República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

* B R 1 0 2 0 2 4 0 1 7 2 6 1 A 2 *

(21) BR 102024017261-2 A2

(22) Data do Depósito: 22/08/2024

(43) Data da Publicação Nacional: 03/03/2026

(54) Título: PEPTÍDEOS SINTÉTICOS COM ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA E POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA

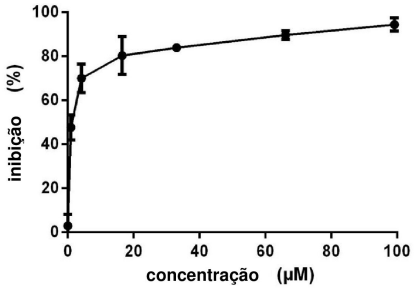
(51) Int. Cl.: C07K 7/08; A61K 38/10; A61P 9/12.

(52) CPC: C07K 7/08; A61K 38/10; A61P 9/12.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL.

(72) Inventor(es): CAMILA INNOCENTE ALVES; WALTER ORLANDO BEYS DA SILVA; LUCÉLIA SANTI; HUGO VERLI; RAUL IZIDORO CARNEIRO.

(57) Resumo: PEPTÍDEOS SINTÉTICOS COM ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA E POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA. A presente patente de invenção diz respeito ao desenvolvimento de novos peptídeos através de docking molecular, ainda não descritos na literatura, visando o desenvolvimento futuro de novas moléculas para o tratamento da hipertensão. Os peptídeos possuem atividade de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), envolvida na regulação da pressão arterial. No Brasil, 388 pessoas morrem por dia por conta da hipertensão. Além disso, também existem os gastos envolvidos no tratamento da hipertensão por parte dos governos. A classe de anti-hipertensivos inibidores da ECA é amplamente utilizada e tem sua farmacocinética e farmacodinâmica bem estabelecidas. Entretanto, diversos efeitos adversos estão relacionados com esses medicamentos. A descoberta de novas moléculas tão efetivas quanto, porém menos tóxicas, se torna urgente.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

PEPTÍDEOS SINTÉTICOS COM ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA E POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA

Campo da Invenção

[001] O presente relatório descritivo diz respeito a uma patente de invenção de novos peptídeos sintéticos com possível aplicação no tratamento da hipertensão, apresentando atividade de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), envolvida na regulação da pressão arterial. Os peptídeos podem ser vantajosos no desenvolvimento de novos fármacos anti-hipertensivos, sendo de interesse farmacêutico. A presente invenção se situa nos campos da Biotecnologia e Farmácia.

Antecedentes da Invenção

[002] Os riscos do desenvolvimento de hipertensão arterial já são bem estabelecidos e sabe-se que essa condição de saúde pode acarretar em diversos outros eventos, incluindo a morte. A falta do tratamento efetivo da hipertensão, muitas vezes tendo como causa o abandono do tratamento por efeitos adversos que influenciam na qualidade de vida dos pacientes, é extremamente preocupante nesse ponto. As principais classes de anti-hipertensivos disponíveis hoje em dia são os Beta-Bloqueadores, os Inibidores dos Canais de Cálcio, os Diuréticos, os Bloqueadores dos Receptores de Angiotensina (BRA) e os Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (iECA). A Linha de Cuidado do Adulto com Hipertensão Arterial Sistêmica do Ministério da Saúde indica o uso de iECA para o controle da hipertensão em pacientes diabéticos com ou sem nefropatia, pacientes com histórico de infarto prévio e pacientes com doença renal crônica.

[003] A enzima conversora de angiotensina (ECA) faz parte do sistema renina-angiotensina-aldosterona, um importante sistema que atua na regulação da

pressão arterial. Quando há uma diminuição na pressão arterial, o rim irá liberar o hormônio renina, que irá fazer a conversão do angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I). Por ação da ECA, a Ang I será convertida em angiotensina II (Ang II), um potente vasoconstritor que irá elevar a pressão arterial. Paralelamente, a ECA também irá degradar a bradicinina, um vasodilatador, em fragmentos inativos. Entretanto, os efeitos adversos relatados dessa classe de medicamentos podem ser tão críticos ao ponto de levar ao abandono do tratamento.

