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

(11) PI 0720879-0 B1

(22) Data do Depósito: 28/12/2007

(45) Data de Concessão: 24/11/2020

(54) Título: MICROVESÍCULA DERIVADA DE LEVEDURA CARREADORA DE FATOR TISSULAR (TF), COMPOSIÇÃO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA QUE A COMPREENDE E PROCESSOS PARA A SUA FABRICAÇÃO

(51) Int.Cl.: C07K 14/745; C12N 15/81; C12N 15/09; A61K 38/36.

(30) Prioridade Unionista: 29/12/2006 EP 06380342.3.

(73) Titular(es): THROMBOTARGETS EUROPE, S.L..

(72) Inventor(es): JAVIER PEDREÑO EGEA; LUIS CAVEDA CATASÚS; JUAN RAMÓN RODRÍGUEZ FERNÁMDEZ-ALBA.

(86) Pedido PCT: PCT EP2007064644 de 28/12/2007

(87) Publicação PCT: WO 2008/080989 de 10/07/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 29/06/2009

(57) Resumo: MICROVESÍCULA DERIVADA DE FERMENTO CARREADOR DE FATOR DE TECIDO(TF), COMPOSIÇÃO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA QUE A COMPREENDE E PROCESSOS PARA A SUA MANUFATURA Expõem-se microvesículas derivadas de fermento portadoras de fator de tecido que compreendem uma membrana de fermento e uma proteína de fator de tecido, ou um fragmento da mesma, ou uma proteína de fator de tecido ou um fragmento da mesma fundida a outro peptídeo como uma proteína de fusão tendo atividade pró-coagulante. Os ditos produtos podem ser usados como agentes pró-coagulantes no tratamento de hemorragias em um paciente.

MICROVESÍCULA DERIVADA DE LEVEDURA CARREADORA DE FATOR TISSULAR (TF), COMPOSIÇÃO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA QUE A COMPREENDE E PROCESSOS PARA A SUA FABRICAÇÃO

Campo da Invenção

[001] De uma maneira geral, a presente invenção refere-se ao tratamento de hemorragias em um paciente com um agente pró-coagulante. Mais especificamente, a invenção refere-se a microvesículas derivadas de levedura carreadora de fator tissular que compreendem uma membrana de levedura e uma proteína de fator tissular, ou um fragmento desta, ou uma proteína de fator tissular ou um fragmento desta fundida a um outro peptídeo como uma proteína de fusão que é dotada de atividade pró-coagulante, e às suas aplicações como um agente pró-coagulante de utilidade para tratar hemorragias em um paciente, bem como para promover angiogênese e migração de células. A invenção refere-se ainda a processos para a produção da dita microvesícula derivada de levedura carreadora de fator tissular.

Antecedentes da Invenção

[002] A hemóstase é o mecanismo por meio do qual os seres vivos reagem a uma hemorragia e envolve a participação de dois processos que se tornam funcionais imediatamente depois de uma lesão e permanecem ativos durante um longo período de tempo. O primeiro deles é conhecido como hemóstase primária e é caracterizado pela ocorrência de vaso constrição no sítio de lesão vascular e

formação de agregados de plaquetas. O segundo é conhecido como hemóstase secundária, sendo a fase em que é formado o coágulo de fibrina devido à ação das diferentes enzimas proteolíticas de cascata de coagulação.

[003] Diversos cofatores e enzimas proteolíticas participam na segunda fase do processo de coagulação do sangue, todos eles referidos como fatores de coagulação, e consiste em várias fases que terminam com formação de fibrina a partir da hidrólise de fibrinogênio devido à ação de trombina. A trombina é formada previamente pela hidrólise proteolítica de uma apoenzima, protrombina. Esta proteólise é realizada pelo Fator X (FXa) de coagulação ativada, que se liga à superfície das plaquetas ativadas e somente na presença do seu cofator, Fator V (FVa) de coagulação ativada, e íons de cálcio, e é capaz de hidrolisar a protrombina. A ativação do Fator X (FX) de coagulação pode ocorrer por dois caminhos separados, o caminho intrínseco e o caminho extrínseco.

[004] O caminho intrínseco consiste em uma série de reações em que cada proenzima é hidrolisada, proporcionando a sua forma de protease ativa. Em cada etapa, a enzima proteolítica recentemente formada catalisará a ativação da proenzima seguinte para proporcionar sucessivamente a forma ativa.

[005] No caminho extrínseco da coagulação do sangue, o Fator tissular (TF), exposto nas células

adventícias no sítio da lesão, liga-se ao Fator VII de coagulação circulante/Fator VII de coagulação ativado (FVII/FVIIa) para formar o complexo TF::FVIIa e, na presença de cálcio, para agir como um substrato de forma que ocorre ativação de FX. O caminho extrínseco é atualmente considerado o caminho mais relevante na coagulação do sangue, e é aceito que na eventualidade de uma hemorragia produzida por uma lesão vascular, a coagulação é disparada devida à ativação do caminho extrínseco que envolve a interação de TF com o seu ligante, FVII/FVIIa.

[006] O TF consiste em um componente de proteína (anteriormente referido como apoproteína-III de fator tissular) e um fosfolipídio. O TF especificamente liga-se ao FVII/FVIIa e desempenha uma função relevante no caminho extrínseco de coagulação do sangue. As funções fisiológicas atribuídas ao TF são amplamente conhecidas; por um lado, é um receptor específico para FVIIa e, uma vez que tenha sido formado o complexo TF::FVIIa, ele funciona como um substrato de forma que tem lugar a ativação de FX. Com efeito, depois de uma lesão vascular, o TF, que é normalmente sequestrado na superfície de células adventícias que circundam externamente os vasos sanguíneos, entra em contacto e interage com o seu ligante, FVII presente no sangue, para formar o complexo TF::FVII. Uma vez formado este complexo, ocorre a auto-ativação de FVII,

proporcionando a sua forma ativa (FVIIa).

[007] A glicosilação é um processo específico de sítio dirigido por enzima de acordo com o qual sacarídeos são adicionados a lipídios e proteínas. Acredita-se que este processo está envolvido na estabilidade, duplicação e transporte; muito embora nenhuma evidência de sua função real tenha sido descrita para o TF.

[008] Foi amplamente aceito que o TF constitui o elemento principal responsável pela rapidez com que a coagulação é iniciada. Para a coagulação começar, é absolutamente necessário que FX seja ativado e comece a hidrólise da protrombina. A fonte deste FXa tem sido atribuída principalmente à interação de FVIIa com o seu receptor, o TF.

[009] A purificação de TF foi reportada a partir de vários tecidos tais como: cérebro humano, cérebro bovino; placenta humana; cérebro ovino; e, pulmão. É amplamente aceito que muito embora existam diferenças na estrutura da proteína de TF entre espécies, não existem diferenças funcionais quando medidas em ensaios de coagulação *in vitro*.

[0010] É amplamente aceito que, a fim de demonstrar atividade biológica, o TF deve estar associado com fosfolipídios *in vitro*. Constatou-se que a remoção do componente de fosfolipídio do TF, por exemplo, pelo uso de uma fosfolipase, resulta em uma perda de sua atividade

biológica *in vitro*. A relipidação pode restabelecer a atividade de TF *in vitro*.

[0011] Embora algumas quantidades de proteína de TF "purificada" tenham sido disponibilizadas a partir de vários tecidos, a baixa concentração da proteína de TF no sangue e nos tecidos e o alto custo, tanto econômico quanto de esforço, de purificar a proteína a partir de tecidos torna este material insuficiente. Consequentemente, existe uma necessidade no sentido de se contar com uma fonte alternativa de proteína de TF, vantajosamente a proteína de TF lipidada.

[0012] A proteína de TF foi expressa em vários sistemas mediante a utilização do cDNA humano clonado. Desta forma, reportou-se a sobre-expressão da proteína de TF em *E. coli* (Paborsky *et al.*, Biochemistry 28, 8072 (1989)). Além disso, a patente U.S. número 6.261.803 expõe um processo para preparar-se TF recombinante funcional em um organismo hospedeiro procariótico. Consegue-se um alto rendimento na expressão da proteína de TF completa em *E. coli*.

[0013] Muito embora a expressão heteróloga de proteínas em *E. coli* apresente algumas vantagens, a expressão de proteínas eucarióticas nas ditas bactérias está associada com um grande número de problemas, principalmente quando a proteína a ser expressa é uma proteína eucariótica glicosilada, devido à ausência nas

bactérias de seus próprios sistemas de glicosilação.

[0014] Consequentemente, uma estratégia alternativa consiste em emitir uma proteína de TF alterada à qual falta o domínio de transmembrana. Este TF chamado "solúvel" (ou TF "truncado") acumula-se no citoplasma das células bacterianas e pode ser expresso em quantidades relativamente grandes. Entretanto, neste sistema, a proteína de TF que é assim expressa está usualmente presente no *E. coli* em um estado quase cristalino na forma dos chamados corpos de inclusão. Quando este é o caso, os corpos de inclusão têm de ser solubilizados por meio do uso de quantidades muito grandes de agentes caotrópicos, e as proteínas que foram monomerizadas desta maneira têm uma vez mais de ser redobradas, com uma grande quantidade de esforço e usualmente com tão somente um baixo rendimento, em uma confirmação ativa, renaturada. Além disso, em princípio, o TF solúvel não é adequado para o uso em reagentes de tempo de protrombina, uma vez que ele é desprovido do domínio para a interação com fosfolipídios.

[0015] Outra abordagem para a sobre-expressão de proteína de TF consiste na utilização de um grande número de sistemas de expressão conhecidos e empregados com êxito que codificam produtos das fusões de genes (por exemplo, com β-galactosidase, MalE, transferase de glutationa, His-marcado, e outros). Entretanto, estes sistemas não são adequados para a expressão de TF biologicamente ativo.

Muito embora produtos de expressão possam ser detectados e o nível de expressão também possa ser aumentado quando os ditos sistemas são usados, os produtos de expressão assim obtidos estão por vezes associados com uma completa perda de função, a qual não pode ser restabelecida, mesmo quando se utilizam métodos de renaturação elaborados.

[0016] Os problemas de sobre-expressão da proteína de TF em *E. coli* podem ser contornados pela realização da expressão da dita proteína em um sistema eucariótico. Desta forma, a expressão em células de levedura, em culturas de células de insetos utilizando-se baculovírus como um vetor, ou em células de mamíferos cultivadas, por exemplo, células ovarianas de hamsters, ou em linhas de células humanas, é, em princípio, adequada. Entretanto, estes sistemas padecem de desvantagens cruciais, entre outras; os rendimentos de proteínas recombinantes são muito mais baixos quando comparados à produção de *E. coli* recombinante.

[0017] As variedades de levedura combinam as vantagens dos sistemas hospedeiros distintos anteriormente. Por um lado eles imitam mais estreitamente a fisiologia nativa de uma proteína eucariótica do que *E. coli*, e, por outro lado, eles são fáceis de manusear, fáceis de cultivar, apresentam crescimento muito mais rápido e muito maior economia. Diversos fatores, todavia, afetam a expressão de proteínas nA levedura desta forma. Estes fatores incluem, sendo que não se fica confinado aos

mesmos:

- a escolha das sequências reguladoras de genes, tais como promotores, que controlam a expressão de uma proteína heteróloga; as sequências promotoras empregadas para controlar a expressão heteróloga deverão ser tipicamente "fortes", isto é, elas deverão efetuar a expressão muito alta da proteína, e adequadamente controlável, pelo que a expressão pode ser, a princípio, eficientemente reprimida até ser alcançada uma biomassa ótima da cultura e, então, rapidamente estabelecida para realizar expressão de proteína; e

- uma secreção eficiente da proteína heteróloga expressa; a secreção da proteína expressa (expressão extracelular) é frequentemente preferida em relação à expressão intracelular uma vez que esta última acarretará primeiro o arrombamento da célula, descarregando assim todo o conteúdo celular, e então isolando a proteína desejada a partir da fossa de material celular e detritos. Ainda, a secreção eficiente de uma proteína, por sua vez, depende de vários fatores incluindo: (i) a seleção das sequências de sinal – sequências de peptídeos que são usualmente as regiões N-terminais das proteínas secretadas naturalmente, e que encaminham a proteína para o caminho secretor celular, e, (ii) os componentes específicos do caminho secretor que interagem com as sequências de sinais e efetuam a secreção da proteína vinculada.

[0018] Stone M.J. *et al* (Biochem. J. (1995) 310, 605-614) descrevem a expressão do domínio de superfície do TF (TF truncado) na *Saccharomyces cerevisiae*. Para a purificação do TF, carregaram-se culturas em uma coluna de imuno-afinidade conjugada com um anticorpo anti-TF e a proteína é eluída e submetida a diálise. Este ensaio permitiu o acesso a quantidades de miligrama de TF truncado.

[0019] Brucato C.L. *et al*. (Protein Expression e Purification 26 (2002), 386-393) descreve a expressão da proteína de TF de coelho recombinante de extensão plena completamente formada em *Pichia pastoris*. A purificação da proteína de TF é realizada por cromatografia de afinidade de metal imobilizada.

[0020] Não existe até agora processo conhecido para preparar grandes quantidades de TF recombinante biologicamente ativo, a partir de levedura com alto rendimento. Vantajosamente, o referido TF recombinante deverá ser obtido sob um alto nível de atividade, preferentemente, sob um nível de atividade adequado para usos terapêuticos. Portanto, constitui um objeto da presente invenção gerar quantidades úteis de proteína de TF lipidada utilizando-se técnicas recombinantes. Vantajosamente, a proteína de TF recombinante deverá ser de utilidade para aplicações terapêuticas.

Sumário da Invenção

[0021] Em um primeiro aspecto, a invenção refere-se a uma levedura carreadora de fator tissular (TF) derivado de microvesícula que compreende (i) uma membrana de levedura, e (ii) uma proteína de fator tissular (TF) ou uma variante desta que é dotada de atividade pró-coagulante, em que uma parte da dita proteína de fator tissular (TF) ou fragmento desta que tem atividade pró-coagulante é integrada na dita membrana.

[0022] Em outros aspectos, a invenção refere-se a uma composição que compreende uma microvesícula derivada de levedura carreadora de TF, a uma microvesícula derivada de levedura carreadora de TF de acordo com um medicamento, a uma composição farmacêutica que compreende uma microvesícula derivada de levedura carreadora de TF, a uma microvesícula derivada de levedura carreadora de TF para o tratamento de hemorragias em um paciente e a uma microvesícula derivada de levedura carreadora de TF para o tratamento de uma enfermidade que requer a promoção de migração celular e/ou angiogênese em um paciente.

[0023] De acordo com outro aspecto, a invenção refere-se a um processo para a fabricação de uma microvesícula derivada de levedura carreadora de TF que tem atividade pró-coagulante da invenção, o qual compreende as etapas de:

a) submeter uma cultura de células de levedura recombinantes que emitem proteína de TF ou um fragmento

desta que tem atividade pró-coagulante para fermentação sob condições que permitem a expressão da dita proteína de TF, ou fragmento desta que tem atividade pró-coagulante;

b) peletizar o produto resultante a partir da fermentação da etapa a), para proporcionar um produto de fermentação;

c) submeter o dito produto de fermentação proveniente da etapa b) a homogeneização, para obter-se um homogeneizado de fermentação;

d) submeter o dito homogeneizado de fermentação proveniente da etapa c) a separação para obter-se uma pílula e um extrato de levedura clarificado (CYE) que contém a dita microvesícula derivada de levedura carreadora de TF que é dotada de atividade pró-coagulante;

e) coletar o dito extrato de levedura clarificado (CYE) que contém a dita microvesícula derivada de levedura carreadora de TF; e opcionalmente,

f) se desejado, isolar ou purificar as ditas microvesículas derivada de levedura carreadora de TF, dotadas de atividade pró-coagulante.

[0024] De acordo com um outro aspecto, a invenção refere-se a um processo para a preparação de microvesículas que compreende uma proteína de membrana de interesse a partir de uma célula hospedeira eucariótica que compreende as etapas de:

a) desenvolver uma cultura da dita célula

hospedeira eucariótica sob condições que permitem a expressão da dita proteína de membrana de interesse;

b) submeter a fração de célula da cultura de a) a homogeneização;

c) submeter o homogeneizado obtido a partir da etapa b) a separação, para obter-se uma pílula e um extrato de célula clarificado que contém as ditas microvesículas derivadas de células que contêm a proteína de membrana de interesse;

d) purificar as ditas microvesículas derivadas de células por divisão de dimensão.

[0025] Em outro aspecto, a invenção refere-se a uma proteína lipidada de fator tissular (TF) modificado, selecionada a partir do grupo de:

(i) Um fator tissular (TF) truncado desprovido de todo ou parte do domínio responsável por ligação a FVIIa, que tem atividade pró-coagulante,

(ii) um mutante de proteína de TF que tem atividade pró-coagulante, em que o domínio responsável pela ligação a FVIIa não é funcional; e

(iii) um mutante de proteína de TF que é dotado de atividade pró-coagulante que carrega pelo menos um sítio de N-glicosilação não funcional.

[0026] Em outros aspectos, a invenção refere-se a uma proteína lipidada de TF modificada de acordo com a invenção para o uso como um medicamento, a uma composição

farmacêutica que compreende uma proteína lipidada de TF modificada e um veículo farmaceuticamente aceitável, a uma proteína lipidada de TF modificada para o tratamento de hemorragias em um paciente e para o tratamento de uma enfermidade que requer a promoção de migração celular e/ou angiogênese em um paciente.

[0027] Em outro aspecto, a invenção refere-se a uma sequência de polinucleotídeos que codifica um fator tissular (TF) truncado desprovido da totalidade ou de parte do domínio responsável pela ligação a FVIIa, tendo atividade pró-coagulante, para um mutante de proteína de TF que tem atividade pró-coagulante, em que o domínio responsável pela ligação a FVIIa não é funcional e para um mutante de proteína de TF que tem atividade pró-coagulante que carrega pelo menos um sítio de N-glicosilação não funcional.

[0028] A invenção também se refere a um vetor que compreende uma sequência de polinucleotídeos da invenção, a uma célula hospedeira que compreende um polinucleotídeo da invenção ou o vetor da invenção, e a um anticorpo que se liga especificamente a uma proteína de TF modificada da invenção.

Descrição Breve dos Desenhos

[0029] A Figura 1 mostra a estratégia de clonagem para a geração de pTT10301. A Figura 1A mostra o mapa do plasmídio pTT10301. Um fragmento de DNA de 1.050 bp que

contém o promotor de GPD (pGPD), um sítio de BamHl único e o terminador de PGK (PGKt) foi extirpado a partir de plasmídio pG1 depois da digestão com enzimas de restrição de DNA HindIII e XbaI. O fragmento de DNA foi isolado por eletroforese de gel de agarose e purificado com um kit de extração de DNA (Qiagen) e clonado no plasmídio Yep352, previamente digerido com HindIII e XbaI. O plasmídio pTT10301 resultante foi desenvolvido em *E. coli* e purificado com o kit JETstar de purificação de DNA comercial (Genomed Gmbh). A Figura 1B mostra a análise de endonuclease de restrição do plasmídio pTT10301 gerado.

[0030] A Figura 2 mostra um traçado de hidropatia de proteína de TF humana. Estão representados os quatro domínios da proteína (sequência líder, extracelular, transmembrana e domínios citoplásmicos).

[0031] A Figura 3 mostra a sequência de cDNA da proteína de TF humana (Gene Bank #BC011029). O quadro de leitura aberto (ORF) está enquadrado bem como os códons de partida (ATG) e extremo (TAA). A sequência de cDNA inclui os quatro domínios (peptídeo de sinal, domínio extracelular, região de transmembrana e terminação citoplasmática) da proteína de TF humano (hTF). As setas mostram a sítioização de recozimento dos preparadores A [preparador de montante, codificação dos primeiros quatro aminoácidos hTF maturado desprovido do peptídeo de sinal e contendo um códon de iniciação ATG no quadro com TF ORF] e

B [preparador de jusante, com o códon de terminação em negrito], os dois contendo um sítio *BamH*I de restrição (sublinhado).

[0032] A Figura 4 mostra uma representação esquemática da estratégia de clonagem para gerar o plasmídio pTT10302 (Figura 4A). O fragmento de DNA obtido a partir da reação de PCR foi digerido com BamHI e clonado no plasmídio pTT10301, previamente digeridos com BamHI e desfosforilado. O plasmídio resultante (pTT10302) foi desenvolvido em *E. coli* e purificado com o kit JETstar de purificação de DNA comercial (Genomed Gmbh). A Figura 4B mostra a análise de restrição do plasmídio pTT10302 gerado.

[0033] A Figura 5 mostra a expressão de rTF em diferentes clones de levedura recombinantes. Análises de mancha-oeste dos extratos provenientes de levedura transformados com o plasmídio esgotado pTT10301 (C-) e com o vetor de expressão contendo a proteína hTF madura recombinante, pTT10302 (faixas 1-8), foram realizadas pelo uso do anticorpo monoclonal CD142 anti-humano de camundongo purificado (BID Biosciences Pharmingen). Os marcadores de peso molecular em kDa estão ilustrados no lado esquerdo da figura.

[0034] A Figura 6 mostra os resultados de uma mancha-oeste depois de tratamento de endoglicosilase de extratos yTT10301. Assim, os extratos provenientes de levedura de expressão de rTF (yTT10301) foram tratados com

500 unidades de endoglicosilase H (Endo H)(faixa 2) ou N-Glicosidase F (PNGase F) (faixa 3) durante 1 hora a 37°C, seguindo-se as instruções do fabricante. Estas amostras e o extrato não tratado (faixa 1) foram analisadas por mancha-oeste com o mAb de TF anti-humano. Marcadores de peso molecular em kDa estão ilustrados no lado esquerdo da figura.

[0035] A Figura 7 ilustra fotografias de microscópio a laser confocais que mostram a expressão de rTF por levedura recombinante yTT10301. Esferoplastos provenientes de rTF emissores de levedura recombinantes foram fixados com paraformaldeído a 4% e incubados com um mAb contra um ATPase de levedura (Figura 7A) ou com um TF mAb anti-humano (Figura 7B). Depois da incubação com um anticorpo anti-camundongo de cabra conjugado com fluoresceína, observaram-se as células por meio de microscopia confocal (1, 3, 5 e 7) ou por contraste de fase (2, 4, 6 e 8). Obtiveram-se imagens em um microscópio a laser confocal BIO-RAD Radiance 2000.

[0036] A Figura 8 ilustra fotografias por microscópio a laser confocais que mostram que a expressão de rTF por levedura recombinante depende da presença do plasmídio pTT10302. Esferoplastos provenientes de levedura recombinante (yTT10300) abrigando o plasmídio de expressão esgotado pTT10301 foram fixados com paraformaldeído a 4% e incubados com um mAb contra um ATPase de levedura (Figura

8A) ou com um mAb de TF anti-humano (Figura 8B). Depois de incubação com um anticorpo anti-camundongo de cabra conjugado com fluoresceína, observaram-se as células por meio de microscopia confocal (1 e 3) ou por contraste de fase (2 e 4). Obtiveram-se imagens em um microscópio a laser confocal BIO-RAD Radiance 2000.

[0037] A Figura 9 mostra que o rTF está associado às membranas de levedura. Tratou-se um extrato a partir de yTT10301 com Triton X114 e depois de centrifugação a fase aquosa e a pílula de detergente foram coletadas separadamente. A fase aquosa foi tratada novamente com Triton X114 (1% de concentração final), e separaram-se duas fases como anteriormente. Misturou-se a segunda pílula de detergente com a primeira. O extrato completo (faixa 1), a primeira (faixa 2), a segunda (faixa 3) fases aquosas, e a fase de detergente (faixa 4) foram analisadas por SDS-PAGE e por mancha Coomassie (Figura 9A) ou por mancha-oeste que reagiu com um mAb contra TF humano (Figura 9B).

[0038] A Figura 10 é um gráfico que mostra a evolução dos parâmetros principais durante todo o processo de fermentação. Uma alteração na pressão de oxigênio (PO_2), que é o único parâmetro não controlado, reflete as mudanças nos requisitos de oxigênio sofridas pelas células durante o processo. Sustou-se a fermentação quando a PO_2 atingiu uma condição estacionária (18 horas).

[0039] A Figura 11 é um diagrama que representa o

esquema geral do processo de fermentação para produzir CYE-TF.

[0040] A Figura 12 mostra os resultados de uma análise mancha-oeste para determinar a presença de TF nos preparados obtidos a partir do primeiro teste de fermentação. Cada faixa corresponde a 5 µl de ou sobrenadante (sn) ou pílula (pp) obtido pelo procedimento descrito na Figura 11. Amostras de proteína foram analisadas por mancha-oeste utilizando-se um mAb específico contra TF humano. O controle positivo (rTF) é um TF recombinante comercial (10 ng) produzido em *E. coli* (American Diagnostica, Inc.). Marcadores de peso molecular, em kDa encontram-se ilustrados no lado esquerdo da figura.

[0041] A Figura 13 mostra imagens por microscopia eletrônica de amostras de CYE-TF. O produto CYE-TF foi adsorvido por grades de cobre revestidas de carbono previamente tratadas por uma descarga incandescente. A grade foi incubada com PBS que continha albumina de soro bovino a 3% (BSA) durante 1 hora anteriormente à incubação com o mAb específico contra hTF ou com um anticorpo não relacionado. As grades foram lavadas extensamente com PBS e incubadas com anticorpo de IgG anti-camundongo de coelho conjugado com ouro. Lavaram-se as grades e as amostras foram manchadas negativamente por tratamento com acetato de uranil a 1%. As imagens foram obtidas em um microscópio eletrônico JEOL 1200 EXII. As setas indicam a posição de

partículas de ouro coloidal.

[0042] A Figura 14 mostra um esquema do procedimento de clarificação de CYE-TF por meio de Filtragem de Fluxo Tangencial. - A) O CYE-TF foi submetido a filtragem de fluxo tangencial (TFF) em um Sistema de Filtragem de Fluxo Transverso (Sartorius sartoflow Slice 200 Benchtop). O CYE-TF foi filtrado sucessivamente através de membranas de 0,45 µm, 0,2 µm e 0,1 µm (polissulfona, Sartorius). As membranas foram previamente equilibradas com Tampão de Fosfato (fosfato de sódio 20 mM, ate pH 7,4, 500 mM NaCl). O material remanescente retido depois da filtragem através das membranas de 0,2 µm e antes de 0,10 µm foi recuperado e usado como material de partida para as etapas de purificação sucessivas. B) Utilizou-se dispersão de luz dinâmica para se determinar a distribuição de dimensão das microvesículas.

