



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

(21) PI 1000639-7 A2



(22) Data de Depósito: 24/03/2010
(43) Data da Publicação: 12/11/2013
(RPI 2236)

(51) Int.Cl.:
A61K 35/74
A61P 35/00
A61P 31/00

(54) Título: EXTRATO BRUTO DE BACTÉRIA TEREDINIBACTER TURNERA, PROCESSO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO O MESMO E USO NO TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS E DESORDENS PROLIFERATIVAS

(73) Titular(es): Universidade Federal do Rio de Janeiro

(72) Inventor(es): Ana Lucia Moraes Giannini, Andre Menezes da Costa, Carlos Augusto Gomes Soares, Celina Monteiro Abreu, Franklin David Rumjanek, Lilian Heeren Raschle, Marcus Vinicius Xavier Senra, Paula Corsini Madeira, Renato Santana de Aguiar, Vinicius Figueiredo Vizzoni

(57) Resumo: EXTRATO BRUTO DE BACTÉRIA *Teredinibacter turnera*, PROCESSO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO O MESMO E USO NO TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS E DESORDENS PROLIFERATIVAS. A presente invenção se refere ao extrato bruto de bactéria *Teredinibacter turnera* atuante como agente antiproliferativo e antiviral, empregado em uma composição farmacêutica para o uso em tratamento de distúrbios e desordens proliferativas em mamíferos e infecções celulares e virais.

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

EXTRATO BRUTO DE BACTÉRIA *Teredinibacter turnerae*, PROCESSO DE
OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA
CONTENDO O MESMO E USO NO TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS E
5 DESORDENS PROLIFERATIVAS

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção pertence à área químico-farmacêutica, mais precisamente, a área de produtos naturais com utilidade à saúde pública devida sua atividade inibidora da proliferação celular e viral.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

10 Na última década, grandes avanços foram obtidos no tratamento de vários tipos de câncer. Apesar disso, mais da metade dos pacientes com neoplasias não responde ao tratamento com quimioterápicos ou sofrem relapsos. Assim, existe grande interesse na descoberta de produtos naturais
15 com atividade antineoplásica (Paterson & Anderson, 2005). As plantas representam a maior fonte de quimioterápicos explorados atualmente (Akihisa et al., 2006a; 2006b; Murakami et al., 2000; Ukiya et al., 2002). Uma fonte alternativa de fármacos seria a utilização de organismos marinhos, que incluem uma grande diversidade de espécies.

20 Esta fonte de compostos começou a ser explorada recentemente, resultando no isolamento de cerca de 15000 produtos oriundos de animais marinhos e no arquivamento de centenas de patentes. As propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antineoplásicas de alguns destes compostos, como a Briostatina I, Halicondrina B e Dolastatina (Proksch et al., 2003), estão
25 sendo avaliadas em testes clínicos em fase I ou II. Estes compostos são de difícil isolamento, necessitando-se de uma grande quantidade inicial do animal marinho para purificação de pequenas quantidades da droga de interesse. Para exemplificar, 1g da droga anticâncer ecteinascidina 743 (ET-743) é obtida a partir de 1 ton do tunicado *Ecteinascidia turbinata*. Da mesma forma, são
30 necessárias 15 toneladas do briozoário *Bugula neretina* a fim de purificar 13mg de Briostatina.

Uma alternativa para produção destes compostos de forma mais eficiente dependeria do cultivo destes animais marinhos. A produtividade, em biomassa,

de briozoários e tunicados, entretanto, ainda é incipiente e incapaz de suprir as demandas.

A complexidade da estrutura química das briostatinas indicou que uma versatilidade bioquímica, exclusivamente encontrada em bactérias, seria necessária para a síntese destes compostos. Desta forma, Haygood e colaboradores analisaram as populações bacterianas associadas a espécimes de *B. neritina* coletados ao redor do mundo e detectaram a bactéria simbiote *Candidatus Endobugula sertula* associada a *B. neritina* (Haygood & Davidson 1997; Davidson & Haygood, 1999). Resultados de hibridização *in situ* e seqüenciamento de metagenoma, demonstraram que a bactéria *Ca. E. sertula* é a verdadeira responsável pela síntese da estrutura central das Briostatinas (Haygood & Davidson, 1997; Davidson, *et al.*, 2001; Hildebrand, *et al.*, 2004a; Sudek, *et al.*, 2007).

A associação da produção de briostatinas com bactérias simbiotes não cultiváveis é parte de um grupo crescente de estudos da síntese de compostos bioativos isolados de invertebrados marinhos. Estes estudos se originaram na década de 90, quando esforços pioneiros revelaram que a estrutura química complexa de compostos bioativos isolados de invertebrados marinhos indicava a necessidade de vias metabólicas bacterianas (Anthoni *et al.*, 1990; Kobayashi & Ishibashi, 1993). De fato, bactérias simbiotes foram apontadas como as verdadeiras fontes de compostos bioativos isolados dos invertebrados marinhos hospedeiros (Hildebrand *et al.*, 2004b; Piel, 2004; König *et al.*, 2006). Na maioria das vezes estes compostos proporcionam algum tipo de defesa química, sendo fundamentais para a sobrevivência de invertebrados marinhos morfológicamente expostos ou desprotegidos, de baixa capacidade de locomoção ou de estilo de vida sésil. Não obstante, esponjas, tunicados, briozoários e ascídios, estão sabidamente, entre as maiores fontes de compostos bioativos com potencial farmacológico (Anthoni *et al.*, 1990; Haygood *et al.*, 1999; Faulkner, 2000; Piel *et al.*, 2004). Para estes animais, explorar relações simbióticas com bactérias capazes de produzir metabólitos secundários bioativos parece ser uma excelente estratégia para aquisição de novas defesas químicas e melhoramento da adaptabilidade no ambiente marinho, onde a pressão seletiva exercida por predadores ou parasitas é maior

do que em qualquer outro ecossistema, principalmente em regiões subtropicais e tropicais (Proksch *et al.*, 2002).