[004] A tosse seca é o principal efeito adverso relatado em pacientes em uso de inibidores da ECA. Com a inibição da enzima, a bradicinina não será degradada em seus fragmentos inativos e, portanto, acabará se acumulando. Por causar broncoconstrição e ser um importante mediador inflamatório (Maurer et al., 2011), resultará na tosse seca. Além disso, efeitos teratogênicos também estão presentes (Laube et al., 2007), o que limita o uso desta classe em pacientes gestantes. Tendo em vista os eventos relatados, é de extrema importância e urgência o descobrimento de novas moléculas para o tratamento da hipertensão, que sejam tão efetivas quanto às que já estão no mercado, porém sejam menos tóxicas.

[004] A ECA possui dois domínios, o domínio N- e o domínio C- terminal, onde os dois estão envolvidos na degradação de bradicinina (Bernstein et al., 2011), porém o último domínio parece estar mais envolvido na formação da Ang II do que o primeiro (Fuchs et al., 2008). Dessa forma, pensando no desenvolvimento de medicamentos que apresentem menos efeitos adversos, como a tosse seca, é importante procurar por moléculas que consigam inibir seletivamente apenas o domínio C-terminal. Assim, o domínio N-terminal seguirá disponível para degradar a bradicinina e, dessa forma, esse peptídeo não irá se acumular, não resultando na tosse seca. Pacientes em uso de Lisinopril, um inibidor da ECA com maior seletividade para o domínio C-terminal, tendem a apresentar uma menor incidência desse efeito adverso, assim como Perindopril (Yeşil et al., 1994).

[005] Peptídeos consistem em uma boa alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos, já que são biocompatíveis e, portanto, tendem a apresentar baixa toxicidade ao organismo. Além disso, também podem apresentar alta seletividade pelo seu alvo, já que são capazes de realizar diversas interações (Craik et al., 2023), quando comparados com outras pequenas moléculas. Quando se trata de peptídeos com atividade de inibição da ECA, alguns pontos são importantes na hora de desenhar a molécula. Fatores como baixo peso molecular (sequências de 2-12 aminoácidos), aminoácidos hidrofóbicos nos últimos 3 resíduos da extremidade C-terminal e resíduos de prolina em uma ou mais posições das últimas 3 na extremidade C-terminal tendem a melhorar a atividade inibitória (Cheung et al., 1980; Norris & FitzGerald, 2013). Tripeptídeos inibidores da ECA com aminoácidos aromáticos na extremidade C-terminal, aminoácidos carregados positivamente na segunda posição da extremidade C-terminal e aminoácidos hidrofóbicos na extremidade N-terminal apresentam melhor atividade de inibição (Wu et al., 2006).

[006] O documento BR102021013693-6A2, “PRODUTO ANTI-HIPERTENSIVO FORMADO POR PEPTÍDEOS BIOATIVOS ENCAPSULADOS OBTIDOS DA BIOMASSA DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES”, descreve a obtenção de peptídeos bioativos a partir da massa de microrganismos fotossintetizantes, com atividade de inibição da enzima conversora de angiotensina.

[007] O documento JPH0616568A, “ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME INHIBITOR”, descreve a obtenção de um tripeptídeo com atividade de inibição da ECA, que apresentou IC50 de 3.7 μM.

[008] O documento WO2013047128A1, “PEPTIDE AND ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME INHIBITOR”, descreve a obtenção de peptídeos bioativos, com IC50 variando de 0.1 até 70 μM..

[009] O documento US931556B2, “PEPTIDES THAT INHIBIT ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME AND PEPTIDES WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY PURIFIED FROM OVOTRANSFERRIN AND METHODS OF PRODUCING AND

USING THE SAME", descreve a obtenção de peptídeos através da digestão *in silico* de ovotransferrin, onde os peptídeos apresentaram IC50 variando de 0.6 até 2.8 μM (modelo QSAR).

[010] As patentes descritas anteriormente apresentam valores de IC50 maiores do que os valores obtidos na presente patente de invenção, o que mostra que, possivelmente, os peptídeos aqui apresentados podem possuir um maior potencial anti-hipertensivo, se mostrando ótimos candidatos para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento e controle da hipertensão no mundo todo.