[0043] A Figura 15 mostra um perfil de cromatografia por exclusão de dimensão do produto de CYE-TF em uma coluna Sephacryl S-500. A eluição foi realizada a 4°C com Tampão de Fosfato e coletaram-se frações de 4 ml sob velocidade de fluxo de 1 ml/min. A eluição de Proteína foi monitorada por medição da densidade óptica a 280 nm.

[0044] A Figura 16 mostra um ensaio de mancha-oeste para detectar rTF. Submeteram-se a eletroforese 15 µl de cada fração em 12,5%-SDS-PAGE Tris-Glicina gel. Depois da eletroforese, as proteínas foram transferidas para

membranas de nitrocelulose. As membranas foram então incubadas com um anticorpo monoclonal de camundongo comercial antiTF (American Diagnostica) durante 1 hora. As membranas foram então incubadas com anticorpos IgG anti-camundongo de coelho, seguidas por incubação com anticorpos IgG anti-coelho de cabra conjugados com peroxidase de raiz-forte. Detectaram-se proteínas imuno-reativas por quimiluminescência utilizando-se kits de coloração ECL Advanced Western (GE Healthcare).

[0045] A Figura 17 mostra um perfil de proteína de diferentes lotes de microvesículas que contêm rTF purificado por cromatografia de exclusão de dimensão. A) Proteínas provenientes de quatro lotes diferentes de microvesículas purificadas que contêm rTF (como indicado no topo da figura) foram fracionadas por SDS-PAGE, e o gel foi colorido com *coomassie* azul. Marcadores de peso Molecuñlra estão ilustrados no lado esquerdo da figura. B) Análise densitométrica das diferentes bandas de proteína em cada lote realizadas depois da varredura do gel colorido.

[0046] A Figura 18 mostra uma análise de Cromatografia de Camada Fina (TLC). PA: ácido fosfatídico (Sigma), PS: Fosfatidilserina (Fluka), PG: Fosfatidilglicerol (Sigma), CAR: Cardiolipin (Sigma), ERG: Ergosterol (Fluka), PE: Fosfatidil etanolamina (Sigma), PI: Fosfatidilinositol (Sigma), PC: Fosfatidilcolina (Sigma), MARCA: Triacilcliceridas (Sigma).

[0047] A Figura 19 mostra a sequência de cDNA da proteína de TF humano (Gene Bank #BC011029). O quadro de leitura aberto (ORF) é enquadrado desta forma que os códons de partida (ATG) e final (TAA). A sequência de cDNA inclui os quatro domínios (peptídeo de sinal, domínio extracelular, região de transmembrana e caudacitoplasmática) da proteína de TF humano (hTF). As setas mostram o sítio de recozimento dos preparadores A [preparador de montante, codificação dos primeiros quatro aminoácidos de hTF completamente formados desprovidos de peptídeo de sinal e contendo um códon ATG de iniciação no quadro com TF ORF] e E [preparador de jusante; nucleotídeos de codificação de histidinas em negrito], os dois contendo um sítio *BamH*I de restrição (sublinhado).

[0048] A Figura 20 mostra a estratégia de clonagem para a geração de pTT10303. A Figura 20A mostra que o fragmento de DNA obtido a partir da reação de PCR foi digerido com BamHI e clonado no plasmídio pTT10301, previamente digerido com BamHI e desfosforilado. O plasmídio pTT10303 resultante foi desenvolvido em *E. coli* e purificado com o kit JETstar de purificação de DNA comercial (Genomed Gmbh). A Figura 20B mostra a análise de restrição do pTT10303 gerado.

[0049] A Figura 21 mostra os resultados de uma análise de mancha-oeste da expressão de rTF-his-marca. Análise de mancha-oeste de extratos a partir de culturas de

levedura recombinante yTT10302 (faixas 1-4, correspondente aos clones 2 a 5) e rTF produzidos em E.coli (C+). Fez-se reagir a mancha com o anticorpo monoclonal CD142 anti-humano de camundongo purificado (BD Biosciences Pharmingen). Os marcadores de peso molecular em kDa estão ilustrados no lado esquerdo da figura.

[0050] A Figura 22 mostra também os resultados da expressão de rTF-his-marca. A Figura 22A mostra SDS-PAGE e coloração de Coomassie azul de extratos a partir de levedura yTT10300 (faixa 1), yTT10301 expressor de rTF (faixa 2), ou yTT10302 (clone #5) expressor de rTF-his-marcador (faixa 3). Controle positivo correspondente a 5 ng de um rTF produzido em *E. coli* (faixa 4). A Figura 22B é uma análise de mancha-oeste destas amostras ilustradas na Figura 17A, utilizando-se o anticorpo monoclonal CD142 anti-humano de camundongo purificado (BD Biosciences Pharmingen). Marcadores de peso moleculares em kDa estão ilustrados no lado esquerdo da figura.

[0051] A Figura 23 mostra esquematicamente o processo para purificação de 6HT-TF.

[0052] A Figura 24 mostra os resultados da purificação de 6HT-TF por cromatografia de afinidade. O CYE-6HT-TF foi usado como material de partida. O extrato foi filtrado através de um filtro de dimensão de poro de 0,2 µm por filtragem tangencial e foi aplicado a uma coluna de cromatografia de afinidade de quelato de metal comercial

de 5 ml (HiTrap®, Pharmacia Biotech). A coluna foi submetida a três lavagens consecutivas com tampão de partida (20 mM tampão de fosfato, 500 mM NaCl, pH 7,4) sem imidazol, com 10 mM de imidazol e com 100 mM de imidazol, respectivamente. Submeteu-se o 6HT-TF a eluição com o mesmo tampão que continha frações de eluição imidazol 1 M. Coletaram-se frações de eluição de 2,5 ml (faixas 4 a 7, correspondentes respectivamente às frações #1, #2, #3, e #4) e submeteram-se a diálise contra 20 mM de tampão de fosfato, 50 mM de NaCl, pH 7,4. O extrato de levedura filtrado de partida (faixa 1), o material não ligado (faixa 2), a última lavagem com tampão de partida contendo 100 mM e as primeiras quatro frações de eluição foram analisadas por SDS-PAGE e mancha-oeste (Figura 24A) ou coloração de prata (Figura 24B). Marcadores de peso molecular em kDa encontram-se indicados no lado esquerdo da figura.

[0053] A Figura 25 mostra os resultados de uma análise de mancha-oeste do 6HT-TF purificado depois de tratamento de endoglicosilase. A fração de 6HT-TF purificada foi tratada com 500 unidades de PNGase F (faixa 2) ou Endo H (faixa 3) seguindo-se as instruções do fabricante. Estas amostras e o eluado não tratado (faixa 1) foram analisados por mancha-oeste com um TF mAb anti-humano. Marcadores de peso molecular em kDa encontram-se indicados no lado esquerdo da figura.

[0054] A Figura 26 mostra os resultados de uma

imunoeletronmicroscopia de 6HT-TF purificado por cromatografia de afinidade. A primeira fração de eluição foi adsorvida para grades de cobre revestidas de colódio. A grade foi tratada para rotulação de imuno-ouro com anticorpo monoclonal de anti-TF.

[0055] A Figura 27 é uma representação esquemática de uma microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção. A Figura 22A mostra a representação esquemática de uma microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção que compreende uma membrana derivada de levedura (1) e uma proteína de TF (2) (ou um fragmento desta que tem atividade pró-coagulante) integrada na dita membrana derivada de levedura (1). Encontram-se representados o espaço intra-microvesícula (3) e o espaço extra-microvesícula (4). As Figuras 22B e 22C mostram a arquitetura básica de uma microvesícula derivada de levedura de suporte de TF da invenção. Os lipídeos da bicamada de lipídeos de membrana derivada de levedura são anfipáticos; eles são dotados de cabeças polares hidrófilas (5) que apontam para o espaço extra-microvesículas (4) e duas terminações de hidrocarbonetos hidrófobos (6) que apontam para o espaço intra-microvesículas (3). Na concretização ilustrada na Figura 22B, o domínio de N-terminal de uma proteína de TF (2), ou fragmento desta que tem atividade pró-coagulante, fica voltado para o espaço extra-microvesícula (4). Na concretização ilustrada na

Figura 22C, o domínio de N-terminal da proteína de TF (2), ou fragmento do mesmo que tem atividade pró-coagulante, fica voltado para o espaço intra-microvesícula (3).

[0056]A Figura 28 mostra a sequência de cDNA da proteína de TF humana (Gene Bank #BC011029). O quadro de leitura aberto (ORF) está enquadrado bem como os códons de partida (ATG) e extremo (TAA). A sequência de cDNA inclui os quatro domínios (peptídeo de sinal, domínio extracelular, região de transmembrana e terminação citoplasmática) da proteína de TF humano (hTF). As setas mostram a sítioização de recozimento dos preparadores F [preparador de montante, codificação dos primeiros quatro aminoácidos hTF maturado desprovido do peptídeo de sinal e contendo um códon de iniciação ATG no quadro com TF ORF] e E [preparador de jusante; nucleotídeos de codificação de histidinas em negrito], os dois contendo um sítio *BamH*I de restrição (sublinhado).

[0057] A Figura 29. **Estratégia de clonagem para a geração de pTT10304**. A) O fragmento de DNA obtido a partir da reação de PCR foi digerido com BamHI e clonado no plasmídio pTT10301, previamente digerido com BamHI e desfosforilado. O plasmídio pTT10304 resultante foi desenvolvido em *E. coli* e purificado com o kit JETstar de purificação de DNA comercial (Genomed Gmbh). B) Análise de restrição do vetor pTT10304 gerado.

[0058] A Figura 30 mostra uma representação

esquemática da posição das mutações de pontos em sítios de glicosilação em TF humano.

[0059] A Figura 31 mostra uma mancha-oeste perscrutada com anticorpo anti-TF1. PM1 refere-se à alteração Ala-Asn na posição 11, PM2 refere-se a mudança Ala-Asn na posição 124, e PM3 refere-se a mudança Asn-Ala na posição 137. PM1,2; 1,3; e 1,2,3 refere-se a combinações destas. TT103MH é o TF tipo silvestre.

[0060] A Figura 32. **Curvas de resposta de dose da atividade pró-coagulante de TT-103 e rTF relipidado.**- A atividade pró-coagulante foi medida em um coagulômetro utilizando-se plasma humano normal combinado e diferentes concentrações de seja TT-103 a partir de diferentes combinações ou rTF relipidado.

[0061] A Figura 33 mostra as atividades pró-coagulantes *in vitro* de TT-103 não tratado (1), TT-103 sendo submetido a tratamento de Triton X-100 (2), TT-103 sendo submetido a tratamento de Triton X-100 depois da diálise, permitindo a relipidação de rTF (3), lipossomos esgotados (4) e microvesículas provenientes de levedura recombinante de rTF não-expresso (5). A quantidade de rTF determinada por ELISA foi a mesma (120 ng/ml) nas amostras 1, 2 e 3.

[0062] A Figura 34 mostra a atividade pró-coagulante de TT-103 em plasma heparinizado (TT-103) comparado com rTF relipidado, trombina e Thromborel S.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção

[0063] De acordo com um aspecto, a invenção refere-se a uma microvesícula derivada de levedura carreadora de fator tissular, doravante chamada de "Microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção", que compreende (i) uma membrana de levedura, e (ii) uma proteína de fator tissular (TF) ou uma variante desta que é dotada de atividade pró-coagulante, em que uma parte da dita proteína de fator tissular (TF) ou variante desta dotada de atividade pró-coagulante é integrada na dita bicamada de lipídeos. A microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção tem atividade pró-coagulante e, deste modo, ela pode ser usada como um medicamento para o tratamento de hemorragias em um paciente.

[0064] Da maneira que é utilizado neste contexto, o termo "microvesícula derivada de levedura" refere-se um compartimento pequeno e fechado, que é substancialmente composto por membranas, ou fragmentos destas, a partir de células de levedura. Uma membrana refere-se, em geral, a uma camada organizada de umas poucas moléculas de espessura formando o limite de uma célula (isto é, a membrana de célula ou plasma) ou os limites de organelas intracelulares.

[0065] O componente (i) da microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção é uma membrana de levedura que se originará das células de levedura usadas na produção da microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção. Tipicamente, uma membrana é composta de duas camadas de lipídios orientados (isto é, uma bicamada de lipídios) onde podem encontrar-se embutidas proteínas. Uma bicamada de lipídios, que é a estrutura básica das membranas de uma célula, é usualmente formada por moléculas anfipáticas (por exemplo, fosfolipídios, ácidos graxos e outros) em um ambiente aquoso, sendo cada molécula orientada com o grupo hidrófilo no lado externo da camada e o grupo hidrófobo para o interior da camada. Tipicamente, proteínas são implantadas na bicamada de lipídios; deste modo, a microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção contém proteínas provenientes das membranas de células de levedura, que são normalmente integradas nas ditas membranas de células de levedura.

[0066] Em uma concretização particular, a dita microvesícula derivada de levedura deriva de membranas de células de levedura ou ou seus fragmentos, tais como, por exemplo, membranas de plasma de células de levedura ou os seus fragmentos. De acordo com outra concretização particular, a dita microvesícula derivada de levedura deriva de membranas de organelas de células de levedura intracelular, ou de seus fragmentos, tais como núcleo,

aparelho Golgi, retículo Endoplasmático, e assemelhados.

[0067] A dita microvesícula derivada de leveduras prosseguirá, de um modo geral, a partir das células de levedura usadas na sua produção (por exemplo, depois de sujeição do produto de fermentação dA levedura a um tratamento de homogeneização como ilustrado no processo exposto no Exemplo 1). Praticamente qualquer célula de levedura pode ser usada para produzir a dita microvesícula derivada de leveduras, vantajosamente células de levedura não floculantes, e, preferentemente, a célula de levedura classificada como uma célula de levedura "Considerada Geralmente como Segura" (ou GRAS) pela Federal Drug Administration (FDA) para consumo humano, uma vez que as ditas substâncias aprovadas como GRAS do não requerem aprovação pré-comercial por parte da FDA porque elas são substancialmente inócuas para animais, incluindo seres humanos. Exemplos ilustrativos, mas não limitativos, de células de levedura que podem ser usadas no processo para produzir a microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção são as chamadas espécies de levedura de solução que produzem álcool, gás de ácido carbônico, levedura de Baker, e assemelhados pela metabolização de um líquido de material de fermentação. Especificamente, células de levedura preferidas incluem células de levedura provenientes de *Saccharomyces* sp., e assemelhados, por exemplo, a variedade *S. cerevisiae* T73 ura3^{-}, um derivado

da variedade *S. cerevisiae* T73, uma variedade amplamente usada na produção de vinho (Exemplo 1) ou *Pichia sp.*

[0068] O componente (ii) da microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção é uma proteína de fator tissular (TF) ou uma variante desta dotada de atividade pró-coagulante.

[0069] Tal como usado neste contexto o termo "variante de TF" refere-se a qualquer polipeptídio derivado de TF por substituição, inserção ou adição de um ou mais aminoácidos.

[0070] Em uma concretização particular, o dito componente (ii) da microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção é uma proteína de TF.

[0071] O termo "fator tissular" ou "TF", tal como usado neste contexto, inclui TF nativo ou do tipo silvestre (wt) de qualquer espécie de animal, incluindo seres humanos, bem como seus mutantes mantendo pelo menos uma das funções do dito TF wt, vantajosamente, uma função do TF wt no que diz respeito a coagulação.

[0072] A proteína de TF é uma glicoproteína de membrana integral que é amplamente distribuída no reino animal que, como é encontrado naturalmente, consiste em um componente proteínico (proteína) e um fosfolipídio. Alguns sítios de glicosilação estão presentes em uma proteína de TF para a adição de cadeias laterais de oligossacarídeos para a dita proteína retribuir uma proteína de TF em uma

forma glicosilada. Na dependência do grau de glicosilação, diferentes formas glicosiladas da proteína de TF poderão ser disponibilizadas. Sob este aspecto, o TF completamente formado contém três sítios de glicosilação N encadeados potenciais da forma Asn-Xaa-Ser/Thr (Asn^{11}-Leu^{12}-Thr^{13}, Asn^{124}-Val^{125}-Thr^{126} e Asn^{137}-Asn^{138}-Thr^{139}). A glicosilação N encadeada nA levedura envolve tipicamente um núcleo interno de cerca de dez resíduos de manose, vinculados à asparagina por meio de dois resíduos GlcNAc, e uma cadeia externa ramificada de 50-100 resíduos de manose. Portanto, a glicosilação N vinculada poderá adicionar potencialmente tantos quantos 300 resíduos de manose ao TF, um aumento na massa molecular em cerca de 60 kDa. Além disso, é igualmente possível que vários resíduos de manose pudessem ser vinculados a vários sítios de glicosilação O vinculados (mais de 25). Em uma concretização particular, a microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção compreende uma proteína de TF glicosilada. Tal como usado neste contexto, o termo “glicosilado” inclui qualquer grau de glicosilação.

[0073] Na Figura 27A encontra-se ilustrada uma representação esquemática de uma microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção.

[0074] A proteína de TF tem uma estrutura de domínio, isto é, ela é uma proteína com regiões funcionais independentes. Em uma concretização particular, a dita

proteína de TF é a proteína de TF humano (hTF). Cada um dos domínios da proteína de hTF tem características estruturais e funcionais únicas: (1) um peptídio de sinal ou uma região com uma sequência líder de 32 que é processada pós-translacionalmente quando a proteína é processada a partir da forma imatura para a forma completamente formada; (2) um domínio extracelular hidrófilo N-glicosilado que compreende cerca de 219 aminoácidos terminais; (3) um fragmento de cerca de 23 aminoácidos, principalmente hidrófobos, que se acreditam ser aminoácidos de domínio de transmembrana; e (4) a extremidade carboxílica de 21 aminoácidos que se acreditam ser os aminoácidos que formam parte do fragmento citoplásmico de proteína. A estrutura de domínio da proteína de hTF permite a produção de, por exemplo, o domínio extracelular da proteína ou seus fragmentos funcionais. A sequência de aminoácidos da proteína de hTF é conhecida e pode ser consultada em bases de dados de proteínas tais como, por exemplo, NCBI (hTF, Número de acesso: P13726).

[0075] Adicionalmente, a proteína de TF pode ser um elemento de uma proteína de fusão, a dita proteína de fusão contendo uma primeira região que compreende uma proteína de TF ligada a uma segunda região que compreende outro peptídio ou proteína. A dita segunda região pode ser ligada à região amino-terminal da dita proteína de TF, ou, alternativamente, a dita segunda região pode ser ligada à

região carboxil-terminal da dita proteína de TF. Tanto a primeira quanto a segunda região podem ser diretamente ligadas uma à outra ou podem ser ligadas através de um polipeptídio de ligação entre as ditas primeira e segunda regiões.

[0076] Em uma concretização particular, a dita proteína de fusão compreende uma proteína de TF e uma marca, usualmente um marcador de peptídio, ligada ao domínio de C-terminal ou N- terminal da dita proteína de TF. O dito marcador é geralmente um peptídio ou sequência de aminoácidos que pode ser usada no isolamento ou purificação da dita proteína de fusão. Desta forma, O dito marcador é capaz de ligação a um ou mais ligantes, tais como, por exemplo, um ou mais ligantes de uma matriz de afinidade, tal como um suporte ou glóbulo de cromatografia com alta afinidade. Um exemplo do dito marcador é um marcador de histidina (marcador de His ou HT), tal como um marcador que compreende 6 resíduos de histidina (His6 ou H6), que pode ligar-se a uma coluna de níquel (Ni^{2+}) ou cobalto (Co^{2+}) com alta afinidade. A marcador de His, tal como ilustrada nos Exemplos 2 e 3, tem o aspecto desejável de que ela pode aglutinar os seus ligantes sob condições que são desnaturantes para a maior parte das proteínas e dilaceradoras para a maior parte das interações proteína-proteína. Desta forma, ela pode ser usada para remover a proteína chamariz marcada com H6 em seguida à dilaceração

das interações proteína-proteína com as quais o chamariz participou.

[0077] Exemplos ilustrativos adicionais, não limitativos de marcas de utilidade para isolar ou purificar a proteína de fusão incluem a marcador Arg, marcador FLAG, marcador Strep, um epítopo capaz de ser reconhecido por um anticorpo, tal como a marca-c-myc (reconhecida por um anticorpo anti-c-myc), marca-SBP, marca-S, peptídio de ligação de calmodulin, domínio de ligação de celulose, domínio de ligação de quitina, marca-S-transferase de glutationa, proteína de ligação de maltose, NusA, TrxA, DsbA, marca-Avi, e assemelhados. (Terpe K., Appl. Microbiol. Biotechnol. (2003), 60:523-525), uma sequência de aminoácidos tais como Ala-His-Gly-His-Arg-Pro; Pro-Ile-His-Asp-His-Asp-His-Pro-His-Leu-Val-Ile-His-Ser; Gly-Met-Thr-Cys-X-X-Cys; β-galactosidase, e outras.

[0078] Em uma concretização particular, O dito marcador é uma marca-His ligada ao domínio C-terminal da dita proteína de TF. De acordo com outra concretização, O dito marcador é uma marca-His ligada ao domínio N-terminal da dita proteína de TF.

[0079] A dita proteína de fusão também é dotada de atividade pró-coagulante. A atividade pró-coagulante da dita proteína de fusão pode ser ensaiada tal como mencionado anteriormente, por exemplo, por qualquer um dos ensaios de coagulação mencionados no Exemplo 4, tais como

por um ensaio de coagulação de plasma *in vitro*, ou por um ensaio de coagulação *in vitro* no sangue total não-anticoagulado, ou por um ensaio *in vivo* em um modelo de animal de hemorragia séria ou por um ensaio *in vivo* em um modelo de animal de hemorragia letal, tais como aqueles ensaios mencionados no Exemplo 4.

[0080] A dita proteína de fusão pode ser obtida por meios convencionais, por exemplo, por meio de expressão de gene da sequência de nucleotídios que codifica a dita proteína de fusão em uma célula de levedura adequada. A marcador eventual pode ser usada, se desejado, para o isolamento ou purificação da dita proteína de fusão.

[0081] De acordo com outra concretização particular, o dito componente (ii) da microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção é um fragmento de TF que tem atividade pró-coagulante.

[0082] Tal como usado neste contexto, o termo "fragmento da proteína de TF que tem atividade pró-coagulante" inclui qualquer peptídio a partir do qual TF que, quando é lipidado, tem atividade pró-coagulante. A atividade pró-coagulante de um fragmento de TF pode ser facilmente ensaiada por meio de qualquer ensaio convencional, por exemplo, por meio de qualquer um dos ensaios de coagulação mencionados no Exemplo 4. A título de mera ilustração, a atividade pró-coagulante de um fragmento de TF pode ser determinada por um ensaio de coagulação em

plasma *in vitro*, ou por um ensaio de coagulação *in vitro* em sangue total não-anticoagulado, ou por um ensaio *in vivo* em um modelo de animal de hemorragia séria ou por um ensaio *in vivo* em um modelo de animal de hemorragia letal, tais como aqueles ensaios mencionados no Exemplo 4.

[0083] A sequência de aminoácidos do dito fragmento da proteína de TF que tem atividade pró-coagulante pode ser idêntica àquela do fragmento correspondente da proteína de TF nativa, ou, alternativamente, pode ter inserções, supressões ou modificações de um ou mais aminoácidos com relação à proteína de TF nativa, desde que o fragmento resultante da proteína de TF tenha atividade pró-coagulante.

[0084] Em uma concretização particular, o fragmento de TF que tem atividade pró-coagulante compreende uma proteína de TF completamente formada. O termo "TF completamente formado" como usado neste contexto, refere-se a uma proteína de TF a cuja sequência de aminoácidos falta o peptídio de sinal. De acordo com uma concretização preferida, a dita proteína de TF completamente formada compreende a proteína de TF humana completamente formada. Além disso, em uma concretização específica, a dita proteína de TF humana completamente formada tem a sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ ID NO: 1.

[0085] De acordo com outra concretização particular, o fragmento da proteína de TF que tem atividade

pró-coagulante é uma proteína de TF em que a totalidade ou parte do domínio responsável pela ligação ao FVIIa está ausente e, consequentemente, a proteína resultante é incapaz de ligação ao FVIIa. O dito fragmento de uma proteína de TF que tem atividade pró-coagulante, mas onde falta o domínio responsável pela ligação ao FVIIa é por vezes chamado de "proteína de TF truncada" ou "forma truncada de TF" nesta descrição. Por extensão, a dita "proteína de TF truncada" pode incluir mutantes de proteína de TF que são dotados de atividade pró-coagulante em que o domínio responsável pela ligação ao FVIIa não é funcional.

[0086] De acordo com uma concretização particular, a dita proteína de TF truncada compreende o domínio de interação para o Fator X, a região de transmembrana e a caudacitoplasmática e carece, parcialmente ou totalmente, do domínio responsável pela ligação ao FVIIa. Além disso, de acordo com uma concretização específica, a dita proteína de TF truncada é uma forma truncada da proteína de TF humana que contém o domínio de interação para o Fator X (aa 174-251), a região de transmembrana (aa 252-274), e a caudacitoplasmática (aa 275-295) e um marcador de histidina extra (Exemplo 3). Os inventores descobriram agora, surpreendentemente, que a dita forma truncada da proteína de TF, a qual é desprovida do domínio responsável pela ligação ao FVIIa, é dotada de atividade pró-coagulante (Exemplo 4, Tabela 3).

[0087] Os autores da presente invenção descobriram agora, surpreendentemente, que o dito fragmento de TF, a quem falta a totalidade ou parte do domínio responsável pela ligação ao FVIIa, tem atividade pró-coagulante. Este resultado foi surpreendente uma vez que é amplamente conhecido que o TF age no caminho extrínseco de coagulação do sangue por ser exposto nas células adventícias nas ligações dos locais de lesão ao Fator VII de coagulação circulante/Fator VII de coagulação ativado (FVII/FVIIa) para formar o complexo TF::FVIIa que, na presença de cálcio, funciona como um substrato de forma tal que ocorre a ativação de FX. É aceito que na eventualidade de uma hemorragia produzida por uma lesão vascular, a coagulação seja disparada devido à ativação do caminho extrínseco que envolve a interação de TF com o seu ligante, FVII/FVIIa.

[0088] De acordo com outra concretização, o TF modificado contém uma ou mais mutações no domínio que é responsável pela ligação ao FVIIa, que resulta em que o TF modificado é incapaz de ligar-se ao dito FVIIa ou o faz com uma afinidade substancialmente reduzida. São conhecidas na técnica mutações de ponto no domínio de ligação ao FVIIa do TF que cancelam a ligação ao dito FVIIa (por exemplo, aquelas descritas por Kelley, R.F. *et al.*, 1995, Biochemistry, 34:10383-10392, cujo conteúdo fica portanto incorporado por referência na sua totalidade).

