

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

(22) Data de pedido: <b>2003.06.06</b>	(73) Titular(es): <b>DYAX CORP.</b> <b>300 TECHNOLOGY SQUARE CAMBRIDGE, MA</b> <b>02139</b> <b>US</b>
(30) Prioridade(s): <b>2002.06.07 US 387239 P</b> <b>2002.08.28 US 407003 P</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2008.07.09</b>	(72) Inventor(es): <b>ARTHUR C. LEY</b> <b>US</b> <b>ROBERT. C. LADNER</b> <b>US</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2011.10.12</b> <b>034/2012</b>	(74) Mandatário: <b>LUÍSA MARIA FERREIRA GUERREIRO</b> <b>PRACETA FERNANDO NAMORA, Nº 7, 3º ESQ. 2820-598</b> <b>CHARNECA DA CAPARICA</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **POLIPEPTÍDEO CONTENDO UM DOMÍNIO KUNITZ MODIFICADO**

(57) Resumo:

UM POLIPEPTÍDEO QUE COMPREENDE A SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS: MET HIS SER PHE CYS ALA PHE LYS ALA ASP ASP GLY PRO CYS ARG ALA ALA HIS PRO ARG TRP PHE PHE ASN ILE PHE THR ARG GLN CYS GLU GLU PHE ILE TYR GLY GLY CYS GLU GLY ASN GLN ASN ARG PHE GLU SER LEU GLU GLU CYS LYS LYS MET CYS THR ARG ASP (AMINOÁCIDOS 30-60 DA SEQ ID Nº: 2), EM QUE O POLIPEPTÍDEO INIBE A CALICREÍNA.

## RESUMO

### POLIPEPTÍDEO CONTENDO UM DOMÍNIO KUNITZ MODIFICADO

Um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos:  
Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg  
Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys  
Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe  
Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp  
(aminoácidos 30-60 da SEQ ID N°: 2), em que o polipeptídeo  
inibe a calicreína.

## DESCRIÇÃO

### POLIPEPTÍDEO CONTENDO UM DOMÍNIO KUNITZ MODIFICADO

#### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

As proteases estão envolvidas numa ampla variedade de vias biológicas. Em particular as protéases de serina, como calicreína, plasmina, elastase, ativador de plasminogénio uroquinase, trombina, inibidores de coagulação humana associada à lipoproteína, e fatores de coagulação como os fatores VIIa, IXa, Xa, XI, XIIa têm sido implicados em vias que afetam o fluxo sanguíneo, por exemplo, isquemia geral e focal, invasão tumoral, ibrinólise, perda de sangue peri-operatório e inflamação. Inibidores de proteases de serina específicos têm, portanto, recebido atenção como alvos potenciais dos fármacos para diversas doenças isquémicas.

Um tal inibidor, a aprotinina (também chamado de inibidor de tripsina pancreática bovina ou BPTI), obtido a partir do pulmão bovino, foi aprovado nos Estados Unidos para uso profilático na redução da perda de sangue peri-operatório e a necessidade de transfusão em pacientes submetidos à circulação extracorpórea (CPB), por exemplo, no curso de uma cirurgia de revascularização miocárdica. A aprotinina está disponível comercialmente sob o nome comercial de TRASYLOL® (Bayer Corporation Pharmaceutical Division, West Haven, Connecticut) e foi previamente aprovada para uso no tratamento da pancreatite. A eficácia da aprotinina está associada às suas capacidades relativamente não específicas para inibir uma variedade de proteases de serina, incluindo calicreína plasmática e plasmina. Essas proteases são importantes num número de vias do sistema de ativação de contato (CAS).

A CAS é inicialmente ativada quando o sangue total contata a superfície de substratos externos (por exemplo, caulino, vidro, sulfato de dextrano ou superfícies ósseas danificadas). A calicreína, uma protease serina, é uma enzima do plasma que inicia a cascata da CAS levando à ativação dos neutrófilos, plasmina, coagulação, e diversas cininas. A calicreína é segregada como uma proenzima (pré-calicreína) que circula como uma molécula inativa até ser ativada por um evento proteolítico no início da cascata de CAS. Claramente, a inibição específica da calicreína seria uma abordagem muito atraente para controlar a perda de sangue associada à CPB e o início da resposta inflamatória sistêmica (SIR), como seria encontrado durante, por exemplo, vários procedimentos cirúrgicos invasivos.

Apesar de ser o único composto licenciado para a prevenção da perda sanguínea peri-operatória na CPB para revascularização do miocárdio (CABG), a aprotinina não é tão amplamente utilizada como seria de esperar. Existem preocupações sérias quanto ao uso deste polipeptídeo bovino em pacientes que necessitam de CPB, e em particular o uso deste composto dos procedimentos de CABG. A aprotinina não é específica para a calicreína, mas interage com enzimas adicionais (por exemplo, plasmina) em múltiplas vias. Assim, o mecanismo de ação da aprotinina é em grande parte especulativo, e a falta de compreensão precisa do que é afetado durante o tratamento com a aprotinina produz o risco de complicações durante o tratamento. Uma complicação frequentemente citada é a trombose descontrolada, devido às ações da aprotinina sobre a via fibrinolítica. Há uma preocupação não só sobre tais eventos hiperagudos como a trombose dos vasos maiores no período peri-operatório, mas

também sobre a patência do enxerto após o procedimento de CABG. Além disso, como uma proteína natural obtida a partir do pulmão bovino, a administração de aprotinina em seres humanos pode provocar reações graves de hipersensibilidade ou anafiláticas ou anafilactóides após o primeiro e, mais frequentemente, após a administração repetida aos pacientes. Isto é particularmente preocupante num grande número de pacientes que têm de repetir os procedimentos de CABG. Além disso, há uma crescente preocupação do público a respeito do uso de material derivado de fontes bovinas como um vetor potencial para a transmissão da encefalopatia espongiforme bovina aos seres humanos.

Estas preocupações deixam claro que continua a ser uma necessidade a existência de meios mais eficazes e mais específicos e métodos para prevenir ou reduzir a perda de sangue peri-operatório e o início da SIR num paciente submetido à cirurgia, resultando em ativação do CAS, tais como procedimentos CABG em pacientes de CPB, ou substituição da anca.

## **RESUMO DA INVENÇÃO**

Esta descrição, incluindo a invenção, é baseada na descoberta de peptídeos que inibem as proteases de serina. As proteases de serina tais como, por exemplo, a calicreína, estão envolvidas em, por exemplo, vias que levam à perda excessiva de sangue peri-operatório e o início da resposta inflamatória sistémica. Inibidores do peptídeo da calicreína preferidos incluem aqueles descritos nas Patente US 6333402 e 6057287 de Markland et al. A presente descrição é dirigida, em parte, ao uso dos

peptídeos em métodos terapêuticos e composições adequadas para o uso na eliminação e redução de isquemias variadas, incluindo, mas não limitado a, perda de sangue peri-operatório, e o início da resposta inflamatória sistêmica. A perda de sangue peri-operatório resulta de procedimentos cirúrgicos invasivos que levam ao contato com a ativação de componentes do complemento e os sistemas de coagulação/fibrinólise. Mais especificamente, a presente descrição fornece métodos de utilização de inibidores da calicreína para reduzir ou evitar a perda de sangue peri-operatório e uma resposta inflamatória sistêmica em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos invasivos, especialmente cirurgias cardiotorácicas.

Numa modalidade, a presente descrição é direcionada para um método para prevenir ou reduzir a isquemia num paciente compreendendo administração ao paciente de uma composição que compreende um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos: Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys Xaa56 Xaa57 Xaa58 (SEQ ID N°: 1), em que Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa56, Xaa57 Xaa58 são cada um aminoácido ou ausente; Xaa10 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Asp e Glu; Xaa11 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala e Thr; Xaa13 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys e Gln; Xaa15 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn e Gln; Xaa16 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em:

Ala, Gly, Ser, Asp e Asn; Xaa17 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln e Thr; Xaa18 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: His, Leu, Gln e Ala; Xaa19 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Pro, Gln, Leu, Asn e Ile; Xaa21 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Trp, Phe, Tyr, His e Ile; Xaa22 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Tyr e Phe; Xaa23 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Tyr e Phe; Xaa31 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile e Thr; Xaa32 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly e Val; Xaa34 é um aminoácido selecionado a partir do grupo que consiste de: Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly e Leu; Xaa35 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Tyr, Trp e Phe; Xaa39 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Glu, Gly, Ala, Ser e Asp; Xaa40 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Gly e Ala; Xaa43 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Asn e Gly; Xaa45 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Phe e Tyr; e em que o polipeptídeo inibe a calicreína.

Numa concretização particular, a isquemia é a perda de sangue peri-operatório devido a um procedimento cirúrgico realizado no paciente. O procedimento cirúrgico pode ser uma cirurgia cardiotorácica, como, por exemplo, a circulação extracorpórea ou cirurgia de revascularização miocárdica.

Numa concretização particular, posições de aminoácidos individuais da SEQ ID N°: 1 podem ser uma ou mais das seguintes: Xaa10 é Asp, Xaa11 é Asp, Xaa13 é Pro, Xaa15 é Arg, Xaa16 é Ala, Xaa17 é Ala, Xaa18 é His, Xaa19 é Pro, Xaa21 é Trp, Xaa31 é Glu, Xaa32 é Glu, Xaa34 é Ile, Xaa35 é Tyr, Xaa39 é Glu.

Numa outra modalidade, a presente descrição é direcionada para um método para prevenir ou reduzir o início da resposta inflamatória sistêmica associada a um procedimento cirúrgico num paciente compreendendo administração ao paciente de uma composição que compreende um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos: Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys Xaa56 Xaa57 Xaa58 (SEQ ID N°: 1), em que Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa56, Xaa57 ou Xaa58 são cada individualmente um aminoácido ou ausente; Xaa10 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Asp e Glu; Xaa11 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala e Thr; Xaa13 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys e Gln; Xaa15 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn e Gln; Xaa16 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Ala, Gly, Ser, Asp e Asn; Xaa17 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln e Thr; Xaa18 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: His, Leu, Gln e Ala; Xaa19 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Pro, Gln, Leu, Asn e



Ile; Xaa21 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Trp, Phe, Tyr, His e Ile; Xaa22 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Tyr e Phe; Xaa23 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Tyr e Phe; Xaa31 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile e Thr; Xaa32 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly e Val; Xaa34 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly e Leu; Xaa35 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Tyr, Trp e Phe; Xaa39 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Glu, Gly, Ala, Ser e Asp; Xaa40 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Gly e Ala; Xaa43 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Asn e Gly; Xaa45 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Phe e Tyr; e em que o polipeptídeo inibe a calicreína. Numa concretização particular, o procedimento cirúrgico pode ser uma cirurgia cardiotorácica, como, por exemplo bypass, cardiopulmonar ou cirurgia de revascularização miocárdica. Numa concretização particular, posições de aminoácidos individuais da SEQ ID N°: 1 podem ser uma ou mais das seguintes: Xaa10 é Asp, Xaa11 é Asp, Xaa13 é Pro, Xaa15 é Arg, Xaa16 é Ala, Xaa17 é Ala, Xaa18 é His, Xaa19 é Pro, Xaa21 é Trp, Xaa31 é Glu, Xaa32 é Glu, Xaa34 é Ile, Xaa35 é Tyr, Xaa39 é Glu.