[011] Diversos peptídeos já foram descritos na literatura como inibidores da ECA. Peptídeos obtidos da hidrólise do soro de leite apresentaram valores de IC50 de 9.09 μM, 11.59 μM e 25.08 μM (Tondo et al., 2020). Um peptídeo obtido da hidrólise do bolo de palmiste apresentou IC50 de 47 μM (Zarei et al., 2019). Um peptídeo com perfil hidrofóbico apresentou IC50 de 49.50 ± 3.88 μM (Panyayai et al., 2018). Seria de grande interesse farmacêutico encontrar peptídeos inibidores da ECA que possuam valores de IC50 mais baixos, na escala de nanomolar. Além disso, também é importante avaliar a segurança dos peptídeos, através de estudos de toxicidade.

REFERÊNCIAS

Bernstein KE, Shen XZ, Gonzalez-Villalobos RA, Billet S, Okwan-Duodu D, Ong FS, et al. Different in vivo functions of the two catalytic domains of angiotensin-converting enzyme (ACE). Curr Opin Pharmacol. 2011 Apr;11(2):105–11.

Cheung HS, Wang FL, Ondetti MA, Sabo EF, Cushman DW. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. J Biol Chem. 1980 Jan;255(2):401–7.

Craik DJ, Fairlie DP, Liras S, Price D. The future of peptide-based drugs. *Chem Biol Drug Des*. 2013;81(1):136-147. doi:10.1111/cbdd.12055

Cushman, D W, and H S Cheung. "Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung." *Biochemical pharmacology* vol. 20,7 (1971): 1637-48. doi:10.1016/0006-2952(71)90292-9

Fuchs S, Xiao HD, Hubert C, Michaud A, Campbell DJ, Adams JW, et al. Angiotensin-converting enzyme C-terminal catalytic domain is the main site of

angiotensin I cleavage in vivo. Hypertens Dallas Tex 1979. 2008 Feb;51(2):267–74.
Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. J Biol Chem. 1991 Aug;266(23):15377–83.
Laube GF, Kemper MJ, Schubiger G, Neuhaus TJ. Angiotensin-converting enzyme inhibitor fetopathy: long-term outcome. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2007 Sep;92(5):F402-403.
Maurer M, Bader M, Bas M, Bossi F, Cicardi M, Cugno M, et al. New topics in bradykinin research. Allergy. 2011;66(11):1397–406.
Ministério da Saúde, Brasil. 2021. Linha de Cuidado do Adulto com Hipertensão Arterial Sistêmica. Disponível em <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/linha_cuidado_adulto_hipertens%C3%A3o_arterial.pdf>. Acesso em 10/12/2023.
Norris R, FitzGerald, RJ. Antihypertensive Peptides from Food Proteins. Bioactive Food Peptides in Health and Disease. 2013 Jan 30
Panyayai T, Sangsawad P, Pacharawongsakda E, Sawatdichaikul O, Tongsima S, Choowongkomon K. The potential peptides against angiotensin-I converting enzyme through a virtual tripeptide-constructing library. Comput Biol Chem. 2018 Dec 1;77:207–13.
Tondo AR, Caputo L, Mangiatordi GF, Monaci L, Lentini G, Logrieco AF, et al. Structure-Based Identification and Design of Angiotensin Converting Enzyme-Inhibitory Peptides from Whey Proteins. J Agric Food Chem. 2020 Jan 15;68(2):541–8.
Wu J, Aluko RE, Nakai S. Structural requirements of Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: quantitative structure-activity relationship study of di- and tripeptides. *J Agric Food Chem*. 2006;54(3):732-738. doi:10.1021/jf051263l
Yeşil S, Yeşil M, Bayata S, Postaci N. ACE inhibitors and cough. *Angiology*. 1994;45(9):805-808. doi:10.1177/000331979404500908
Zarei M, Abidin NBZ, Auwal SM, Chay SY, Haiyee ZA, Sikin AM, et al. Angiotensin Converting Enzyme (ACE)-Peptide Interactions: Inhibition Kinetics, In Silico Molecular Docking and Stability Study of Three Novel Peptides Generated from Palm Kernel Cake Proteins. Biomolecules. 2019 Oct 4;9(10):569.

Sumário da Invenção

[012] Visando a solução dos problemas acima relatados, desenvolveu-se a presente patente de invenção para relatar o desenvolvimento de dois novos peptídeos com capacidade inibitória da ECA. Estes peptídeos podem apresentar vantagens na utilização de baixas doses.