[0089] Os autores da presente invenção também

observaram que a atividade pró-coagulante do TF bem como a sua expressão em células hospedeiras de levedura é aumentada quando o dito TF realiza mutações nos sítios de glicosilação que impedem a ligação de pelo menos uma das três cadeias de glicosil N-ligadas encontradas no TF do tipo silvestre. Desta forma, em uma concretização particular, a microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção compreende um fragmento da proteína de TF não glicosilado que tem atividade pró-coagulante. Tal como mencionado anteriormente, o termo "glicosilado" inclui qualquer grau de glicosilação. Em uma concretização preferida, a variante de TF é um polipeptídio em que pelo menos um dos sítios de N-glicosilação do TF tem modificado de maneira a tornar o mesmo não funcional, isto é, incapaz de servir como um sítio de aceitação para a adição de cadeias de glicósidos. Os sítios de N-glicosilação na sequência de TF que podem ser modificados são aqueles anteriormente mencionados, isto é, o sítio Asn^{11}-Leu^{12}-Thr^{13}, o sítio Asn^{124}-Val^{125}-Thr^{126} e/ou o sítio Asn^{137}-Asn^{138}-Thr^{139}. Qualquer modificação das regiões de consenso de N-glicosilação é adequada na medida em que a adição da cadeia de glicosil N-ligado seja abolida ou substancialmente inibida. Preferentemente, a modificação é introduzida no resíduo Asn correspondente às posições 11, 124 e/ou 136 no TF humano completamente formado, uma vez que este é o resíduo que serve como aceitante para a fixação da cadeia

de glicosil. Da maneira que é utilizado neste contexto, “locais correspondentes aos locais 11, 124 e/ou 136 no TF humano completamente formado” refere-se aos sítios de N-glicosilação em outros ortólogos de TF que possam aparecer em uma posição diferente na cadeia de polipeptídios, mas que combinam com os sítios de N-glicosilação no TF humano completamente formado quando as sequências humanas e ortólogas são alinhadas com base na similaridade de sequências. Um algoritmo adequado para alinhamento ou múltiplas sequências de TF e, assim, para identificar sítios de N-glicosilação em ortólogos de TF correspondentes aos locais em TF humano completamente formado TF, é o programa PILEUP que faz parte do GCG Software Package(Genetics Computer Grupo, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wis.). O PILEUP cria um alinhamento de múltiplas sequências a partir de um grupo de sequências relacionadas utilizando alinhamentos no sentido de pares, progressivos, para mostrar a relação e percentual de identidade de sequências. Ele também traça uma árvore ou dendrograma que mostra as relações de agrupamento usadas para criar o alinhamento. O PILEUP utiliza uma simplificação do método de alinhamento progressivo de Feng e Doolittle, J.Mol. Evol., 35: 351-360 (1987). Preferentemente, os resíduos Asn nas posições 11, 124 e/ou 136 são substituídos por Ala. Desta forma, em uma concretização preferida, a variante de TF que faz parte das

microvesículas é selecionada a partir do grupo de N11A, N124A, N137A, N11A e N124A, N11A e N137A, N124A e N137A e N11A, N124A e N137A no TF humano completamente formado TF. Em qualquer outro ortólogo, as mutações ocorrerão nos correspondentes resíduos de Asn que formam os locais de consenso de glicosilação N-encadeado.

[0090] Adicionalmente, como no caso de uma proteína de TF, o fragmento da proteína de TF dotado de atividade pró-coagulante usado na execução desta invenção pode ser um elemento de uma proteína de fusão, a dita proteína de fusão contendo uma primeira região que compreende o seu dito fragmento de proteína de TF que tem atividade pró-coagulante, ligada à segunda região que compreende outro peptídio ou proteína. A dita segunda região pode ser ligada à região amino-terminal da dita proteína de fragmento de TF ou, alternativamente, a dita segunda região pode ser ligada à região carboxil-terminal do dito fragmento de proteína de TF. Tanto a primeira quanto a segunda regiões podem ser ligadas diretamente ou ligadas através de um polipeptídio vinculador entre dita primeira e segunda regiões.

[0091] Em uma concretização particular, a dita proteína de fusão compreende um fragmento da proteína de TF dotado de atividade pró-coagulante e a marcador ligada ao domínio de C-terminal ou N-terminal da dita proteína de fragmento de TF. O dito marcador é de uma maneira geral um

peptídio ou sequência de aminoácidos que pode ser usada no isolamento ou purificação da dita proteína de fusão. Exemplos ilustrativos, não-limitativos de marcas adequadas para a produção desta proteína de fusão incluem aqueles mencionados anteriormente em conexão com a proteína de fusão em que a primeira região foi uma proteína de TF. Em uma concretização particular, o dito marcador é uma marca-His ligada ao domínio de C-terminal da dita proteína de TF ou seu fragmento dotado de atividade pró-coagulante. De acordo com outra concretização, o dito marcador é uma marca-His ligada ao domínio de N-terminal da dita proteína de TF ou seu fragmento dotado de atividade pró-coagulante. Esta proteína de fusão também tem atividade pró-coagulante, sendo que a sua atividade pró-coagulante pode ser ensaiada tal como mencionada anteriormente, por exemplo, por meio de qualquer um dos ensaios de coagulação mencionados no Exemplo 4.

[0092] De acordo com a invenção, uma parte da dita proteína de TF ou seu fragmento que tem atividade pró-coagulante é integrada na dita membrana de levedura. Normalmente, a dita parte compreende a região lipófila da dita proteína ou fragmento (isto é, o domínio central de TF), enquanto que as suas regiões hidrófilas (isto é, a região amino-terminal e a região carboxil-terminal da dita proteína de TF) ficam voltadas para o lado exoplasmático ou lado endoplasmático da membrana. Informação relacionada com

as regiões lipófilas e hidrófilas da proteína de TF pode ser obtida a partir da Figura 2 que mostra um traçado de hidropatia de uma proteína de TF. O Exemplo 1, Seção 1.4 mostra que a dita proteína de TF ou seu fragmento que tem atividade pró-coagulante é integrada na membrana (isto é, ela é uma proteína associada à membrana).

[0093] De acordo com uma concretização particular, o domínio N-terminal da proteína de TF ou do seu fragmento que tem atividade pró-coagulante fica voltado para o lado exoplasmático da dita membrana, enquanto que de acordo com outra concretização particular o domínio N-terminal da dita proteína de TF ou fragmento que tem atividade pró-coagulante fica voltado para o lado endoplasmático da dita membrana (Figura 27).

[0094] A dimensão da microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção pode variar dentro de uma faixa relativamente ampla, usualmente a dita dimensão é igual ou mais baixa do que 1 µm, tipicamente igual a ou mais baixa do que 0,1 µm. Em uma concretização particular, a dimensão da microvesícula carreadora de TF derivada de leveduras da invenção varia entre 0,1 até 0,01 µm, conforme determinado por meio de microscopia eletrônica (Exemplo 1, Seção 1.6).

Processo para produzir microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção

A microvesícula carreadora de TF derivada de

leveduras da invenção pode ser obtida, tipicamente, por meio de técnicas recombinantes. Desta maneira, de acordo com outro aspecto, a invenção refere-se a um processo para a fabricação de uma microvesícula carreadora de TF derivada de levedura que tem atividade pró-coagulante (isto é, a microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção), doravante chamado de o "processo da invenção", que compreende:

a) submeter uma cultura de células de levedura recombinantes que expressam proteína de TF ou um fragmento desta que tem atividade pró-coagulante para fermentação sob condições que permitem a expressão da dita proteína de TF, ou seu fragmento que tem atividade pró-coagulante;

b) peletizar o produto resultante da fermentação da etapa a), para proporcionar um produto de fermentação;

c) submeter o dito produto de fermentação proveniente da etapa b) a homogeneização, para proporcionar um homogenado de fermentação; e

d) submeter o dito homogenado de fermentação proveniente da etapa c) a separação, para proporcionar uma pílula e um extrato de levedura clarificado (CYE) que contém a dita microvesícula carreadora de TF derivada de levedura que tem atividade pró-coagulante (isto é, a microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção);

e) coletar o dito extrato de levedura clarificado

(CYE) que contém a dita microvesícula carreadora de TF derivada de levedura que tem atividade pró-coagulante; e, opcionalmente,

f) se desejado, isolar ou purificar as ditas microvesículas carreadoras de TF derivadas de levedura que têm atividade pró-coagulante.

[0095] As células de levedura recombinantes que expressam proteína de TF ou um fragmento desta que tem atividade pró-coagulante podem ser obtidas por métodos recombinantes convencionais conhecidos daqueles versados na técnica. Sucintamente, a célula de levedura é transformada com um vetor de expressão de levedura que compreende a codificação de sequência de nucleotídios para a proteína de TF ou um fragmento desta que tem atividade pró-coagulante, encadeada operacionalmente a um promotor funcional de levedura.

[0096] A codificação de cDNA para proteína de TF ou um fragmento desta que tem atividade pró-coagulante pode ser amplificada pela reação de cadeia de polimerase (PCR) utilizando-se uma biblioteca de cDNA como gabarito e os preparadores apropriados. O Exemplo 1 expõe a amplificação da codificação do cDNA para a proteína de hTF completamente formada; o Exemplo 2 expõe a amplificação da codificação de cDNA para a proteína de hTF completamente formado com 18 nucleotídios extras (codificação para seis histidinas) na extremidade 3’; e o Exemplo 3 expõe a amplificação da

codificação de cDNA para uma forma truncada da proteína de hTF (TTF), que contém o domínio de interação para o Fator X, a região de transmembrana, e a caudacitoplasmática com 18 nucleotídios extras (codificação para seis histidinas) na extremidade 3´.

[0097] Da maneira que é utilizado neste contexto, "vetor" refere-se a uma molécula de ácido nucléico capaz de transportar outro ácido nucléico ao qual ela foi vinculada. O termo "vetor de expressão de levedura" tal como usado neste contexto, refere-se a construções de expressões de DNA, por exemplo, segmentos de ácido nucléico, plasmídios, cosmídios, fágios, vírus ou partículas de vírus capazes de sintetizarem as proteínas em apreço codificadas por seus genes recombinantes respectivos (isto é, proteína de TF ou um fragmento desta que tem atividade pró-coagulante) carreados pelo vetor em uma levedura. Alternativamente, segmentos de ácido nucléico também podem ser usados para criar células de levedura transgênicas, utilizando-se recombinação não direcional ou homóloga, em que o gene ou genes de interesse são integrados de forma estável no genoma de levedura. Normalmente, o vetor de expressão de levedura compreende a codificação de sequências de nucleotídios para TF ou um fragmento destes que tem atividade pró-coagulante vinculada operacionalmente a um promotor que é funcional em células de levedura (isto é, um promotor funcional de levedura).

[0098] Os vetores para o uso com a invenção são, por exemplo, vetores capazes de replicação e/ou expressão autônoma de ácidos nucléicos aos quais eles estão encadeados nas células de levedura. No presente relatório, os termos “plasmídio” e “vetor” são usados permutavelmente quando o plasmídio é a forma mais comumente usada de um vetor. Além disso, a invenção destina-se a incluir essas outras formas de vetores de expressão que servem a funções equivalentes e que se tornam conhecidas na técnica subsequentemente a este assunto. O dito vetor de expressão de levedura pode ser um vetor de expressão episomal de levedura ou um vetor de expressão integrativa de levedura, e eles podem ser obtidos por meio de técnicas convencionais conhecidas da pessoa versada na técnica.

[0099] Desta forma, de acordo com uma concretização, o dito vetor de expressão de levedura é um vetor de expressão episssômica de levedura. O termo “vetor de expressão episssômica de levedura”, tal como usado neste contexto, refere-se a um vetor de expressão que é mantido como uma molécula de DNA extra-cromossômica no citoplasma de levedura. Em uma concretização particular, o dito vetor de expressão episssômica de levedura, adicionalmente à codificação de sequência de nucleotídios para a proteína de TF ou um fragmento desta que tem atividade pró-coagulante vinculada operacionalmente a um promotor funcional de levedura, compreende ainda: (i) um gene de seleção de

levedura; (ii) uma origem de replicação de levedura; (iii) um gene de seleção bacteriana; e (iv) um sinal de término de transcrição de levedura. Vantajosamente, o dito vetor de expressão episssômica de levedura compreende ainda um sítio de restrição único para clonagem do gene selecionado (proteína de TF ou um fragmento desta que tem atividade pró-coagulante) sob o controle do promotor funcional de levedura e seguido pelo sinal de término de transcrição de levedura.

[00100] Praticamente qualquer promotor funcional de levedura, gene de seleção de levedura, origem de replicação de levedura, gene de seleção bacteriana, sinal de término de transcrição de levedura, e sítio de restrição para clonagem, pode ser usado na fabricação do dito vetor de expressão episssômica de levedura; não obstante, em uma concretização particular, utiliza-se o promotor de deidrogenase gliceraldeído-3-fosfato (pGPD) como o promotor funcional de levedura; de acordo com outra concretização particular, o gene URA3 (URA3) é usado como o gene de seleção de levedura; de acordo com outra concretização particular, utiliza-se a origem de replicação de 2 micrômetros (2µ) de levedura como a origem de replicação de levedura; de acordo com outra concretização particular, utiliza-se o gene de resistência a ampicilina (Amp) como o gene de seleção bacteriana; e de acordo com outra concretização particular, utiliza-se o sinal de término de

transcrição da quinase de fosfoglicerato (PGKt) como o sinal de término de transcrição de levedura específico. Desta forma, em uma concretização específica (Exemplos 1-3), o vetor de expressão episssômica de levedura compreende (i) o gene de URA3; (ii) o gene de Amp para selecionar e propagação do vetor em *E. coli*; (iii) a origem de replicação de 2µ levedura; (iv) o pGPD; (v) o sinal de término de transcrição de levedura especifico de PGKt; e (vi) um sítio de restrição de *Bam*HI único que permite a clonagem de genes selecionados sob o controle do pGPD, e seguido pela sequência de PGKt.

[00101] De acordo com outra concretização, o dito vetor de expressão de levedura é um vetor de expressão integrante de levedura. O termo "vetor de expressão integrante de levedura", tal como usado neste contexto, refere-se a um vetor que é capaz de integrar o genoma de levedura. Em uma concretização particular, o referido vetor de expressão integrante de levedura compreende: (i) um gene de seleção bacteriano; e (ii) um cassete de expressão inserido em um gene de seleção de levedura, sendo que o dito cassete de expressão compreende ainda um promotor funcional de levedura, um sinal de término de transcrição de levedura e a sinal de término de transcrição de levedura e um sítio de restrição único para clonagem do gene selecionado (proteína de TF ou um fragmento desta que tem atividade pró-coagulante).

[00102] Praticamente qualquer gene de seleção bacteriana, cassete de expressão inserido em um gene de seleção de levedura, promotor funcional de levedura, sinal de término de transcrição de levedura, e sítio de restrição único para clonagem do gene selecionado, pode ser usado na fabricação do dito vetor de expressão integrante de levedura; não obstante, em uma concretização particular, o gene de resistência a ampicilina (Amp) é usado como o gene de seleção bacteriano; de acordo com outra concretização particular, o cassete de expressão pGPD-BamHI-PGKt inserido na região central do gene URA3 é usado como cassete de expressão que contém um promotor funcional de levedura a (pGDP), um sinal de término de transcrição de levedura (PGKt), e sítio de restrição único (BamHI) para clonagem do gene selecionado na região central do gene URA3.

[00103] Virtualmente qualquer célula de levedura suscetível de ser transformada com o dito vetor de expressão de levedura que compreende a codificação de sequência de nucleotídio para a proteína de TF ou um fragmento desta que tem atividade pró-coagulante, vinculada operacionalmente a um promotor funcional de levedura, pode ser usada na presente invenção. A transformação de células de levedura com o dito vetor de expressão de levedura pode ser realizada por meios convencionais conhecidos pela pessoa versada na técnica (Sambrook *et al*., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual).

[00104] De acordo com uma concretização preferida, a dita levedura é uma levedura não floculante (isto é, células de leveduras que quando são dispersas em um processo de fermentação não se floculam (agregam)). Vantajosamente, a dita célula de levedura é uma célula de levedura GRAS. Exemplos ilustrativos, não limitativos, de células de levedura que podem ser usadas no processo da invenção são as chamadas espécies de levedura de licor (leveduras usados para produzir um licor) que produzem álcool, gás de ácido carbônico, levedura de padaria, e assemelhados, pela metabolização de um líquido de material de fermentação. Especificamente, os preferidos são selecionados a partir de *S. cerevisiae*. Exemplos de tal levedura de licor incluem células de levedura de cerveja, células de levedura de vinho, e células de levedura de saquê. De acordo com uma concretização preferida da invenção, a célula de levedura é uma célula de levedura de vinho, tal como *S. cerevisae* T73 ura3^{-} (Exemplos 1-3).

[00105] Uma vez que a célula de levedura é transformada, a etapa seguinte consiste em submeter a cultura de células de levedura recombinantes que expressam proteína de TF ou um fragmento desta que tem atividade pró-coagulante a fermentação sob condições que permitem a expressão da dita proteína de TF, ou seu fragmento que tem atividade pró-coagulante. De acordo com uma concretização particular, a dita célula de levedura é desenvolvida em um

meio adequado em que a dita célula de levedura pode expressar o produto heterólogo desejado (proteína de TF ou seu fragmento que tem atividade pró-coagulante). Meios de cultura apropriados para o desenvolvimento de células de levedura são amplamente conhecidos daqueles versados na técnica e serão selecionados a partir daqueles mais apropriados em vista das células de levedura a serem cultivadas. Qualquer material para produzir um produto de fermentação pode ser usado, na medida em que ele seja adequado para fermentação causada pelas células de levedura não aglutinantes empregadas, e materiais conhecidos poderão ser utilizados à vontade. Por exemplo, maltes, sucos de frutas, líquidos de açúcar, líquidos de cereais sacarificados, e assemelhados são normalmente usados individualmente ou em combinação conforme for apropriado na produção de licores. Desta forma, nutrientes e assemelhados podem ser adicionados aos mesmos quando for necessário.

[00106] As condições de fermentação não são diferentes das condições conhecidas em essência e podem ser fixadas pela pessoa versada na técnica. Em uma concretização particular, a fermentação é seguida pelo controle da evolução dos parâmetros principais durante o processo de fermentação e é sustada quando a pressão de oxigênio (PO_2) alcança uma condição estacionária.

[00107] O produto de fermentação resultante proveniente da etapa de fermentação a) é então peletizado

por métodos convencionais, tais como por centrifugação, e novamente suspenso em tampão de lise adequado antes da sujeição do dito produto a homogeneização. As leveduras podem ser homogeneizadas por meio de métodos convencionais, por exemplo, por alta pressão em um homogeneizador para proporcionar um homogenado de fermentação.

[00108] O homogenado de fermentação é então submetido a to separação por meio de métodos convencionais, tais como por centrifugação, para proporcionar uma pílula e um extrato de levedura clarificado (CYE) que contém a dita microvesícula carreadora de TF derivada de leveduras que tem atividade pró-coagulante (isto é, a microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção) que pode ser coletada separadamente. Um esquema geral para o processo da invenção encontra-se exposto na Figura 11.

[00109] A presença da proteína de TF ou de um fragmento desta que tem atividade pró-coagulante pode ser determinada por meio de métodos convencionais, tais como, por análise de mancha-oeste mediante utilização de um anticorpo monoclonal de proteína anti-TF específica (mAb). Além disso, a atividade pró-coagulante do CYE pode ser determinada por meio de qualquer ensaio convencional, tal como por qualquer um dos ensaios de coagulação mencionados no Exemplo 4, por exemplo, tipicamente por um ensaio de coagulação *in vitro* em plasma ou em sangue total não-anticoagulado, e assemelhado.

[00110] Outros exames de amostras de CYE por microscopia imunoeletrônica mostraram a presença de microvesículas derivadas de leveduras rotulados por mAb anti-TF na superfície das ditas microvesículas. As ditas microvesículas, que compreendem proteína de TF ou um fragmento desta que tem atividade pró-coagulante, são igualmente dotadas de atividade pró-coagulante e correspondem às microvesículas carreadoras de TF derivadas de leveduras da invenção.

[00111] Opcionalmente, se desejado, as ditas microvesículas carreadoras de TF derivadas de leveduras que têm atividade pró-coagulante previamente obtidos de acordo com o processo da invenção podem ser concentradas, isoladas ou purificadas por meio de métodos convencionais conhecidos pela pessoa versada na técnica. A título de ilustração, a purificação por meio de cromatografia de afinidade de proteínas que contêm um marcador de peptídio (por exemplo, uma marca-His, ou outra assemelhada), seja no término C- ou N-, constitui um método amplamente padronizado para se obterem preparados altamente purificados de um grande número de proteínas. Como qualquer método cromatográfico, o dito método pode ser facilmente aumentado. Procedimentos de purificação alternativos, tais como cromatografia de imunoafinidade, podem ser realizados, muito embora eles requeiram a disponibilidade de estoques bem padronizados de anticorpos mono ou policlonais anti-TF

específicos, especialmente para uma produção aumentada.

[00112] Desta forma, o método de isolamento e purificação dependerá, entre outras coisas, da natureza da proteína de TF ou seu fragmento que tem atividade pró-coagulante, isto é, se ela for uma proteína de fusão que tem a marcador para ligação a um ou mais ligantes de uma matriz de afinidade, tal como um suporte de cromatografia ou glóbulo com alta afinidade (por exemplo, uma marca-His, ou assemelhado), ou um epítope capaz de ser reconhecido por um anticorpo, tal como c-myc-marcador (reconhecido por um anticorpo anti-c-myc), e outros assemelhados.

[00113] A Figura 23 mostra esquematicamente um método para purificar microvesículas derivadas de leveduras carreadores de uma proteína de TF recombinante (ou um fragmento desta que tem atividade pró-coagulante) na forma da proteína de fusão fundida a uma marca-His [isto é, (microvesículas derivadas de levedura carreadora de (proteína marca-His de TF) ou “Produto de Droga 6HT-TF” como mencionado na Figura 23]. Sucintamente, um extrato de levedura clarificado (CYE) obtido de acordo com o processo anteriormente exposto, que contém microvesículas derivadas de levedura carreadora (TF-his-marcador de proteína), é filtrado (por exemplo, através de um filtro de dimensão de poro de 0,2 μm por filtragem de fluxo tangencial) antes de ser carregado sobre uma coluna de afinidade apropriada (por exemplo, coluna de afinidade HiTrap®); então, depois de

aplicação da amostra, o fluxo passante é recuperado (material não ligado), e a coluna é submetida a diversas lavagens e, depois da última lavagem, as microvesículas derivadas de levedura carreadora (TF-his-marcador de proteína) são submetidas a eluição mediante adição à coluna de um tampão apropriado (por exemplo, um tampão que contém imidazol) e as frações de eluição são coletadas e submetidas a diálise para proporcionar as microvesículas derivadas de levedura carreadora (TF-his-marcador de proteína) derivadas de leveduras.

[00114] Desta forma, de acordo com outra concretização, as microvesículas derivadas de levedura de carreador de TF da invenção podem ser purificadas por um equipamento ÄKTA prime. O ÄKTA prime é um sistema cromatográfico de líquido automatizado proveniente da General Electric Healthcare que pode ser usado para o dêsenvolvimento de protocolos de purificação padrão que poderão ser facilmente aumentados para grandes produções.

Método para a purificação de microvesículas que compreendem uma proteína de membrana de interesse a partir de um hospedeiro eucariótico

[00115] Os autores da presente invenção também observaram que as vesículas presentes no extrato clarificado derivado das células expressoras de TF podem ser, além disso, enriquecidas utilizando-se divisão de dimensão. Sem com isso se pretender ficar vinculado a

qualquer teoria, acredita-se que a divisão de dimensão utilizando uma membrana que tem uma dimensão de poro definida permite a eliminação de outros componentes do extrato de células que são prejudiciais à atividade pró-coagulante da proteína. Acredita-se que o método desenvolvido pelos inventores é de uma maneira geral aplicável à purificação de qualquer proteína de membrana em uma hospedeira eucariótica na dita membrana. Desta forma, em um outro aspecto, a invenção refere-se a um processo para a fabricação de uma preparação de microvesículas que compreende uma proteína de membrana de interesse que compreende as etapas de:

(a) desenvolver uma cultura de uma célula hospedeira eucariótica sob condições capazes de permitirem a expressão da dita proteína de membrana de interesse;

(b) submeter as células da cultura de (a) a homogeneização;

(c) submeter o homogenado proveniente da etapa (b) a separação, para proporcionar uma pílula e um extrato de células clarificado que contém as ditas microvesículas derivadas de células que contêm a proteína de membrana de interesse;

(d) purificar as ditas microvesículas derivadas de células por meio de divisão de dimensão.

Etapa (a): Desenvolvimento de uma cultura de uma célula hospedeira eucariótica

[00116] As hospedeiras eucarióticas que podem ser usadas no contexto da presente invenção incluem quaisquer células que podem ser cultivadas no laboratório ou em uma instalação de produção, mas, com maior preferência, uma célula que pode ser manipulada geneticamente de maneira a permitir expressão dentro da célula de uma proteína de membrana de interesse. Hospedeiras que podem ser usadas na presente invenção incluem levedura (por exemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*), células de insetos, células de plantas ou sistemas de células de mamíferos (por exemplo, COS, CHO, BHK, 293,3T3).

[00117] As hospedeiras eucarióticas usadas podem seja expressar a sua proteína como parte do proteoma normal ou podem ter sido modificadas pela introdução de um ácido nucléico exógeno que codifica a proteína de membrana de interesse. Nos dois casos, as células precisam ser cultivadas sob condições que permitem a expressão da proteína de membrana de interesse. Se a proteína de membrana de interesse for codificada por um ácido nucléico, este ácido nucléico pode ser colocado em um vetor sob o controle do promotor. Exemplos de promotores amplamente conhecidos que são adequados para a execução da invenção incluem promotores constitutivos, tais como aqueles encontrados em alguns vírus eucarióticos (vírus polioma, adenovírus, SV40, CMV, vírus de sarcoma aviário, vírus de hepatite B, promotor de gen metalotioneina, promotor de

quinase de timidina de vírus simplex de herpes, regiões de LTR de retrovírus, promotor de imunoglobulina, promotor de actina, promotor de EF-1alfa bem como promotores capazes de serem induzidos em que a em que expressão do gene de jusante requer adição da substância de um sinal exógeno para a cultura, tal como o promotor de tetraciclina, NFKappaB/luz UV, Cre/lox, promotores de choque térmico, promotores de polimerase II de RNA regulável descritos em WO/2006/135436, bem como promotores específicos de tecido, tais como o promotor de PSA descrito na WO2006012221.