Apesar de uma enorme gama de compostos supostamente bacterianos terem sido isolados de esponjas, ascídios e briozoários, apenas um caso é relatado para o filo dos moluscos. Este trabalho lista os compostos da classe das dolastatinas, isolados do gastrópode *Dolabella auricularia*. Diversos compostos da classe das dolastatinas apresentam notável atividade anticâncer e estão sendo utilizados em testes clínicos e no desenvolvimento de novas drogas (Schwartzmann *et al.*, 2003). Uma vez que compostos idênticos, ou extremamente similares, foram posteriormente isolados de cianobactérias, acredita-se que as dolastatinas são, na verdade, produto de bactérias simbiotes ou presentes na dieta de *Dolabella auricularia*. Todavia, como a última hipótese parece mais provável, este exemplo não se caracterizaria propriamente como um caso de "simbiose de defesa química" (Piel, 2004).

A bactéria celulolítica e fixadora de nitrogênio *Teredinibacter turnerae* é comprovadamente um endosimbionte de moluscos marinhos perfurantes de madeira da família Teredinidae. O genoma de *T. turnerae* apresenta nove cassetes gênicos (regiões 1-9) que codificam policetídeo sintases (PKSs) e peptídeo sintetases não-ribossômicas (NRPSs) (Yang *et al.* 2009). Todas estas regiões são de fato funcionais, sendo expressas *in vitro* e *in symbio*. Assim, *T. turnerae* dispõe aproximadamente de 7% do seu genoma para a síntese de metabólitos secundários policetídeos e peptídicos não-ribossômicos, representando uma taxa extremamente expressiva e maior do que a encontrada em bactérias *Streptomyces* spp., conhecidas como grande produtores de antibióticos. Além disso, foi mostrado que *T. turnerae* é filogeneticamente relacionada ao simbiote de briozoários *Ca. Endobugula sertula* produtor de briostatina (Lim & Haygood, 2004).

No Brasil, o teredinídeo de manguezal *Neoteredo reynei*, conhecido popularmente como Turu, é utilizado no Norte do país como alimento, fortificante, afrodisíaco e também no tratamento da anemia e da tuberculose.

A literatura científica é rica em informações sobre a importância ecológica dos teredinídeos. São encontrados diversos artigos descrevendo aspectos genéticos e evolutivos, tanto dos moluscos teredinídeos, como de suas bactérias endossimbiontes.

Distel *et al*, demonstrou em 2002, as condições químicas ideais para o crescimento *in vitro* de 6 linhagens isoladas de *T. turnerae* (0,3M NaCl, celulose, uma fonte de nitrogênio) propondo também, baseado em variações na sequência do gene do rRNA16S, que bactérias *T. turnerae* ou filogeneticamente próximas, são encontradas como simbioses em toda a família Teredinidae.

A literatura patentária indica que os moluscos Teredinidae e seus simbioses são empregados para obtenção de enzimas hidrolíticas. A patente americana US7288400 descreve um processo de produção da esterase pelo isolamento de uma sequência de ácido nucléico de organismos pertencente ao gênero *Teredinebacter*, sua clonagem, expressão e isolamento da enzima produzida.

O pedido de patente PCT, WO97/44361 refere-se a uma endoglucanase que pode ser derivada de diversos organismos, dentre os quais a *T. turnerae* e seu processo de produção em micro-organismos recombinantes.

A patente US7361477 protege um extrato aquoso obtido a partir de organismos endógenos de moluscos marinhos, dentre os quais a bactéria *Teredinibacter*, para preservação de madeira contra a corrosão causada por moluscos marinhos.

Desta forma, fica claro que não existe no estado da técnica, até o presente momento, nenhuma menção da possibilidade de se empregar bactérias *T. turnerae* para a obtenção de substâncias antibióticas e antiproliferativas voltadas para o tratamento do câncer, e viroses.

Assim, com o objetivo de produzir novos compostos com atividade biológica de interesse e em grandes quantidades, especificamente com potencial terapêutico (anticâncer, antiviral e antibiótico) foram desenvolvidos uma série de experimentos que culminaram neste pedido de patente.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: Atividade antiproliferativa produzida por extratos metanólicos de culturas de *T. turnerae* em meio BMS-LowPi. A) Teste com as linhagens celulares HEK293, H460, A549 e Hela; B) Teste com as linhagens celulares IMR-90, MCF-7, COS-7, B16 e Melan A. Valores para leitura de absorbância a 490nm em reação de MTT (atividade mitocondrial) e expressos como

percentual dos controles não tratados. NT= células não tratadas, MC= controle do meio sem bactérias. Média de três réplicas independentes.

Figura 2: Efeito da concentração de fosfato em cultura de *T. turnerae* na atividade antiproliferativa sobre células de mamíferos. Extratos metanólicos de cultura de *T. turnerae* em meio com reduzida [Pi] (CS30-P) apresentam maior
5 atividade, levando à reduzida atividade mitocondrial das células (teste MTT expresso em absorbância a 490nm). NT= não tratado, ME=metanol, Meio= controle do meio sem bactérias, +P= 1mM Pi, -P= 16µM Pi.

Figura 3: Atividade da composição contendo concentrações baixas do
10 extratos de cultura de *T. turnerae* CS30 sobre linfócitos T primários humanos. Dados sobre linfócitos não ativados (A) ou ativados com PMA e ionomicina (B). *T. turnerae* foi cultivado em meio BMS LowPi. Valores para leitura em reação de MTT (atividade mitocondrial). NT= não tratado, Met=metanol, Ct= controle do meio sem bactérias, cs30=composição *T. turnerae*. Os valores indicam
15 médias de pelo menos três réplicas independentes.