[013] Os peptídeos aqui descritos podem surgir como alternativas no tratamento da hipertensão arterial, através do desenvolvimento de novas

moléculas com atividade e segurança conhecidas. Os peptídeos desenvolvidos são novos e não foram encontrados relatos destes na literatura ou em bancos de peptídeos como o BIOPEP. O peptídeo correspondente à sequência Ser-Pro-Tyr-Gly-Trp-His-Val-Leu-Glu-Val-Leu-Gly-Arg (SPYGWHVLEVLGR) obteve um valor de IC50 de 979.7 nM. O peptídeo correspondente à sequência Leu-Ile-Trp-Ser-Pro-Ile-Phe-Phe-Gly-Phe-Lys (LIWSPIFFGFK) obteve um valor de IC50 de 677.1 nM.

Breve Descrição das Figuras

[014] Os peptídeos aqui relatados podem ser verificados na figura em anexo, onde:

[015] A Figura 1 representa a curva de inibição do peptídeo referente à sequência 1 - Ser-Pro-Tyr-Gly-Trp-His-Val-Leu-Glu-Val-Leu-Gly-Arg (SPYGWHVLEVLGR), conforme o protocolo de inibição de Cushman e Cheung (1971). Se avalia a porcentagem da inibição da atividade da enzima (eixo y) em função das concentrações de peptídeo (eixo x).

[016] A Figura 2 representa a curva de inibição do peptídeo referente à sequência 2 - Leu-Ile-Trp-Ser-Pro-Ile-Phe-Phe-Gly-Phe-Lys (LIWSPIFFGFK), conforme o protocolo de inibição de Cushman e Cheung (1971). Se avalia a porcentagem da inibição da atividade da enzima (eixo y) em função das concentrações de peptídeo (eixo x).

Descrição Detalhada da Invenção

[017] A presente invenção se refere a dois peptídeos sintéticos com potencial atividade anti-hipertensiva, com atividade de inibição da enzima conversora de angiotensina constatada em ensaios *in vitro*.

[018] A atividade de inibição da enzima foi constatada em ensaios *in vitro* seguindo o método de Cushman e Cheung (1971), utilizando o substrato hipuril-histidil-leucina (HHL). A reação consiste na clivagem do substrato tripeptídico por parte da enzima, liberando ácido hipúrico e histidil-leucina (HL). Se compara

a quantidade de ácido hipúrico formado nos tubos controle (apenas a enzima) com os tubos teste (na presença dos peptídeos), onde se espera uma menor quantidade de produto formado (referente à inibição da atividade da enzima).

[019] Resumidamente, 10 uL de cada peptídeo (em diferentes concentrações) foram pré-incubados com 15 uL da enzima a 0,1 U/mL (0,016 U/mL final). A reação se inicia com 50 uL do substrato HHL 0,3% (0,16% final) e os tubos são incubados por 30 minutos a 37 ºC (o volume final da reação era de 90 uL, completados com o tampão do ensaio 50mM HEPES, 300mM NaCl, pH 8.3). A reação foi finalizada com a adição de 75 uL HCl 1M. O conteúdo dos tubos foi passado para novos tubos contendo 500 uL de acetato de etila para extração do produto (ácido hipúrico). Os tubos foram centrifugados a 7.000 RPM por 10 minutos, e a camada superior coletada e transferida para novos tubos. Os tubos foram colocados em banho-maria a 100 ºC por 25 minutos para evaporação do solvente. Após, 400 uL de água destilada foram adicionados e 200 uL de cada tubo transferido para uma placa de quartzo de 96 poços, lida em espectrofotômetro a 228 nm.

[020] O valor de IC50 (concentração necessária para inibir 50% da atividade da enzima) é uma medida de potência na descoberta de novas moléculas terapêuticas. Aplicando o ensaio in vitro descrito anteriormente, se avalia o efeito de diferentes concentrações dos peptídeos na atividade da enzima, representado pelas curvas de inibição nas figuras 2 e 3.

[021] A resposta (inibição da enzima) obtida em função das diferentes concentrações de cada peptídeo são plotados no programa GraphPad Prism e, através de regressão não linear, os valores de IC50 são obtidos.