[00118] As células são cultivadas utilizando-se qualquer meio de cultura adequado. A pessoa versada na técnica apreciará que o meio de cultura tem de ser selecionado na dependência do tipo de célula hospedeira a ser usada. Entretanto, uma ampla variedade de meios para cada tipo de célula encontra-se disponível para aquelas pessoas versadas na técnica, tais como descritos em Sambrook, J. *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)) e Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al, John Wiley & Sons (1992)).

[00119] Praticamente qualquer proteína de membrana pode ser expressa e purificada de acordo com o método da invenção. Se a proteína de interesse for uma proteína de membrana, então a proteína pode ser expressa como tal,

porque ela será visada para o sistema de membrana da célula hospedeira desde que ela contenha uma sequência de sinais. As proteínas de membranas que podem ser expressas utilizando-se o método da invenção incluem receptores, transportadores tais como receptores de estrógeno, transportadores de aminoácidos, receptores andrógenos, receptores de pituitária, receptores de transferrina, receptores de progesterona, e transportadores de glicose. É igualmente possível expressar proteínas solúveis utilizando-se o método da invenção se estas proteínas solúveis forem fundidas a uma sequência de sinais no término-N e a um domínio de transmembrana no término-C. Desta maneira, a proteína de fusão será inserida nas membranas da célula hospedeira e purificada nas microvesículas. De acordo com uma concretização preferida, a proteína de membrana de interesse é rTF, um fragmento desta ou um mutante de N-glicosilação desta tal como descrita anteriormente.

Etapa (b): Homogeneização

[00120] Na etapa (b), as células da cultura são homogeneizadas de maneira tal a proporcionarem um homogenado. As células precisam ser separadas em relação ao meio de cultura utilizando-se qualquer técnica disponível para a pessoa versada (centrifugação, sedimentação, filtragem e assemelhados). Uma vez que as células estejam isoladas, estas são submetidas a homogeneização de maneira

a romper as paredes das células e membranas de plasma e para liberar o conteúdo intracelular para o tampão em que é realizada a homogeneização. O rompimento das células é realizado utilizando-se qualquer método adequado conhecido na técnica, tal como alta pressão, cavitação de nitrogênio, choque osmótico utilizando-se um tampão hipotônico, tratamento com ultra-som, homogeneização mecânica, métodos de rompimento de tecido enzimolíticos, sonificação. A homogeneização é realizada com a ausência de qualquer detergente. Preferentemente, a homogeneização é realizada por alta pressão.

Etapa (c): Separação do homogenado

[00121] O homogenado é então fracionado por meios convencionais a fim de separar células não rompidas e agregados grandes em relação ao conteúdo liberado a partir das células. Preferentemente, o fracionamento é realizado por centrifugação a 13000xg. O sobrenadante obtido depois da centrifugação é um extrato de células clarificado que compreende o material solúvel, bem como diferentes populações de microvesículas de diferentes dimensões que resultam da fragmentação do sistema de membranas celulares.

Etapa (d): Purificação de Divisão de Dimensão

[00122] O extrato de células clarificado obtido na etapa (c) é então fracionado com base na dimensão das microvesículas que formam o dito extrato de maneira a selecionar aqueles que têm uma dimensão de diâmetro

específica. Os autores da presente invenção verificaram que podem ser usadas técnicas de purificação de divisão de dimensão para proporcionarem uma preparação de microvesículas de pureza suficiente que pode ser administrada terapeuticamente sem etapas de purificação adicionais, tais como cromatografia e outros métodos anteriormente considerados necessários. Sem com isso se pretender ficar delimitado por qualquer teoria particular da invenção acredita-se que as etapas de processamento dos extratos de células clarificados através de um fracionamento de divisão de dimensão resultam em um produto com uma carga de contaminantes reduzida. Além disso, os contaminantes são da dimensão e natureza que eles podem ser facilmente separados em relação à microvesícula por meio de uma simples etapa de purificação por divisão de dimensão.

[00123] A filtragem de membranas é uma técnica amplamente conhecida no campo da técnica de bioprocessamento. Uma membrana é definida como uma estrutura que tem dimensões laterais muito maiores do que a sua espessura, através da qual pode ocorrer a transferência de massa sob uma variedade de forças de acionamento. Conquanto muitos filtros possam ser considerados membranas, os filtros também incluem materiais cujas dimensões laterais não são usualmente 100 vezes maiores do que a sua espessura e cuja função de separação é principalmente por captura de espécies ou partículas através da sua espessura.

Os parâmetros mais comuns usados para caracterizar membranas caem em três categorias gerais. Estas são propriedades de transporte, características de poros (geométricas), e propriedades de superfície (ou predominantemente químicas). Não obstante, as propriedades de transporte dependem significativamente das características de poro e superfície. Muito embora a separação de membranas possa ser mais lenta e um processo de volume mais baixo do que outros processos de separação, a sua eficiência torna-o um método que pode ser usado para recuperar pequenas quantidades de produtos valiosos.

[00124] Os sistemas de filtros de membranas podem ser concebidos em uma variedade de maneiras de forma a terem propriedades de filtragem diferentes. Os critérios de concepção incluem: operação em extremidade morta (com ou sem agitação) ou modalidade de fluxo transversal; recuperação plena ou parcial da mistura alimentada; aplicação de pressão de transmembrana externa por meio de bombeamento, manta de gás inerte, ou evacuação do lado permeado do dispositivo; e o uso de folhas planas (seja de forma simples ou acumulada), feixe de fibras ocas, ou membranas tubulares. Os métodos de separação por divisão de dimensão utilizam uma membrana de divisão de dimensão que pode ser uma diálise ou outra membrana assemelhada como será do conhecimento daqueles normalmente versados na técnica. Materiais de membrana de diálise adequados de

utilidade na filtragem por membrana de divisão de dimensão da invenção incluem aqueles comercialmente disponíveis, tais como aqueles produzidos a partir de polietersulfona, policarbonato, nylon, polipropileno, e assemelhados. Fornecedores destes materiais de membranas de diálise incluem Akzo-Nobel, Millipore, Inc., Poretics, Inc., e Pall Corp., a título de exemplo.

[00125] De acordo com uma concretização preferida, o fracionamento de dimensão baseado em membrana é uma filtragem de fluxo tangencial (TFF), também conhecida como "filtragem de fluxo transverso". A filtragem de fluxo tangencial é um processo de separação acionado por pressão em que fluido é bombeado tangencialmente ao longo da superfície da membrana. Uma pressão aplicada serve para forçar uma parte do fluido incluindo contaminantes através da membrana para a dimensão de filtrado. Particulados e macromoléculas que são excessivamente grandes para passar através dos poros de membrana são retidos no lado de montante. Em contraste com as técnicas de filtragem por fluido normal (NFF) em que os componentes retidos são formados na superfície da membrana, a filtragem de fluxo tangencial varre os componentes retidos por meio do fluxo do fluido.

[00126] A TFF é classificada com base na dimensão dos componentes que estão sendo separados. Uma classificação das dimensões de poros das membranas é

fornecida tipicamente como um valor em micrômetros e indica que partículas maiores do que a classificação serão retidas pela membrana. Um limite de peso molecular nominal (NMWL), por outro lado, é uma indicação de que a maior parte das macromoléculas dissolvidas com pesos moleculares mais altos do que o NMWL e algumas com pesos moleculares mais baixos do que o NMWL serão retidas pela membrana. Uma forma do componente, sua capacidade de deformar-se, e sua interação com outros componentes na solução afetam todas elas a retenção. Diferentes fabricantes de membranas utilizam diferentes critérios para designar as classes de NMWL para uma família de membranas, mas aqueles normalmente versados na técnica serão capazes de determinar a classificação apropriada empiricamente.

[00127] A ultrafiltragem é uma das formas mais amplamente usadas de TFF e é usada para separar proteínas a partir de componentes tampão para permuta de tampão, dessalinização, ou concentração, mas também pode ser usada para filtragem dos extratos de células clarificados da invenção. Dimensões de proso típicas para filtragem de microvesículas variam de 0,2 até 0,1 de micrômetro. De acordo com uma concretização preferida, a TFF contém uma primeira membrana que tem uma dimensão de poro de 0,2 de micrômetro e uma segunda membrana que tem uma dimensão de poro de 0,1 de micrômetro, de forma que o espaço entre membranas acumula microvesículas que têm um diâmetro entre

0,2 e 0,1 micrômetros.

[00128] Na operação da unidade de TFF, usa-se uma bomba para gerar fluxo da corrente de alimentação através do canal entre duas superfícies de membrana. Durante cada passagem de fluido sobre a superfície da membrana, a pressão aplicada força uma parte do fluido através da membrana e dentro da corrente de filtrado. O resultado é um gradiente na concentração de material de alimentação a partir das condições de massa no centro do canal para as condições de parede mais concentrada na superfície da membrana. Existe também um gradiente de concentração ao longo do comprimento do canal de alimentação a partir da entrada para a saída (retentor) quando progressivamente mais fluido passa para o lado do filtrado. O fluxo de material de alimentação ao longo da extensão da membrana provoca uma queda de pressão da alimentação para a extremidade de retentor do canal. O fluxo no lado de filtrado da membrana é tipicamente baixo e haverá pouca restrição, de maneira tal que a pressão ao longo do comprimento da membrana no lado de filtrado é aproximadamente constante.

[00129] As membranas podem ser fabricadas a partir de vários materiais que oferecem alternativas nas características de lavagem e compatibilidade química. Materiais que são adequados incluem celulose, polietersulfona e outros materiais conhecidos daqueles

versados na técnica. Em determinadas concretizações utiliza-se polietersulfona. As membranas de polietersulfona típicas tendem a adsorver proteína bem como outros componentes biológicos, conduzindo a sujeira da membrana e fluxo diminuído. Algumas membranas são modificadas hidrofilamente para serem mais resistentes a sujeira, tais como a Biomax (Millipore).

[00130] Aqueles versados na técnica reconhecerão que vários tipos de módulos de TFF serão de utilidade na prática da invenção. Módulos de TFF de utilidade incluem, sendo que não se fica limitado aos mesmos, módulos de placa plana (também conhecidos como cassetes), módulos enrolados em espiral, e módulos de fibra oca.

[00131] Para qualquer modulo dado, parâmetros de processo chave podem ser então facilmente otimizados por aqueles normalmente versados na técnica. Tais parâmetros incluem taxa de fluxo transversal, pressão de transmembrana (TMP), controle de filtrado, área de membrana, e concepção de diafiltragem. A taxa de fluxo transversal depende de qual o módulo que é selecionado. De uma maneira geral, uma taxa de fluxo transversal mais alta proporciona sob TMP igual e aumenta a ação de varredura através da membrana e reduz o gradiente de concentração no sentido da superfície de membrana. Muitas aplicações de TFF aplicam um ponto de ajuste de pressão e fluxo transversal e o filtrado flui descontrolado e irrestrito para fora do módulo. Este é o

tipo de operação mais simples, mas em algumas circunstâncias poderá ser desejado usar algum tipo de controle de filtrado além daquele conseguido pela simples ajustagem da pressão com a válvula de retentor. A área de membrana é selecionada depois da determinação do fluxo de processo e do volume total a ser processado e também é dependente do tempo de processo.

[00132] A concentração pode ser tipicamente realizada por centrifugação a 2000-4500g, tal como entre 2500-4000g, ou entre 2750-3500g, ou entre 3000-3500g, tal como a 3000g ou 3100g ou 3200g ou 3300g ou 3400g ou 3500g.

[00133] Tipicamente, a centrifugação pode ser realizada durante várias horas, por exemplo, durante mais do que uma hora, tal como durante 1-10 horas.

[00134] Para reduzir ao mínimo quaisquer efeitos negativos na estabilidade do polipeptídio de interesse a centrifugação pode, em particular, ser realizada a uma temperatura na faixa de 2-200°C, tal como na faixa de 3-15 graus Celsius ou na faixa de 3-10°C ou na faixa de 3-6 graus Celsius.

[00135] Os tampões preferidos para o uso na TFF são tampões de fosfato, tampão HEPES ou tampão TRIS. Entretanto, o tampão em determinadas concretizações tem uma concentração de 5 mM até 15 mM, incluindo concentrações de pelo menos 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM e 15 mM, e além disso incluindo

concentrações de mM situadas entre elas. Em determinadas concretizações, o tampão tem um pH situado entre cerca de 7,2 até 7,5. Desta forma, de acordo com uma concretização o tampão tem um pH def 7,2, 7,3, 7,4 ou 7,5 ou valores de pH fracionários entre eles. De acordo com outra concretização, o tampão permutador de tampão compreende, além disso, 0,10 M até 0,20 M NaCl e 3,5% até 4,5% de sacarina.

[00136] De acordo com uma concretização preferida, a preparação de microvesícula obtida depois da etapa de fracionamento de dimensão é ainda aplicada a uma segunda etapa de purificação que permite a separação das microvesículas que têm a quantidade de proteína/atividade mais alta a partir de qualquer outro produto presente na amostra.

[00137] De acordo com uma concretização, a dita segunda etapa de purificação é realizada por uma segunda etapa de fracionamento de dimensão. De acordo com outra concretização, a segunda etapa de purificação pode ser realizada por meio de cromatografia de afinidade. Se as microvesículas contiverem TF, então a cromatografia de afinidade é realizada utilizando-se um composto que mostra afinidade com o TF (por exemplo, um anticorpo). Se as microvesículas contiverem uma proteína de fusão que compreende TF e a marca, a cromatografia de afinidade pode ser realizada mediante utilização de um ligante que mostra afinidade no sentido da dita marca. Preferentemente, a

marcador é um marcador de hexahistidina, caso este em que a cromatografia de afinidade é realizada utilizando-se uma coluna de afinidade de metal.

[00138] Uma vez que a preparação de microvesículas foi purificada, o eluado da etapa de fracionamento é então testado quanto à presença da proteína de interesse e aquelas frações que contêm a quantidade mais alta de proteína ou a atividade mais alta são então agrupadas e usadas diretamente. O perfil de eluição da coluna pode ser testado quanto à presença da proteína, utilizando-se quaisquer meios disponíveis conhecidos na técnica para detectar a presença da proteína dada (ELISA, Mancha-oeste, RIA e assemelhadas) ou pode ser testada quanto à presença da atividade da proteína de interesse. A pessoa versada na técnica apreciará que o teste de atividade dependerá da proteína que está sendo purificada. De acordo com uma concretização preferida, a proteína de interesse é TF e a atividade que pode ser detectada para identificar aquelas frações que contêm as vesículas que compreendem a dita proteína é a atividade pró-coagulante como explicada no Exemplo 5.

Usos terapêuticos da microvesícula carreadora de TF derivada de leveduras da invenção

[00139] Diferentes ensaios mostraram que a microvesícula carreadora de TF derivada de leveduras da invenção exibem atividade pró-coagulante. Efetivamente, o

Exemplo 4 inclui:

a) ensaios i*n vitro* demonstrando que a microvesícula carreadora de TF derivada de leveduras da invenção causam formação de grumos de fibrina e coagulação do sangue em condições saudáveis e em pacientes; a saber, os ditos ensaios mostram que as ditas microvesículas carreadoras de TF derivadas de leveduras da invenção são capazes de coagular:

- plasma proveniente de pacientes saudáveis (ensaios de coagulação em plasma);
- deficientes de plasma em FVIII, em FIX ou em FXI (ensaios de coagulação em plasma);
- plasma proveniente de deficiência de plaquetas adquirida (ensaios de coagulação em plasma Trombocitopênico);
- plasma proveniente de plasma deficiente em FXI na presença de um anticorpo de anti-FVII (ensaios de coagulação em plasma);
- sangue proveniente de pacientes saudáveis (ensaios de coagulação em sangue total não-anticoagulado); e
- sangue proveniente de pacientes hemofílicos (ensaios de coagulação em sangue total não-anticoagulado);

b) ensaios i*n vivo* demonstrando que A levedura carreadora de TF derivado de microvesícula da invenção é um agente de utilidade para tratamento anti-hemorrágico em

modelos de hemorragia grave (por aplicação diretamente no vaso sanguíneo previamente seccionado); a saber, os ditos ensaios mostram que a dita microvesícula carreadora de TF derivada de levedura é de utilidade como um agente hemostático tópico em animais experimentais não tratados e tratados com heparina.

c) Ensaios *in vivo* demonstrando que a microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção é um agente de utilidade para tratamento anti-hemorrágico tópico em modelos de hemorragia letal (por aplicação diretamente no vaso sanguíneo previamente seccionado); a saber, os ditos ensaios mostram que a dita microvesícula carreadora de TF derivada de levedura é de utilidade como um agente hemostático tópico em um modelo de animal de hemorragia letal por seção próxima de caudas de camundongo deficientes em FVIII.

[00140] Estes resultados mostram claramente que a microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção é um agente pró-coagulante ou anti-hemorrágico de utilidade para o tratamento tópico de hemorragias em um paciente.

[00141] Desta forma, a microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção pode ser usada como um medicamento, ou seja, como um agente pró-coagulante, ou como um agente anti-hemorrágico, particularmente como um agente anti-hemorrágico para aplicação no tratamento de

hemorragias em um paciente.

[00142] Consequentemente, em um outro aspecto, a invenção refere-se à microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção como um medicamento. Em uma concretização particular, a invenção refere-se à microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção como um medicamento tópico com atividade pró-coagulante (anti-hemorrágica) adequado para tratar hemorragias em um paciente.

[00143] Muito embora a microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção pudesse ser aplicada topicamente para o tratamento de hemorragia em um paciente, isto é, sem misturá-la com um veículo farmaceuticamente aceitável, uma vez que os componentes do extrato de levedura clarificado (CYE) que compreendem as ditas microvesículas carreadoras de TF derivadas de levedura obtidas de acordo com o processo da invenção são substancialmente inócuos para um paciente, em geral, para administração a um paciente, a microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção será formulada em uma forma de administração farmacêutica adequada para a sua administração, preferentemente, para a sua administração tópica para o tratamento tópico (sítio) de hemorragias.

[00144] Desta forma, em um outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição farmacêutica, doravante chamada de a composição farmacêutica da invenção, que

compreende uma microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção e um veículo, carreador ou excipiente farmaceuticamente aceitável. A dita composição farmacêutica é então formulada em uma forma de administração farmacêutica adequada para a sua administração a um paciente.

[00145] Então, para a sua administração a um paciente, as microvesículas carreadoras de TF derivadas de leveduras da invenção serão formuladas em uma forma de administração farmacêutica, preferentemente uma forma de administração farmacêutica adequada para a sua administração tópica, para cuja finalidade os carreadores e excipientes farmaceuticamente aceitáveis adequados para a preparação da forma de administração farmacêutica desejada serão incorporados. A informação relacionada com os ditos carreadores e excipientes, bem como sobre as ditas formas de administração adequadas para a administração do dito produto da invenção, pode ser encontrada em tratados de farmácia galênica. Uma recapitulação das diferentes formas de administração farmacêutica de drogas em geral, e de seus processos de preparação, pode ser encontrada na publicação intitulada "Tratado de Farmacia Galénica" *("Galenic Pharmacy Treatise")*, by C. Faulí i Trillo, 1st Edition, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

[00146] Muito embora pudessem ser usadas diferentes formas de administração farmacêutica das microvesículas

carreadoras de TF derivadas de leveduras da invenção, na prática a administração do dito produto topicamente é mais vantajosa; portanto, as ditas microvesículas carreadoras de TF derivadas de leveduras da invenção serão formuladas em uma forma farmacêutica adequada para a sua administração tópica. Exemplos ilustrativos, não limitativos, das ditas formas farmacêuticas, incluem aerossóis, soluções, suspensões, emulsões, géis, pomadas, cremes, curativos, emplastros, unguentos, colutórios, e assemelhados. Para esse fim a composição farmacêutica da invenção incluirá os veículos, carreadores e/ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis requeridos para preparar a forma de administração farmacêutica das microvesículas carreadoras de TF derivadas de leveduras da invenção para administração tópica.

[00147] Portanto, em uma concretização particular, a composição farmacêutica da invenção é uma composição farmacêutica para a administração tópica de microvesículas carreadoras de TF derivadas de leveduras da invenção que compreende o dito produto e um veículo, carreador ou excipiente farmaceuticamente aceitável adequado para a administração tópica das microvesículas carreadoras de TF derivadas de leveduras da invenção. Exemplos ilustrativos, não limitativos, dos veículos, carreadores ou farmaceuticamente aceitáveis mas para a administração tópica das ditas microvesículas carreadoras de TF derivadas

de leveduras podem ser encontrados em tratados de farmácia galênica.

[00148] Em uma concretização particular, a composição farmacêutica da invenção compreende microvesículas de levedura carreadora de TF que compreende proteína de TF humana, ou um fragmento desta que tem atividade pró-coagulante, tal como, por exemplo, TF humano completamente formado ou um TF humano truncado (isto é, uma proteína de TF humano em que todo ou parte do domínio responsável pela ligação a FVIIa está ausente ou uma proteína de TF humano mutante que tem atividade pró-coagulante em que o domínio responsável pela ligação a FVIIa não é funcional).

[00149] As microvesículas derivadas de levedura carreadora de TF da invenção estarão presentes na composição farmacêutica da invenção em uma quantidade terapeuticamente efetiva. A dita quantidade pode variar dentro de uma ampla faixa, por exemplo, entre cerca de 1,0 pg de proteína ativa/ml e 1,0 mg de proteína ativa /ml, preferentemente entre 0,05 µg de proteína ativa/ml e 10 µg de proteína ativa/ml, e ainda com maior preferência entre cerca de 0,1 µg de proteína ativa /ml e 2,0 µg de proteína ativa/ml.

[00150] A dose de microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção a ser administrada ao paciente pode variar dentro de uma faixa muito ampla, por

exemplo, entre cerca de 1,0 pg de proteína ativa/ml e 1,0 mg de proteína ativa/ml, preferentemente entre 0,05 µg de proteína ativa/ml e 10 µg de proteína ativa/ml, e ainda com maior preferência entre cerca de 0,1 µg de proteína ativa/ml e 2,0 µg de proteína ativa/ml. A dose de microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção a ser administrada dependerá de vários fatores, incluindo entre eles os aspectos da proteína de TF ou seu fragmento que tem atividade pró-coagulante usada, tais como, por exemplo, a sua atividade e semi-vida biológica, concentração da proteína de TF ou seu fragmento que tem atividade pró-coagulante na formulação, a condição clínica do indivíduo ou paciente, o distúrbio hemorrágico a ser tratado e outros assemelhados. Por esta razão, as doses mencionadas neste contexto devem ser consideradas somente como orientações para aquela pessoa versada na técnica, e esta pessoa deverá ajustar as doses de acordo com as variáveis mencionadas anteriormente. Não obstante, a composição farmacêutica da invenção pode ser administrada uma ou mais vezes ao dia para propósitos preventivos ou terapêuticos.

[00151] A composição farmacêutica da invenção pode ser usada em conjunto com outras drogas adicionais de utilidade na prevenção e/ou tratamento da diátese hemorrágica (por exemplo, fatores de coagulação, plasma humano, e outros) para proporcionar uma terapia de

combinação. As ditas drogas adicionais podem ser partes desta composição farmacêutica ou, alternativamente, elas poderão ser proporcionadas na forma de composição separada para a sua administração simultânea ou sucessiva (sequencial em tempo) com relação à administração da composição farmacêutica da invenção.

[00152] A composição farmacêutica da invenção também pode ser colocada em um suporte. Consequentemente, em um outro aspecto, a invenção refere-se a um produto que compreende a composição farmacêutica da invenção e um suporte. O termo "suporte", tal como usado neste contexto, refere-se a um substrato de material adequado que permite a deposição de uma composição farmacêutica da invenção no mesmo, a sua sustentação e a sua liberação no sítio desejado, por exemplo, no sítio onde a composição farmacêutica da invenção exerce o seu efeito terapêutico. O dito suporte pode ser um suporte sólido ou um suporte não sólido, por exemplo, um suporte líquido ou um suporte gasoso. Exemplos ilustrativos, não limitativos de suportes sólidos incluem bandagens, curativos, compressas, emplastros e assemelhados. Exemplos ilustrativos, não limitativos, de suportes líquidos incluem géis, sprays, colutórios, e assemelhados. Exemplos ilustrativos, não limitativos de suportes gasosos incluem ar, propelentes e assemelhados.

[00153] Em uma concretização particular, a

composição farmacêutica da invenção compreende microvesículas de levedura carreadoraas de TF que compreende proteína de TF humana, ou um fragmento desta que tem atividade pró-coagulante, tal como, por exemplo, TF humano completamente formado ou um TF humano truncado (isto é, uma proteína de TF humano em que a totalidade ou parte do domínio responsável pela ligação a FVIIa está ausente ou um mutante de proteína de TF humana que tem atividade pró-coagulante em que o domínio responsável pela ligação a FVIIa não é funcional).

[00154] Este produto que compreende a composição farmacêutica da invenção depositada em um suporte pode ser obtida por meio de métodos convencionais, por exemplo, pela mistura de uma composição farmacêutica da invenção e do suporte. A interação entre a composição farmacêutica da invenção e o suporte pode ser uma interação física ou química, na dependência da natureza dos componentes da composição farmacêutica da invenção e do suporte utilizado.

[00155] De acordo com outro aspecto, a invenção refere-se ao uso da microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento de hemorragias em um paciente, em particular, para o tratamento tópico de hemorragias em um paciente saudável ou em um paciente com diátese hemorrágica.

[00156] O termo “tratamento tópico”, tal como usado

neste contexto, refere-se à aplicação do tratamento diretamente no sítio onde o mesmo é requerido, por exemplo, em seções descontínuas da pele (cortes e assemelhados) e tecido vascular (vasos rompidos, e assemelhados) em hemorragia venosa ou arterial devida a ferimentos abertos, cirurgia e assemelhados, e hemorragias muco-cutâneas e micro-vasculares.

[00157] De acordo com esta invenção e tal como ilustrado no Exemplo 4, as microvesículas derivadas de levedura carreadora de TF da invenção podem funcionar como um agente pró-coagulante ou anti-hemorrágico, e consequentemente, o dito produto pode ser usado para tratar ou corrigir distúrbios hemorrágicos, com particularidade aqueles distúrbios hemorrágicos associados com diátese hemorrágica.

[00158] O termo “diátese hemorrágica” refere-se ao processo que provoca um distúrbio hemostático e que como resultado dá origem à ocorrência da síndrome hemorrágica a qual pode ocasionalmente acontecer com sangramento prolongado e excessivo. A diátese hemorrágica poderá ser ocasionada por uma coagulopatia congênita ou adquirida e/ou por um distúrbio de plaquetas congênito e adquirido.

