO A SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA SEQ ID NO: 2 SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE IL-6 E CRP EM UM MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE EM RATOS

[0157] A proteína C Reativa (CRP) estava a $290,6 \pm 15,5$ pg/mL no soro dos ratos tratados com Solução Salina Tamponada com Tris (TBS) (G1), enquanto a

concentração no soro dos ratos tratados com TBS foi de $265,8 \pm 14,3$ pg/mL. Observou-se um aumento significativo do nível sérico de IL-6 no grupo com Artrite (G2) para uma média de $6989,2 \pm 475,2$ pg/mL. Isso foi inibido por uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 a $6219,8 \pm 359,8$ e $5393,6 \pm 420,4$ pg/mL para dosagens de 10 mg/kg e 20 mg/kg, respectivamente (G3 e G4), dando uma redução percentual de 11,0% e 22,8%, respectivamente.

[0158] Observou-se um aumento significativo do nível sérico de CRP no grupo com Artrite (G2) para uma média de $748,2 \pm 21,8$ pg/mL. Isso foi inibido por uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 a $726,4 \pm 36,6$ e $523,3 \pm 110,5$ pg/mL para de 10 mg/kg e 20 mg/kg (G3 e G4), respectivamente, dando uma redução percentual de 2,9% e 30,1%, respectivamente.

EFEITO DE UMA LECTINA RECOMBINANTE TENDO A SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA SEQ ID NO: 2 E DEXAMETASONA SOBRE O PESO DO TIMO E DO BAÇO EM UM MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE EM RATOS

[0159] O grupo com artrite induzida por adjuvante e tratado com veículo (G2) apresentou uma diminuição significativa no peso do timo quando comparado ao grupo de controle normal (G1). Vinte e um (21) dias de injeção intraperitoneal de 10 mg/kg e 20 mg/kg de uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 (G3 e G4) mostraram ganho de 14,48% e perda de 3,98%, respectivamente, em comparação ao Grupo D2. Dexametasona a 0,5 mg/kg, IP, apresentou uma redução considerável (ou seja, 19,33%) no peso do timo em comparação ao grupo G2.

[0160] O grupo com artrite induzida por adjuvante e tratado com veículo (G2) apresentou um aumento mínimo no peso do baço quando comparado ao grupo de controle normal (G1). Vinte e um (21) dias de injeção intraperitoneal de 10 mg/kg e 20 mg/kg de uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 (G3 e G4) mostraram um aumento de 40,55% e 12,17%, respectivamente, em comparação ao Grupo D2. A dexametasona a 0,5 mg/kg, IP, apresentou uma redução significativa (ou seja, 51,57%) no peso do baço em comparação ao grupo G2.

EFEITO DE UMA LECTINA RECOMBINANTE TENDO A SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA SEQ ID NO: 2 E DEXAMETASONA SOBRE A HEMATOLOGIA EM UM MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE EM RATOS

[0161] O grupo com artrite induzida por adjuvante e tratado com veículo (G2) apresentou uma alteração moderada a significativa em todos os parâmetros hematológicos testados quando comparado ao grupo de controle normal (G1). Vinte e um (21) dias de injeção intraperitoneal de 10 mg/kg e 20 mg/kg de uma lectina recombinante tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 (G3 e G4) não modificaram a alteração causada pela artrite. Entretanto, dexametasona a 0,5 mg/kg, IP, apresentou alterações moderadas a significativas (ou seja, WBC - redução de 60,3%; RBC - aumento de 23,4%; Hb - aumento de 25,2% e HCT - aumento de 22,4%) na hematologia em comparação ao grupo G2.

EFEITO DE UMA LECTINA RECOMBINANTE TENDO A SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA SEQ ID NO: 2 E DEXAMETASONA SOBRE O PESO CORPORAL EM UM MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE EM RATOS

[0162] Os grupos tratados com lectina recombinante (G3 e G4) e o grupo com artrite induzida adjuvante e tratado com veículo (G2) mostraram uma tendência semelhante ao grupo de controle normal (G1) em ganhar peso corporal. Entretanto, o grupo da dexametasona a 0,5 mg/kg, IP (G5) não apresentou ganho de peso corporal ao longo do período de tratamento.

TABELA 1.

Amostra	Inibição de citocinas (%)	
	IL-8	IL-6
IFN- γ a 100 ng/ml	Controle	Controle
IFN- γ a 100 ng/ml + SEQ ID NO: 2 (ng/ml)		
1	22,4	46,3
10	27,9	49,4
250	14,9	31,9
500	11,2	23,7
1000	-40,8	-25,2

TABELA 2.

Amostra	Inibição de citocinas (%)	
	TNF- α	IL-1- β
LPS a 25 ng/ml	Controle	Controle
LPS a 25 ng/ml + SEQ ID NO: 2 (ng/ml)		
1	24,8	30,4
10	18,6	24,4
25	29,2	23,5
100	32,9	27,6
500	26,1	26,7
1000	17,2	24,4

TABELA 3.

Amostra	Inibição de TNF- α (%)	
IFN- γ a 100 ng/ml	Controle	
IFN- γ a 100 ng/ml + SEQ ID NO: 2 (ng/ml)		
1	26,5	
10	6,1	
100	11,7	
500	11	

TABELA 4.