Figura 4: Atividade antiretroviral de extratos de cultura de *T. turnerae* contra HIV. A) Infeciosidade de HIV na presença de extratos bacterianos cultivados em alto e baixo níveis de fosfato. Efeito inibitório foi testado em infecções de HIV em células Ghost. Foram empregados clones virais
20 expressando o gene da luciferase como repórter da infecção viral e a infeciosidade viral foi avaliada através da atividade de luciferase. Células Ghost foram infectadas com HIV na presença de diferentes diluições dos extratos bacterianos e a infeciosidade avaliada através da atividade de luciferase 48 horas após a infecção. Os experimentos foram feitos em
25 triplicatas e normalizados pelos valores de infeciosidade obtidos da infecção controle sem a adição dos extratos bacterianos. B) Avaliação da citotoxicidade dos extratos bacterianos. As mesmas diluições dos extratos foram adicionadas às células Ghost e após 48 horas a viabilidade celular foi avaliada através de corante vital e plotadas neste gráfico. Tratamento com várias diluições dos
30 extratos. Os valores estão apresentados com o percentual em relação a controles de células não tratadas. Alta concentração de fosfato = extrato de cultura de *T. turnerae* em meio BMS 1mM Pi; Baixa concentração de fosfato= extrato de cultura de *T. turnerae* em meio BMS 16µM Pi.

Figura 5: Atividade antibiótica de cultura e extratos de cultura de *T. turnerae*. A) Teste em placa do crescimento da linhagem CS30 de *T. turnerae* sobre as bactérias *Sphingomonas* sp., *Bacillus cereus*, *Staphylococcus sciuri*, *Stenotrophomonas maltophilia*. B) Discos de papel contendo o extrato metanólico obtido a partir de cultura líquida da linhagem CS30 de *T. turnerae* sobre as mesmas bactérias do teste em A.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

O primeiro objeto desta invenção é o extrato bruto obtido a partir de culturas da bactéria *Teredinibacter turnerae*, rico em substâncias bioativas úteis no tratamento de distúrbios e desordens proliferativas celulares e virais, incluindo infecções com retrovírus, vírus de RNA, e/ou vírus de DNA.

O segundo objeto desta invenção refere-se ao processo de obtenção de extratos de culturas da bactéria *T. turnerae*.

Também é objeto desta invenção uma composição farmacêutica contendo entre 0,01 a 1% do extrato bruto de culturas ou de células ou sobrenadantes de cultura da bactéria *T. turnerae*, além de excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

O uso do extrato bruto de bactérias *T. turnerae* como agente antiproliferativo e antiviral voltado para o tratamento de distúrbios e desordens proliferativas em mamíferos, incluindo o Homem.

E, finalmente, o último objeto desta invenção é o método de tratamento de distúrbios e desordens proliferativas em mamíferos e infecções virais compreendido da administração de uma composição contendo o extrato de culturas da bactéria *T. turnerae* e excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O principal objeto desta invenção é o extrato bruto de bactérias *Teredinibacter turnerae* rico em substâncias bioativas, obtido pelo cultivo *in vitro* de linhagens de *Teredinibacter turnerae*. As bactérias *T. turnerae* são cultivadas em um meio basal seletivo, de composição definida, contendo baixa concentração de fosfato inorgânico (Pi); uma fonte de carbono e uma fonte de nitrogênio. O meio basal empregado para o cultivo destas bactérias deve ser um meio conhecido do estado da técnica, podendo ser quaisquer meio pertencente ao grupo consistido do: meio basal com sacarose (BMS); como apresentado em Trindade-Silva *et al* em 2009; o meio basal apresentado por

Waterbury *et al* em 1983; e/ou meio descrito por Greene e Freer em 1986; esses meios podem apresentar uma ou variadas fontes de carbono, como por exemplo: sacarose, carboximetilcelulose, celulose, celobiose, frutose, salicina, acetato, glutamato, succinato, piruvato, pectina, xilana, xilose, extrato de leveduras, glicose e caseína, com ou sem a adição de compostos nitrogenados, com ou sem agitação. Para esta aplicação é principalmente empregado meio com concentrações reduzidas de fosfato inorgânico (Pi) e a sacarose como fonte de carbono. A fonte de nitrogênio pode ser o cloreto de amônio ou nitrogênio atmosférico (N₂), em uma temperatura inferior a 35°C, durante 1 a 7 dias. O meio de cultura empregado pode ainda ser sólido, pela adição de uma quantidade adequada de Agar.

Preferencialmente, o meio de cultura empregado é o meio basal BM, contendo uma concentração inferior a 1mM de fosfato de sódio como fonte de fosfato inorgânico; entre 0,1% a 1% de sacarose como fonte de carbono; e até 0,5% de cloreto de amônio como fonte de nitrogênio, com o meio de cultura sendo mantido sob agitação. Alternativamente, as bactérias podem ser cultivadas por microaerofilia, ou seja, sem a adição de cloreto de amônio, empregando-se, portanto a fixação do nitrogênio atmosférico, com o meio de cultivo sendo mantido sem agitação ou em outras condições de microaerofilia. Ainda preferencialmente a temperatura ideal de cultivo das bactérias é 30°C e o tempo de cultivo fica compreendido entre 1 a 7 dias.

Este meio e condições de cultura permitem que as bactérias *T. turnerae* cresçam e sejam capazes de produzir os compostos bioativos em maior quantidade, os quais ficam retidos no extrato bruto desta invenção, associado às células ou secretados para o meio.

Variantes espontâneas da bactéria *T. turnerae* podem surgir *in vitro*, levando ao surgimento de novas habilidades fisiológicas, distintas da bactéria *T. turnerae* selvagem originalmente isolada do molusco Teredinidae hospedeiro. As variantes clonais foram cultivadas em meios de cultura contendo diferentes fontes de carbono e concentração de sais, visando à verificação da atividade antiproliferativa de cada variante. Algumas não apresentam atividade biológica e assim, nesta invenção, são empregadas preferencialmente linhagens originais e selvagem, como a linhagem CS30 de

T. turnerae isolada de *Neoteredo reynei*. Esta linhagem está depositada na ATCC® (American Type Culture Collection) sob o número PTA-10521.