[00159] O termo “coagulopatia” refere-se a um distúrbio do fator de coagulação. Este distúrbio pode ser devido a uma deficiência ou déficit de fator de coagulação específico, cuja consequência será a ocorrência da síndrome

hemorrágica, ou devido a um distúrbio de fator de coagulação. De uma maneira geral a coagulopatia pode ser uma coagulopatia congênita ou uma coagulopatia adquirida.

[00160] Como exemplos ilustrativos, não limitativos, de coagulopatias congênitas, poderão ser mencionadas as deficiências de fatores de coagulação selecionados a partir de Fator V de coagulação (FV), Fator VII de coagulação (FVII), Fator VIII de coagulação (FVIII), o déficit ou deficiência que provoca hemofilia A, Fator IX de coagulação (FIX) cujo déficit ou deficiência provoca hemofilia B, Fator X de coagulação (FX), Fator XI de coagulação (FXI) cujo déficit ou deficiência provoca a hemofilia C, Fator XII de coagulação (FXII), Fator XIII de coagulação (FXIII) e as suas combinações.

[00161] As coagulopatias adquiridas podem ter origens diferentes. Exemplos ilustrativos incluem as deficiências de síntese de fator de coagulação em falha hepática grave, terapia anticoagulante (tal como heparina, heparinas de baixo peso molecular, *warfarin*, derivados de cumarina, dicumarinas, e assemelhados). Um mecanismo alternativo é baseado em um consumo exagerado de fatores de coagulação de forma tal que eles não ficam disponíveis para formarem o coágulo em uma lesão de sangramento. Este mecanismo ocorre na síndrome de coagulação intravascular disseminada ou coagulopatia devida à consunção que ocorre em enfermidades múltiplas, tais como em septicemia grave

que danifica as plaquetas de ativação de endotélio de microcirculação e fatores de coagulação com a formação de múltiplos microtrombos; na invasão de sangue pelo TF tal como soltura placentária; na retenção de um feto morto; em múltiplos traumas com o esmagamento de tecidos; em mordidas de cobras venenosas, e assemelhados. Em vasculite, a danificação parietal e de endotélio libera ativadores de coagulação. O consumo de fatores de coagulação piora pela lise da fibrina de numerosos microtrombos devido à ação de plasmina com liberação de PDF, que são antiplaquetas e anticoagulantes.

[00162] O termo “distúrbio de plaquetas” refere-se a um distúrbio tanto no número quanto na capacidade funcional das plaquetas, cujo resultado é a ocorrência da síndrome hemorrágica. O dito distúrbio de plaquetas pode ser congênito ou adquirido.

[00163] Em uma concretização particular, o dito distúrbio de plaquetas é um distúrbio de plaquetas congênito. Exemplos ilustrativos, não limitativos de distúrbios de plaquetas congênitos incluem a enfermidade de Glanzmann, a doença de Bernard Soulier, a síndrome de Bolin-Jamieson, a síndrome de Wiskott-Aldrich, a síndrome de Paris-Trousseau-Jacobsen, trombocitopenia de cromossomos X, síndrome de plaquetas de Gray, síndrome de Sebastian e anemia de Fanconi.

[00164] De acordo com outra concretização

particular, o referido distúrbio de plaquetas é um distúrbio de plaquetas adquirido. Exemplos ilustrativos, não limitativos, de distúrbios de plaquetas adquiridos incluem distúrbios mieloproliferantes, tais como trombocitemia, policitemia, leucemia mielocítica crônica, e outras; há aqui distúrbios de plaquetas funcionais em metaplasia mielóide com tempo de sangramento aumentado, defeitos de retenção de glóbulos de vidro, defeito de agregação de plaquetas, liberação anormal, e defeito de fator de plaquetas III. Foram encontrados defeitos de plaquetas funcionais em disproteinemias em escorbuto e em enfermidade cardíaca congênita e cirrose.

[00165] Os termos “coagulopatia adquirida” e “distúrbio de plaquetas adquirido” referem-se à origem do distúrbio, que pode ser iatrogênico ou secundário a outras enfermidades.

[00166] O termo “paciente” tal como usado neste contexto inclui qualquer elemento de uma espécie animal, incluindo a espécie humana; a título de um exemplo ilustrativo, não limitativo, o dito paciente pode ser um mamífero, tal como um primata, um animal doméstico, um roedor, e outros, sendo que o dito paciente é preferentemente um homem ou mulher de qualquer idade e raça. Em uma concretização particular, o dito paciente é um ser humano sem histórico de distúrbios de hemóstase, tais como um indivíduo que não tem coagulopatias ou distúrbio de

plaquetas. De acordo com outra concretização particular, o dito paciente é um ser humano que tem um histórico de distúrbios de hemóstase, tais como um indivíduo que tem diátese hemorrágica, por exemplo, uma coagulopatia, tal como uma coagulopatia congênita ou adquirida, ou um distúrbio de plaquetas, tal como um distúrbio de plaquetas congênito ou adquirido.

[00167] Portanto, em uma concretização particular, a invenção refere-se ao uso de microvesículas derivadas de levedura carreadoraas de TF da invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento tópico de hemorragias em um ser humano sem histórico de distúrbios de hemóstase. De acordo com outra concretização particular, a invenção refere-se ao uso de microvesículas derivadas de levedura carreadoraas de TF da invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento tópico de hemorragia em um ser humano que tem uma diátese hemorrágica.

[00168] Tal como mencionado anteriormente, para administração tópica ao paciente, as microvesículas derivadas de levedura carreadoraas de TF da invenção serão formuladas em uma forma farmacêutica adequada para a sua administração tópica para tratamento tópico (sítio) de hemorragias em um paciente. Exemplos ilustrativos, não limitativos das ditas formas farmacêuticas incluem aerossóis, soluções, suspensões, emulsões, géis, pomadas, cremes, ataduras, emplastros, unguentos, colutórios, e

assemelhados. Para tal finalidade, a composição farmacêutica que compreende microvesículas derivadas de levedura carreadoraas de TF da invenção incluirá os veículos, carreadores e excipientes farmaceuticamente aceitáveis requeridos para a preparação da forma de administração farmacêutica escolhida. Informação referente à composição farmacêutica (forma de administração farmacêutica, doses, quantidade de componente ativo, e assemelhados) já foram mencionados em conexão com a composição farmacêutica da invenção.

[00169] Também foi reportado que o TF induz angiogênese e produção aumentada de VEGF (Ollivier et al., 2000, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 20:1374-1381; Chen et al., 2000, Thromb.Haemost., 86:334-345 y Watanabe et al., 1999, Thromb.Res., 96:183-189). Desta forma, em um outro aspecto, a invenção refere-se às microvesículas derivadas de levedura da invenção para o tratamento de enfermidades em que é requerida uma angiogênese aumentada ou migração de células aumentada.

[00170] As enfermidades associadas com uma angiogênese diminuída e que poderá beneficiar-se do tratamento das composições promotoras de angiogênese da invenção incluem enfermidade das artérias coronárias, por exemplo, miocárdio isquêmico, infarto do miocárdio, cardiopatia isquêmica ou enfermidade arterial periférica, tal como claudicação de isquemia de limbo crônica (músculo

esqueletal) ou dor de inação/ulceração isquêmica/gangrena. A promoção de angiogênese é requerida bem como em ataque isquêmico/neuropatia, tal como tecido do cérebro/nervo, por exemplo, *pneumbra* isquêmico depois de ataque/infarto. Alternativamente, o efeito proangiogênico das composições da invenção pode ser usado para promover a cura e/ou endotelialização de superfícies luminares intravasculares, por exemplo, para promover a endotelialização de placa aterosclerótica instável/ulcerada, por exemplo, em artérias coronárias/carótidas, ou nas superfícies luminares de-endotelializadas, tais como aquelas encontradas em seguida a uma endarterectomia, por exemplo, dentro da artéria da carótida, trombectomia (seja/ou arterial/venosa), angioplastia, tal como balão, laser, ou angioplastia criogênica, uma aterectomia, ou em seguida a trombose, por administração de uma composição que inclui um agente de óxido nítrico. As composições proangiogênicas da invenção também podem ser de utilidade na resolução de trombose arterial e/ou venosa aguda ou crônica, por exemplo, revascularização e/ou neovascularização e/ou recanalização. De acordo com outra concretização, as composições da invenção promovem o desenvolvimento de glóbulos neocapilares para aplicações de terapia de genes, aplicações de regeneração de órgãos, e para c9locação de órgãos híbridos bioartificiais (por exemplo, pâncreas, rim, pulmão, fígado) bem como promoção e/ou aumento da cura de

lesões e/ou para promoção de tecido de granulação, por exemplo, para lesões crônicas, tais como lesões isquêmicas, diabéticas, neuropáticas, baseadas em condição venosa.

[00171] Reportou-se que o TF promove a migração de células (Ott et al., 2005, Circulation, 111:349-355 e WO0105353). Desta forma, em um outro aspecto, a invenção refere-se às composições que compreendem o TF da invenção para promover a migração de células em pacientes com necessidade destas. Será apreciado que diferentes enfermidades podem ser tratadas com as composições da invenção da dependência do tipo de célula cuja migração é estimulada. Por exemplo, pacientes que padecem de uma lesão em um lúmen corpóreo, tal como um vaso sanguíneo, artéria, artéria coronária, veia de lúmen esofágico, e uretra requerem um estímulo da migração de células endoteliais; pacientes que sofrem de lesões no sistema nervoso central como um resultado de choque isquêmico e hemorrágico, e a partir de lesão traumática necessitará de um estímulo para a migração de células neurais para o sítio da lesão; pacientes que padecem de úlceras que podem ser crônicas e resistentes ao tratamento, por exemplo, em pacientes diabéticos e idosos, por exemplo, úlceras das pernas e escaras de decúbito, lesões corneanas, queimaduras, abrasões, incisões cirúrgicas, locais de enxerto doador, e lesões causadas por agentes infecciosos). Outras condições médicas que podem ser tratadas são condições crônicas (tais

como úlcera venosa crônica, úlcera diabética, úlcera de compressão, escaras de pressão, e úlceras ou escaras da superfície da mucosa), lesões de superfície da pele e epitelial causadas por uma condição inflamatória ou infecção persistente, ou por um defeito genético (tal como formação de quelóide e anormalidades de coagulação) serão beneficiadas por um estímulo da migração de células epiteliais necessárias para repovoar o tecido danificado.

Composição que compreende microvesículas derivadas de levedura carreadora de TF da invenção

[00172] De acordo com outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição, doravante chamada a "composição da invenção", que compreende microvesículas derivadas de levedura carreadora de TF da invenção e um veículo.

[00173] Praticamente, qualquer veículo que não afete prejudicialmente as microvesículas derivadas de levedura carreadora de TF da invenção pode ser usado na dita composição da invenção.

[00174] De acordo com uma concretização, o dito veículo compreende um meio substancialmente líquido, tal como o meio que circunda as microvesículas derivadas de levedura carreadora de TF da invenção obtido por operação do processo da invenção. Consequentemente, em uma concretização particular, a composição da invenção compreende o extrato de levedura clarificado obtido na operação do processo da invenção.

TF truncado desprovido de todo ou parte do domínio responsável pela ligação ao FVIIa

[00175] Tal como mencionado anteriormente, surpreendentemente os inventores descobriram que uma proteína de TF truncado, que é incapaz de ligação ao FVIIa, tem atividade pró-coagulante. Tal como pode ser observado no Exemplo 4, os inventores mostraram que a dita forma truncada da proteína de TF tem atividade pró-coagulante em um ensaio de coagulação em plasma.

[00176] Desta forma, em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um TF truncado desprovido de todo ou parte do domínio responsável pela ligação a FVIIa, doravante chamado de "TF truncado desprovido de domínio de ligação a FVIIa da invenção", em que todo ou parte do domínio responsável pela ligação a FVIIa está ausente, e, consequentemente, ele é incapaz de ser ligado a FVIIa, mas tem atividade pró-coagulante. Por extensão, o dito "TF truncado desprovido de domínio de ligação a FVIIa da invenção" inclui mutantes de proteína de TF que têm atividade pró-coagulante, em que o domínio responsável por ligação a FVIIa não é funcional devido a mutações.

[00177] O TF truncado desprovido de domínio de ligação a FVIIa da invenção pode ser obtido por meios convencionais, por exemplo, por meio de expressão de gene da sequência de nucleotídios que codifica a dita proteína em um sistema de expressão adequado (levedura, bactérias,

células eucarióticas, células de insetos, e assemelhados).

[00178] Com a finalidade de se determinar se o TF truncado desprovido de domínio de ligação a FVIIa da invenção é capaz de ligação a FVIIa, podem utilizar-se ensaios de ligação tais como aquele descrito na publicação internacional WO00/04148. Adicionalmente, a atividade pró-coagulante do TF truncado desprovido de domínio de vinculação a FVIIa da invenção pode ser ensaiada tal como foi mencionado anteriormente, por exemplo, por meio de qualquer um dos ensaios de coagulação mencionados no Exemplo 4, tais como por meio de um ensaio de coagulação *in vitro* in plasma, ou por um ensaio de coagulação *in vitro* em sangue total não-anticoagulado, ou por um ensaio *in vivo* em um modelo de animal de hemorragia grave ou por meio de um ensaio *in vivo* em um modelo de animal de hemorragia letal, tais como aqueles ensaios mencionados no Exemplo 4.

[00179] Em uma concretização particular, o dito TF truncado desprovido de domínio de ligação a FVIIa da invenção compreende o domínio de interação para o Fator X, a região de transmembrana e a caudacitoplasmática e ausências, parcialmente ou totalmente, do domínio responsável pela ligação a FVIIa. Além disso, em uma concretização específica, o referido TF truncado desprovido de domínio de ligação a FVIIa da invenção é uma forma truncada da proteína de TF humano que contém o domínio de interação para o Fator X (aa 174-251), a região de

transmembrana (aa 252-274), e a caudacitoplasmática (aa 275-295) e um marcador de histidina extra (Exemplo 3). Os inventores descobriram agora, surpreendentemente, que a dita forma truncada da proteína de TF, desprovida do domínio responsável pela ligação a FVIIa, é dotada de atividade pró-coagulante (Exemplo 4, Tabela 3).

[00180] De acordo com outra concretização particular, o TF é modificado por uma ou mais mutações de ponto no domínio de ligação de FVIIa, de forma que o dito domínio não é mais capaz de ligação a FVIIa. Mutações de ponto no domínio de TF de ligação a FVIIa que se sabe abolirem a ligação ao dito FVIIa são conhecidas na técnica (por exemplo, aquelas descritas por Kelley, R.F. et al., 1995, Biochemistry, 34:10383-10392, cujo conteúdo é, portanto, incorporado por referência na sua totalidade).

[00181] Observou-se, surpreendentemente, que o dito fragmento de TF, desprovido da totalidade ou parte do domínio responsável pela ligação a FVIIa, tem atividade pró-coagulante uma vez que, como é amplamente conhecido, no caminho extrínseco de coagulação do sangue, o TF liga-se aos FVII/FVIIa circulantes para formar o complexo TF::FVIIa e, na presença de cálcio, funcionar como um substrato de maneira tal que ocorre a ativação de FX. É aceito que na eventualidade de a hemorragia produzida por uma lesão vascular, a coagulação é disparada devido à ativação do caminho extrínseco que envolve a interação de TF com o seu

ligante, FVII/FVIIa.

[00182] O TF truncado desprovido de domínio de ligação ao FVIIa da invenção pode ser glicosilado ou não. Desta forma, em uma concretização particular, o TF truncado desprovido de domínio de ligação ao FVIIa da invenção não é glicosilado, enquanto de acordo com outra concretização particular, o dito TF truncado desprovido de domínio de ligação ao FVIIa da invenção é glicosilado. Conforme mencionado anteriormente, o termo "glicosilado" inclui qualquer grau de glicosilação.

Mutantes de TF carreadores de um ou mais sítios de glicosilação não-funcionais

[00183] Conforme mencionado anteriormente, os autores da presente invenção também observaram que a atividade pró-coagulante de TF, bem como a sua expressão em células hospedeiras de levedura é aumentada quando o dito TF realiza mutações nos sítios de glicosilação que impedem a vinculação de, pelo menos, uma das três cadeias de glicosil N-encadeadas encontradas no TF do tipo silvestre. Desta forma, em uma concretização particular, a microvesícula derivada de levedura carreadora de TF da invenção compreende um fragmento não-glicosilado da proteína de TF que é dotado de atividade pró-coagulante. Tal como mencionado anteriormente, o termo "glicosilado" inclui qualquer grau de glicosilação. De acordo com uma concretização preferida, a variante de TF é um polipeptídio

em que pelo menos um dos sítios de N-glicosilação de TF foi modificado de maneira a torná-lo não funcional, isto é, incapaz de servir como sítio de aceitação para a adição de cadeias de glicosídio. Os sítios de N-glicosilação na sequência de TF que podem ser modificados são aqueles previamente mencionados, isto é, o sítio Asn^{11}-Leu^{12}-Thr^{13}, o sítio Asn^{124}-Val^{125}-Thr^{126} e/ou o sítio Asn^{137}-Asn^{138}-Thr^{139}. Qualquer modificação das regiões de consenso de N-glicosilação é adequada, na medida em que a adição da cadeia de glicosil N-encadeada seja abolida ou substancialmente inibida. Preferentemente, a modificação é introduzida no resíduo Asn correspondente às posições 11, 124 e/ou 136 no TF humano completamente formado, uma vez que este é o resíduo que serve como aceitante para a vinculação da cadeia de glicosil. Tais como usados na presente invenção “sítios correspondentes aos sítios 11, 124 e/ou 136 no TF humano completamente formado” referem-se aos sítios de N-glicosilação em outros ortólogos de TF que possam aparecer em uma posição diferente na cadeia de polipeptídios, mas que coincidem com os sítios de N-glicosilação no TF humano completamente formado quando as sequências humanas e ortólogas são alinhadas com base na similaridade de sequências. Um algoritmo adequado para alinhamento ou múltiplas sequências de TF e, desta forma, para identificação de sítios de N-glicosilação em ortólogos de TF correspondentes aos sítios no TF humano completamente

formado é o programa PILEUP que faz parte do GCG Software Package(Genetics Computer Grupo, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wis.). O PILEUP cria um alinhamento de múltiplas sequências a partir de um grupo de sequências relacionadas utilizando-se alinhamentos progressivos por pares para mostrar a relação e percentual de identidade de sequências. Ele também traça uma árvore ou dendrograma mostrando as relações de agrupamento usadas para criar o alinhamento. O PILEUP utiliza uma simplificação do método de alinhamento progressivo de Feng e Doolittle, J.Mol. Evol., 35: 351-360 (1987). Preferentemente, os resíduos Asn nas posições 11, 124 e/ou 136 são substituídos por Ala. Desta forma, de acordo com uma concretização preferida, a variante de TF que forma parte das microvesículas é selecionada a partir do grupo de N11A, N124A, N137A, N11A e N124A, N11A e N137A, N124A e N137A e N11A, N124A e N137A no TF humano completamente formado. Em qualquer outro ortólogo de TF, as mutações ocorrerão nos correspondentes resíduos Asn que formam os sítios de consenso de glicosilação N-encadeada.

[00184] O TF truncado desprovido de domínio de ligação ao FVIIa, o TF de mutante carreador de um domínio de ligação ao FVIIa não funcional e os mutantes de TF carreadores de um ou mais sítios de N-glicosilação não funcionais da invenção podem estar na forma de um elemento da proteína de fusão, a dita proteína de fusão contendo uma

primeira região que compreende o dito TF truncado desprovido de domínio de ligação ao FVIIa, o dito TF de mutante carreando um domínio de ligação ao FVIIa não funcional e os ditos mutantes de TF carreando um ou mais sítios de N-glicosilação não funcionais da invenção ligados à segunda região que compreende outro peptídio ou proteína. A dita segunda região pode ser ligada à região amino-término do dito TF truncado desprovido de domínio de ligação de FVIIa, com o dito TF de mutante carreando um domínio de ligação de FVIIa não funcional e os ditos mutantes de TF carreando um ou mais sítios de N-glicosilação não funcionais da invenção, ou, alternativamente, a dita segunda região pode ser ligada à região carboxila terminal do dito TF truncado desprovido de domínio de ligação de FVIIa, com o dito TF de mutante carreando um domínio de ligação de FVIIa não funcional e os ditos mutantes de TF carreando um ou mais sítios de N-glicosilação não funcionais da invenção. Tanto a primeira como a segunda regiões podem ser ligadas diretamente ou então ligadas através de um polipeptídio vinculador entre a referida primeira e segunda regiões.

[00185] De acordo com uma concretização particular, a dita proteína de fusão compreende um TF truncado desprovido de domínio de ligação de FVIIa, um TF de mutante carreando um domínio de ligação de FVIIa não funcional ou um mutante de TF carreando um ou mais sítios de N-

glicosilação não funcionais e uma marca, usualmente um marcador de peptídio, ligada ao domínio C-terminal ou N-terminal do dito TF truncado desprovido de domínio de ligação de FVIIa da invenção. O dito marcador é de uma maneira geral a peptídio ou sequência de aminoácidos que pode ser usada no isolamento ou purificação da dita proteína de fusão. Exemplos ilustrativos, não limitativos, das ditas marcas foram mencionados anteriormente. De acordo com uma concretização particular, o dito marcador é um marcador His ligada ao domínio C-terminal da dita proteína de TF. De acordo com outra concretização, o dito marcador é um marcador His ligada ao domínio N-terminal da dita proteína de TF.

[00186] A dita proteína de fusão poderá ser obtida através de meios convencionais, por exemplo, por meio de expressão de genes da sequência de nucleotídios que codifica a dita proteína de fusão em uma célula de levedura adequada. A marcador eventual pode ser usada, se desejado for, para o isolamento ou purificação da dita proteína de fusão.

[00187] O TF truncado desprovido de domínio de ligação de FVIIa, o TF de mutante carreador de um domínio de ligação de FVIIa-binding não funcional e os mutantes de TF carreadores de um ou mais sítios de N-glicosilação não funcionais podem ser usados como um medicamento, por exemplo, na forma de um agente pró-coagulante no tratamento

de hemorragias em um paciente.

[00188] Consequentemente, em um outro aspecto, a invenção refere-se ao referido TF truncado desprovido de domínio de ligação de FVIIa, ao dito TF de mutante carreador de um domínio de ligação de FVIIa não funcional e aos ditos mutantes de TF carreadores de um ou mais sítios de N-glicosilação não funcionais na forma de um medicamento. Em uma concretização particular, a invenção refere-se a dito TF truncado desprovido de domínio de ligação de FVIIa, ao dito TF de mutante carreador de um domínio de ligação de FVIIa não funcional e ditos mutantes de TF carreadores de um ou mais sítios de N-glicosilação não funcionais na forma de um medicamento com atividade pró-coagulante adequado para o tratamento de hemorragias em um paciente.

[00189] Além disso, em um outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição farmacêutica que compreende um TF truncado desprovido de domínio de ligação de FVIIa, um TF de mutante carreador de um domínio de ligação de FVIIa não funcional ou um mutante de TF carreador de um ou mais sítios de N-glicosilação não funcionais e um veículo farmaceuticamente aceitável. Em uma concretização particular, a dita composição farmacêutica é uma composição farmacêutica para a administração tópica da um TF truncado desprovido de domínio de ligação de FVIIa, um TF de mutante carreador de um domínio de ligação de FVIIa não funcional

ou um mutante de TF carreador de um ou mais sítios de N-glicosilação não funcionais e um carreador farmaceuticamente aceitável adequado para a administração tópica de dito TF truncado desprovido de domínio de ligação de FVIIa da invenção ou o TF de mutante carreador de um ou mais sítios de N-glicosilação não funcionais.

[00190] Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um TF truncado desprovido de domínio de ligação de FVIIa, um TF de mutante carreador de a domínio de ligação de FVIIa não funcional e um mutante de TF carreador de um ou mais sítios de N-glicosilação não funcional para o tratamento de uma enfermidade que requer promoção de migração celular e/ou angiogênese em um paciente. Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um TF truncado desprovido de domínio de ligação de FVIIa, um TF de mutante carreador de um domínio de ligação de FVIIa não funcional ou um mutante de TF carreador de um ou mais sítios de N-glicosilação não funcional para a promoção de angiogênese ou para promover migração celular em um paciente com necessidade do mesmo.

[00191] De uma maneira geral, para administração a um paciente, o TF truncado desprovido de domínio de ligação de FVIIa, o TF de mutante carreador de um domínio de ligação de FVIIa não funcional ou os mutantes de TF carreadores de um ou mais sítios de N-glicosilação não funcionais serão formulados em uma forma farmacêutica adequada para a sua administração tópica para tratamento

tópico (sítio) de hemorragias. Exemplos ilustrativos, não limitativos, das ditas formas farmacêuticas incluem aerossóis, soluções, suspensões, emulsões, géis, pomadas, cremes, bandagens, emplastros, unguentos, desinfetantes orais (colutórios), e assemelhados. Para tal finalidade, a composição farmacêutica que compreende o TF truncado desprovido de domínio de ligação de FVIIa da invenção incluirá os carreadores e excipientes farmaceuticamente aceitáveis requeridos para a preparação da forma de administração farmacêutica escolhida. Portanto, em uma concretização particular, esta composição farmacêutica composição da invenção compreende, adicionalmente à proteína de TF truncado da invenção, um veículo farmaceuticamente aceitável tal como pode ser encontrado em tratados de farmácia galênica.

[00192] O TF truncado desprovido de domínio de ligação de FVIIa da invenção, o TF de mutante carreador de um domínio de ligação de FVIIa não funcional da invenção e os ditos mutantes de TF carreadores de um ou mais sítios de N-glicosilação não funcionais da invenção estarão presentes nesta composição farmacêutica em uma quantidade terapeuticamente efetiva. A dita quantidade poderá variar dentro de uma ampla faixa, por exemplo, entre cerca de 1,0 pg de proteína ativa/ml e 1,0 mg de proteína ativa/ml, preferentemente entre 0,05 µg de proteína ativa/ml e 10 µg de proteína ativa/ml, e ainda com maior preferência entre

cerca de 0,1 µg de proteína ativa/ml e 2,0 µg de proteína ativa/ml.

[00193] De acordo com outro aspecto, a invenção refere-se a uma sequência de polinucleotídeos (doravante referida como sendo “o polinucleotídeo da invenção”) que codifica o dito TF truncado desprovido de domínio de ligação de FVIIa, o dito TF de mutante carreador de um domínio de ligação de FVIIa não funcional e os ditos mutantes de TF carreadores de um ou mais sítios de N-glicosilação não funcionais.