Em ainda outra modalidade, a presente descrição é direcionada para um método para prevenir ou reduzir o início da resposta inflamatória sistêmica associada a um procedimento cirúrgico num paciente compreendendo administração ao paciente de uma composição que compreende um polipeptídeo que consiste na sequência de aminoácidos:

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg  
Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys  
Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe  
Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID  
Nº: 2), em que o polipeptídeo inibe a calicreína. Numa  
modalidade, o procedimento cirúrgico é uma cirurgia  
cardiotorácica, como, por exemplo bypass cardiopulmonar ou  
cirurgia de revascularização miocárdica.

Em ainda outra modalidade, a presente descrição é  
direcionada para um método para prevenir ou reduzir o  
início da resposta inflamatória sistêmica associada a um  
procedimento cirúrgico num paciente compreendendo  
administração ao paciente de uma composição que compreende  
um polipeptídeo que consiste na sequência de aminoácidos:  
Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala  
His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu  
Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser  
Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 5-  
60 da SEQ ID Nº: 2), em que o polipeptídeo inibe a  
calicreína. Numa modalidade, o procedimento cirúrgico é uma  
cirurgia cardiotorácica, como, por exemplo bypass,  
cardiopulmonar ou cirurgia de revascularização miocárdica.

Numa outra modalidade, a presente descrição é direcionada  
para um método para prevenir ou reduzir a isquemia num  
paciente compreendendo a administração ao paciente de uma  
composição que compreende um polipeptídeo que consiste na  
sequência de aminoácidos: Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp  
Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile  
Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly  
Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys

Thr Arg Asp (aminoácidos 5-60 da SEQ ID N°: 2), em que o polipeptídeo inibe a calicreína. Numa concretização particular, a isquemia pode ser a perda de sangue peri-operatório devido a um procedimento cirúrgico realizado no paciente. Numa modalidade, o procedimento cirúrgico é uma cirurgia cardiotorácica, como, por exemplo bypass, cardiopulmonar ou cirurgia de revascularização miocárdica.

Baseada na descrição aqui referida, a presente invenção fornece:

Um polipeptídeo compreende a sequência de aminoácidos: Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 3-60 da SEQ ID N°: 2), em que o polipeptídeo inibe a calicreína.

Numa modalidade o polipeptídeo consiste na sequência de aminoácidos: Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 3-60 da SEQ ID N°: 2).

Numa modalidade o polipeptídeo consiste na sequência de aminoácidos: Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID N°: 2).

A presente invenção fornece ainda uma composição farmacêutica compreende um polipeptídeo da invenção e um ou mais tampões farmaceuticamente aceitáveis, transportadores e excipientes.

A presente invenção fornece ainda um recipiente compreendendo a composição farmacêutica da invenção.

A presente invenção fornece ainda uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica o polipeptídeo da invenção.

Outros aspectos e modalidades da presente invenção são apresentados nas reivindicações anexas.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

A FIG. 1 é um diagrama simplificado das principais vias múltiplas e eventos relacionados envolvidos no sistema de ativação de contato e resposta inflamatória sistêmica (SIR) que podem surgir num paciente submetido a traumatismo de tecidos moles e osso, como o associado a uma cirurgia de revascularização miocárdica (CABG), especialmente quando o procedimento CABG envolve a circulação extra-corpórea do sangue, tais como o bypass cardiopulmonar (Dispositivo de bypass). As setas indicam a ativação de um componente ou um evento para outro componente ou evento na cascata. As setas em ambas as direções indicam efeitos de ativação de componentes ou eventos em ambas as direções. As setas quebradas indicam a participação provável de um componente ou evento na ativação de outro componente ou evento. As abreviaturas são as seguintes: "tPA" = ativador do plasminogénio tecidual; "C5a" = componente de uma proteína

do sistema de complemento; "fXIIa" = proteína ativadora da pré-caliceína para formar a caliceína ativa; "extrínseca" = sistema de coagulação extrínseca; "intrínseca" = sistema de coagulação intrínseco.

A FIG. 2 mostra uma parte de um ADN e a correspondente sequência de aminoácido deduzida para um KI de polipeptídeo da invenção em plasmídeo pPIC-K503. O ADN inserido codifica o sinal peptídeo  $\alpha$  prepro de *Saccharomyces cerevisiae* (sublinhado) fundida em moldura para o terminal amino do polipeptídeo PEP-1 KI tendo a sequência de aminoácidos delimitada pela área do rectângulo. A sequência de aminoácidos do polipeptídeo PEP-1 KI mostrado na região do rectângulo é a SEQ ID N°: 2, e a correspondente sequência de codificação de nucleotídeos do polipeptídeo KI é a SEQ ID N°: 3. As setas tracejadas indicam a localização e a direção de duas sequências de iniciadores PCR em regiões AOX que foram usados para produzir modelos de sequenciamento. A sequência de ADN para toda a sequência de nucleotídeos da figura compreende a sequência de codificação estrutural para a proteína de fusão e é designada por SEQ ID N°: 27. A dupla porção sublinhada da sequência indica uma sequência de sonda de diagnóstico. *BstBI* *EcoRI* indicam locais dos seus respectivos sítios palindrômicos, hexaméricos, de restrição de endonuclease na sequência. Os asteriscos denotam códons de parada de translação.

As FIGS. 3A e 3B mostram um alinhamento das sequências de aminoácidos das modalidades preferidas da presente descrição, a sequência LACI nativa a partir da qual estas variantes foram derivadas (SEQ ID N°: 32), e outros domínios Kunitz conhecidos (SEQ ID N°s: 29-31 e 33-53). Os resíduos de cisteína estão realçados.

## DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Segue-se uma descrição das modalidades preferidas da presente invenção.

A presente descrição, incluindo a invenção, é baseada na descoberta de um grupo de polipeptídeos inibidores da calicreína (KI) que inibem a calicreína plasmática com uma especificidade que permite a sua utilização na melhoria dos métodos de prevenção ou redução de isquemia, como, por exemplo, perda de sangue peri-operatório e/ou uma resposta inflamatória sistêmica (SIR) induzida pela calicreína, especialmente, por exemplo, em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos e, particularmente, envolvendo procedimentos cirúrgicos de cirurgia cardiotorácica, por exemplo, a circulação extracorpórea (CPB), como um enxerto de revascularização do miocárdio (CABG). Os KIs podem ser usados especificamente para, por exemplo, cirurgia cardíaca pediátrica, transplante pulmonar, artroplastia total da anca e transplante de fígado, e para reduzir ou prevenir o AVC peri-operatório durante o CABG, oxigenação por membrana extracorpórea (ECMO) e acidentes vasculares cerebrais (AVC) durante esses procedimentos.

A cirurgia Cardiotorácica é a cirurgia da área do peito, mais comumente do coração e pulmões. As doenças típicas tratadas por cirurgia cardiotorácica incluem doença arterial coronária, tumores e cânceros do esôfago, pulmão e da parede do peito, coração e anormalidades da válvula, e defeitos de nascimento envolvendo o peito ou o coração. Onde a cirurgia cardiotorácica é utilizada para tratamento, incorre-se no risco de perda de sangue (por exemplo,

isquemia induzida pela cirurgia) e o início de uma resposta inflamatória sistêmica (SIR). A SIR induzida pela cirurgia pode resultar em disfunção orgânica grave (síndrome da resposta inflamatória sistêmica; SIRS).

*Polipeptídeos úteis de acordo com a presente invenção*

Os polipeptídeos KI úteis na presente invenção compreendem polipeptídeos de domínio Kunitz. Numa modalidade desses domínios Kunitz são formas variantes da estrutura furada compreendendo domínio Kunitz 1 da proteína inibidora da coagulação humana associada à lipoproteína (LACI). A LACI contém três estruturas internas furadas de peptídeo, bem definidas, que são paradigma dos domínios Kunitz (Girard, T. et al., 1989 Nature, 338:518-520). Os três domínios Kunitz de LACI conferem a capacidade de ligar e inibir a calicreína, embora não com afinidade excepcional. Variantes do domínio Kunitz 1 de LACI aqui descritas foram selecionadas, da calicreína isolada e ligada com maior afinidade e especificidade (ver, por exemplo, Patentes US 6333402 e 6057287). Um exemplo de um polipeptídeo preferido útil de acordo com a presente invenção, e que é um polipeptídeo da invenção, tem a sequência de aminoácidos definida pelos aminoácidos 30-60 da SEQ ID N°: 2.

Cada polipeptídeo útil de acordo com a presente invenção liga a calicreína, e polipeptídeos preferidos também são inibidores da calicreína (KI), como determinado por ensaios ligação e inibição da calicreína conhecidos na técnica. A maior afinidade e especificidade para calicreína dos polipeptídeos da variante de domínio Kunitz aqui descrita fornece a base para a sua utilização em cirurgia

cardiotorácica, por exemplo, CPB e especialmente procedimentos cirúrgicos CABG, para prevenir ou reduzir a perda sanguínea peri-operatória e/ou o início da SIR em pacientes submetidos a tais procedimentos. Os polipeptídeos KI usados de acordo com a presente invenção têm ou compreendem a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo da variante do domínio Kunitz isolada originalmente por bibliotecas de triagem do fago pela capacidade de ligar a calicreína.

Os polipeptídeos KI úteis nos métodos e composições da presente invenção compreendem um polipeptídeo de domínio Kunitz que compreende a sequência de aminoácidos:

**Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys  
Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26  
Xaa27 Xaa28 Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39  
Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys  
Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys Xaa56 Xaa57 Xaa58 (SEQ ID NO:1)**

"Xaa" refere-se a uma posição numa cadeia de peptídes que pode ser qualquer uma de uma série de diferentes aminoácidos. Por exemplo, para os peptídeos KI aqui descritos, Xaa10 pode ser Asp ou Glu; Xaa11 pode ser Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala ou Thr; Xaa13 pode ser Pro, Arg, His, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys ou Gln; Xaa15 pode ser Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn ou Gln; Xaa16 pode ser Ala, Gly, Ser, Asp ou Asn; Xaa17 pode ser Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln ou Thr; Xaa18 pode ser His, Leu, Gln ou Ala; Xaa19 pode ser Pro, Gln, Leu, Asn ou Ile; Xaa21 pode ser Trp, Phe, Tyr, His ou Ile; Xaa31 pode ser Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile ou Thr; Xaa32 pode



ser Glu, Gln, Asp Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly ou Val; Xaa34 pode ser Ile, Thr, Ser, Val, Ala, Asn, Gly ou Leu; Xaa35 pode ser Tyr, Tip ou Phe; Xaa39 pode ser Glu, Gly, Ala, Ser ou Asp. Os aminoácidos Xaa6, Xaa7, Xaa8, Xaa9, Xaa20, Xaa24, Xaa25, Xaa26, Xaa27, Xaa28, Xaa29, Xaa41, Xaa42, Xaa44, Xaa46, Xaa47, Xaa48, Xaa49, Xaa50, Xaa52, Xaa53 e Xaa54 podem ser qualquer aminoácido. Além disso, cada um dos quatro primeiros e dos últimos três aminoácidos da SEQ ID N°: 1 podem, opcionalmente, estar presentes ou ausentes e podem ser quaisquer aminoácidos, se houver.