Após um período ótimo de cultivo, compreendido entre 1 a 3 dias, a cultura de bactérias *T. turnerae* é liofilizada (secagem a vácuo e a frio). Os compostos bioativos são extraídos com a retomada do material seco (liofilizado) a partir das culturas ou dos sobrenadantes das culturas ou ainda diretamente a partir das células bacterianas recolhidas por centrifugação (cerca de 9.000g) ou método similar, em um volume adequado de metanol ou acetato de etila (aproximadamente 1/10 do volume inicial de cultura). O material solubilizado é posteriormente mantido durante 4 a 16 horas em uma temperatura compreendida entre 4°C a 10°C. Após este tempo o material é submetido à agitação, o líquido sobrenadante submetido à filtração e o extrato orgânico filtrado obtido é seco a vácuo utilizando-se técnicas e equipamentos conhecidos do estado da arte. Posteriormente este extrato seco é retomado em metanol ou outro solvente polar, num volume 1/10 do volume anterior. O solvente empregado deve ser polar, preferencialmente com polaridade entre a água e o acetato de etila, incluindo-os.

As substâncias bioativas contidas no extrato bruto de bactérias *T. turnerae* CS30 são úteis no tratamento de distúrbios e desordens proliferativas e infecções com HIV ou outros vírus.

Para fins desta invenção, temos que distúrbios e desordens proliferativas são quaisquer distúrbios e desordens proliferativas causadas por organismos procariontes, células neoplásicas de mamíferos e/ou por vírus em processo de replicação.

O extrato bruto de bactérias *T. turnerae*, obtido pelo processo anteriormente descrito, apresenta atividade antibiótica sobre organismos procariontes, podendo, tais organismos procariontes serem bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas. Testes *in vitro* realizados e mostrados na tabela 1, comprovam que a atividade proliferativa do extrato bruto de bactérias *T. turnerae* apresenta um amplo espectro de ação, inibindo o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, entretanto, nenhuma pessoa versada na área de microbiologia pode ser capaz de limitar o efeito inibitório deste extrato aos gêneros bacterianos testados.

TABELA 1: Atividade antimicrobiana de *T. turnerae* sobre diferentes linhagens bacterianas.

5

Linhagens Bacterianas	Atividade Antimicrobiana	
	Crescimento em placa	Extrato metanólico
<i>Sphingomonas</i> sp.	+	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	+
<i>Staphylococcus sciuri</i>	+	+

10 O extrato bruto de bactérias *T. turnerae* apresenta ainda uma atividade antiproliferativa eficaz na inibição da proliferação de células neoplásicas. Para esta invenção, entende-se por células neoplásicas as células tumorais de mamíferos podendo ser, células tumorais de órgãos e/ou tecidos de mamíferos e/ou células do sistema imune.

15 Dentre os vírus que tem sua infecciosidade inibida pelo extrato bruto de bactérias *T. turnerae* podemos citar os vírus de RNA, tais como o vírus da Dengue e os retrovírus, incluindo o HIV. Os extratos da bactéria *T. turnerare* apresentam efeito potencialmente contra outros vírus, cujo genoma seja de RNA ou DNA.

20 Outro objeto desta invenção é uma composição farmacêutica contendo entre 0,01 a 1% do extrato bruto de culturas ou de células ou sobrenadantes de cultura da bactéria *T. turnerae*, além de excipientes farmacêuticamente aceitáveis, úteis para o tratamento de distúrbios e desordens proliferativas e infecções virais em mamíferos.

25 Para fins desta invenção, excipientes farmacêuticamente aceitáveis são os componentes químicos presentes em uma composição farmacêutica, que apresentam pouco ou nenhum efeito terapêutico, atuando de forma a conferir forma, volume e/ou gerando maior estabilidade a referida composição

farmacêutica. Os excipientes da composição farmacêutica contendo extrato bruto de bactérias *T. turnerae* aqui empregados são aqueles conhecidos pelos iniciados nas artes farmacêuticas, podendo ser quaisquer excipientes pertencentes ao grupo consistido de: diluente, solvente, aglutinante, estabilizante, conservante ou um regulador de pH. Preferencialmente, o excipiente empregado nesta composição deve ser um diluente, solvente, estabilizante ou conservante.

A composição farmacêutica desta invenção, dependendo da diluição do extrato bruto de bactérias *T. turnerae*, pode ser empregada no tratamento de infecções virais e distintos distúrbios e desordens proliferativas tais como aquelas causadas por infecções bacterianas, neoplasias e moléstias causadas por vírus.

A composição farmacêutica deve conter, em seu volume final, entre 0,01% a 1% do extrato bruto de bactérias *T. turnerae* para que ocorra uma inibição eficaz e suficiente da proliferação de organismos procariontes, neoplasias e infecções virais.

Os organismos procariontes que sofrem inibição de seu processo proliferativo devido à ação da composição contendo entre 0,01% a 1% do extrato bruto de bactérias *T. turnerae* e excipientes farmacêuticamente aceitáveis são bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas.

Preferivelmente, as bactérias que apresentam o crescimento inibido pelo extrato bruto de *T. turnerae* pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Sphingomonas* e *Stenotrophomonas*, mas não limitado a estes gêneros.

As células neoplásicas cuja proliferação é inibida pela composição contendo entre 0,01% a 1% do extrato bruto de bactérias *T. turnerae* e excipientes farmacêuticamente aceitáveis são células tumorais de mamíferos, podendo ser quaisquer células tumorais de órgãos e/ou tecidos de mamíferos e/ou células do sistema imune.