[00194] Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um vetor (doravante chamado de “o vetor da invenção”) que compreende uma sequência de polinucleotídeos da invenção. Os vetores que são adequados para o uso na presente invenção incluem vetores de expressão procariótica, tais como pUC18, pUC19, Bluescript e seus derivados mp18, mp19, pBR322, pMB9, CoIEl , pCRl , RP4, vetores de fage e vaivém, tais como pSA3 e pAT28, vetores de expressão de levedura, tais como 2 micro plasmídios, plasmídios integrativos, vetores YEP, plasmídios centroméricos e assemelhados, vetores de expressão de plantas, tais como vetores de pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE e assemelhados, vetores de expressão de células de insetos, tais como vetores de pAC e pVL, vetores de expressão eucariótica sejam baseados em vetores virulentos (adenovírus, vírus adeno-associados, retrovírus e

lentivírus) bem como vetores não virulentos, tais como pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEFl/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAXl, pZeoSV2, pCI, pSVL e pKSV-10, pBPV-1, pML2d e pTDTl.

[00195] Em um outro aspecto, a invenção refere-se a uma célula hospedeira (doravante chamada de "a célula hospedeira da invenção") que compreende um polinucleotídeo da invenção ou o vetor da invenção. As células que podem ser usadas para os propósitos da invenção são preferentemente células eucarióticas, com maior preferência uma célula de vertebrado ou invertebrado, células de insetos ou células fúngicas, ainda com maior preferência a célula de vertebrado em uma célula de Xenopus, uma célula isolada a partir de um peixe zebra ou uma célula de mamífero. Preferentemente, a célula de mamífero é uma célula proveniente de uma linha de células estabelecidas, tais como CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK 293, 3T3, WI38 e assemelhadas, uma célula tronco embrionária, uma célula tronco adulta ou uma célula somática.

[00196] Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um anticorpo que se liga especificamente a um TF truncado desprovido de domínio de ligação de FVIIa, a um TF de mutante carreador de um domínio de ligação de FVIIa não funcional ou a mutantes de TF carreadores de um ou mais sítios de N-glicosilação não funcional da invenção. Os anticorpos que são adequados para o uso na presente

invenção incluem anticorpos "intactos" que compreendem uma região variável de ligação de antígeno, bem como um domínio constante de cadeia leve (CL) e domínios constantes de cadeia pesada, CH1, CH2 e CH3, fragmentos “Fab” resultantes da digestão de papaína de um anticorpo intacto e que compreende um único sítio de ligação de antígeno e um CL e uma região de CH1, fragmentos “F(ab’)2” resultantes da digestão de papaína de um anticorpo intacto e que contém dois sítios de ligação de antígenos, os fragmentos “Fab´” contêm o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada e tem somente um sítio de ligação de antígeno. Os fragmentos Fab' diferem dos fragmentos Fab pela adição de poucos resíduos no término carboxila do domínio CH 1 de cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas provenientes da região de articulação de anticorpo, “Fv” é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um sítio de reconhecimento de antígeno e ligação de antígeno completo, fragmentos de anticorpo FV ou "scFv" de cadeia única que compreendem os domínios de anticorpo VL e VH, em que estes domínios estão presentes em uma única cadeia de polipeptídios, diacorpos” compreende um domínio variável de cadeia pesada (VH) conectado a um domínio variável de cadeia leve (VL) na mesma cadeia de polipeptídios (VH-VL) conectada por um vinculador de peptídio que é demasiadamente curta para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia e

“anticorpos bi-específicos" (BAbs) são simples, anticorpos bivalentes (ou imuno-terapeuticamente efetivos ou seus fragmentos) que têm dois sítios de ligação de antígenos diferentemente específicos.

[00197] Os exemplos seguintes ilustram a invenção e não deverão ser considerados como uma limitação desta.

EXEMPLOS

[00198] Os Exemplos 1-3 expõem a produção em leveduras de um produto pró-coagulante baseado na expressão de (i) proteína de TF humana completamente formada, opcionalmente na forma de uma proteína de fusão fundida a um marcador His (Exemplo 3), de (ii) uma forma truncada de proteína de TF humana fundida a um marcador His (Exemplo 4) e de (iii) mutantes de N-glicosilação de proteína de TF humana (exemplo 5). Os ditos produtos pró-coagulantes, todos em conjunto, estão genericamente nomeados no Exemplo 6, por simplicidade, fator tissular microvesiculado, TF microvesiculado ou mTF. O Exemplo 2 ensina a purificação do TF microvesiculado.

[00199] O Exemplo 6 expõe alguns ensaios *in vitro* realizados para o propósito de avaliação da capacidade do dito mTF provocar coágulo de fibrina em pacientes saudáveis e hemofílicos sob diferentes concentrações, bem como alguns ensaios *in vivo* realizados com o propósito de avaliar a capacidade do dito mTF de tratar hemorragias em modelos de hemorragia grave e letal.

EXEMPLO 1

Produção de um produto pró-coagulante baseado na expressão da proteína de TF de comprimento pleno em levedura (CYE-TF)

1.1. Vetor de expressão de levedura

[00200] Para expressão de TF recombinante, gerou-se um vetor episssomático de levedura (*pTT-10301*) a partir de plasmídios pG1 (*ATCC # 37305*) e Yep352 (*ATCC # 37673*) em seguida à estratégia de clonagem ilustrada na Figura 1. O plasmídio pTT-10301 contém os seguintes elementos:

i) o gene URA3 que permite a seleção de levedura recombinante na ausência de uracil nos meios de crescimento,

ii) o gene de resistência a ampicilina (Amp) para seleção e propagação do vetor de plasmídio em *E. coli*,

iii) a região de réplica de 2 micrômetros (2µ) de levedura, que permite a réplica episssômica do vetor nA levedura,

iv) o promotor de gliceraldeído-3-fosfato deidrogenase (*GPD*), que controla a transcrição de genes colocados a jusante,

v) o sinal de término de transcrição de levedura específico da quinase de fosfoglicerato (*PGK*), e

vi) um sítio de restrição de *Bam*HI único que permite a clonagem de genes selecionados sob o controle do promotor de GPD (pGPD), e seguida pela sequência de parada de PGK (PGKt).

[00201] A Figura 1A mostra o mapa do vetor de plasmídio pTT10301. Na Figura 1B encontra-se ilustrada a análise de endonuclease de restrição para confirmar a organização apropriada de todos os elementos dentro do plasmídio.

[00202] Utilizou-se a variedade *E. coli* DH5α (Stratagene) para amplificação de plasmídio. Células de bactérias abrigando o plasmídio pTT10301 foram desenvolvidas a 37°C em meio Luria Broth Ampicilin (LBA) (1% triptona, 1% NaCl, 0,5% extrato de levedura, 50 mg de ampicilina por ml). Cepas de glicerol de culturas bacterianas recombinantes que continham plasmídio pTT-10301 foram mantidas a -80°C.

1.2. Gene recombinante

[00203] O fator tissular (TF) é uma proteína de 295-aminoácido (aa) com uma sequência líder de 32-aa. A proteína completamente formada pode ser dividida em três domínios: um domínio extracelular (aa 33-251), uma região de transmembrana (aa 252-274), e uma caudacitoplasmática (aa 275-295). A Figura 2 mostra o traçado de hidropatia da proteína de TF humano (hTF).

[00204] A codificação de cDNA para a proteína de hTF completamente formada (aa 33-295) foi amplificada como um fragmento 816-bp por reação de cadeia de polimerase (PCR). Para esta reação de PCR utilizou-se como gabarito uma biblioteca de cDNA de placenta humana (Marathon-Ready

cDNA, Clontech Laboratories, Inc.), e oligonucleotídios A e B, recozendo respectivamente na extremidade 5´ou 3´de gene de TF humano, foram usados como preparadores.

[00205] A Figura 3 mostra a sequência de recozimento dos preparadores A e B dentro da sequência de hTF DNA [SEQ ID NO: 5] (acesso ao banco de genes # BC011029). O preparador A codifica os primeiros quatro aminoácidos de hTF completamente formado desprovido de peptídio de sinal e contendo um códon de iniciação ATG no quadro com hTF ORF.

[00206] As condições de PCR foram as seguintes: 35 ciclos de PCR (94°C, 30 s; 45°C 30 s; 72°C 1 minuto) e uma etapa extensão final de 7 minutos a 72°C. Depois disso, o produto PCR foi purificado (sistema de purificação de DNA Qiagen).

1.3. Geração de vetor de expressão de plasmídio de rTF

[00207] O fragmento de DNA amplificado por PCR obtido conforme mencionado na Seção 1.2 foi digerido com *Bam*HI para remover as extremidades, precipitado em etanol, e clonado no vetor pTT10301 previamente digerido com *Bam*HI. Depois de análise de restrição de endonuclease de vários clones, selecionou-se um plasmídio que continha o gene de hTF recombinante completamente formado (doravante referido como rTF) na orientação correta com relação ao promotor de GDP (pGDP), denominado pTT10302, (Figura 4).

[00208] A sequência de DNA do rTF contido no

plasmídio pTT10302 foi 100% idêntica à sequência publicada (Gene Bank #BC011029). A sequência de DNA do DNA de codificação de rTF foi executada em um sequenciador automático (ABI prism 370, Applied Biosystems) utilizando-se preparadores A e B e reagentes Big Dye Terminator. As células DH5α de *E. coli* carreadoras do plasmídio pTT10302 foram desenvolvidas durante a noite a 37°C em meio LBA e usadas para preparar as cepas de glicerol, as quais foram mantidas a -80°C.

1.4. Expressão de rTF por levedura recombinante

[00209] Para gerar levedura recombinante expressor de fator tissular humano completamente formado recombinante (rTF), utilizou-se o vetor de expressão pTT10302 para transformar células de levedura T73 ura3$^-$.

[00210] O T73 ura3$^-$ é um derivativo da variedade T73 de *S. cerevisiae* muito bem caracterizada, que é amplamente usada na produção de vinho. O T73 é uma variedade diplóide selecionada na região de Alicante, Espanha (Colección Española de Cultivos Tipo, número de acesso # CECT1894), e é comercializado no mundo todo para indústria alimentícia por Lallemand Inc. (Montreal, Quebec, Canada). A variedade T73 ura3$^-$ é um derivado de T73 em que as duas cópias do gene URA3 foram rompidas (J. Agric. Food Chem. 1998. 46, 1689-1693). O T73 ura3$^-$ é uma variedade de levedura URA- e alimentício seguro fenotipicamente estável que permite a geração de levedura T73 recombinante

utilizando-se vetores de plasmídio carreadores do gene marcador capaz de ser selecionado URA3.

[00211] Para se gerarem cepas operacionais, desenvolveram-se células de T73 ura3$^-$ em uma bandeja Petri e isolou-se e desenvolveu-se uma única colônia a 30°C em meio de YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona bacteriológica, 2% glicose) até alcançar uma densidade de 10^7 células/ml. Então, células de levedura foram pelotizadas por centrifugação, resuspensas em 15% glicerol em meio seletivo mínimo (base de nitrogênio em extrato de levedura e meio sintético completo sem uracil; YNB CSM-URA) e congelado em alíquotas a -80°C até serem usadas. Descongelaram-se três alíquotas selecionadas aleatoriamente e verificaram-se quanto à ausência de contaminação bacteriana. Primeiro, descongelou-se uma alíquota de T73 ura3$^-$ fresco e tornaram-se as células suscetíveis de adquirir o vetor de plasmídio de acordo com o protocolo LiAc/SS-DNA/PEG (Métodos in Enzymology 1994. 350:87-96). Seguiu-se uma estratégia assemelhada para gerar levedura recombinante de controle protegendo o plasmídio pTT10301 esgotado.

[00212] Selecionaram-se clones de levedura recombinantes pela sua capacidade de crescerem em meios destituídos de uracil. Isolaram-se oito clones independentes transformados com pTT10302 e cultivaram-se durante a noite em meio sem uracil. Estas culturas de

levedura recombinantes, chamadas de yTT10301, foram pelotizadas e homogeneizadas utilizando-se glóbulos de vidro. Similarmente, clones independentes a partir de levedura transformado com pTT10301 (chamados de yTT10300) também foram submetidos ao mesmo procedimento.

[00213] Proteínas provenientes de diferentes clones dos dois tipos de leveduras recombinantes leveduras foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose que foi submetida a análise de mancha-oeste. Conforme ilustrado na Figura 5, todos os clones selecionados a partir das culturas de yTT10301 (clones 1 até 8) expressaram vários polipeptídios que foram reconhecidos pelo anticorpo monoclonal específico de TF anti-humano (mAb) CD142 (BD Biosciences Pharmingen). Entretanto, nenhum dos clones yTT10300 mostrou polipeptídios imuno-reativos com o TF mAb anti-humano (a faixa C, na Figura 5, corresponde a um destes clones).

[00214] Tal como ilustrado na Figura 5, a dimensão molecular do produto imuno-reativo em yTT10301 (faixas 1 até 8) foi cerca de 35 kDa (assinalado com um asterisco). Outros produtos dotados de massas moleculares de 44 e 46 kDa (assinalados por meio de setas), e um grande agregado variando na dimensão de 70 até 115 kDa (conforme seta) pôde ser igualmente observado. Polipeptídios com pesos moleculares mais baixos do que 35 kDa correspondem com toda a probabilidade aos produtos de degradação de rTF.

[00215] O aparecimento de vários produtos relacionados a TF mostrando diferentes mobilidades eletroforéticas podia ser devido seja à agregação de proteínas, diferentes graus de glicosilação ou ambos. Para investigar estas possibilidades, trataram-se extratos provenientes de yTT10301 (clone #7) com as endoglicosilases Endo H e PNGase F. Conforme ilustrado na Figura 6, depois da incubação seja com Endo H (faixa 2) ou PNGase F (faixa 3) o agregado maior (75 até 150 kDa) desapareceu enquanto um produto de 75 kDa foi claramente observado (compare-se a faixa 1 com as faixas 2 e 3). Adicionalmente, as bandas de proteína de 44 e 46 kDa também desapareceram com os dois tratamentos. Nas amostras tratadas com Endo H (faixa 2) os produtos de 44 e 46 kDa pareceram dar origem a um produto de cerca de 36 kDa. O tratamento de PNGase F resultou no aparecimento de duas bandas de 37 e 39 kDa (faixa 3). Por outro lado, o produto de 35 kDa permaneceu inalterado depois do tratamento com estas glicosilases. Desta forma, parece que o produto de 35 kDa corresponde à proteína de rTF não glicosilada e o produto de 75 kDa que pode ser reconhecido depois do tratamento de endoglicosilase pode representar um dímero da proteína não glicosilada. O grande agregado observado nas amostras não tratadas podia corresponder ao mesmo dímero, mas com diferentes graus de glicosilação. De uma maneira assemelhada, as proteínas de 44 e 46 kDa parecem corresponder à proteína de 35 kDa com

padrões de glicosilação diferentes.

[00216] O peso molecular prognosticado de hTF desprovido do peptídio de sinal determinado de acordo com a sequência de aminoácidos é de 29,8 kDa. A discrepância entre a massa molecular prognosticada e observada podia ser devida à migração anômala da proteína em SDS-PAGE em decorrência da presença de uma extensão dos aminoácidos hidrófobos.

[00217] Adicionalmente, a expressão de rTF por yTT10301 foi analisada por microscopia confocal de varredura a laser. Para estes estudos, esferoplastos (isto é, uma levedura desprovido de parede de célula produzido por tratamento enzimático) provenientes de não-expressão (yTT10300), e expressão de rTF (yTT10301, clone #7) fixaram-se e incubaram-se leveduras recombinantes com seja o TF mAb anti-humano ou com um mAb contra uma membrana de levedura ATPase. Tal como ilustrado na Figura 7, o anti-ATPase mAb especificamente rotulou somente a superfície dos esferoplastos (Figura 7A, estampas 1 e 3). Entretanto, o TF mAb anti-humano mostrou um sinal distribuído sobre toda a célula, indicando a presença de rTF não somente na membrana de plasma, mas também dentro da célula, provavelmente associado com compartimentos de célula membranosos internos (Figura 7B, estampas 5 e 7). Por outro lado, conforme ilustrado na Figura 8, nas células de levedura que abrigam um plasmídio esgotado (yTT10300) o mAb anti-ATPase também

deu um sinal específico na superfície de célula (Figura 8A, estampa 1), mas, como era de se esperar, a rotulação com o anticorpo de TF anti-humano não foi suscetível de ser detectada (Figura 8B, estampa 3).

[00218] Para se confirmar que o rTF era uma proteína associada com membrana, trataram-se células yTT10301 de levedura com tampão de lise que continha o detergente Triton X-114 (para uma concentração final de 1%). Depois de 1 hora de incubação a 4°C, o lisado foi aplicado sobre amortecedor de sacarina a 6%, aquecido a 30°C durante 3 minutos e centrifugado a 300 x g durante 3 minutos para separar a fase aquosa superior em relação à fase de detergente inferior. A fase aquosa foi coletada e a pílula de detergente foi mantida em gelo. Depois de se coletar uma pequena alíquota para análise subsequente, submeteu-se a fase aquosa a uma segunda rodada de extração com Triton X-114. Depois de uma nova separação de fase, coletou-se uma segunda fase aquosa e adicionou-se a nova pílula de detergente à pílula anterior. A mistura das duas pílulas de detergente e as duas fases aquosas foi analisada por coloração de SDS-PAGE e Coomassie-blue (Figura 9A), e por mancha-oeste com o TF mAb anti-humano (Figura 9B). Tal como se encontra ilustrado na Figura 9B, os produtos característicos derivados de rTF foram observados exclusivamente na fase de detergente (faixa 4), e não em qualquer uma das duas fases aquosas (faixas 2 e 3). Quanto

ao gel colorido de Coomassie observa-se que a maior parte das proteínas provenientes de extratos de levedura permaneceu na fase aquosa (faixas 2 e 3). Este resultado demonstra claramente que o rTF expresso por yTT10301 encontra-se associado à membrana

1.5. Processo de fermentação

[00219] Para testar a produção de extratos de levedura yTT10301 a nível pré-industrial, os inventores realizaram fermentações em um biorreator de 2 litros (Biostat B-2L. BRAUN). As condições de operação e meio de cultura foram:

[00220] **Condições de operação**: T: 30°C; Velocidade de agitação: 250-300 rpm; pH: 4,5; Fluxo de ar: 6 l/m.

[00221] **Meio de cultura**: CSM-URA: 0,78 g/l; YNB: 6,7 g/l; Sacarina: 20 g/l.

[00222] O gráfico da Figura 10 mostra a evolução dos parâmetros principais durante todo o processo de fermentação. Uma mudança na pressão de oxigênio (PO_2), que é o único parâmetro não controlado, reflete as mudanças nos requisitos de oxigênio a que foram submetidas as células durante o processo. A fermentação foi sustada quando a PO_2 alcançou uma condição estacionária (assinaladas com uma seta) (18h).

[00223] O produto resultante da fermentação foi peletizado por centrifugação a 3.000 rpm (1.200xg) durante 10 minutos e resuspenso em 200 ml de tampão de lise (25 mM

PIPES (pH 7,8), 50 mM NaCl). As leveduras foram homogeneizados por alta pressão (1.000 bar (10^8 Pa)) (homogeneizador NIRO SOAVIS. Panda 2K), e o homogenado centrifugado a 13.000 rpm (13.000xg) durante 30 minutos a 4°C, e a pílula (50 ml) e o sobrenadante de extrato de levedura clarificado (CYE) (150 ml) foram coletados separadamente. O esquema geral do procedimento está representado na Figura 11.

[00224] A concentração de proteína nos dois preparados foi quantificada por meio do ensaio BCA colorimétrico padrão (*Pierce*), e a presença de rTF foi determinada por meio de análise mancha-oeste. Os resultados destes ensaios mostraram que a concentração de proteína total foi assemelhada para as duas amostras (pílula: 3,8 mg/ml e CYE: 3,9 mg/ml), e, consequentemente, a quantidade de rTF detectada por meio de mancha-oeste também foi equivalente no CYE e na pílula, conforme ilustrado na Figura 12.

[00225] A atividade pró-coagulante, determinada tal como se encontra descrita no EXEMPLO 4, no CYE e na pílula também foi assemelhada quando as duas amostras foram analisadas no mesmo dia de preparação (1.400 ng/ml de rTF ativo), mas a estabilidade do rTF foi muito mais baixa nos extratos de pílula (1.500 vs 199 ng/ml) no 4° dia depois da preparação, provavelmente devido à presença de proteases nesta fração. Desta forma, a fração de CYE foi selecionada

para subsequentes preparações de produto de droga.

1.6. Microscopia Eletrônica

[00226] Para melhor caracterizar o produto CYE, realizou-se análise de microscopia imunoeletrônica. O exame das amostras de CYE por microscopia eletrônica (*EM*) mostrou a presença de grande número de vesículas derivadas de levedura de diferentes dimensões (variando entre 0,1 a 0,01 µm). Cerca de 5-10% destas vesículas foram rotuladas pelo TF mAb anti-humano conforme observado pela presença de partículas douradas na sua periferia (assinaladas com setas) (Figura 13). Por outro lado, nas grades de controle que foram incubadas com um mAb não relacionado observaram-se muito poucas partículas douradas, e elas não estavam associadas às vesículas (não ilustradas).

[00227] Encontra-se perfeitamente estabelecido que a ótima atividade de coagulação do sangue requer a associação de TF aos lipídios (Thromb. Haemost. 2001; 86: 66-74), e uma vez que os extratos de levedura de TF não expressor provenientes de yTT10300 não exibem qualquer atividade pró-coagulante, estes resultados indicaram que a atividade pró-coagulante do CYE residirá no rTF lipidado resultante da associação do rTF com as microvesículas membranosas derivadas de levedura, que são doravante referidas como CYE-TF (isto é, uma fração de CYE, que tem atividade pró-coagulante, que contém rTF em associação com microvesículas membranosas derivadas de levedura).

EXEMPLO 2

Produção de um produto pró-coagulante enriquecido em microvesículas que contêm o TF de extensão plena (mTF)

2.1 Processo de purificação

[00228] Preparou-se um extrato de levedura clarificado contendo rTF (doravante chamado de CYE-TF) obtido a partir de yTT10301, seguindo=se o procedimento previamente descrito (Exemplo 1, Seções 1.1 até 1.5). O CYE-TF foi submetido a etapas sucessivas de filtragem por fluxo tangencial em um Sistema de Filtragem por Fluxo Transverso [Crossflow Filtration System (Sartorius sartoflow Slice 200 Benchtop)] utilizando-se filtros com uma redução gradual na dimensão de poros (membranas de 0,45 µm, 0,2 µm e 0,1 µm) (Sartorius, polissulfona). Na Figura 14A encontra-se ilustrado um diagrama do procedimento que foi seguido.

[00229] Para purificar as microvesículas que continham rTF (mTF) carregaram-se 10 ml de extrato de CYE-TF filtrado, correspondente a microvesículas de dimensão de 0,1 a 0,2 µM (retentado de 0,1 µM), em uma coluna de cromatografia de exclusão por tamanho (Sephacryl S500column -HR (60 cm-26 mm, 320ml-General Electric) previamente equilibrada com tampão de fosfato e acoplada a um sistema AKTA-FPLC. Realizou-se eluição sob uma velocidade de fluxo de 1ml/min utilizando-se o mesmo tampão, e coletaram-se 42 frações de 4ml cada uma. O padrão de eluição foi monitorado

por medição da absorvência das frações a 280 nm. Os perfis cromatográficos obtidos nas diferentes tentativas de purificação foram semelhantes. O gráfico na Figura 15 mostra um perfil cromatográfico representativo.

[00230] As alíquotas provenientes de cada uma das frações foram analisadas por mancha-oeste, e por ensaio de atividade para identificar aquelas frações que continham atividade pró-coagulante. A Figura 16 mostra que as frações 5-25 que acumulam mTF quando observadas por mancha-oeste, também foram as frações onde a atividade foi concentrada (Tabela 1).

Tabela 1

Atividade pró-coagulante de mTF nas frações 5-42 obtida depois de purificação por exclusão de dimensão

Fração	atividade ngTF/ml	Fração	atividade ngTF/ml
F.5	169	F.23	171
F.6	236	F.24	146
F.7	353	F.25	106
F.8	298	F.26	32
F.9	261	F.27	3
F.10	246	F.28	0
F.11	197	F.29	0
F.12	237	F.30	0
F.13	239	F.31	0
F.14	261	F.32	0
F.15	241	F.33	0
F.16	125	F.34	0
F.17	269	F.35	0
F.18	312	F.36	0
F.19	263	F.37	0
F.20	265	F.38	0
F.21	282	F.39	0
F.22	248	F.40	0
F.23	171	F.41	0
F.24	146	F.42	0
F.25	106	F.43	0

[00231] Finalmente, para concentrar a atividade, as frações 5 até 43 provenientes de cada processo de purificação foram agrupadas e submetidas novamente ao TFF através de um filtro de 0,1µm. Mediante estes meios é possível obterem-se lotes reproduzíveis (14.31, 14.32, 15.32, 15.36) de mTF biologicamente ativo, conforme ilustrado na Tabela 2, e todos estes lotes mostram um perfil de proteína similar (Figura 17).

Tabela 2: Comparação do conteúdo de proteína total e da atividade pró-coagulante entre lotes

	Total de Proteína µg/ml	Proteína Ativa ng/ml
mTF Agrupamento 14.31	346	709
mTF Agrupamento 14.32	283	659
mTF Agrupamento 15.32	271	745
mTF Agrupamento 15.36	342	718

2.2. Caracterização bioquímica de microvesículas que contêm rTF purificadas por cromatografia de exclusão por tamanho

2.2.1. Teor de Proteínas

[00232] As microvesículas onde é inserido rTF contêm adicionalmente ao rTF outras proteínas de membranas integrais derivadas das células hospedeiras de levedura. O teor de proteína de diferentes lotes de mTF purificado foi

analisado por SDS-PAGE e coloração Coomassie blue (Figura 17A). A comparação visual do gel colorido indica que o perfil de proteínas de diferentes lotes foi quase idêntico. Para realizar uma análise comparativa mais exata, o gel foi varrido e cada faixa do gel foi submetida a densitometria e obteve-se um traçado mostrando os picos correspondentes às diferentes bandas de proteínas, e a intensidade relativa de cada proteína, a partir de cada lote. Os perfis de proteína dos quatro lotes ilustrados na Figura 17 (painel B) foram extremamente similares.