Os peptídeos definidos de acordo com a SEQ ID N°: 1 formam um conjunto de polipeptídeos que se ligam à calicreína. Por exemplo, numa modalidade preferida da presente invenção, um polipeptídeo KI útil nos métodos e composições da presente invenção tem as seguintes posições variáveis: Xaa11 pode ser Asp, Gly, Ser ou Val; Xaa13 pode ser Pro, Arg, His ou Asn; Xaa15 pode ser Arg ou Lys; Xaa16 pode ser Ala ou Gly; Xaa17 pode ser Ala, Asn, Ser ou Ile; Xaa18 pode ser His, Leu ou Gln; Xaa19 pode ser Pro, Gln ou Leu; Xaa21 pode ser Trp ou Phe; Xaa31 é Glu; Xaa32 pode ser Glu ou Gln; Xaa34 pode ser Ile, Thr ou Ser; Xaa35 é Tyr, e Xaa39 pode ser Glu, Gly ou Ala.

Uma modalidade mais específica da presente invenção é definida pelos seguintes aminoácidos em posições variáveis: Xaa10 é Asp; Xaa11 é Asp; Xaa13 pode ser Pro ou Arg; Xaa15 é Arg; Xaa16 pode ser Ala ou Gly; Xaa17 é Ala; Xaa18 é His; Xaa19 é Pro; Xaa21 é Trp; Xaa31 é Glu; Xaa32 é Glu; Xaa34 pode ser Ile ou Ser; Xaa35 é Tyr; e Xaa39 é Gly.

Também englobado dentro do escopo da presente invenção são peptídeos que compreendem partes dos polipeptídeos aqui descritos. Por exemplo, polipeptídeos que poderiam incluir domínios de ligação de epítomos de calicreína específicos. Tais fragmentos dos polipeptídeos aqui descritos também seriam abrangidos.

Os polipeptídeos KI úteis nos métodos e composições descritos aqui compreendem um domínio Kunitz. Um subconjunto das sequências abrangidos pela SEQ ID N°: 1 são descritos pela seguinte (onde não é indicado "Xaa" refere-se ao mesmo conjunto de aminoácidos que são permitidos para a SEQ ID N°: 1):

**Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16  
Xaa17 Xaa18 Xaa19 Arg Xaa21 Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Xaa31  
Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu  
Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO:33).**

**Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro  
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu  
Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp  
(amino acids 3-60 of SEQ ID NO:2),**

**Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala Asn His Leu  
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys  
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg  
Asp (SEQ ID NO:4),**

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln  
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Thr Tyr Gly Gly Cys  
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg  
Asp (SEQ ID NO:5),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln  
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Gln Phe Thr Tyr Gly Gly Cys  
Ala Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg  
Asp (SEQ ID NO:6),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Ser Leu Pro  
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Gly  
Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp  
(SEQ ID NO:7),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln  
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys  
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg  
Asp (SEQ ID NO:8),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Gly Ala His Leu  
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu  
Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp  
(SEQ ID NO:9),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Arg Cys Lys Gly Ala His Leu  
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu  
Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp  
(SEQ ID NO:10),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Gly Gly Arg Cys Arg Gly Ala His Pro  
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys  
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg  
Asp (SEQ ID NO:11),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro  
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys  
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg  
Asp (SEQ ID NO:12),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Val Gly Arg Cys Arg Gly Ala His Pro  
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys  
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg  
Asp (SEQ ID NO:13),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Val Gly Arg Cys Arg Gly Ala Gln Pro  
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys  
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg  
Asp (SEQ ID NO:14),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Ser Cys Arg Ala Ala His Leu  
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys  
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg  
Asp (SEQ ID NO:15),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Glu Gly Gly Ser Cys Arg Ala Ala His Gln  
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys  
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg  
Asp (SEQ ID NO:16),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Gly Ala His Leu  
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys  
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg  
Asp (SEQ ID NO:17),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Arg Gly Ala Leu Pro  
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys  
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg  
Asp (SEQ ID NO:18),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Ser Gly Asn Cys Arg Gly Asn Leu Pro  
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys  
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg  
Asp (SEQ ID NO:19),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Ser Gly Arg Cys Arg Gly Asn His Gln  
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys  
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg  
Asp (SEQ ID NO:20),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Gly Gly Arg Cys Arg Ala Ile Gln Pro  
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys  
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg  
Asp (SEQ ID NO:21),

**Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Arg Cys Arg Gly Ala His Pro  
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys  
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg  
Asp (SEQ ID NO:22).**

As FIGS. 3A e 3B fornecem um alinhamento de sequências de aminoácidos destas sequências, a sequência LACI nativa a partir da qual estas variantes foram derivadas (SEQ ID N°: 32), e outros domínios Kunitz conhecidos (SEQ ID N°s: 29-31 e 33-53).

Os polipeptídeos KI úteis nos métodos e composições descritos neste documento, incluindo os polipeptídeos KI da presente invenção, podem ser feitos de forma sintética, usando qualquer protocolo padrão de síntese de polipeptídeos e equipamentos. Por exemplo, a síntese progressiva de um polipeptídeo KI descrita aqui pode ser realizada através da remoção de um grupo protetor terminal amino (N), a partir de um aminoácido inicial (ie, carboxi-terminal), e o seu acoplamento com a extremidade carboxilo do próximo aminoácido na sequência do polipeptídeo. Este aminoácido é também adequadamente protegido. O grupo carboxil do aminoácido de entrada pode ser ativado para reagir com o N-terminal do aminoácido ligado pela formação num grupo reativo como a formação numa carbodiimida, um anidrido simétrico, ou um grupo "ativo de éster" como o hydroxibenzotriazole ou ésteres pentafluorofenyl. Métodos de síntese de peptídeos em fase sólida preferidos incluem o método BOC, que utiliza tert-butiloxicarbonil como grupo de proteção de  $\alpha$ -amino, e o método FMOC, que utiliza 9-fluorenilmetloxycarbonil para proteger o  $\alpha$ -amino dos resíduos de aminoácidos. Ambos os métodos são bem conhecidos pelos peritos na técnica (Stewart, J. and Young,

J., Solid-Phase Peptide Synthesis (W.H. Freeman Co., San Francisco 1989); Merrifield, J., 1963. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154; Bodanszky, M. e Bodanszky, A., The Practice of Peptide Synthesis (Springer-Verlag, New York 1984). Se desejar, terminal amino e/ou carboxi adicionais de aminoácidos podem ser concebidos para a sequência de aminoácidos e acrescentados durante a síntese de polipeptídeos.

Alternativamente, os polipeptídeos de domínio Kunitz e polipeptídeos KI úteis nas composições e métodos da presente invenção podem ser produzidos por métodos recombinantes utilizando qualquer de um número de células e vetores de expressão correspondente, incluindo mas não limitado a vetores de expressão bacteriana, vetores de expressão de levedura, vetores de expressão de baculovírus, vetores de expressão viral de mamíferos, e assim por diante. Os polipeptídeos de domínio Kunitz e polipeptídeos KI úteis nas composições e métodos da presente invenção também podem ser produzidos transgenicamente usando moléculas de ácido nucleico compreendendo uma sequência de codificação para um domínio Kunitz ou polipeptídeo KI aqui descrito, em que a molécula de ácido nucleico pode ser integrada e expressa a partir do genoma de um animal hospedeiro através de métodos transgênicos disponíveis na técnica. Em alguns casos, pode ser necessário ou vantajoso fundir a sequência de codificação para um polipeptídeo de domínio Kunitz ou um polipeptídeo KI compreendendo o domínio Kunitz para outra sequência de codificação num vetor de expressão para formar um polipeptídeo de fusão que é facilmente expresso numa célula hospedeira. De preferência, a célula hospedeira que expressa tal polipeptídeo de fusão também processa o polipeptídeo de

fusão para produzir um domínio Kunitz ou um polipeptídeo KI úteis na presente invenção, que contém apenas a sequência de aminoácido desejada. Obviamente, se qualquer outro aminoácido (s), continuar ligado ao domínio Kunitz expresso ou polipeptídeo KI, tal aminoácido (s) adicional não deve diminuir a ligação de calicreína e/ou a atividade inibitória da calicreína do domínio Kunitz ou polipeptídeo KI de modo a impedir o uso do polipeptídeo nos métodos ou composições da presente invenção.

Um sistema de expressão recombinante preferido para a produção de polipeptídeos KI úteis nos métodos e composições aqui descritos é um vetor de expressão de levedura, que permite que uma sequência de ácido nucleico codificando a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo KI ou polipeptídeo de domínio Kunitz a ser ligado no mesmo quadro de leitura com uma sequência de nucleotídeos codificando a sequência de peptídeo líder mat $\alpha$  prepro de *Saccharomyces cerevisiae*, que por sua vez está sob o controle de um promotor de levedura operacional. O plasmídeo de expressão de levedura recombinante resultante pode então ser transformado por métodos padrão nas células de um hospedeiro de levedura apropriado e compatível, cujas células são capazes de expressar a proteína recombinante a partir da expressão do vetor de levedura recombinante. De preferência, uma célula de levedura hospedeira transformada com tal vetor de expressão recombinante também é capaz de processar a proteína de fusão para fornecer um polipeptídeo KI ativo útil nos métodos e composições da presente invenção. Uma levedura hospedeira preferida para a produção de polipeptídeos recombinantes de domínio Kunitz e polipeptídeos KI compreendendo tais domínios Kunitz é a *Pichia pastoris*.



Como mencionado acima, os polipeptídeos KI que são úteis em métodos e composições descritos neste documento podem incluir um polipeptídeo de domínio Kunitz aqui descrito. Alguns polipeptídeos KI podem incluir uma sequência de acompanhamento adicional, de preferência de 1-6 aminoácidos de comprimento, na extremidade amino e/ou carboxi terminal, desde que esse aminoácidos adicionais não diminuam significativamente a afinidade de ligação da calicreína ou atividade de inibição da calicreína, de modo a impedir o uso nos métodos e composições descritos neste documento. Tais aminoácidos adicionais podem ser deliberadamente adicionados para expressar um polipeptídeo KI numa célula hospedeira recombinante especial ou podem ser adicionados para fornecer uma função adicional, por exemplo, para fornecer um peptídeo para ligar o polipeptídeo KI a outra molécula ou para fornecer uma porção de afinidade que facilita a purificação do polipeptídeo. De preferência, o aminoácido adicional (s) não inclui cisteína, o que poderia interferir com as pontes dissulfeto do domínio Kunitz.