A composição farmacêutica deve conter, em seu volume final, entre 0,01% a 1% do extrato bruto de bactérias *T. turnerae* e excipientes farmacêuticamente aceitáveis, para que ocorra a inibição eficaz e suficiente da proliferação viral. Preferencialmente, o extrato bruto deve ser diluído em uma razão compreendida entre 0,01% a 1% do volume final da dita composição farmacêutica.

Dentre os vírus que tem sua proliferação inibida pela composição farmacêutica contendo entre 0,01% a 0,5% do extrato bruto de bactérias *T. turnerae* podemos citar os vírus de RNA HIV, além de outros vírus de RNA e DNA. Esta composição farmacêutica apresenta efeito inibitório na infecciosidade de retrovírus.

O terceiro objeto desta invenção trata-se do uso de uma composição farmacêutica, como descrita acima, contendo uma quantidade farmacologicamente efetiva do extrato bruto de bactérias *T. turnerae* suficientemente capaz de desencadear um efeito antiproliferativo voltado para o tratamento de distúrbios e desordens proliferativas em mamíferos, tais como aquelas causadas por infecções bacterianas, neoplasias e moléstias causadas por vírus.

Os exemplos que serão apresentados a seguir são meramente ilustrativos das concretizações realizadas, não devendo, portanto, serem empregados na delimitação dos direitos da invenção.

Exemplo 1: Atividade antiproliferativa dos compostos bioativos contidos no extrato bruto de *T. turnerae*.

Linhagens estabelecidas de células H460, A549, Hela, MCF-7, B16, Melan A, IMR-90, HEK293, COS-7 e macrófagos primários de camundongo foram inoculadas com 0,4 µl do extrato bruto de *T. turnerae* diluído 250 vezes no próprio meio de cultura, durante 72 horas.

A atividade antiproliferativa foi observada tanto por testes de MTT (teste de atividade mitocondrial), quanto por contagens de células após os tratamentos. Resultados com um inibidor de caspases mostram que a morte celular induzida por extratos de *T. turnerae* não é causada por eventos de apoptose, mas, como mostrado por dados adicionais, provavelmente por autofagia (dados não mostrados). Os resultados são demonstrados nas figuras 1 e 2.

Exemplo 2: Efeito diferenciado sobre linfócitos T primários ativados e não-ativados.

As composições contendo os extratos brutos de *T. turnerae* apresentam atividades distintas, sobre linfócitos T ativados ou não ativados (Figura 3). Nota-se que linfócitos não ativados inicialmente (primeiras 48 horas) sofrem pequena redução na viabilidade celular (teste de MTT). De forma bem distinta

ao empregarmos linfócitos T ativados com PMA e ionomicina, nota-se uma resposta oposta, com um incremento na proliferação celular nas primeiras 48hs. Estes dados indicam que extratos de cultura de *T. turnerae* apresentam alguma atividade celular atuante nestas células do sistema imune. Desta forma, investigamos em seguida se tais atividades poderiam ter efeito no ciclo celular do retrovírus que atacam estas células do sistema imune, como o HIV.

Exemplo 3: Atividade antiretroviral

De forma geral, para testar a atividade antiretroviral dos extratos bacterianos utilizamos as células Ghost R3/X4/R5 (Aguiar *et al.*, 2008). Estas células expressam os receptores para a entrada do HIV e podem ser utilizadas para avaliar a infecciosidade viral. Os vírus gerados foram então normalizados através da dosagem da proteína viral p24 por ELISA e utilizados para infectar células Ghost (R3/X4/R5). As infecções foram feitas na presença de diluições dos extratos de *T. turnerae* (diluições 1/4, 1/20, 1/100, 1/400 e 1/2000). Foram empregados clones virais expressando o gene da luciferase como indicador da infecção viral e a infecciosidade viral foi avaliada através da atividade de luciferase. A infecciosidade viral foi avaliada nos extratos celulares 48 horas após a infecção através da atividade de luciferase quantificada em um luminômetro (Luciferase assay kit, Promega Co.). Além disto, experimentos paralelos foram conduzidos utilizando as mesmas diluições dos extratos bacterianos a fim de avaliar a citotoxicidade destes compostos. Para isto, a viabilidade celular na presença dos extratos bacterianos foi avaliada com corante vital (CellTiter-Blue Cell Viability Assay, Promega). Os extratos de *T. turnerae* reduziram dramaticamente a infecção por HIV-1 quando comparados com controles celulares não contendo tais extratos (Figura 4). A atividade antiretroviral foi mais eficaz nos extratos de *T. turnerae* cultivados com reduzida concentração de fosfato inorgânico. Além disto, os extratos bacterianos não foram citotóxicos nas concentrações inibitórias contra o HIV (diluições 1/400 e 1/100), validando o efeito antiretroviral de tais extratos (Figura 4). Os mesmos resultados foram encontrados quando os extratos de *T. turnerae* foram avaliados em linfócitos T CD4+, as células naturalmente infectadas por HIV.

Exemplo 4: Atividade antibiótica da composição contendo o extrato bruto de *T. turnerae*.

A atividade antimicrobiana de *T. turnerae* foi demonstrada. Crescimentos da linhagem CS30 e extratos metanólicos de culturas desta bactéria, foram testados contra crescimentos confluentes de uma diversidade de bactérias, incluindo linhagens Gram-positivas e Gram-negativas, como pode ser observado na Figura 5 e na Tabela 2. Observou-se a reprodutibilidade de ambas as atividades dos crescimentos de *T. turnerae* sobre a linhagem indicadora *Sphingomonas* sp., causando de forma dose dependente a inibição do crescimento de *Sphingomonas*. Também Foi observado a atividade biológica sobre as bactérias Gram-positivas *Bacillus cereus*, *Staphylococcus sciuri* e a bactéria Gram-negativa *Stenotrophomonas maltophilia*. Todas as atividades observadas eram retidas em extratos de culturas de *T. turnerae*.