2.2.2. Teor de lipídios

[00233] O teor de lipídios do mTF purificado foi analisado por cromatografia de camada fina seguindo-se o procedimento descrito por Hara e Radin (Anal. Biochem. 1978, 90: 420-426) com algumas modificações (Rodriguez-Sureda y Peinado-Onsurbe, 2005, Anal.Biochem. 343: 277-282). Basicamente, dissolveram-se 120 mg de produto liofilizado em um tubo de vidro em 1 ml da mistura de hexano e isopropanol (3:2, v:v). O frasco, protegido da luz para evitar oxidação dos lipídios, foi mantido em um agitador orbital durante 24h. Neste período adicionaram-se 0,3 ml de sulfato de sódio (0,47 M). Para facilitar a separação de fases, a amostra foi centrifugada. A fase superior (hexano) contém lipídios apolares enquanto os polares tais como fosfolipídios são encontrados junto à interfase. A fase superior foi transferida para um frasco

diferente e foi evaporada utilizando-se gás de nitrogênio para evitar oxidação de lipídios. O extrato seco que continha os lipídios foi dissolvido em clorofórmio (0,2 ml). O TLC foi realizado em uma placa de gel de sílica utilizando-se como uma fase móvel Clorofórmio:metanol e água (C:M:W, 345:133:21, v:v:v). Em paralelo às amostras, analisaram-se padrões de lipídios sob as mesmas condições. Uma vez que as amostras foram passadas nas placas, os lipídios foram visualizados pela adição de vapores de iodo. A identificação dos diferentes componentes de lipídios nas amostras foi realizada por comparação da sua mobilidade com aquela dos padrões.

[00234] Por meio desta técnica foi possível determinar que o CYE-TF (lote 91) sob diferentes concentrações 5, 10 e 20 µg/ml) bem como o produto purificado continham (lote 14.31 a 5, 10 e 20 µg/ml) um teor de lipídios complexo, incluindo triacilglicéridas, ergosterol, fosfatiletanoamina, cardiolipina, ácido fosfatídico, fosfatidilcolina, fosfatidilserina/fosfatidilinositol (Figura 18). O perfil de lipídio das microvesículas que contêm rTF difere do perfil derivado do rTF relipidizado obtido por incorporação do rTF em lipossomos sintéticos seguindo-se os procedimentos descritos por, entre outros, Waters, E.K. e Morrisey, J.H. (Biochemistry, 2006, 45:3769-3774), Brucato, C. et al (Protein Expression and Purification, 1998,

26:386-393), WO9848283, e Guha, A. et al (Proc.Natl.Acad.Sic.USA, 1986, 83:299-302). Embora os lipossomos sintéticos descritos em todos estes documentos compreendam essencialmente uma combinação de fosfatidilcolina e fosfatidilserina, ou fosfatidilcolina, fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina, as microvesículas derivadas de levedura purificadas de acordo com a presente invenção compreendem componentes adicionais, tais como ergosterol e cardiolipina que não são encontrados nos lipossomos que contêm rTF.

EXEMPLO 3

Produção de um produto pró-coagulante baseado na expressão da proteína modificada de marca-His de TF de extensão plena em levedura (6HT-TF)

3.1. Produção de rTF que contém uma marca-6xhis no término de carboxila

[00235] A purificação por cromatografia de afinidade de proteínas que contêm um marcador de histidina (marca-his), seja no término C ou N, é um método perfeitamente padronizado que foi extensamente usado para se obterem preparados altamente purificados de um grande número de proteínas. Desta forma que qualquer método cromatográfico, o procedimento pode ser facilmente aumentado. Por esta razão produziu-se um rTF que contém uma marca-6xhis no término carboxila.

3.2. Geração de vetor de expressão de plasmídio de

marca-his-rTF

[00236] A codificação de cDNA para a proteína de hTF completamente formada (aa 33-295) com 18 nucleotídios extras (codificação para seis histidinas) na extremidade 3', foi amplificada como um fragmento 842-bp por PCR. Para esta reação, seguiu-se uma estratégia similar aquela descrita no Exemplo 1 (Seções 1.2 e 1.3). Desta forma, usou-se como gabarito uma biblioteca de cDNA de placenta humana (Marathon-Ready cDNA, Clontech Laboratories, Inc.), e usaram-se oligonucleotídios A e E como preparadores. No oligonucleotídio E (SEQ ID NO: 3) o códon de terminação (TAA) da sequência de hTF DNA foi substituído por uma codificação de sequência de nucleotídios para 6 resíduos de histidinas seguida por um novo códon de terminação (MARCA). A Figura 19 mostra o sítio dos preparadores A e E na sequência de DNA de hTF (acesso # BC011029 no Gene Bank).

[00237] Depois de 35 ciclos de PCR (94°C, 30s, 45°C 30s, 72°C 1 min) e uma etapa de extensão final de 7 minutos a 72°C, purificou-se um produto de DNA com a dimensão esperada (sistema de purificação de DNA Qiagen).

[00238] O fragmento de DNA amplificado por PCR foi digerido com *Bam*HI para remover as extremidades, precipitado em etanol, e clonado no vetor pTT10301 previamente digerido com *Bam*HI. Depois de análise de restrição de endonuclease de diversos clones, foi selecionado o plasmídio pTT10303, contendo o gene hTF-his-

marcador recombinante na orientação direita com relação ao promotor de GDP (pGDP) (Figura 20).

[00239] Os inventores confirmaram ainda que a sequência de DNA do hTF-his-marcador recombinante clonado no pTT10301 foi 100% idêntica à sequência de hTF DNA anteriormente publicada (*Gene Bank #BC011029*) e que ela continha os 18 nucleotídios extra esperados na extremidade 3'. A análise da sequência de DNA da hTF-his-marcador recombinante foi realizada em um sequenciador automático (ABI prism 370, Applied Biosystems) utilizando-se preparadores A e E e reagentes Big Dye Terminator. Desenvolveram-se células DH5α carreadoras do plasmídio pTT10303 durante a noite a 37°C em meio de LBA e utilizaram-se para preparar cepas de glicerol.

3.3. Expressão de rTF-his-marca

[00240] Para gerar hTF-his-marcador completamente formado recombinante de expressão de levedura (rTF-his-marca), utilizou-se o vetor de expressão pTT10303 para transformar células de levedura T73 ura3$^-$ tal como descritas no Exemplo 1 (Seção 1.4). Selecionaram-se clones de levedura recombinantes (denominados yTT10302) por sua habilidade de se desenvolverem em meios desprovidos de uracil. Isolaram-se cinco clones independentes de yTT10302 e cultivaram-se durante a noite em meios sem uracil. A análise de mancha-oeste mostrou que todos os clones selecionados expressaram polipeptídios reconhecidos pelo TF

mAb anti-humano (Figura 21). A Figura 22 mostra o padrão de expressão de rTF-his-marcador do clone selecionado (yTT10302 clone #5) em comparação com extratos provenientes de leveduras recombinantes yTT10300 e yTT10301. Tal como é ilustrado, as dimensões moleculares dos produtos anti-TF imuno-reativos expressos por yTT10302 foram de cerca de 36, 38, 45, 47 e 49 kDa (assinalados com setas), enquanto outros agregados de grande peso molecular (cerca de 100 até 115 kDa) também puderam ser observados (seta). Como no caso dos extratos de levedura yTT10301, estas diferenças na mobilidade corresponderam a diferentes graus de glicosilação de rTF tal como se encontra ilustrado na Figura 20.

3.4. Purificação de rTF-his-marcador por cromatografia

3.4.1. Processo de purificação

[00241] Para a purificação de rTF-his-marca, os inventores partiram de extratos clarificados que continham rTF-his-marcador (doravante chamados de CYE-6HT-TF) obtidos a partir de yTT10302 seguindo-se o procedimento anteriormente descrito (Exemplo 1, Seção 1.5). O dito CYE-6HT-TF foi filtrado através de um filtro de tamanho de poro de 0,2 μm por filtragem de fluxo tangencial antes de ser carregado sobre uma coluna de afinidade HiTrap® de 5 ml (Pharmacia Biotech), que foi previamente lavada com água e equilibrada com tampão de partida (20 mM de tampão de fosfato, 500 mM de NaCl, pH 7,4). Depois de aplicação da

amostra, o fluxo passante foi recuperado (material não ligado), e a coluna foi submetida a três lavagens: a primeira com 40 ml de tampão de partida (20 mM de tampão de fosfato, 500 mM de NaCl, pH 7,4); a segunda lavagem foi com 40 ml de tampão de partida que continha 10 mM de imidazol; e a terceira com 40 ml de tampão de partida suplementado com 100 mM de imidazol. Depois da última lavagem, a proteína rTF-his-marcador microvesiculada chamada de 6HT-TF, foi eluída mediante adição à coluna de 25 ml de tampão de partida que continha 1 M de imidazol, e coletaram-se as frações de eluição (frações #1, #2, #3, e #4) de 2,5 ml. Na Figura 23 encontra-se ilustrado um esquema geral do processo.

[00242] Esta frações foram submetidas a diálise em tampão de diálise (20 mM de tampão de fosfato, 50 mM de NaCl, pH 7,4), e o extrato de partida, material não ligado, última lavagem antes da eluição e as quatro frações de eluição dialisadas foram analisadas por SDS-PAGE e coloração de prata ou por mancha-oeste. Conforme ilustrado na mancha-oeste na Figura 24A, depois da ligação à coluna 6HT-TF, o produto pode ser recuperado com êxito principalmente nas primeiras três frações de eluição (faixas 4-6). Digno de nota, quando proteínas provenientes destas amostras foram visualizadas ao colorir-se o gel com prata (Figura 24B), as bandas de proteína puderam ser observadas somente nas faixas correspondentes ao extrato de levedura de partida

(faixa 1) e ao material não ligado (faixa 2), mas não nas frações eluídas (faixas 4-7). Adicionalmente, a quantidade de proteína total nestas amostras ficou sob o limite de detecção do reagente BCA padrão (20 μg/ml).

[00243] Estes resultados, em conjunto com o resultado da mancha-oeste, demonstraram claramente que produto 6HT-TF altamente purificado pôde ser obtido por este procedimento de cromatografia de afinidade. Mais importante, as frações de eluição dialisadas #1-3 mantiveram a atividade pró-coagulante, determinada conforme descrito no EXEMPLO 4, e surpreendentemente a fração #1 mostrou essencialmente a mesma atividade pró-coagulante que o extrato de partida CYE-6HT-TF. Tal como era esperado, a fração que continha menos quantidade de proteína rTF imuno-reativa (fração #4, faixa 7) não mostrou qualquer atividade pró-coagulante.

[00244] As diferenças entre a concentração de proteína total versus atividade nestas duas amostras podem ser sumariadas da seguinte forma:

	Concentração de proteína total (mg/ml)	Concentração de rTF (ng/ml)
CYE-6HT-TF	6.2	275
fração #1 6HT-TF	ND*	252

ND*: não detectado por ensaio colorimétrico padrão (BCA) (limite de detecção 20 μg/ml)

3.4.2. Métodos Analíticos

[00245] Tal como ilustrado na mancha-oeste da Figura 19 o produto 6HT-TF nas frações eluídas consistiu, desta forma que no extrato de levedura total, de diversas bandas de proteína variáveis na dimensão que foram similarmente originadas por glicosilação diferencial da rTF-his-marca. Para estudar esta possibilidade, a fração #1 eluída foi submetida a tratamento de endoglicosilase. Sucintamente, os extratos provenientes de levedura expressor de rTF (yTT10301) tratado com 500 unidades (U) de endoglicosidase H (Endo H) ou N-glicosidase F (PNGase F) durante 1 h a 37°C foram, além disso, analisados por mancha-oeste com o TF mAb anti-humano. A Figura 25 mostra que depois do tratamento com seja PNGase F (faixa 2) ou Endo H (faixa 3) as bandas de proteína 45, 47 e 49 kDa disapareceram com os dois tratamentos. Depois da incubação de PNGase F observaram-se somente dois polipeptídios, o 36 e o 38 kDa que foi aumentado mais provavelmente devido à deglicosilação dos produtos de 45, 47 e de 49 kDa (comparem-se as faixas 1 e 2). O tratamento com Endo H deu origem a um único produto imuno-reativo de 36 kDa (faixa 3), que devia corresponder à proteína rTF-his-marcador não glicosilada.

[00246] Adicionalmente, analisou-se 6HT-TF purificado por EM depois de ser submetido a imunocoloração com TF mAb anti-humano tal como descrito no Exemplo 1

(Seção 1.6). Conforme ilustrado na Figura 26, pode ser observado na mesma um grande número de partículas de ouro, a maior parte das quais estavam associadas a pequenas vesículas de tamanho regular. Em uma amostra assemelhada proveniente dA levedura expressor de non-rTF, analisada em paralelo, o número de partículas de ouro foi extremamente reduzido (não ilustrado). Este resultado indica que o procedimento de cromatografia de afinidade usado para purificar o produto 6HT-TF permite a recuperação de 6HT-TF biologicamente ativo que está associado às microvesículas de membrana derivadas de levedura.

EXEMPLO 4

Produção de um produto pró-coagulante baseado na expressão de uma forma truncada da proteína de hTF em leveduras (CYE-TTF)

4.1. Geração do vetor de expressão de plasmídio de TF-his-marcador (TTF-his-marca) truncado

[00247] A codificação de cDNA para uma forma truncada da proteína de hTF (TTF), contendo o domínio de interação para o Fator X (aa 174-251), a região de transmembrana (aa 252-274), e a caudacitoplasmática (aa 275-295) com 18 nucleotídios extras (codificação para seis histidinas) na extremidade 3´, foi amplificada por PCR como um fragmento de 398 bp. Seguiu-se uma estratégia similar aquela descrita no Exemplo 1 (Seções 1.2 e 1.3). Desta forma, utilizou-se uma biblioteca de cDNA de placenta

humana (Marathon-Ready cDNA, Clontech Laboratories, Inc.) como gabarito, e usaram-se oligonucleotídios F e E como preparadores. In oligonucleotídio E, o códon de término (TAA) da sequência de DNA hTF foi substituído por uma codificação de sequência de nucleotídios para 6 resíduos de histidinas seguido por um novo códon de término (MARCA). A Figura 28 mostra a sítioização dos preparadores F e E na sequência de DNA hTF (Gene Bank accession # BC011029).

[00248] Depois de 35 ciclos de PCR (94°C, 30s, 45°C 30s, 72°C 1 min) e uma etapa de extensão final de 7 min a 72°C, purificou-se um produto de DNA com a dimensão esperada (sistema de purificação de DNA Qiagen).

[00249] O fragmento de DNA amplificado por PCR foi digerido com *Bam*HI, para remover as extremidades, precipitado por etanol, e clonado no vetor pTT10301 previamente digerido com *Bam*HI. Depois de análise de restrição de endonuclease dos diversos clones, selecionou-se o plasmídio pTT10304 que continha o gene de TTF-his-marcador recombinante na orientação direita com relação ao promotor de GDP (pGDP) (Figura 29).

[00250] Os inventores confirmaram ainda que a sequência de DNA do rTF-his-marcador clonado no pTT10301 foi 100% idêntica à sequência anteriormente publicada (Gene Bank #BC011029) e que ela contém os 18 nucleotídios extra esperados na extremidade 3′ (Figura 25). As células DH5α carreadoras do plasmídio pTT10304 foram desenvolvidas

durante a noite a 37°C em meio de LBA e usadas para preparar cepas de glicerol.

4.2. Expressão de rTTF-his-marcador por levedura recombinante

[00251] Para se regenerarem leveduras recombinantes expressores de TF-his-marcador (rTTF-his-marca) truncado humano recombinante, utilizou-se o vetor de expressão pTT10304 para transformarem células de levedura T73 ura3- conforme descritas no Exemplo 1 (Seção 1.4). Selecionaram-se clones de levedura recombinantes (chamados de yTT10304) pela sua capacidade de crescerem em meios desprovidos de uracil.

[00252] Para a expressão de rTTF-his-marca, prepararam-se e analisaram-se quanto à atividade extratos de levedura clarificados (CYE) obtidos a partir de yTT10304 seguindo-se o procedimento anteriormente descrito no Exemplo 1 (Seção 1.5), que tem atividade pró-coagulante, denominada CYE-TTF (isto é, extrato de levedura clarificado (CYE) que contém fator tissular truncado microvesiculado (TTF)), tais como descritos no EXEMPLO 1.

EXEMPLO 5

Geração do vetor de expressão de plasmídio de TF mutante de N-glicosilação

[00253] O TF mostra três resíduos diferentes onde ocorre a N-glicosilação, a saber, N11, N124, e N137. Mutantes simples acomodando estes resíduos (N11A, N124A e

N137A) e todas as suas combinações possíveis foram construídos utilizando-se procedimentos padrão (Figura 30).

Mutagênese Dirigida a Oligonucleotídio

[00254] Utilizou-se uma reação de PCR padrão usando-se os oligonucleotídios listados na tabela 3 para gerar os diferentes mutantes (Protocolos Correntes em Biologia Molecular, 15° capítulo). Utilizou-se o plasmídio pTT10302 como um modelo de DNA, e utilizou-se Pfu como polimerase uma vez que ele mostra uma fidelidade muito alta e baixa taxa de erro.

Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídios usados para gerar mutantes de glicosilação em TF. Ala significa Alanina, e Asn significa Asparagina.

Nome (SEQ ID NO)	Troca de sítio de aminoácido	Direção	Oligo Sequência 5´-3´
TT-7071	11-Asn para Ala	Para frente	TGACACCGTCGTATACGTAATTGAACCTTMARCAT
TT7075	11-Asn para Ala	Inversa	ACTGTGGCAGCATATCGATTAACTTGGAAATCA
TT-7072	124-Asn para Ala	Para frente	ATCTTCTACGGTCACTGCCACTTTTGTTCCCAC
TT-7076	124-Asn para Ala	Inversa	GTGGGAACAAAAGTGGCAGTGACCGMARCAAAGAT
TPM1	137-Asn para Ala	Para frente	ACTTMARCATCAGTTGGGCAAACACTTTCCTAAGC
TPM2	137-Asn para Ala	Inversa	GCTMARCAGAAAGTGTTTGCCCTTCTGACTAAAGT

Resultados

Mutações de pontos em sítios de glicosilação que afetam o TF

[00255] A Figura 31 mostra uma mancha-oeste antiTF comparando o perfil dos diferentes mutantes em sítios de glicosilação locais com o tipo silvestre. Conforme ilustrado, o perfil é diferente em todos eles, e quando tratados com glicosilases, todas as bandas tornam-se uma, o que significa que o perfil observado é devido a à condição de glicosilação diferente.

[00256] Determinou-se a atividade de coagulação destes mutantes, e os dados encontram-se sumariados na Tabela 4. Todos os dados foram normalizados para o tipo silvestre, cuja atividade e expressão foi considerada como sendo 100. As duas mutações simples em 11 (PM1) e 124 (PM2) mostraram um aumento na atividade, muito embora, surpreendentemente, o efeito mais digno de nota fosse observado quando o resíduo 124 foi mudado, uma vez que a sua atividade e expressão foram significativamente aumentadas (6 e 2 vezes respectivamente). A atividade daqueles mutantes duplos e mutantes triplos em que se encontra envolvido PM2 também foi aumentada.

Tabela 4

Atividade relativa e expressão dos diferentes mutantes em sítios de glicosilação quando comparados ao 6HT-TF do tipo silvestre.

Atividade relativa		**Expressão relativa**
PM/6H-TF*100		**PM/6H-TF*100**
WT	100	100
PM1	190	48
PM2	602	194
PM3	64	67
PM1&2	206	52
PM1&3	0	15
PM2&3	114	108
PM1&2&3	294	12

PM = Mutação de ponto

EXEMPLO 6

Avaliação da atividade pró-coagulante de fator de tecido microvesiculado (mTF)

[00257] Por simplicidade, neste Exemplo, "fator tissular microvesiculado", "TF microvesiculado" ou "mTF" refere-se, de uma maneira geral, ao fator tissular, fator tissular modificado (por substituição, eliminação, adição ou troca de um ou mais aminoácidos), proteína de fusão que compreende fator tissular, ou fator tissular truncado desprovido de parte ou todo o domínio de união para FVIIa, sendo todos eles total ou parcialmente glicosilados e associados à microvesícula derivada de leveduras (isto é, sendo integrados na camada de lipídios das microvesículas)

a não ser que de outro modo estabelecido.

[00258] Para o propósito de avaliação da atividade de pró-coagulante de fator tissular microvesiculado proporcionado pela presente invenção, realizou-se uma série de ensaios *in vitro* e *in vivo*, especificamente:

1. Ensaios *in vitro* demonstrando que TF microvesiculado causa formação de coágulos de fibrina e coagulação do sangue em condições saudáveis e de paciente

1.1 Ensaios de coagulação em plasma proveniente de pessoas saudáveis.

1.2 Comparação do efeito pró-coagulante de vesículas purificadas por filtragem de gel e TF relipidado.

1.3 Ensaios de coagulação em plasmas deficientes em FVIII, em FIX ou em FXI.

1.4 Ensaios de coagulação em plasmas Trombocitopênicos.

1.5 Ensaios de coagulação em plasma proveniente de plasma deficiente em FVIII, FIX e FXI na presença de um anticorpo anti-FVII.

1.6 Ensaios de coagulação em sangue total não anticoagulado proveniente de pessoas saudáveis.

1.7 Ensaios de coagulação em sangue total não-anticoagulado proveniente de pacientes hemofílicos (ensaios de coagulação em sangue total não-anticoagulado).

2. Ensaios *In vivo* demonstrando que TF microvesiculado é um agente de utilidade para tratamento tópico anti-hemorrágico em modelos de hemorragia grave (por aplicação deste diretamente ao vaso sanguíneo previamente seccionado)

2.1 Ensaio em um modelo de animal de hemorragia grave por seção próxima de caudas de ratos.

2.2 Ensaio em um modelo de animal de hemorragia grave previamente tratado com heparina.

3. Ensaios *in vivo* demonstrando que o TF microvesiculado é um agente de utilidade para o tratamento anti-hemorrágico tópico em modelos de hemorragia letal (por aplicação diretamente no vaso sanguíneo previamente seccionado)

3.1 Ensaio em um modelo de animal de hemorragia letal por seção próxima de caudas de camundongos deficientes em FVIII.

I. MATERIAIS e MÉTODOS

Materiais

[00259] Como fonte de fator tissular microvesiculado (mTF) utilizaram-se três compostos diferentes:

(i) Extratos de levedura clarificados contendo TF microvesiculado (CYE-TF), obtidos de acordo com o Exemplo 1;

(ii) proteína de fusão de marcador de histidina de

TF-hexa microvesiculada purificada (6HT-TF) obtida de acordo com o Exemplo 2; e

(iii) Extrato de levedura clarificado que contém fator tissular truncado microvesiculado (CYE-TTF) obtido de acordo com o Exemplo 3.

[00260] Plasmas deficientes em Fator de Coagulação FVIII-, FIX- e FXI- comerciais foram adquiridos a partir da Dade Behring Marburg GmbH.

[00261] Anticorpo FVII anti-humano monoclonal comercial (clone HVII-1) foi adquirido a partir da Sigma Aldrich.

[00262] Camundongos hemofílicos comerciais (Allele: $F8^{tm1Kaz}$; nome comum MFVIII-16; submetido a mutação por Haig H Kazazian; Referência: Bi L; Lawler AM; Antonarakis SE; High KA; Gearhart JD; Kazazian HH Jr. 1995. O rompimento visado do gene VIII de fator de camundongo produz um modelo de hemofilia A, Nat. Genet. 10:119-21) foram adquiridos da Jackson Laboratory.

[00263] rTF Comercial foi adquirido a partir da American Diagnostica.

[00264] Amostras de plasma provenientes de cinco doadores saudáveis foram obtidas a partir do Blood Bank de Vall d'Hebrón Hospital, Department "Banc de Sang i Teixits"(Pg,Vall d'Hebrón, 119-129, 08035 Barcelona). As amostras de plasma foram checadas quanto a vírus de hepatite B (HBV), vírus de hepatite C (HCV), HIV e TPHA e

foram todos negativos. As cinco amostras de plasma foram agrupadas e congeladas a -20C em frascos de 1,5 ml até serem usadas.

Métodos

Relipidação de rTF

[00265] Submeteu-se a relipidação rTF comercial (American Diagnostica) seguindo-se o procedimento padrão descrito por Morrissey (http://www.tf7.org/relipidation2.pdf) em que rTF é incorporado em lipossomos de fosfolipídio lipossomos. A quantidade de rTF presente nas amostras foi quantificada pelo "IMUBIND Tissue Factor ELISA Kit", proveniente da American Diagnostica Inc.(No. 845) e seguindo-se especificações do fornecedor.

Ensaios *in vitro*

[00266] A fim de se determinar se um fator tissular truncado microvesiculado é desprovido de parte ou da totalidade do domínio de união (ligação) a FVII, e de saber se ele ainda se encontra ativo, primeiramente, realiza-se um ensaio de ligação do fator tissular truncado microvesiculado ao FVIIa com a finalidade de se determinar se a ligação de fator tissular truncado microvesiculado a FVIIa pode ser detectado ou não, e, em segundo lugar, o ensaio de coagulação em plasma pode ser usado para determinar se o fator tissular truncado ainda se encontra ativo como um pró-coagulante.

Ensaio de ligação do fator tissular truncado

microvesiculado ao FVIIa

[00267] Para se determinar a interação entre seja proteína de fusão marcada de histidina TF-hexa microvesiculado purificado (6HT-TF), extratos de levedura clarificados contendo TF microvesiculado (CYE-TF) ou estratos de levedura clarificados contendo TF truncado microvesiculado (CYE-TTF) e o Fator de Coagulação VIIa (FVIIa) os autores da invenção seguiram uma versão modificada do método descrito na publicação internacional WO 00/04148. Por estes meios, ensaiou-se a ligação de 6H-TF, CYE-TF ou CYE-TTF a FVIIa bioestanhado como um teste ELISA. Para isto, preparou-se FVIIa bioestanhado (BEGR-7a) tal como descrito anteriormente (Kelley *et al*., 1995 Biochem. 34:10383-10392). Então, revestiram-se placas de micro titulação de 96 cavidades com BEGR-7a utilizando-se estreptavidina como um agente de captura. As cavidades foram lavadas duas vezes com Tween 20 a 0,05% em água destilada e bloquearam-se com PBS contendo 1% leite seco não gorduroso (solução de bloqueio) durante 2h. Depois disso, adicionaram-se às cavidades diluições décuplas de 6HT-TF, CYE-TF ou CYE-TTF, partindo-se sob uma concentração de 10 µg/ml, preparada em tampão de TNC (20 mM Tris, pH 7,5, 100 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$), e contendo uma quantidade fixa de seja estreptavidina conjugada com BEGR-7a ou estreptavidina isoladamente. Depois da 2h de incubação sob R/T, as cavidades foram lavadas novamente com Tween 20 a

0,05% para eliminar material não ligado. Para detectar o complexo TF-FVIIa nas diferentes soluções que continham TF utilizou-se um anti-soro policlonal de coelho anti-TF específico. Para isto, uma diluição a 1:500 da diluição de soros anti-TF foi adicionada às cavidades e incubada 2h a 37°C. As placas foram lavadas cinco vezes antes da ser adicionado o anticorpo de detecção. Diluiu-se anticorpo de imunoglobulina anti-coelho caprina conjugado a peroxidase G (IgG) (Southern Biotechnology Associated) 1:1000 em solução de bloqueio e incubou-se durante 1h a 37°C. As placas foram lavadas novamente cinco vezes e utilizaram-se peróxido de hidrogênio e ortofenilenodiamina (OPD) a 0,05% para desenvolver a reação. Depois de 10 a 15 minutos de incubação sob temperatura ambiente, a reação foi sustada pela adição de H2SO4 (2N) e a absorvência foi medida a 492 nm em uma leitora de placas Multiskan Plus (sistema laboratorial).