Um exemplo de um polipeptídeo de domínio Kunitz preferido útil nos métodos e composições da presente invenção, e que é um polipeptídeo da presente invenção, tem a sequência de resíduos de aminoácidos 30-60 da SEQ ID N°: 2. Quando expressos e processados num sistema de expressão de levedura de proteína de fusão (por exemplo, com base na expressão integrante do plasmídeo pHIL-D2), um tal polipeptídeo de domínio Kunitz retém um terminal amino adicional de dipeptídeo Glu-Ala a partir da fusão com a sequência de peptídeo líder  $\alpha$  prepro de *S. cerevisiae*. Quando segregado da célula de levedura hospedeira, a maioria do peptídeo líder é processado a partir da proteína

de fusão para produzir um polipeptídeo KI funcional (aqui referido como "PEP-1") com a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 2 (ver região retangular na FIG. 2).

Polipeptídeos KI particularmente preferidos úteis nos métodos e composições descritos neste documento têm uma afinidade de ligação para a calicreína que é da ordem de 1000 vezes maior do que a aprotinina, que está atualmente aprovada para uso em procedimentos CABG para reduzir a perda de sangue. As afinidades ligação de polipeptídeos KI surpreendentemente elevadas como aqui descritas indicam que tais polipeptídeos KI apresentam um alto grau de especificidade para a calicreína com a exclusão de outros alvos moleculares (ver Tabela 1, abaixo). Assim, a utilização de tais polipeptídeos de acordo com a presente invenção reduz grande parte da especulação sobre os possíveis alvos terapêuticos num paciente. O menor grau de especificidade exibida, por exemplo, pela aprotinina, leva a possíveis efeitos colaterais pleiotrópicos e ambiguidade quanto ao seu mecanismo terapêutico.

Os polipeptídeos definidos, por exemplo, na SEQ ID N°: 1 contêm posições invariantes, por exemplo, as posições 5, 14, 30, 51 e 55 pode ser apenas Cys. Outras posições, como, por exemplo, as posições 6, 7, 8, 9, 20, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 41, 42, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 53 e 54 podem ser qualquer aminoácido (incluindo aminoácidos de ocorrência não natural). Numa modalidade particularmente preferida, um ou mais aminoácidos correspondem a uma sequência nativa (por exemplo, SEQ ID N°: 32, ver Fig. 3). Numa modalidade preferida, pelo menos uma posição variável é diferente daquela da sequência nativa. Em ainda outra

modalidade preferida, os aminoácidos podem ser cada um individual ou coletivamente substituídos por uma substituição do aminoácido conservadora ou não conservadora. Substituições de aminoácidos conservadoras substituem um aminoácido por outro aminoácido de estrutura química semelhante e podem não ter nenhum efeito sobre a função da proteína. Substituições de aminoácidos não conservadoras substituem um aminoácido por outro aminoácido da estrutura química diferente. Exemplos de substituições conservadoras de aminoácidos incluem, por exemplo, Asn->Asp, Arg->Lys e Ser->Thr. Numa modalidade preferida, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 e/ou 21 destes aminoácidos pode ser independente ou coletivamente, em qualquer combinação, selecionados para corresponder à posição correspondente da SEQ ID N°: 2.

Outras posições, por exemplo, as posições 10, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 31, 32, 34, 35, 39, 40, 43 e 45, podem ser qualquer de um conjunto selecionado de aminoácidos. Assim, a SEQ ID N°: 1 define um conjunto de sequências possíveis. Cada membro desse conjunto contém, por exemplo, uma cisteína nas posições 5, 14, 30, 51 e 55, e qualquer um de um conjunto específico de aminoácidos nas posições 10, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 221, 22, 23, 31, 32, 34, 35, 39, 40, 43 e 45. Numa modalidade preferida, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e/ou 19 destes aminoácidos pode ser independentemente ou coletivamente, em qualquer combinação, selecionados para corresponder à posição correspondente da SEQ ID N°: 2. O peptídeo tem de preferência pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% de identidade da SEQ ID N°: 2.

## *Métodos e composições*

A presente invenção é também dirigida a métodos para prevenir ou reduzir a isquemia. Preferidos são os métodos para prevenir ou reduzir a perda de sangue peri-operatória e/ou uma resposta inflamatória sistêmica (SIR) num paciente, especialmente associados com a cirurgia cardiotorácica. Um método para o tratamento envolve a administração de um polipeptídeo KI compreendendo um domínio Kunitz. Uma modalidade do método envolve o uso de um peptídeo contendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 1, que tem uma afinidade para calicreína que é aproximadamente 1000 vezes ou mais superior ao de uma ampla gama de serina protease, por exemplo, a aprotinina, que é isolado do pulmão bovino e atualmente aprovada para uso em procedimentos CABG (TRASYLOL®, Bayer Corporation Pharmaceutical Division, West Haven, Connecticut).

Os pacientes submetidos a qualquer de uma série de procedimentos cirúrgicos, especialmente aqueles envolvendo circulação extracorpórea, por exemplo cirurgia cardiotorácica, como, por exemplo, a CPB e/ou trauma ósseo, como a divisão do esterno ou substituição da anca, estão em risco de perda de sangue peri-operatória e inflamação. O contato do sangue de um paciente com as superfícies de corte do osso ou equipamentos de CPB é suficiente para ativar uma ou várias respostas em cascata indesejáveis, incluindo um sistema de ativação de contato (CAS), que pode levar à perda de sangue peri-operatório extensa necessitando de transfusão de sangue imediata, bem como uma resposta inflamatória sistêmica (SIR), que, por sua vez, pode resultar em danos permanentes nos tecidos e órgãos. Embora não desejando ser limitado a qualquer mecanismo

específico ou teoria, parece que a perda de sangue que ocorre associada à cirurgia cardiotorácica, por exemplo, a CPB, como num procedimento CABG, provavelmente resulta de extravasamento capilar extenso, que pode resultar em perda significativa de sangue que deve ser substituído por transfusão de sangue imediata.

Os métodos descritos aqui são úteis para prevenir ou reduzir isquemias diversas, incluindo, por exemplo, perda de sangue peri-operatório e SIR num paciente submetido a um procedimento cirúrgico, e, especialmente, em que o procedimento cirúrgico requer circulação extracorpórea, por exemplo, cirurgia cardiotorácica, como, por exemplo, CPB. Os métodos da presente invenção são particularmente úteis para prevenir ou reduzir a perda de sangue peri-operatória e/ou SIR num paciente submetido a um procedimento CABG exigindo CPB, ou outras cirurgias cardíacas.

Composições preferidas para uso médico compreendem um polipeptídeo KI aqui descrito. Tais composições úteis podem ainda compreender um ou mais tampões farmacologicamente aceitáveis, transportadores e excipientes, que podem proporcionar uma característica desejável à composição, incluindo, mas não limitado a, administração melhorada da composição a um paciente, reforço da circulação de meia-vida do polipeptídeo KI da composição, compatibilidade melhorada da composição com a química do sangue do paciente, melhor armazenamento da composição, e/ou eficácia melhorada da composição para a administração a um paciente. Além de um polipeptídeo KI descrito aqui, as composições podem ainda compreender um ou mais outros compostos farmacologicamente ativos que proporcionam um benefício

profilático ou terapêutico adicional a um paciente sujeito a um procedimento cirúrgico invasivo.

Composições úteis nos métodos da presente invenção compreendem qualquer um dos polipeptídeos de domínio Kunitz ou polipeptídeos KI compreendendo tais polipeptídeos de domínio Kunitz aqui descritos. Particularmente preferidos são os polipeptídeos KI compreendendo um polipeptídeo de domínio Kunitz tendo uma sequência de aminoácido 58 de aminoácidos 30-60 da SEQ ID N°: 2. Um exemplo de um tal polipeptídeo KI particularmente preferido útil nos métodos e composições da presente invenção, e que é um polipeptídeo KI da presente invenção, é o polipeptídeo KI PEP-1 tendo a sequência de aminoácido 60 da SEQ ID N°: 2. A sequência de nucleotídeos codificando a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 2 é fornecida na SEQ ID N°: 3 (ver, por exemplo, nucleotídeos 309-488 na FIG 2.). Entende-se que, com base no código genético conhecido, a presente invenção também fornece formas degeneradas da sequência de nucleotídeos da SEQ ID N°: 3 simplesmente substituindo um ou mais dos códons degenerados conhecidos para cada aminoácido codificado pela sequência de nucleotídeos. Os nucleotídeos 7-180 da SEQ ID N°: 3, e suas formas degeneradas, codificam polipeptídeo de domínio Kunitz de ocorrência não-natural tendo a sequência de aminoácido 58 de aminoácidos 30-60 da SEQ ID N°: 2.

Qualquer de uma variedade de moléculas de ácido nucleico pode compreender a sequência de nucleotídeos de nucleotídeos 7-180 da SEQ ID N°: 3, formas degeneradas, e partes dele, incluindo mas não limitado a, genomas fago recombinantes, vetores mamíferos virais recombinantes,

vetores de insetos virais recombinantes, mini-cromossomas de levedura, e vários plasmídeos. Tais plasmídeos incluem aqueles usados para clonar e/ou expressar tais sequências de codificação de nucleotídeos. Vetores de expressão fornecem um promotor, que pode ser operacionalmente ligado a uma determinada sequência de nucleotídeos e uma célula hospedeira apropriada, que é capaz de transcrever a sequência de codificação de nucleotídeos específica num ARN mensageiro funcional (mARN) e também traduzir o mARN no polipeptídeo correspondente. Um polipeptídeo assim produzido pode ser isolado da célula hospedeira. Moléculas de ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificando um domínio Kunitz ou um polipeptídeo KI descrito aqui podem ser feitas por métodos padrão de síntese de ácido nucleico, metodologias de ADN recombinante, métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR), e suas combinações.