Amostra	% de aumento na atividade de ALP em relação ao controle	% de aumento no nível de colágeno
Lectina recombinante		
1	37,7	3,2
10	42,8	45,3
25	30,9	26,7
100	27,3	26,8
1000	11	13,5
Vitamina D3 (Controle positivo)		

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína lectina para uso no tratamento ou prevenção de inflamações em um indivíduo em necessidade.

2. Proteína lectina para uso, de acordo com a reivindicação 1, em que a proteína lectina compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60% de homologia com a SEQ ID NO: 1.

3. Proteína lectina para uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a proteína lectina compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60% de homologia com a SEQ ID NO: 2, 3 ou 4.

4. Proteína lectina para uso, de acordo com a reivindicação 2, em que a proteína lectina compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo composto por SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4.

5. Proteína lectina para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a proteína lectina é recombinante.

6. Proteína lectina para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 4, em que a sequência de aminoácidos tem pelo menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de homologia com a SEQ ID NO: 1.

7. Proteína lectina para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a proteína lectina é capaz de inibir a secreção de citocinas inflamatórias.

8. Proteína lectina para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a proteína lectina é capaz de reduzir os níveis de proteína C reativa (CRP) no sangue.

9. Proteína lectina para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a proteína lectina é capaz de estimular a atividade de ACP e /ou os níveis de colágeno.

10. Proteína lectina para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o indivíduo tem uma doença inflamatória crônica.

11. Proteína lectina para uso, de acordo com a reivindicação 9, em que a doença inflamatória crônica pode ser psoríase, artrite psoriática, artrite reumatoide

(RA), hepatite, asma, doença inflamatória intestinal (como doença de Crohn, colite e síndrome do intestino irritável (IBS)), arterite temporal, dermatite atópica, lúpus sistêmico, esclerose múltipla ou sarcoidose.

12. Proteína lectina para uso, de acordo com a reivindicação 10, em que a doença inflamatória crônica é artrite reumatoide (RA).

13. Proteína lectina para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, em que o indivíduo tem inflamação aguda.

14. Proteína lectina para uso, de acordo com a reivindicação 12, em que a inflamação aguda é causada por uma reação alérgica, uma infecção ou trauma.

15. Proteína lectina para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido tratamento compreende a cura da inflamação ou da doença inflamatória crônica, ou a redução dos sintomas associados à inflamação.

16. Proteína lectina para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a referida prevenção compreende prevenir o aparecimento da inflamação, ou prevenir ou retardar a progressão da doença inflamatória crônica.

17. Proteína lectina para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido tratamento ou prevenção compreende administrar a proteína lectina a uma dose de 1 a 50 mg/kg.

18. Composição farmacêutica, que compreende uma proteína lectina e um diluente ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

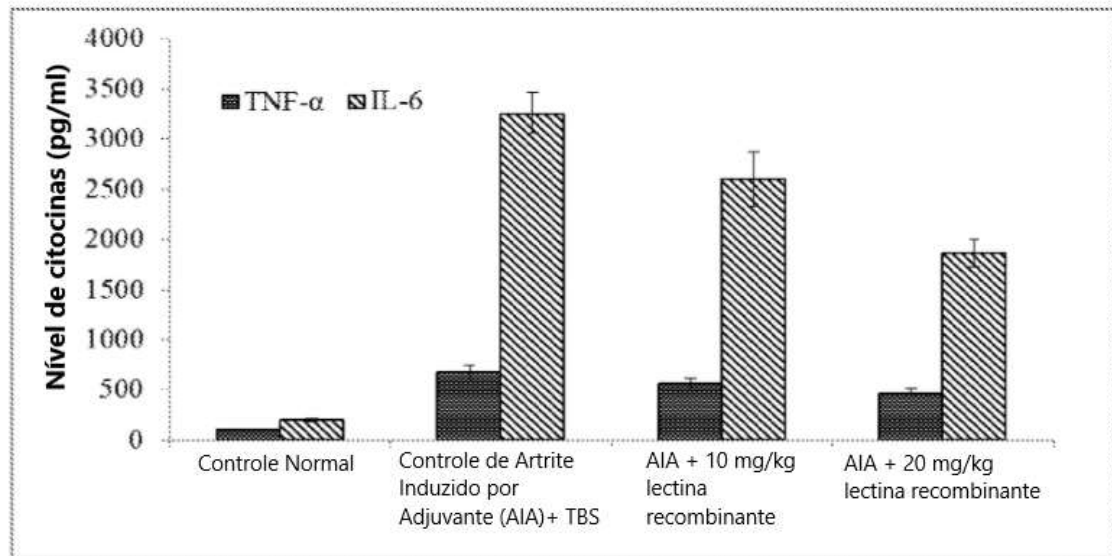
19. Método de tratamento ou prevenção de inflamações em um indivíduo, o método compreendendo administrar uma proteína lectina ou uma composição farmacêutica conforme definida na reivindicação 18 ao indivíduo.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, em que a inflamação é uma condição inflamatória.