TABELA 2: Atividade antimicrobiana de *T. turnerae* sobre diferentes linhagens bacterianas.

Tabela 2: Perfil de crescimento e de atividade antibiótica de variantes de *T. turnerae*.

Variantes de <i>T. turnerae</i>	Perfil de crescimento ^a				Atividade antibiótica ^b			
	BM (0.3 M NaCl)		BM ^{nl} (NaCl free)		<i>Sphingomonas</i> sp.	<i>S. maltophilia</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. sciuri</i>
	Celulose	Caseína	Celulose	Caseína				
CS30	+	-	-	-	+	+	+	+
CS30A	+	+	+/-	+	+	-	-	-
CS30P	+	+	+/-	+	+	-	-	-

^a: crescimento de 4 dias em BM ou BM^{nl} sólido a 30 °C. "+" = crescimento positivo; "+/-" = crescimento fraco; "-" = crescimento negativo. Celulose como fonte carbono + 0.1% NH₄Cl ou caseína como fonte de carbono e nitrogênio.

^b: atividade antibiótica de variantes de *T. turnerae* estriada em placas BMS ou LB cobertas com BMS top-agar contendo as bactérias testadas, Gram-negativas (*Sphingomonas* sp. CS81 ou *Stenotrophomonas maltophilia*) ou Gram-positivas (*Bacillus cereus* ou *Staphylococcus sciuri*). "+" = *T. turnerae* inibe a bactéria testada; "-" = *T. turnerae* não inibe a bactéria testada.

Reivindicações

- 5 1. Extrato bruto rico em substâncias bioativas **caracterizado por** ser obtido a partir de culturas da bactéria *Teredinibacter turnerae*, sendo empregado no tratamento de distúrbios e desordens proliferativas celulares e virais.
2. Extrato bruto, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** linhagem da bactéria *T. turnerae* ser preferencialmente a CS30 isolada de *Neoteredo reynei* depositada na ATCC® sob o número PTA-10521.
- 10 3. Extrato bruto, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** apresentar atividade antibiótica sobre organismos procariontes, compreendendo as bactérias Gram-positivas ou Gram negativas.
4. Extrato bruto, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** apresentar atividade antiproliferativa sobre células neoplásicas, compreendendo células tumorais de mamífero.
- 15 5. Extrato bruto, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** apresentar atividade antiviral em vírus de RNA, retrovírus, ou vírus DNA.
6. Extrato bruto, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado pela** atividade antiviral efetiva em vírus da dengue e HIV.
- 20 7. Processo de obtenção de extratos brutos ricos em substâncias bioativas de culturas da bactéria *Teredinibacter turnerae* **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:
 - 25 a) cultivo das células da bactéria *T. turnerae* depositada na ATCC® sob o número PTA-10521 em um meio de cultura basal seletivo, contendo uma baixa concentração de fosfato inorgânico (Pi); uma fonte de carbono e uma fonte de nitrogênio, a uma temperatura compreendida entre 30°C e 35°C, durante 1 a 7 dias;
 - b) liofilização da cultura;
 - c) extração dos compostos bioativos em um volume adequado de
30 solvente;
 - d) Solubilização do material;
 - e) agitação do material;
 - f) filtração do líquido sobrenadante;

- g) secagem a vácuo do extrato orgânico filtrado;
- h) Associação do extrato seco com metanol ou outro solvente polar, num volume 1/10 do volume anterior.
- 5 8. Processo de obtenção, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo** cultivo das células da bactéria a) compreender como fonte de carbono: sacarose, carboximetilcelulose, celulose, celobiose, frutose, salicina, acetato, glutamato, succinato, piruvato, pectina, xilana, xilose, extrato de leveduras, glicose ou caseína.
- 10 9. Processo de obtenção, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo cultivo das** células da bactéria a) compreenderem opcionalmente via microaerofilia ou por outras condições de microaerofilia.
10. Processo de obtenção, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pela** fonte de nitrogênio em a) ser compreendida por cloreto de amônio (NH_4Cl) ou nitrogênio atmosférico (N_2).
- 15 11. Processo de obtenção, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo** cultivo a) apresentar um meio de cultura com temperatura ideal de 30°C , durante preferencialmente 1 a 3 dias.
12. Processo de obtenção, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado pelo** meio de cultura opcionalmente ser sólido com a adição de uma
- 20 quantidade adequada de Agar.
13. Processo de obtenção, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado pelo** meio de cultura compreender: meio basal BM; fosfato de sódio como fonte de fosfato inorgânico; sacarose, como fonte de carbono e cloreto de amônio, como fonte de nitrogênio.
- 25 14. Processo de obtenção, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado pelo** fosfato inorgânico compreender uma concentração inferior a 1mM; pela sacarose compreender um concentração entre 0,01% e 1% e até 0,5% de cloreto de amônio.
- 30 15. Processo de obtenção, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada pela** etapa c) empregar um volume de 1/10 do solvente.
16. Processo de obtenção, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo** material solubilizado d) ser mantido por 4 a 16 horas a uma temperatura compreendida entre 4°C e 10°C .

17. Processo de obtenção, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo** solvente associado ao extrato seco h) ser polar com uma polaridade entre a água e o acetato de etila.
- 5 18. Composição farmacêutica para o tratamento de distúrbios, desordens proliferativas e infecções virais **caracterizada por** conter uma quantidade suficiente do extrato bruto de culturas ou de células ou sobrenadantes da bactéria *T. turnerae*, além de excipientes farmacêuticamente aceitáveis.
- 10 19. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizada por** apresentar uma concentração do extrato bruto compreendido entre 0,01% a 1%.
20. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizada por** apresentar uma concentração do extrato bruto compreendido entre 0,01% a 0,5%.
- 15 21. Uso do extrato bruto de bactéria *T. turnerae* **caracterizado por** ser empregado como agente antiproliferativo voltado para o tratamento de infecções bacterianas.
- 20 22. Uso do extrato bruto de bactéria *T. turnerae* **caracterizado por** ser empregado como agente antiproliferativo voltado para o tratamento de neoplasias.
23. Uso do extrato bruto de bactéria *T. turnerae* **caracterizado por** ser empregado como agente antiproliferativo voltado para o tratamento de moléstias causadas por vírus.