#### *Perda de sangue peri-operatória e redução do fluxo sanguíneo do coração*

Devido a muitos avanços na medicina, uma série de procedimentos cirúrgicos altamente invasivos são realizadas a cada dia e resultam em perda de sangue, ou colocam os pacientes em alto risco de perda de sangue. Tais pacientes devem ser cuidadosamente monitorizados para restaurar e manter o suprimento de sangue normal e a hemostasia, podendo precisar de transfusões de sangue. Procedimentos cirúrgicos que envolvem perda de sangue incluem os que envolvem métodos de circulação extracorpórea, como a cirurgia cardiotorácica, por exemplo, a CPB. Em tais métodos, o coração de um paciente é interrompido e a circulação, oxigenação e manutenção do volume de sangue são

realizadas artificialmente usando um circuito extra-corpóreo e um oxigenador de membrana sintética. Estas técnicas são comumente usados durante a cirurgia cardíaca. Além disso, é evidente que a cirurgia envolvendo trauma extenso do osso, como a divisão esternal necessária em CABG ou procedimentos de substituição da anca, também está associada com a ativação do CAS, que pode resultar numa variedade de distúrbios no sangue e vasculatura.

A doença coronária aterosclerótica (CAD) causa um estreitamento do lúmen de uma ou várias das artérias coronárias; o que limita o fluxo de sangue para o miocárdio (ou seja, o músculo do coração) e pode causar angina, insuficiência cardíaca, e infartos do miocárdio. Na fase final da aterosclerose da artéria coronária, a circulação coronária pode ser quase completamente obstruída, causando angina COM risco de vida ou insuficiência cardíaca, com uma mortalidade muito alta. Os procedimentos CABG podem ser necessários para fazer a ponte com o vaso sanguíneo obstruído e restaurar sangue para o coração; estes são potencialmente salvadores da vida. Os procedimentos CABG estão entre as cirurgias mais invasivas em que uma ou mais veias ou artérias saudáveis são implantadas para fornecer um "bypass" em torno da área obstruída do vaso doente. Os procedimentos CABG carregam com eles um risco peri-operatório pequeno, mas importante, mas são muito bem sucedidos em fornecer aos pacientes um alívio imediato da mortalidade e morbidade da doença cardiovascular aterosclerótica. Apesar destes resultados muito animadores, a repetição dos procedimentos CABG é frequentemente necessária, como indicado por um claro aumento do número de pacientes que são, eventualmente, submetidos a um segundo e mesmo terceiro procedimento; a mortalidade peri-operatória



e morbidade observada em procedimentos de CABG primários aumenta nesses procedimentos repetidos.

Tem havido melhorias em técnicas cirúrgicas minimamente invasivas para CAD não complicada. No entanto, quase todos os procedimentos CABG realizados para doença cardíaca valvular e/ou congênita, transplante cardíaco, e grande procedimentos aórticos, ainda são realizadas em pacientes apoiados por CPB. Na CPB, cânulas grandes são inseridas nos grandes vasos de um paciente para permitir o bombeamento mecânico e a oxigenação do sangue através de um oxigenador de membrana. O sangue é devolvido ao paciente sem fluir através dos pulmões, que são hipo-perfundidos durante este procedimento. O coração é parado usando uma solução cardioplégica, o paciente é arrefecido para ajudar a prevenir danos cerebrais, e o volume de circulação periférica aumentado por um circuito extracorpóreo, ou seja, o circuito CPB, o que requer "priming" com o sangue do doador e misturas salina usadas para preencher o circuito extracorpóreo. A CPB tem sido amplamente utilizada numa variedade de procedimentos realizados durante quase meio século, com resultados de sucesso. A interação entre superfícies artificiais, células do sangue, proteínas do sangue, endotélio vascular danificado, e os tecidos extravasculares, tais como os ossos, perturba a hemostasia e frequentemente ativa o CAS, que, como mencionado acima, pode resultar numa variedade de distúrbios no sangue e vasculatura. Essas perturbações levam ao excesso de sangramento peri-operatório, que então exige transfusão de sangue imediata. Uma consequência da circulação de sangue total por meio de um circuito extracorpóreo em CPB pode também incluir a resposta inflamatória sistêmica (SIR), que é iniciada pela ativação de contato de sistemas de

coagulação e do complemento. De facto, grande parte da morbidade e mortalidade associada a procedimentos cirúrgicos de CPB aparentemente mecanicamente bem sucedidos é o resultado dos efeitos da ativação da coagulação, a fibrinólise, ou sistemas de complemento. Esta ativação pode danificar o sistema pulmonar, levando à síndrome da angústia respiratória do adulto (ARDS), comprometimento dos rins e da circulação esplâncnica e a indução de uma coagulopatia geral levando à perda de sangue e à necessidade de transfusões. Além dos perigos de perda de sangue peri-operatório, patologias adicionais associados com SIR incluem deficits neurocognitivos, acidente vascular cerebral, insuficiência renal, infarto agudo do miocárdio, e danos no tecido cardíaco.

As transfusões de sangue também apresentam um risco significativo de infecção e elevam o custo de CABG ou outros processos semelhantes que exigem CPB. Na ausência de qualquer intervenção farmacológica, três a sete unidades de sangue devem normalmente ser gastas num paciente, mesmo com excelentes técnicas cirúrgicas. Assim, há um incentivo considerável para o desenvolvimento de novos e melhorados compostos farmacologicamente eficazes para reduzir ou prevenir o sangramento peri-operatório e SIR em pacientes submetidos a procedimentos de CPB e CABG.

#### *Considerações sobre a administração e dosagem de polipeptídeos KI*

Os polipeptídeos KI aqui descritos podem ser administradas a um paciente antes, durante e/ou após um procedimento cirúrgico numa composição farmacêuticamente aceitável. O

termo composição "farmaceuticamente aceitável" refere-se a um transportador não tóxico ou excipiente que pode ser administrado a um paciente, juntamente com um composto desta invenção, e em que o transportador ou excipiente não destrói a atividade biológica ou farmacológica da composição. Os polipeptídeos KI aqui descritos podem ser administrados localmente ou sistemicamente por qualquer meio adequado para a entrega de uma quantidade de polipeptídeos KI inibidores da calicreína a um paciente, incluindo mas não limitado a administrações sistêmicas, como, por exemplo, por via intravenosa e inalação. A administração parenteral é particularmente preferida.

Para a administração parenteral, os polipeptídeos podem ser injetados por via intravenosa, via intramuscular, intraperitoneal ou subcutânea. A administração intravenosa é preferida. Tipicamente, as composições para administração intravenosa são soluções em tampão isotônico estéril aquoso. Outros transportadores farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados a, água estéril, solução salina e solução salina tamponada (incluindo tampões como o fosfato ou o acetato), álcool, óleos vegetais, glicóis de polietileno, gelatina, lactose, amilose, estearato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina, etc. Sempre que necessário, a composição pode também incluir um agente de solubilização e um anestésico local como a lidocaína para aliviar a dor no local da injeção, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sais, lubrificantes, etc., desde que não reajam deletariamente com os compostos ativos. Da mesma forma, a composição pode compreender excipientes convencionais, por exemplo, substâncias transportadoras orgânicas ou inorgânicas farmaceuticamente aceitáveis adequadas para a aplicação

parenteral, enteral ou intranasal que não reajam deleteriammente com os compostos ativos. Geralmente, os ingredientes serão fornecidos separadamente ou misturados em forma de unidade de dosagem, por exemplo, como um pó seco liofilizado ou água livre concentrada num recipiente hermeticamente fechado, como uma ampola ou embalagem indicando a quantidade de agente ativo em unidades de atividade. Quando a composição seja para ser administrada por infusão, pode ser dispensada com uma garrafa de infusão contendo "água para injeção" farmacêutica estéril ou salina. Quando a composição seja para ser administrada por injeção, pode ser fornecida uma ampola de água estéril para injeção ou solução salina para que os ingredientes possam ser misturados antes da administração.

De preferência, os métodos da presente invenção compreendem a administração de um polipeptídeo KI a um paciente como uma perfusão intravenosa de acordo com qualquer procedimento aprovado. Assim, um polipeptídeo IC aqui descrito pode ser administrado a um paciente submetido a um procedimento CABG nos momentos semelhantes aos usados atualmente em protocolos aprovados para administrar aprotinina e numa quantidade necessária para fornecer ao paciente um número necessário ou uma concentração de unidades inibidoras da calicreína (KIU). De acordo com a invenção, um polipeptídeo KI aqui descrito também pode ser administrado a um paciente no período pós-operatório imediato, quando as anormalidades de sangramento podem ocorrer como consequência de efeitos a jusante do SIR. Por exemplo, num procedimento que envolve CPB, um polipeptídeo KI aqui descrito pode ser administrado a um paciente como uma dose de carga inicial, por exemplo, uma quantidade eficaz ao longo de um tempo conveniente, tais como 10

minutos, antes da indução da anestesia. Então, na indução da anestesia, pode ser injetada uma segunda dose de polipeptídeo KI no fluido "priming" CPB ("volume de bomba primário"). O paciente pode então ser colocado numa dose de infusão contínua e controlada por via intravenosa durante a duração do procedimento cirúrgico, e após o procedimento, se indicado.

Atualmente, existem dois regimes aprovados nos Estados Unidos para administrar a aprotinina num paciente submetido a um procedimento CABG (ver, rótulo do produto e literatura inclusa do TRASYLOL®, Bayer Corporation Pharmaceutical Division, West Haven, Connecticut). Em tal regime aprovado é usada uma dose intravenosa de 2 milhões KIU, 2 milhões KIU no volume da bomba principal, e 500 mil KIU por hora de cirurgia. Outro regime aprovado usa uma dose intravenosa de 1 milhão KIU, 1 milhão de KIU no volume da bomba principal, e 250 mil KIU por hora de cirurgia. Como estes regimes são baseados em KIU, os regimes são facilmente adaptados a qualquer polipeptídeo KI aqui descrito uma vez que a atividade específica e KIU de um polipeptídeo KI em particular tenha sido determinados por ensaios padrão. Devido à afinidade de ligação melhorada e à atividade inibitória em polipeptídeos KI representativos aqui descritos em relação à aprotinina, espera-se que tais composições e métodos da presente invenção sejam suscetíveis de exigir menos miligramas (mg) por paciente para fornecer a um paciente o número exigido ou concentração de KIU.

Várias considerações a respeito da dosagem com um polipeptídeo KI em métodos da invenção podem ser ilustradas

por meio de exemplo com o polipeptídeo PEP-1 KI representativo da invenção tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 2 (peso molecular de 7.054 Daltons).

A Tabela 1, abaixo, apresenta uma comparação da afinidade ( $K_{i,app}$ ) do polipeptídeo PEP-1 KI para a calicreína e onze outras proteases plasmáticas conhecidas.