21. Método, de acordo com a reivindicação 20, em que a doença inflamatória é artrite.

22. Método, de acordo com uma das reivindicações 19 a 21, em que a proteína lectina é uma lectina recombinante.

23. Método, de acordo com uma das reivindicações 19 a 22, em que o método compreende a administração da proteína lectina a uma dose de 1 a 50 mg/kg.

**Fig. 1****Fig. 2**

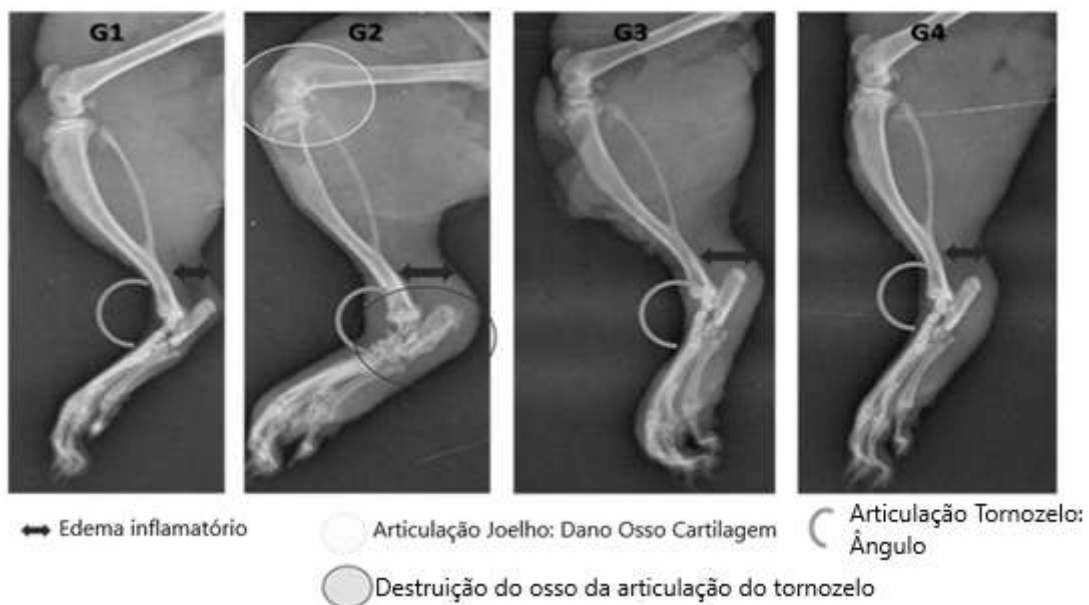


Fig. 3

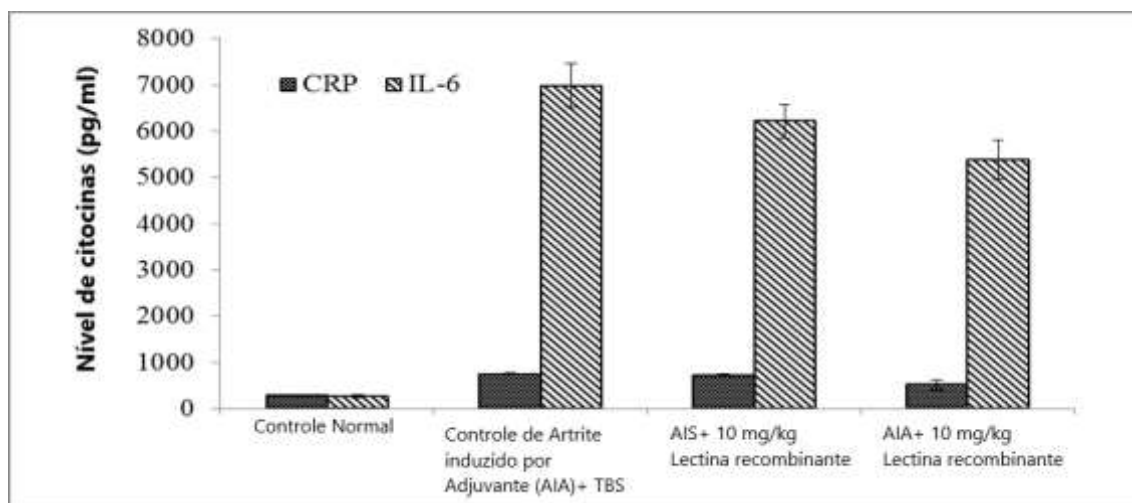


Fig. 4

RESUMO**PROTEÍNA PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS**

A presente invenção se refere a uma lectina para uso no tratamento, redução da progressão e cura de inflamações em um indivíduo em necessidade. Também são descritas composições farmacêuticas compreendendo a referida lectina. A lectina pode compreender uma sequência de aminoácidos tendo a sequência da SEQ ID NO: 1 ou pelo menos 60% de homologia com a SEQ ID NO: 1.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 09 - Listagem de sequência.txt
- Data de Geração do Código: 15/03/2021
- Hora de Geração do Código: 10:01:33
- Código de Controle:
 - Campo 1: 5B462E1CDD42E946
 - Campo 2: 1C378129154E63F8