[022] Os peptídeos aqui descritos obtiveram valores de IC50 baixos quando comparados com outros peptídeos descritos na literatura. O peptídeo #1 (SPYGWHVLEVLGR) obteve um valor de IC50 de 979.7 nM, e o peptídeo #2 (LIWSPIFFGFK) obteve um valor de IC50 de 677.1 nM.

Reivindicações

1. **Peptídeos sintéticos com atividade de inibição da enzima conversora de angiotensina e potencial atividade anti-hipertensiva, caracterizados** por compreenderem as sequências Ser-Pro-Tyr-Gly-Trp-His-Val-Leu-Glu-Val-Leu-Gly-Arg (SPYGWHVLEVLGR) e Leu-Ile-Trp-Ser-Pro-Ile-Phe-Phe-Gly-Phe-Lys (LIWSPIFFGFK), com atividade de inibição da enzima conversora de angiotensina.

2. **Peptídeos sintéticos com atividade de inibição da enzima conversora de angiotensina e potencial atividade anti-hipertensiva,** de acordo com a reivindicação 1, **caracterizados** por compreenderem:

- possíveis modificações da sequência original, com troca e/ou subtração ou adição de aminoácidos e/ou alterações químicas e/ou estruturais.

Figuras

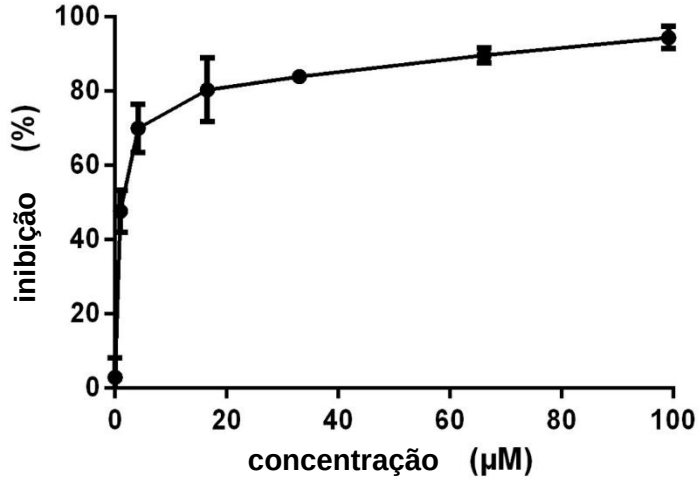


Figura 1

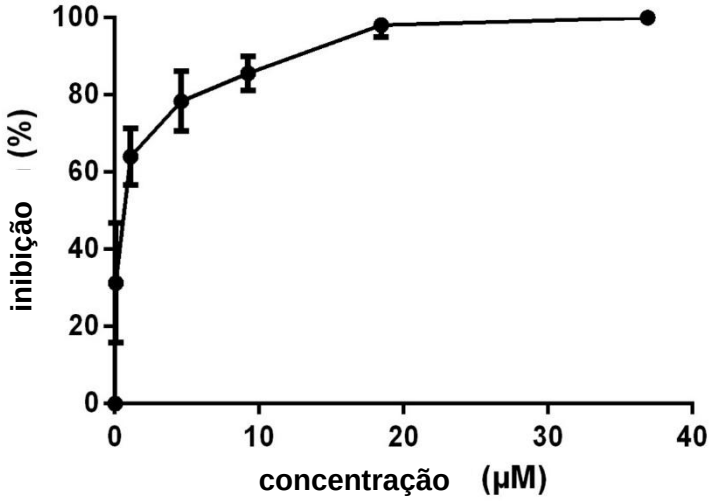


Figura 2

Resumo

PEPTÍDEOS SINTÉTICOS COM ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA E POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA

A presente patente de invenção diz respeito ao desenvolvimento de novos peptídeos através de docking molecular, ainda não descritos na literatura, visando o desenvolvimento futuro de novas moléculas para o tratamento da hipertensão. Os peptídeos possuem atividade de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), envolvida na regulação da pressão arterial. No Brasil, 388 pessoas morrem por dia por conta da hipertensão. Além disso, também existem os gastos envolvidos no tratamento da hipertensão por parte dos governos. A classe de anti-hipertensivos inibidores da ECA é amplamente utilizada e tem sua farmacocinética e farmacodinâmica bem estabelecidas. Entretanto, diversos efeitos adversos estão relacionados com esses medicamentos. A descoberta de novas moléculas tão efetivas quanto, porém menos tóxicas, se torna urgente.