**Tabela 1**

Substrato de Protease	PEP-1 $K_{i,app}$ (pM)	Aprotinina $K_{i,app}$ (pM)
calicreína plasmática humana	44	$3,0 \times 10^4$
calicreína da urina humana	$>1 \times 10^8$	$4 \times 10^3$
calicreína pancreática suína	$2,7 \times 10^7$	550
Clr humano, ativado	$>2,0 \times 10^8$	$>1,0 \times 10^7$
Cls humano, ativado	$>2,0 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^8$
Plasma humano fator XIa	$1,0 \times 10^4$	ND
Plasma humano fator XIIa	$>2,0 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^8$
Plasmina humana	$1,4 \times 10^5$	894
Tripsina pancreática humana	$>2 \times 10^7$	ND
Quimotripsina pancreática humana	$>2,0 \times 10^7$	$7,3 \times 10^5$
Neutrófilo elastase humano	$>2,0 \times 10^7$	$1,7 \times 10^6$
Trombina plasmática humana	$>2,0 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^8$
ND - não determinado		

Claramente, o polipeptídeo PEP-1 KI é altamente específico para a calicreína plasmática humana. Além disso, a afinidade ( $K_{i,app}$ ) do PEP-1 para a calicreína é 1000 vezes maior do que a afinidade da aprotinina para a calicreína: o  $K_{i,app}$  do PEP-1 para a calicreína é cerca de 44 pM (Tabela 1), enquanto o  $K_{i,app}$  da aprotinina para a calicreína é de

30000 pM. Assim, uma dose de PEP-1 poderia ser aproximadamente 1000 vezes menor do que a utilizada para a aprotinina numa base molar. No entanto, a consideração de vários outros fatores podem fornecer uma estimativa mais precisa da dose de PEP-1 necessária na prática. Tais fatores incluem a quantidade de calicreína ativada durante a CPB num paciente em particular, a concentração de calicreína necessária para obter uma SIR, e a biodisponibilidade e distribuição farmacológica do PEP-1 num paciente. No entanto, o uso de um polipeptídeo KI em métodos de acordo com a presente invenção e fornecidos em doses atualmente aprovadas para o uso da aprotinina ainda é esperado fornecer melhorias significativas sobre o uso atual da menos específica e de menor afinidade, aprotinina bovina.

Por exemplo, a quantidade total de circulação de pré-calicreína no plasma é estimada em cerca de 500 nM (Silverberg, M. et al, "The contact System and Its Disorders", em Blood: Principles and Practice of Hematology, Handin, R. et al., eds., JB Lippincott Co., Filadélfia, 1995). Se toda a pré-calicreína for ativada, então seria necessário pelo menos 500 nM de PEP-1 para uma inibição estequiométrica da calicreína. Um indivíduo que tem 5 litros de plasma exigiria, portanto, cerca de 18 mg de PEP-1 para atingir uma concentração plasmática de 500 nM.

Outro fator a considerar é o limiar de concentração de calicreína necessário para induzir uma SIR num paciente. Se a concentração de calicreína ativa deve ser mantida abaixo, por exemplo, de 1 nM, em seguida, devido à sua elevada

afinidade para a calicreína, o PEP-1 oferece uma vantagem significativa sobre a aprotinina na quantidade de proteína que seria necessária para inibir a SIR. Em particular, uma concentração de PEP-1 de 1 nM inibiria 99,6% da calicreína presente no 1 nM (ou seja, somente 0,4 pM de calicreína livre ficaria no sangue), enquanto uma concentração de 1 nM aprotinina só inibe a 24,5% do calicreína presente no 1 nM. Para a aprotinina inibir 99% da calicreína em 1 nM, é necessário uma concentração de aprotinina no plasma de pelo menos 3 M (ou seja, uma concentração 3000 vezes superior ao PEP-1).

Para um paciente submetido a CPB, uma dose inicial clínica de PEP-1 pode ser estimada a partir de um esquema terapêutico recomendado de aprotinina ( $1 \times 10^6$  KIU) mencionado acima. A aprotinina é relatada na literatura inclusive como tendo atividade inibitória específica de 7143 KIU/mg determinada usando um ensaio de pressão sanguínea num cão. Portanto,  $1 \times 10^6$  KIU de aprotinina é equivalente a 140 mg de aprotinina (isto é,  $1 \times 10^6$  KIU/7143 KIU/mg = 140 mg de aprotinina). Num paciente tendo um volume de plasma sanguíneo de 5 litros, 140 mg corresponde a aproximadamente 4,3  $\mu$ M aprotinina (o peso molecular da aprotinina é de 6512 Daltons). A atividade específica de aprotinina no ensaio padrão de inibição utilizado para PEP-1 é de 0,4 KIU/mg de polipeptídeo. A dose de 140 mg corresponderia a uma dose de carga de aprotinina de 56 KIU ( $140 \text{ mg} \times 0,4 \text{ KIU/mg} = 56 \text{ KIU}$ ). Em contraste, uma vez que a atividade específica do polipeptídeo PEP-1 KI é de 10 KIU/mg no ensaio de inibição padrão, uma dose de apenas 5,6 mg de PEP-1 seria obrigada a fornecer o número de KIUs equivalente a 140 mg de aprotinina. Num paciente com um volume de plasma de 5 litros, o que corresponde a cerca de



160 nM de PEP-1 (peso molecular do PEP-1 é de 7054 Daltons), apesar de uma dose mais elevada do polipeptídeo KI PEP-1 pode ser necessário se toda a calicreína plasmática (500 nM) for ativada e/ou se este polipeptídeo KI for mal distribuída num paciente.

Além disso, os polipeptídeos KI podem ser de ocorrência não-natural, e podem ser produzidos sinteticamente ou de forma recombinante, como indicado acima, evitando assim a possível contaminação de doenças transmissíveis que podem surgir durante o isolamento de uma proteína de uma fonte animal natural, tais como no caso de aprotinina, que é isolada do pulmão bovino. Cada vez mais importante para a aceitação pública de um tratamento ou composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo é a prevenção da possível contaminação com e a transmissão para pacientes humanos de vários agentes patológicos. De particular interesse para a segurança das proteínas isoladas a partir de um tecido bovino é a eliminação dos possíveis riscos de exposição a doenças mediadas virais, doenças mediadas bacterianas, e, especialmente, encefalopatia espongiforme bovina.

Como variantes do domínio Kunitz 1 da proteína LACI humana, são esperados menos efeitos colaterais ao administrar os polipeptídeos KI aos pacientes do que a aprotinina, que é uma proteína bovina que é documentada, causar reações anafiláticas e anafilactóides em pacientes, especialmente nas administrações repetidas, como os procedimentos CABG repetidos. Além disso, a ligação altamente específica dos polipeptídeos KI descritos aqui para a calicreína limitam ou eliminam efetivamente as tendências trombóticas

observadas com a aprotinina, e reduzem os problemas observados com a patência do enxerto após os procedimentos CABG.

A invenção será descrita mais adiante, com referência aos exemplos, não limitativos, a seguir.

## EXEMPLIFICAÇÃO

### Exemplo 1: Um polipeptídeo KI representativo

Um polipeptídeo KI de ocorrência não natural (PEP-1) útil nas composições e métodos da presente invenção foi identificado como um polipeptídeo que liga a calicreína exibido num fago recombinante de uma biblioteca de exibição de fago. O PEP-1 tem a seguinte sequência de aminoácido: Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID N°: 2). O peso molecular do PEP-1 é de 7054 Daltons.

A sequência de nucleotídeos (SEQ ID N°: 3) do ADN do fago recombinante que codifica a sequência de aminoácidos PEP-1 (aminoácidos 30-60 da SEQ ID N°: 2) foi isolada e sequenciada por métodos padrão determinados a partir do ADN do fago recombinante. O PEP-1 foi produzido em quantidades úteis para uma melhor caracterização como uma proteína recombinante em células de fenótipo hospedeiro His4 de um a estirpe de levedura *Pichia pastoris*.

## **Exemplo 2: Construção de um plasmídeo recombinante para expressar os polipeptídeos KI**

O plasmídeo inicial, pHIL-D2, é resistente à ampicilina e contém um alelo do tipo selvagem de His4 de *P. pastoris*. A sequência final de ADN compreendendo a sequência de codificação para a proteína de fusão mat $\alpha$  prepro-PEP-1 recombinante na expressão do plasmídeo pPIC-K503 é mostrado na FIG. 2. A sequência de ADN de Phil-D2 foi modificada para produzir pPIC-K503, como segue:

1. O sítio BstBI na região 3'AOX1 de pHIL-D2, localizado a jusante do gene His4, foi removido por digestão de restrição parcial, preenchimento, e ligação, alterando a sequência de TTCGAA (SEQ ID N°: 23) para TTCGCGAA (SEQ ID N° 24). Esta modificação foi feita para facilitar e direcionar a clonagem da cassette de expressão para o plasmídeo.

2. O sítio AatII tendo o gene bla localizado a jusante de His4 foi removido por digestão de restrição, preenchimento, e ligação, modificando a sequência de GACGTC (SEQ ID N°: 25) para GACGTACGTC (SEQ ID N°: 26). Esta modificação foi feita para facilitar a clonagem de cassetes de expressão tendo sítios AatII no plasmídeo. A codificação de ADN PEP-1 foi sintetizada com base na sequência de nucleotídeos do fago original de exibição da ligação da calicreína e consistiu em 450 pares de base (bp). A sequência final de ADN da inserção no plasmídeo Phil-D2 é ladeada por uma sequência 5'AOX1 e uma sequência 3'AOX1 (partes das quais são mostradas na FIG. 2) e codificam uma proteína de fusão compreendendo peptídeo de sinal mat $\alpha$  prepro de *S. cerevisiae* fundida com a sequência de codificação

estrutural para o polipeptídeo PEP-1 KI. O peptídeo de sinal foi adicionado para facilitar a secreção de PEP-1 a partir de células hospedeiras de levedura. Os oligonucleotídeos para formar a inserção foram sintetizados e obtidos comercialmente (Genesis Labs, The Woodlands, TX), e a inserção foi gerada pela reação em cadeia da polimerase (PCR). O ADN sintético ligado que codifica a proteína de fusão mat $\alpha$  prepro/PEP-1 foi em seguida incorporado por ligação no plasmídeo pHIL-D2 modificado entre os sítios *BstBI* e *EcoRI*.

Os produtos de ligação foram usados para transformar a estirpe *Escherichia coli* XL1 Blue. Um ensaio de PCR foi utilizado para exibir os transformantes de *E. coli* para a construção de plasmídeo desejada. O ADN a partir de extratos de células foi amplificado por PCR usando iniciadores contendo sequências 5'AOX1 e 3' AOX1 (ver acima e FIG. 2). Os produtos de PCR do número correto de pares de base foram sequenciados. Além disso, cerca de 20-50 pb em cada lado dos sítios de clonagem foram sequenciados, e foi obtida a sequência prevista. A sequência final de ADN da inserção no plasmídeo pHIL-D2 (para produzir o plasmídeo pPIC-K503) é mostrada na FIG. 2 juntamente com porções de acompanhamento das sequências 5' e 3'AOX1 e sequência de aminoácido correspondente da proteína de fusão que compreende o peptídeo de sinal mat $\alpha$  prepro de *S. cerevisiae* fundida com a sequência de codificação estrutural para o polipeptídeo PEP-1 KI. Um transformante com a construção de expressão de plasmídeo desejada, o plasmídeo pPIC-K503, foi selecionado para preparar linhas de células de levedura para a produção de rotina de PEP-1.