Figuras

Figura 1

5

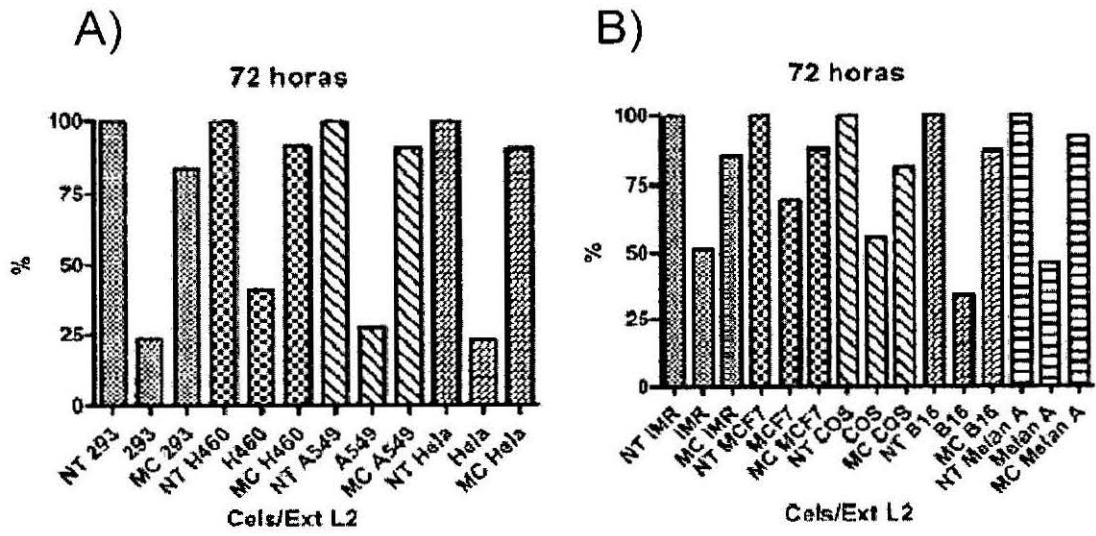


Figura 2

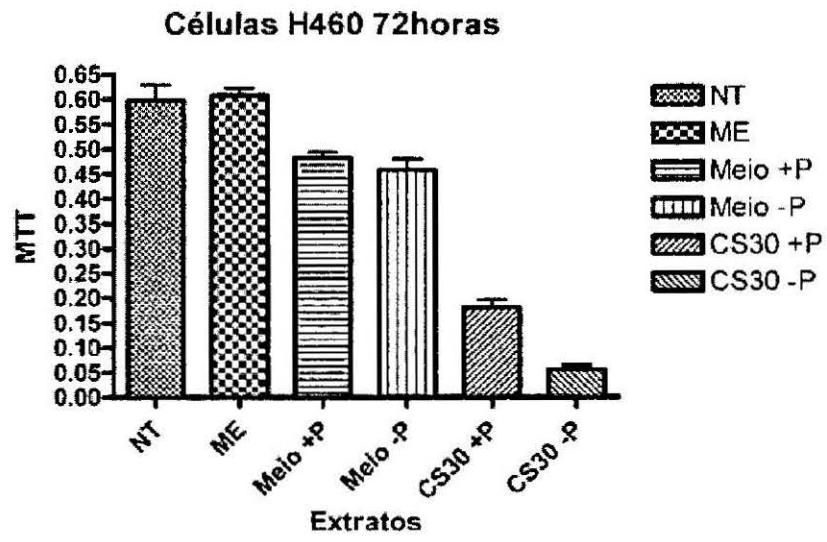


Figura 3

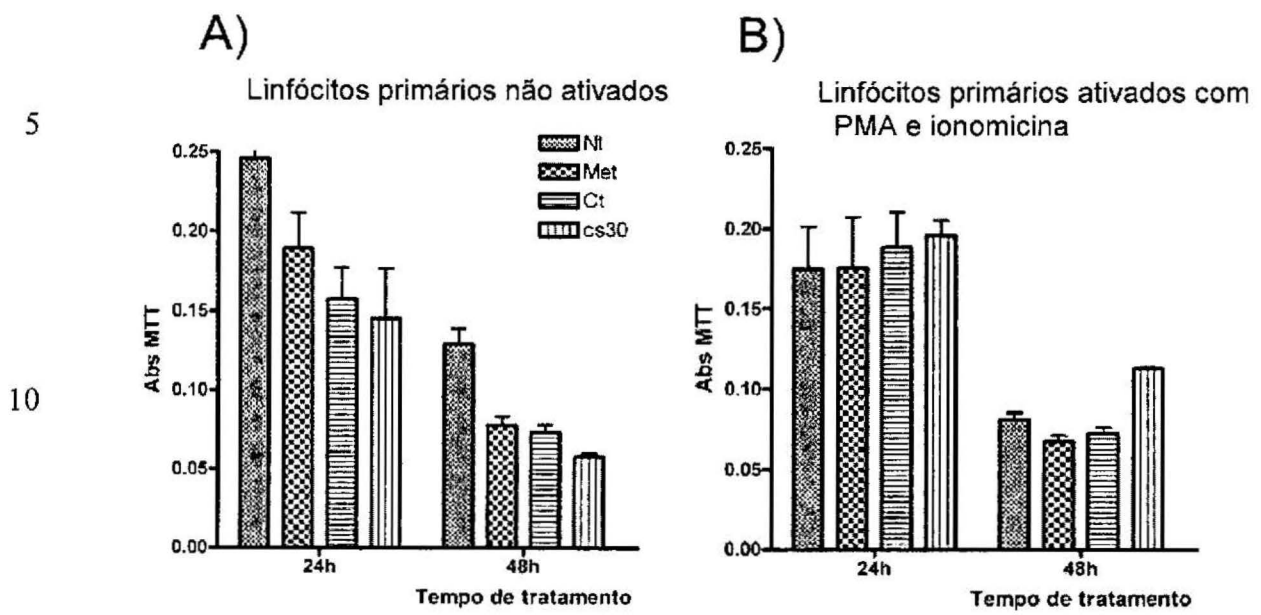


Figura 4

5

10

15

20

25

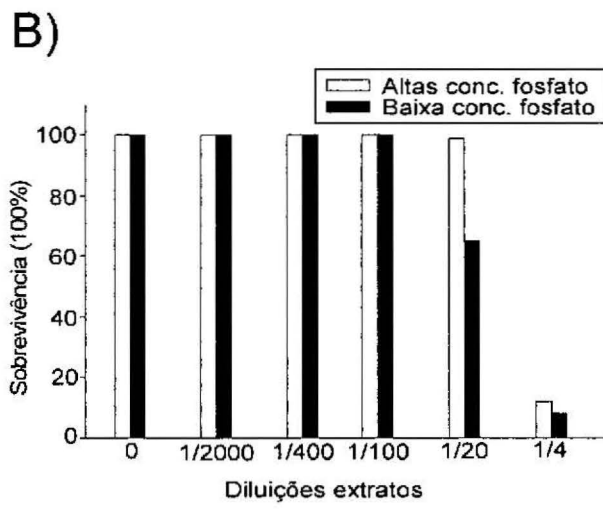
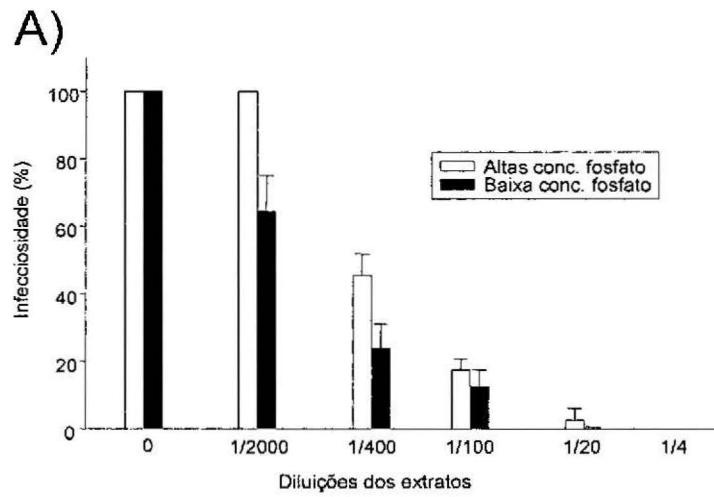
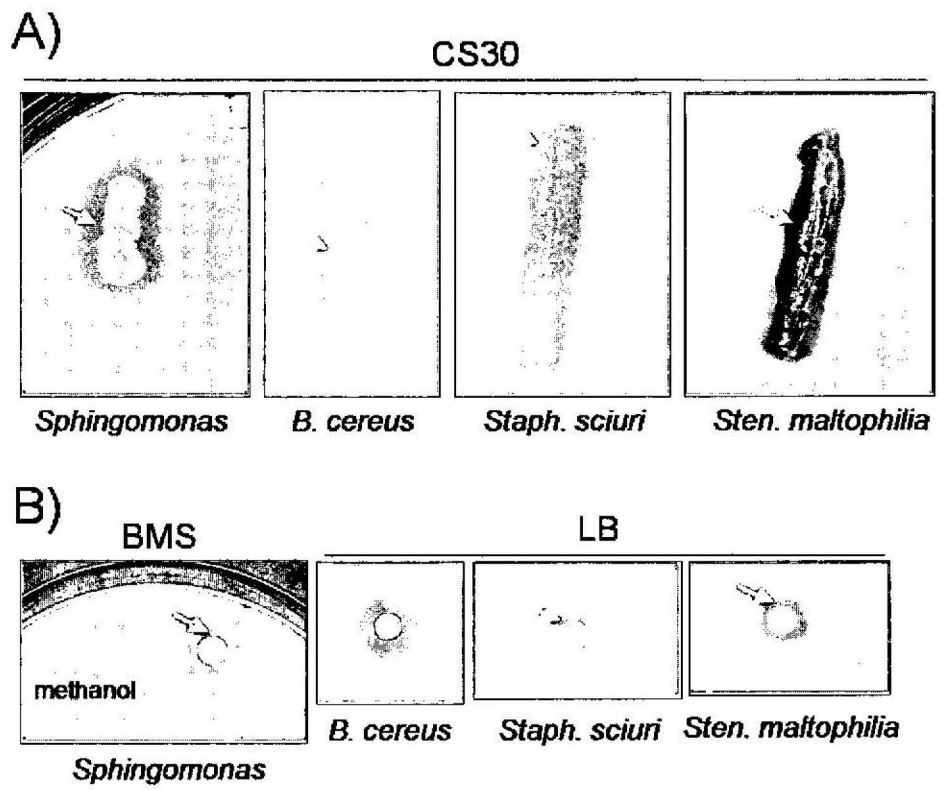


Figura 5



Resumo

EXTRATO BRUTO DE BACTÉRIA *Teredinibacter turnera*, PROCESSO DE
OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO
5 O MESMO E USO NO TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS E DESORDENS
PROLIFERATIVAS

A presente invenção se refere ao extrato bruto de bactéria *Teredinibacter
turnera* atuante como agente antiproliferativo e antiviral, empregado em uma
composição farmacêutica para o uso em tratamento de distúrbios e desordens
10 proliferativas em mamíferos e infecções celulares e virais.