### **Exemplo 3: Fabricação de PEP-1 a partir da linha celular de levedura recombinante**

Esferoplastos de *P. pastoris* GS 115 tendo o fenótipo His4<sup>-</sup> foram transformados com a expressão do plasmídeo pPIC-K503 (acima) seguinte à linearização do plasmídeo no sítio *SacI* e recombinação homóloga do ADN plasmidial no hospedeiro locus 5' AOX1. O fenótipo da estirpe de produção é His4<sup>+</sup>. O plasmídeo inteiro foi inserido na sequência genómica 5'AOX1 da levedura.

Os isolados da transformação foram selecionados para o crescimento na ausência de histidina exógena com metanol como única fonte de carbono. Mais do que 95% dos transformantes mantiveram a capacidade do tipo selvagem para crescer com metanol como única fonte de carbono, demonstrando assim que o plasmídeo foi inserido no genoma do hospedeiro por recombinação homóloga, em vez de por transplantação. Estes transformantes não exigiam histidina exógenos para o crescimento, demonstrando assim que o plasmídeo tinha-se integrado no genoma do hospedeiro. As colónias selecionadas foram clonadas. Foram realizados estudos de expressão de pequenas culturas para identificar clones segregando os mais altos níveis de ativos PEP-1 no meio de cultura. Os níveis de secreção PEP-1 em soluções de cultura sobrenadante clarificadas foram quantificados para níveis de PEP-1 por eletroforese de sódio dodecil sulfato de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e avaliadas quanto à inibição da calicreína. Um clone de levedura foi selecionado para a produção de PEP-1 com base no seu alto nível de expressão de PEP-1 entre as culturas amostradas.

Os bancos de células principais e de trabalho de *P. pastoris* para a produção de PEP-1 foram preparados comercialmente (MDS Pharma Services, Bothell, Washington). A produção padrão de PEP-1 na levedura compreende três etapas da seguinte forma: (1) preparação da cultura de sementes, (2) de fermentação, e (3) recuperação da cultura.

A etapa de semente da cultura consistiu na inoculação de seis frascos (300 mL cada) contendo caldo de inóculo esterilizado (base de levedura de nitrogénio, fosfato, potássio e glicerol, pH = 5) com o conteúdo de um único frasco de um banco de células de trabalho *P. pastoris* produzindo PEP-1. Os frascos foram inoculados num agitador orbital (300 rpm) por cerca de 13 horas a  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

As fermentações foram realizadas num fermentador fechado Braun de 100 litros cheio de caldo estéril. Cada fermentação foi iniciada com a transferência do conteúdo dos seis frascos de cultura de semente para o fermentador. Após aproximadamente 24 horas, o glicerol no fermentador ficou exausto e foi adicionado glicerol durante aproximadamente 8 horas adicionais.

A fase de alimentação mista, que durou aproximadamente 83 horas, foi então iniciada pela adição de uma alimentação de glicerol e metanol. No final deste tempo, a fermentação terminou, e os conteúdos do fermentador foram diluídos com água purificada. A purificação e processamento de PEP-1 consistiu em cinco etapas da seguinte forma: (1) cromatografia de leito expandido (2), cromatografia de troca catiónica (3), cromatografia de interação hidrofóbica

(HIC), (4) ultrafiltração e diafiltração, e (5) filtração final e embalagem.

O passo inicial de purificação consistiu na cromatografia de leito expandido. A cultura fermentada foi aplicada à coluna equilibrada embalada com resina Streamline SP (Amersham Pharmacia Streamline, coluna cromatográfica 200, Amersham Pharmacia, Piscataway, New Jersey). A coluna foi então lavada (50 mM de ácido acético, pH = 3,0 - 3,5) num modo de fluxo para lavar as células de levedura do leito expandido. O adaptador superior foi levantado acima do leito expandido para melhorar a lavagem. O fluxo foi interrompido e o leito foi deixado em repouso. O adaptador foi movido para baixo de modo a ficar um pouco acima do leito instalado. A direção do fluxo foi invertida. O efluente foi recolhido. A lavagem foi continuada num modo de baixo usando 50 mM de acetato de sódio, pH 4.0. O efluente foi recolhido. O PEP-1 foi eluído da coluna utilizando 50 mM de acetato de sódio, pH 6,0. O eluato foi recolhido num recipiente de 50 litros. O eluato foi então filtrado por um filtro de 0,22 num recipiente limpo localizado no sítio de purificação. Amostras adicionais foram recolhidas para a determinação da concentração do PEP-1. Uma etapa de cromatografia de troca catiónica foi então realizada utilizando-se o eluído filtrado da coluna de leito expandido. PEP-1 foi eluído da coluna com 15 mM de citrato trissódico, pH 6.2.

As proteínas adicionais foram removidas da preparação de PEP-1 por cromatografia de interação hidrofóbica (HIC). Antes da HIC, o eluato da coluna de troca catiónica foi diluído com sulfato de amónio. O eluato foi aplicado à

coluna, e o PEP-1 foi eluído utilizando sulfato de amónio (0,572 M) em fosfato de potássio (100 mM), pH 7.0. O eluato foi recolhido em frações com base nos valores A280. Todas as frações foram recolhidas em frascos PETG estéreis, pré-pesados.

As frações selecionadas foram agrupadas num recipiente limpo. O tanque foi concentrado por ultrafiltração. A preparação de PEP-1 concentrado foi imediatamente diafiltrada contra dez volumes de PBS, pH 7.0.

A etapa final de filtração foi realizada antes da embalagem a fim de minimizar o número de organismos contaminantes no volume de PEP-1. A solução foi filtrada em bloco através de um filtro de 0,22 e recolhida num frasco PETG estéril, pré-pesado. Uma amostra foi retirada para testar a libertação dos lotes. O volume restante foi dispensado de forma asséptica em garrafas PETG estéreis e armazenado a -20°C.

#### **Exemplo 4: Teste de Inibição da calicreína.**

Um teste de cinética foi utilizado para medir a atividade inibitória dos polipeptídeos KI, tal como PEP-1. O ensaio cinético mede a fluorescência a seguir à clivagem da calicreína mediada de um substrato, a cumarina metil prolilfenilalanilarginil amino. Uma quantidade conhecida de calicreína foi incubada com uma série de polipeptídeo KI diluído como padrão de referência ou amostras de polipeptídeo KI em série diluídas, num tampão de reação adequado numa placa de microtitulação. Cada amostra foi executada em triplicado. A solução de substrato foi



adicionada, e a placa lida imediatamente, usando um comprimento de onda de excitação de 360 nm e um comprimento de onda de emissão de 460 nm. Pelo menos duas de cada uma das curvas padrão de referência e amostra foram obrigadas a ter um valor de R-quadrado de 0,95 para serem consideradas válidas.

Enquanto esta invenção foi particularmente apresentada e descrita com referências a modalidades preferidas, será entendido pelos peritos na técnica que várias mudanças na forma e detalhes podem ser feitas em se afastar do âmbito de aplicação da invenção abrangido pelas reivindicações em anexo.

## REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos:

**Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro  
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu  
Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp**

(aminoácidos 30-60 da SEQ ID N°: 2), em que o polipeptídeo inibe a calicreína plasmática.

2. Polipeptídeo da reivindicação 1, em que o polipeptídeo consiste na sequência de aminoácidos:

**Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro  
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu  
Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp**

(aminoácidos 30-60 da SEQ ID N°: 2).

3. Polipeptídeo da reivindicação 1, em que o polipeptídeo consiste na sequência de aminoácidos:

**Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala  
Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu  
Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu  
Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp**

(SEQ ID N°: 2).

4. Composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo da reivindicação 1 e um ou mais tampões farmacêuticamente aceitável, transportadores e excipientes.
5. Composição farmacêutica da reivindicação 4, em que o polipeptídeo consiste na sequência de aminoácidos:

**Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro  
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu  
Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp**

(aminoácidos 30-60 da SEQ ID N°: 2).

6. Composição farmacêutica da reivindicação 4, em que o polipeptídeo consiste na sequência de aminoácidos:

**Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala  
Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu  
Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu  
Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp**

(SEQ ID N°: 2).

7. Composição farmacêutica de qualquer das reivindicações 4 a 6, em que a composição é um pó liofilizado.
8. Composição farmacêutica de qualquer das reivindicações 4 a 6, em que a composição é formulada para administração subcutânea.
9. Recipiente contendo a composição farmacêutica de qualquer das reivindicações 4 a 8.
10. Recipiente da reivindicação 9, em que este é uma garrafa de infusão.
11. Molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica o polipeptídeo de qualquer das reivindicações 1 a 3.
12. Molécula de ácido nucleico da reivindicação 11, em que o a dita sequência de ácido nucleico codifica o polipeptídeo da reivindicação 3.

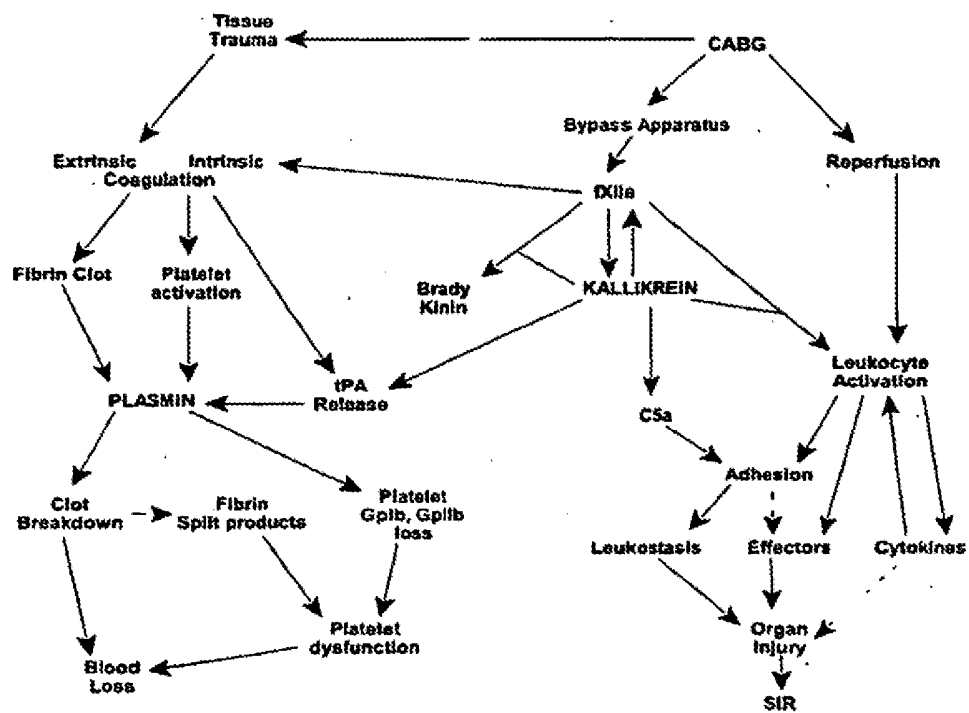


Figura 1

SAOXI

-----+-----

CG ACT TTT AAC GAC AAC TTG AGA AGA TCA AAA AAC AAC TAA TTA TTC GAA BstB I

ACG      ATG AGA TTC CCA TCT ATC TTC ACT GCT GTT TTG TTC GCT GCT

         M   R   F   P   S   I   F   T   A   V   L   F   A   A

TCC TCT GCT TTG GCT GCT CCA GTT AAC ACC ACT ACT GAA GAC GAG ACT

S   S   A   L   A   A   P   V   N   T   T   T   E   D   E   T

GCT CAA ATT CCT GCT GAG GCT GTC ATC GGT TAC TCT GAC TTG GAA GGT

A   Q   I   P   A   E   A   V   I   G   Y   S   D   L   E   G

GAC TTC GAC GTC GCT GTT TTG CCA TTC TCT AAC TCT ACT AAC AAC GGT

D   F   D   V   A   V   L   P   E   S   N   S   T   N   N   G

TTG TTG TTC ATC AAC ACT ACC ATC GCT TCT ATC GCT GCT AAG GAG GAA

L   L   F   I   N   T   T   I   A   S   I   A   A   K   E   E

GGT GTT TCC CTC GAG AAG AGA GAG GCT ATG CAC TCT TTC TGT GCT TTC

G   V   S   L   E   K   R   E   A   M   H   S   F   C   A   F

AAG GCT GAC GAC GGT CCG TGC AGA GCT GCT CAG CCA AGA TGG TTC TTC

K   A   D   D   G   P   C   R   A   A   H   P   R   W   F   F

AAC ATC TTC ACG CGT CAA TGC GAG GAG TTC ATC TAC GGT GGT TGT GAG

N   I   F   T   R   Q   C   E   E   F   I   Y   G   G   C   E

GGT AAC CAA AAC AGA TTC GAG TCT CTA GAG GAG TGT AAG AAG ATG TGT

G   N   Q   N   R   F   E   S   L   E   E   C   K   K   M   C

EcoR I

ACT AGA GAC TAG TAA GAA TTC GCC TTA GAC ATG ACT GTT CCT CAG TTC

T   R   D   \*   \*

←-----

3' AOXI

AAG TTG GGC ACT TAC GAG AAG

3' AOXI

Figura 2

```

SEQ ID 2: (amino acids 3-60) ----MHSFCAFK- DDGPCRAAHPRWFFNIFTRQCEEFIYGG
SEQ ID 4: ----MHSFCAFK- DDGPCKANHLRFFFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 5: ----MHSFCAFK- DDGHCKANHQRFFFNIFTRQCEEFYTYGG
SEQ ID 6: ----MHSFCAFK- DDGHCKANHQRFFFNIFTRQCEQFTYGG
SEQ ID 7: ----MHSFCAFK- DDGHCKASLPRFFFNIFTRQCEEFYIYGG
SEQ ID 8: ----MHSFCAFK- DDGHCKANHQRFFFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 9: ----MHSFCAFK- DDGHCKGAHLRFFFNIFTRQCEEFYIYGG
SEQ ID 10: ----MHSFCAFK- DDGRCKGAHLRFFFNIFTRQCEEFYIYGG
SEQ ID 11: ----MHSFCAFK- DGGRCRGAHPRWFFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 12: ----MHSFCAFK- DDGPCRAAHPRWFFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 13: ----MHSFCAFK- DVGRRCGAHPRWFFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 14: ----MHSFCAFK- DVGRRCGAQPRFFFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 15: ----MHSFCAFK- DDGSCRAHLRFFFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 16: ----MHSFCAFK- EGGSCRAHQRFFFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 17: ----MHSFCAFK- DDGPCRGAHLRFFFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 18: ----MHSFCAFK- DDGHCRGALPRWFFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 19: ----MHSFCAFK- DSGNCRGNLPRFFFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 20: ----MHSFCAFK- DSGRCRGNHQRFFFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 21: ----MHSFCAFK- DGGRCRAIQPRWFFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 22: ----MHSFCAFK- DDGRRCGAHPRWFFNIFTRQCEEFYSYGG
BPTI (SEQ ID 29): ----RPDFCLEPP- YTGPKARIIRYFYNAKAGLCQTFVYGG
ITI-D1 (SEQ ID 30): ----KEDSCQLGY- SAGPCMGMSTRYFYNGTSMACETFYGG
ITI-D2 (SEQ ID 31): ----TVAAENLPI- VRGPCRAFIQLWAFDAVKGKCVLFYGG
LACI-D1 (SEQ ID 32): ----MHSFCAFK- DDGPCKAIMKRFFFNIFTRQCEEFYIYGG
LACI-D2 (SEQ ID 33): ----KPDFCFLEE- DPGICRGYITRYFYNNQTKQCFKYGG
LACI-D3 (SEQ ID 34): ----GPSWCLTPA- DRGLCRANENRFYNSVIGKCRPFKYSG
HKI B9 (SEQ ID 35): ----LPNVCAFP- EKGPCQTYMTRWFFNFETGECELFAYGG
C-3 (SEQ ID 36): ----ETDICKLPK- DEGTCDRDFILKWYDPNTKSCARFVYGG
TFPI-2 D1 (SEQ ID 37): ----NAETICLLPL- DYGPCRALLLRYYYDRYTQSCRQFLYGG
TFPI-2 D2 (SEQ ID 38): ----VPKVCRLQVSVDQCEGSTKEYFFNLSSMTCEKFFSFG
TFPI-2 D3 (SEQ ID 39): ----IPSFCYSPK- DEGLCSANVTRYFYFNPRYRTCDFTYTG
APP-I (SEQ ID 40): ----RNREVCSEA- ETGPCRAMISRWFYFDVTEGKCAPFFYGG
EpINE7 (SEQ ID 41): ----RPDFCLEPP- YTGPCVAMFPYFYNAKAGLCQTFVYGG
BITI-E7-141 (SEQ ID 42): ----RPDFCQLGY- SAGPCVAMFPYFYNGTSMACQTFVYGG
MUTT26A (SEQ ID 43): ----RPDFCQLGY- SAGPCVAMFPYFYNGASMACQTFVYGG
MUTQE (SEQ ID 44): ----RPDFCQLGY- SAGPCVAMFPYFYNGTSMACETFYGG
MUT1619 (SEQ ID 45): ----RPDFCQLGY- SAGPCVGMFSRYFYNGTSMACQTFVYGG
EPI-HNE-1 (SEQ ID 46): EAEARPDFCLEPP- YTGPCIAFFPRYFYNAKAGLCQTFVYGG
EPI-HNE-2 (SEQ ID 47): -----AACNLPI- VRGPCIAFFPRWAFDAVKGKCVLFYGG
EPI-HNE-3 (SEQ ID 48): -----AACNLPI- VRGPCIAFFPRWAFDAVKGKCVLFYGG
EPI-HNE-4 (SEQ ID 49): -----EACNLPI- VRGPCIAFFPRWAFDAVKGKCVLFYGG
DPI14 KR (SEQ ID 50): --EAVREVCSEA- ETGPCIAFFPRWYFDVTEGKCAPFFYGG
DPI24 KR (SEQ ID 51): --EANAETICLLPL- DYGPCIAFFPRYYYDRYTQSCRQFLYGG
DPI68 KR (SEQ ID 52): --EAKPDFCFLEE- DPGICIGFFPRYFYNNQAKQCFKYGG
DPI84 KR (SEQ ID 53): --EAETDICKLPK- DEGTCAFFPRWYDPNTKSCARFVYGG

```

Figura 3A

SEQ ID 2:	(cont.)	CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 4:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 5:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 6:	(cont.)	CAGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 7:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 8:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 9:	(cont.)	CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 10:	(cont.)	CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 11:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 12:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 13:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 14:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 15:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 16:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 17:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 18:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 19:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 20:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 21:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 22:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
BPTI (SEQ ID 29):	(cont.)	CRKR--NNFKSAEDCMRTCGGA
ITI-D1 (SEQ ID 30):	(cont.)	CMGNG--NNFVTEKECLQTCRTV
ITI-D2 (SEQ ID 31):	(cont.)	CQNG--NKFYSEKECREYCGVP
LACI-D1 (SEQ ID 32):	(cont.)	CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
LACI-D2 (SEQ ID 33):	(cont.)	CLGNM--NNFETLEECKNICEDG
LACI-D3 (SEQ ID 34):	(cont.)	CGGNE--NNFTSKQECRLACKKG
HKI B9 (SEQ ID 35):	(cont.)	CGGNS--NNFLRKEKCEKFKFT
C-3 (SEQ ID 36):	(cont.)	CGGNE--NKFQSQKECEKVCAPV
TFPI-2 D1 (SEQ ID 37):	(cont.)	CEGNA--NNFYTWEACDDACWRI
TFPI-2 D2 (SEQ ID 38):	(cont.)	CHRNRIENRFPDEATCMGFCAPK
TFPI-2 D3 (SEQ ID 39):	(cont.)	CGGND--NNFVSREDCKRACAKA
APP-I (SEQ ID 40):	(cont.)	CGGNR--NNFDTEEYCMVCGSA
EpiNE7 (SEQ ID 41):	(cont.)	CMGNG--NNFKSAEDCMRTCGGA
BITI-E7-141 (SEQ ID 42):	(cont.)	CMGNG--NNFVTEKDCLQTCRGA
MUTT26A (SEQ ID 43):	(cont.)	CMGNG--NNFVTEKDCLQTCRGA
MUTQE (SEQ ID 44):	(cont.)	CMGNG--NNFVTEKDCLQTCRGA
MUT1619 (SEQ ID 45):	(cont.)	CMGNG--NNFVTEKDCLQTCRGA
EPI-HNE-1 (SEQ ID 46):	(cont.)	CMGNG--NNFKSAEDCMRTCGGA
EPI-HNE-2 (SEQ ID 47):	(cont.)	CQNG--NKFYSEKECREYCGVP
EPI-HNE-3 (SEQ ID 48):	(cont.)	CQNG--NKFYSEKECREYCGVP
EPI-HNE-4 (SEQ ID 49):	(cont.)	CQNG--NKFYSEKECREYCGVP
DPI14 KR (SEQ ID 50):	(cont.)	CGGNR--NNFDTEEYCMVCGSA
DPI24 KR (SEQ ID 51):	(cont.)	CEGNA--NNFYTWEACDDACWRI
DPI68 KR (SEQ ID 52):	(cont.)	CLGNM--NNFETLEECKNICEDG
DPI84 KR (SEQ ID 53):	(cont.)	CGGNE--NKFQSQKECEKVCAPV

Figura 3B