Ensaios de coagulação em plasma

[00268] Mediu-se a atividade pró-coagulante espontânea (não estimulada) em plasma por meio de um ensaio de coagulação de duas etapas em um coagulômetro de 4 canais (Start 4, Diagnostica Smarcao). Sucintamente, adicionaram-se 50 µl de plasma pobre em plaquetas às depressões já temperadas e 50 µl da amostra (mTF, ou água destilada como controle). Deixou-se esta mistura incubar durante 60 segundos a 37°C e adicionaram-se imediatamente 50 µl de

cloreto de cálcio 25 e o tempo de coagulação foi determinado em segundos no coagulômetro, verificado pela formação do coágulo. Obtiveram-se plasmas deficientes em plaquetas por meio de centrifugação e o número de plaquetas foi determinado por Coulter.

[00269] O efeito pró-coagulante de mTF nos plasmas deficientes em fatores de coagulação (FVIII, FIX ou FXI) correspondeu a hemofilia A, B ou C, respectivamente, foi investigado pelo uso de plasmas comerciais (Dade Behring Marburg GmbH) exaurido por meio de técnicas de imunoafinidade. Em cada caso, o teor final dos ditos fatores de coagulação foi menor do que 1%.

[00270] O efeito pró-coagulante em uma condição semelhante a trombocitopênica foi investigada em plasma exaurido de plaquetas com um processo de centrifugação sequencial.

Ensaios de coagulação em sangue total

[00271] A atividade pró-coagulante em sangue total não-anticoagulado foi determinada por meio de um método de coagulação. Os diferentes agentes (mTF) a serem estudados foram adicionados em volume final de 0,2 ml a 0,8 ml de sangue total não-anticoagulado e mediu-se o tempo de coagulação com um cronômetro desde o início da extração até que apareceu um coágulo de sangue estável e consolidado. O efeito dos diferentes agentes foi avaliado por meio da diminuição ou alongamento dos tempos de coagulação do

sangue.

[00272] Obtiveram-se amostras de sangue a partir de pacientes ou voluntários saudáveis.

Ensaios in vivo

Modelo de hemorragia grave por seção próxima em cauda de rato

[00273] Ratos machos Sprage-Dawley pesando 300-600 gramas foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos de tratamento:

- um grupo de controle, constituído de pelo menos 3 animais que receberam tratamento tópico com solução salina fisiológica, e
- um segundo grupo, também constituído de pelo menos 3 animais, que recebeu tratamento tópico com mTF.

[00274] Todos os compostos entraram em contacto tópico com a seção próxima da cauda do animal para agirem hemostaticamente em um volume de 1 ml/min distribuído diretamente na superfície ferida com o rato em uma posição voltada para cima. A formação do coágulo estável e consolidado foi evidenciada por meio de confirmação de nenhum outro sangramento.

Modelo de hemorragia grave por seção próxima da cauda do rato em animais tratados com drogas anticoagulantes

a) Animais tratados com 6HT-TF

[00275]Ratos machos Sprage-Dawley, pesando 300-600 gramas foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos de

tratamento:

- um grupo de controle, constituído de 14 animais que receberam tratamento tópico com solução salina fisiológica, e

- um segundo grupo constituído de 5 animais que receberam 200 U/kg de heparina intravenosamente (i.v.) 15 minutos antes de começar o procedimento de transecção da cauda. Este grupo foi tratado depois de 15 minutos com mTF (6HT-TF) 1494 ng/ml. O mTF entrou em contacto tópico com a seção próxima da cauda do animal para agir hemostaticamente distribuído gota a gota por uma pipeta plástica eppendorf.

[00276]A formação do coágulo estável e consolidado foi evidenciada por meio de confirmação de mais nenhum sangramento.

b) Animais tratados por CYE-TF

[00277]Distribuíram-se aleatoriamente 27 ratos machos Sprage-Dawley pesando 300-600 gramas em 5 grupos de tratamento:

- um grupo de controle, constituído de 14 animais que receberam tratamento tópico com solução salina fisiológica;

- dois grupos receberam 200 U/kg de heparina i.v. 15 minutos antes de iniciar-se o procedimento de transecção da cauda (para serem tratados com CYE-TF (n=3), e para serem tratados com solução salina fisiológica (n=5)), e

- outros dois grupos receberam oralmente 0,1 mg/kg/dia de *warfarin* durante três dias antes de se iniciar o

procedimento de transecção de cauda (para serem tratados com CYE-TF (n=3) e para serem tratados com solução salina fisiológica (n=2)).

[00278] Portanto, houve um grupo de controle tratado para cada tratamento de anticoagulação. O CYE-TF entrou em contacto tópico com a seção próxima da cauda do animal para atuar hemostaticamente aplicado por meio de uma pipeta *eppendorf* de plástico. A formação do coágulo estável e consolidado foi evidenciada por meio da confirmação de nenhum sangramento mais.

Modelo de hemorragia letal por seção próxima de cauda de camundongos, utilizando-se camundongos deficientes em Fator VIII

[00279] O propósito deste ensaio foi avaliar os efeitos de administração tópica de mTF em um modelo de hemorragia letal (transecção da veia da cauda) utilizando-se camundongos deficientes em Fator VIII (Hemofilia A) obtidos por mutação visada de gene.

[00280] Os camundongos que eram homozíguos para o alele mutante vinculado a cromossomo X, eram viáveis e férteis. As fêmeas homozíguas e machos carreadores tinham menos do que 1% de atividade de Fator VIII normal e exibiam tempos de coagulação prolongados. Estes camundongos recapitularam fatores chave de Haemofilia A e proporcionaram um modelo excelente para o uso na exploração de estratégias de terapia alternativas.

[00281] Proporcionaram-se 5 grupos de tratamento, com de 3 a 5 camundongos por grupo, como se segue:

Grupo A: Camundongos de controle

Veículo 0 ng /ml

Grupo B: Camundongos machos hemofílicos Veículo 0 ng /ml

Grupo C: Camundongos machos hemofílicos mTF 1,494 ng/ml

Grupo D: Camundongos fêmeas hemofílicas Veículo 0 ng /ml

Grupo E: Camundongos fêmeas hemofílicas mTF 1,494 ng/ml

[00282]A concentração de proteína da cepa mTF foi 1,494 ng/ml de material biologicamente ativo. Somente uma dose foi usada diretamente a partir do recipiente de cepa e não se realizou qualquer diluição. As doses de artigo de teste foram calculadas com base na concentração de proteína biologicamente ativa, utilizando-se um ensaio de coagulação de duas etapas. O mTF e o veículo foram administrados topicamente no sítio da hemorragia da cauda gota a gota em uma proporção de 0,25 ml/minuto durante um máximo de 20 minutos (5 ml).

II. RESULTADOS

1. Ensaios *in vitro* demonstrando que o TF microvesiculado causa coagulação do sangue em condições saudáveis e doentes

[00283] Realizaram-se diversos ensaios *in vitro* com

o propósito de se avaliar a capacidade do mTF causar coagulação de fibrina em pacientes saudáveis e hemofílicos sob diferentes concentrações. Tal como mencionado anteriormente, “tempo de coagulação” refere-se ao tempo que o coágulo demora em consolidar-se em uma amostra de sangue não-anticoagulado.

1.1 TF Microvesiculado é capaz de coagular plasma proveniente de pacientes saudáveis (ensaios de coagulação em plasma)

[00284] O ensaio direto para atividade pró-coagulante de mTF em plasma saudável sob diferentes concentrações demonstrou que o mTF é capaz de diminuir de forma muito significativa o tempo de coagulação em condições de plasma saudável, de uma forma de resposta a dose absoluta. Mesmo sob concentrações de mTF muito baixas (2 ng/ml) o tempo de coagulação de plasma saudável é reduzido em quase três vezes. Sob concentrações mais altas (100 ng/ml) ele é reduzido em mais de 5 vezes. A Tabela 5 mostra os resultados em três experiências independentes para proteína de fusão marcador de TF-hexa histidina microvesiculada purificada (6HT-TF), a Tabela 6 para extratos de levedura clarificado que contém TF microvesiculado (CYE-TF), e a Tabela 7 para extrato de levedura clarificado que contém TF truncado microvesículado (CYE-TTF).

Tabela 5

A proteína de fusão de marcador de histidina TF-hexa microvesiculada (6HT-TF) purificada diminui o tempo de coagulação em plasma saudável na forma de uma resposta a dose

6HT-TF (ng/ml)	Tempo de coagulação (segundos)
0,00	168,60 ± 6,06
2,00	63,27 ±2,17
5,00	55,56 ± 0,76
20,00	45,47 ± 0,92
50,00	37,50 ± 0,75
100,00	31,10 ± 0,12

Média ± SEM (n= 3)

Tabela 6

Extratos de levedura clarificado que contêm TF microvesiculado (CYE-TF) diminui o tempo de coagulação em plasma saudável na forma de uma resposta a dose

CYE-TF (ng/ml)	Tempo de coagulação (segundos)
0,00	320,4±81,3
0,43	67,35±4,6
4,30	37,6±1,9
43,00	23,1±1,09
209	18,08±0,26

Média ± SEM (n=4)

Tabela 7

Extratos de levedura clarificado que contêm TF truncado

microvesiculado (CYE-TTF) diminui o tempo de coagulação em plasma saudável

CYE-TTF (ng/ml)	Tempo de coagulação (segundos)
0,00	233,4±2,65
20,00	85,6±1,1

Média ± SEM (n=2)

1.2 O TF microvesiculado é capaz de coagular plasma com eficiência aperfeiçoada quando comparado a rTF relipidado seguindo-se procedimentos padrão.

1.2.1. Atividade pró-coagulante do mTF comparada com rTF comercial relipidado seguindo-se os procedimentos padrão.

[00285] Submeteu-se a relipidação rTF comercial (American Diagnostica) seguindo-se o procedimento padrão descrito por Morrissey (http://www.tf7.org/relipidation2.pdf), em que o rTF é incorporado em lipossomos de fosfolipídio. Obtiveram-se amostras de plasma a partir de cinco doadores saudáveis provenientes do Blood Bank de Vall d'Hebrón Hospital, Department "Banc de Sang i Teixits"(Pg,Vall d'Hebrón, 119-129, 08035 Barcelona). As amostras de plasma foram checadas quanto a vírus de hepatite B (HBV), vírus de hepatite C (HCV), HIV e TPHA e todas elas foram negativas. As cinco amostras de plasma foram agrupadas e congeladas a -20C em frascos de 1,5 até serem utilizadas. A quantidade de rTF presente nas amostras foi quantificada pelo IMUBIND Tissue Factor ELISA Kit, proveniente do American Diagnostica Inc.(No. 845) e

seguindo-se as especificações do fornecedor.

[00286] Primeiro, analisaram-se as possíveis diferenças na atividade entre o rTF incorporado nas microvesículas de levedura ou quando ele é inserido em lipossomos sintéticos. Para estas experiências testaram-se quatro lotes diferentes de mTF (Lotes P4, P7, P8 e P) e um lote de rTF relipidado *in vitro*, todos eles com concentrações de rTF conhecidas conforme determinado por ELISA, quanto a atividade coagulante. Desta maneira, testaram-se diluições em série, seja de mTF (a partir dos quatro lotes diferentes), ou de rTF comercial relipidado, quanto a atividade em um teste de coagulação padrão. O resultado mostrou que sobre toda a gama de concentrações testadas, e independentemente do grupo testado, a atividade pró-coagulante nas amostras de mTF foi sempre mais alta (entre uma ou duas ordens de grandeza) do que aquela das diluições correspondentes de rTF relipidado (Figura 32).

1.2.2. Atividade pró-coagulante do rTF inserido nas microvesículas derivadas de levedura (mTF) comparado ao mesmo rTF inserido nos lipossomos sintéticos.

[00287] Esforços realizados para relipidar o rTF extraído a partir de microvesículas de mTF mostraram que a atividade de rTF é enormemente reduzida quando comparada às microvesículas de levedura originais que contêm rTF (Figura 33). Parece haver um requisito de conformação para a atividade ótima de fator tissular.

1.2.3. Atividade pró-coagulante de mTF em plasma heparinizado

[00288] Adicionalmente, a atividade presente nos preparados reconstituídos foi insignificante em determinados modelos *in vivo* (animais heparinizados) de hemorragia (Figura 34).

[00289] Tomados em conjunto, os resultados mostrados em 1.2 indicam que a combinação única de fator tissular e membrana de leveduras presentes nas microvesículas no mTF ou 6H-TF de acordo com a a invenção exibem uma plêiade de atividades hemostáticas as quais não podem ser conseguidas pela inserção *in vitro* convencional do rTF em lipossomos sintéticos.

1.3. O TF microvesiculado é capaz de coagular plasma a partir de pacientes deficientes em FVIII, FIX e FXI (ensaios de coagulação em plasma)

[00290] O ensaio direto quanto à atividade pró-coagulante de mTF em plasmas deficientes em fatores de coagulação FVIII (Hemofilia A), FIX (Hemofilia B), e FXI (Hemofilia C) obtidos por imunodepleção sob diferentes concentrações, demonstrou que o mTF é capaz de diminuir de forma muito significativa o tempo de coagulação em condições hemofílicas, em uma maneira de resposta de dose evidente. Mesmo sob concentrações de mTF muito baixas (2 ng/ml) ele conseguiu provocar a coagulação de plasmas exauridos de FVIII, FIX ou FXI. Sob concentrações mais

altas (100 ng/ml), o mTF reduz o tempo de coagulação em plasmas exauridos sob o mesmo nível que nos plasmas saudáveis. A Tabela 8 mostra os resultados em 3 experiências independentes para proteína de fusão de marcador de histidina de TF-hexa microvesiculado purificado (6HT-TF), e a Tabela 9 mostra os resultados para extratos de levedura clarificado que contêm TF microvesiculado (CYE-TF).

Tabela 8

A proteína de fusão marcador de histidina de TF-hexa microvesiculado purificado (6HT-TF) diminui o tempo de coagulação em plasmas deficientes em fator de coagulação FVIII (Hemofilia A), FIX (Hemofilia B), e FXI (Hemofilia C) em uma maneira de resposta de dose

6HT-TF (ng/ml)	FVIII (Hemofilia A) Tempo de coagulação (segundos)	FIX (Hemofilia B) Tempo de coagulação (segundos)	FXI (Hemofilia C) Tempo de coagulação (segundos)
0,00	600±0,0	600±0,0	600±0,0
2,00	87,43±3,01	78,37±0,82	66,43±2,17
5,00	57,43±1,68	52,20±0,69	51,67±0,64
20,00	48,57±1,23	41,70±1,18	46,07±1,70
50,00	39,80±0,67	34,40±0,42	38,93±1,23
100,00	32,77±0,38	29,17±0,43	32,50±0,85

Média ± SEM (n= 3)

Tabela 9

Extratos de levedura clarificado que contêm TF microvesiculado diminuem o tempo de coagulação em plasmas deficientes em fator de coagulação FVIII (Hemofilia A), FIX (Hemofilia B), e FXI (Hemofilia C) de uma maneira de resposta de dose

CYE-TF (ng/ml)	FVIII (Hemofilia A) Tempo de coagulação (segundos)	FIX (Hemofilia B) Tempo de coagulação (segundos)	FXI (Hemofilia C) Tempo de coagulação (segundos)
0,00	>600	>600	<600
0,043	127,9±0	126,7±1,2	-
0,43	63,25±5	64,15±5	130,2±0
4,3	34,65±2,65	35,47±2,57	36,9±4,0
43,0	20,15±1,05	20,6±1,4	20,85±1,15

Média ± SEM (n= 2)

1.4. O TF microvesiculado é capaz de coagular plasma a partir de deficiência de plaquetas adquirida (ensaios de coagulação em plasma Trombocitopênico)

[00291] O ensaio direto para atividade pró-coagulante de mTF em plasma a partir de deficiência de plaquetas adquirida demonstrou que o mTF é capaz de diminuir de forma muito significativa o tempo de coagulação em plasmas trombocitopênicos com diferentes contagens de plaquetas. Mesmo sob contagens de plaquetas muito baixas

(<1,000/μl) o tempo de coagulação é drasticamente reduzido pelos extratos de levedura clarificado que contêm o TF microvesiculado TF (CYE-TF), conforme ilustrado na Tabela 10.

Tabela 10

Os extratos de levedura clarificado que contêm TF microvesiculado (CYE-TF) diminuem o tempo de coagulação em plasmas trombocitopênicos

Contagem de Plaquetas	Tempo de Coagulação Sem mTF (segundos)	Tempo de Coagulação com CYE-TF (60 ng/ml) (segundos)
350.000/μl	226,3	21,9
150.000/μl	232,6	22,8
50.000/μl	253,9	22,4
9.000/μl	321,2	21,3
<1,000/μl	>400	21,3

Média ± SEM (n= 1)

1.5. O TF microvesiculado é capaz de coagular plasma proveniente de plasma deficiente em FVIII, FIX e FXI na presença de um anticorpo anti-FVII (ensaios de coagulação em plasma)

[00292] O efeito de TF microvesiculado na coagulação de plasma foi investigado por meio de ensaios de coagulação utilizando-se plasmas deficientes em FVIII, FIX e FXI (FVIII DP, FIX DP e FXI DP) provenientes de voluntários saudáveis na presença de um anticorpo

monoclonal contra FVII. Os resultados mostram de forma evidente que os extratos de levedura clarificado que contêm TF microvesiculado (CYE-TF) são capazes de produzir coagulação de plasma, mesmo reduzindo extraordinariamente o tempo de coagulação mesmo na ausência de FVIII, FIX ou FXI e na presença do anticorpo monoclonal contra FVII, conforme ilustrado na Tabela 11. A coagulação com a ausência de FX, e com a presença de anticorpos FVII significa que, surpreendentemente, o mTF não está atuando através de caminhos de coagulação intrínsecos nem extrínsecos.

Tabela 11

Extratos de levedura clarificado que contêm TF microvesiculado (CYE-TF) coagulam os plasmas deficientes em FVIII, FIX e FXI na presença de anticorpos anti-FVII

	Sem tempo de coagulação de mTF (segundos)	**Com tempo de coagulação de CYE-TF (70ng/ml) (segundos)**
FVIII DP	308,17±5,41	29,6±4,85
FIIIV DP + anti FVII	>395	45,9±0,86
FIX DP	347,4±23,03	26,77±3,97
FIX DP + anti FVII	>400	41,67±0,55
FXI DP	331±5,43	32,9±5,8
FXI DP +	>400	49,17±1,2

anti FVII		
Plasma Normal	126,28±85	28,15±0,05
Plasma Normal + anti FVII	216,8±0	42,55±2,05

Média ± SEM (n= 4)

1.6 O TF microvesiculado é capaz coagular sangue proveniente de pessoas saudáveis (ensaios de coagulação em sangue total não-anticoagulado)

[00293] O ensaio direto quanto a atividade pró-coagulante de mTF em sangue total proveniente de pessoas saudáveis sob diferentes concentrações demonstrou que o mTF é capaz de diminuir de forma muito significativa o tempo de coagulação de uma forma no sentido de dose evidente. Mesmo sob concentrações de mTF muito baixas (1 ng/ml) ele conseguiu reduzir o tempo de coagulação do sangue total proveniente de pessoas saudáveis. Sob concentrações mais altas (100 ng/ml), o mTF reduz o tempo de coagulação em plasmas exauridos em mais do que 8 vezes. Q Tabela 12 mostra os resultados obtidos em três experimentos independentos quanto a proteína de fusão marcador de histidina de TF-hexa microvesiculado purificado (6HT-TF), e a Tabela 13 mostra os resultados quanto a extratos de levedura clarificado que contém TF microvesiculado (CYE-TF).

Tabela 12

A proteína de fusão de marcador de histidina de TF-hexa microvesiculado purificado diminui o tempo de coagulação no sangue total proveniente de pacientes saudáveis segundo uma resposta dosada

6HT-TF (ng/ml)	Tempo de coagulação (minutos)
0,00	4,23 ± 0,54
1,00	2,03 ± 0,14
10,00	1,17 ± 0,12
100,00	0,33 ± 0,03

Média ± SEM (n=3)

Tabela 13

Os estratos de levedura clarificado que contêm TF microvesiculado (CYE-TF) diminuem o tempo de coagulação no sangue total proveniente de pacientes saudáveis segundo uma resposta dosada

CYE-TF (ng/ml)	Tempo de coagulação (segundos)
0,00	264,7±33,4
0,043	235,0±37,5
0,43	168,3±14,2
4,30	76,6±12,1
43,0	43,3±8,8
208	23,0±3,0

Média ± SEM (n=3)

1.7 O TF microvesiculado é capaz de coagular sangue

proveniente de pacientes hemofílicos (ensaios de coagulação em sangue total não-anticoagulado)

[00294] O ensaio direto quanto a atividade pró-coagulante de mTF em sangue total proveniente de pacientes hemofílicos sob concentrações diferentes demonstrou que o mTF é capaz de diminuir de forma muito significativa o tempo de coagulação em uma maneira de resposta a uso evidente. Mesmo sob baixas concentrações de mTF (2-5 ng/ml) ele conseguiu normalizar o tempo de coagulação de sangue total proveniente de pacientes hemofílicos. Sob concentrações mais elevadas (20 ng/ml), o mTF reduz o tempo de coagulação no sangue total hemofílico para menos de um minuto. A Tabela 14 mostra os resultados em três experiências independentes para proteína de fusão marcador de histidina de TF-hexa microvesiculado purificado (6HT-TF), e a Tabela 15 mostra os resultados para extratos de levedura clarificado que contêm TF microvesiculado (CYE-TF).

Tabela 14

A proteína de fusão de marcador de histidina TF-hexa microvesiculado purificado (6HT-TF) diminui o tempo de coagulação em sangue total proveniente de pacientes A e B hemofílicos segundo uma resposta dosada

6HT-TF (ng/ml)	**FVIII (Hemofilia A) Tempo de coagulação (minutos)**	**FXI (Hemofilia B) Tempo de coagulação (minutos)**

0,00	17,17 ± 1,56	19,27 ± 0,84
1,00	8,50 ± 0,47	11,23 ± 0,65
10,00	3,93 ± 0,30	6,40 ± 0,32
100,00	0,80 ± 0,12	0,77 ± 0,15

Média ± SEM (n=3)

Tabela 15

Extratos de levedura clarificado que contêm TF microvesiculado (6HT-TF) diminuem o tempo de coagulação em sangue total proveniente de pacientes A e B hemofílicos segundo uma resposta dosada

CYE-TF (ng/ml)	**FVIII (Hemofilia A) Tempo de coagulação (minutos)**	**FXI (Hemofilia B) Tempo de coagulação (minutos)**
0,00	15,3±1,2	18,4±2,1
1,00	9,8±1,3	11,2±0,1
10,00	5,7±0,7	5,8±0,3
100,00	1,4±0,2	1,5±0,1

Média ± SEM (Hemofilia A, n=3; Hemofilia B, n=2)

2. Ensaios *in vivo* demonstrando que o TF microvesiculado é um agente de utilidade para tratamento anti-hemorrágico tópico em modelos de hemorragia grave (por aplicação diretamente no vaso sanguíneo previamente seccionado)

[00295] Realizaram-se diversos ensaios *in vivo* com o propósito de avaliar a capacidade do mTF causar coagulação de fibrina em pacientes saudáveis e hemofílicos

sob diferentes concentrações.

2.1 O TF microvesiculado é de utilidade como um agente hemostático tópico em um modelo de animal de hemorragia grave por seção próxima de caudas de ratos

[00296] Estudos *in vivo* utilizando-se um modelo de hemorragia grave em rato por transecção de cauda total mostrou uma redução significativa no tempo de sangramento: de 18,16±1,61 até 8,36±0,82 minutos quando se trataram animais com 6HT-TF a 1494 ng/ml até 1,7 μg de concentração de proteína total; de 18,16±5,98 até 9,33±1,05 minutos quando se trataram animais com CYE-TF a 200 ng/ml/min.

2.2 O TF microvesiculado é de utilidade como um agente hemostático tópico em um modelo de animal de hemorragia grave previamente tratado com heparina

[00297] Estudos realizados *in vivo* utilizando-se um modelo de hemorragia grave em rato pré-tratado com anticoagulante (isto é, heparina 200 IU) por seção da cauda total mostrou um efeito anti-sangramento muito significativo. Os ratos não tratados com 6HT-TF sangraram até morrer depois de 90 minutos, onde ratos tratados com 6HT-TF a 1494 ng/ml pararam de sangrar em 15,46±1,20 minutos e mostraram uma capacidade de sobrevivência de 100%. Por outro lado, o uso de CYE-TF também mostrou efeito anti-sangramento assemelhado. Os ratos previamente tratados com heparina sangraram até morrer depois de 90 minutes, enquanto que os ratos tratados com CYE-TF pararam de

sangrar em 14,2± 2,4 (n=5) minutos e também mostraram uma capacidade de sobrevivência de 100%. Os ratos previamente tratados com *warfarin* reduziram o seu tempo de coagulação de 41,6±16,45 para 5.8±0.64 (n=3) minutos quando tratados com CYE-TF (200 ng/ml).

3. Ensaios *in vivo* demonstrando que o TF microvesiculado é um agente de utilidade para tratamento anti-hemorrágico tópico em modelos de hemorragia letal (por aplicação diretamente no vaso sanguíneo previamente seccionado)

3.1 O TF microvesiculado é de utilidade como um agente hemostático tópico em um modelo de animal de hemorragia letal por seção próxima de caudas de camundongos deficientes em FVIII

[00298] Em um modelo de hemorragia letal em camundongos hemofílicos (camundongos deficientes em FVIII), a administração tópica de 6HT-TF resultou em uma redução dramática do tempo de sangramento (de 31,4±4,74 para 5,14±0,69 minutos em ratos machos hemofílicos e de 43,33±13,48 a 5,0±2,0 minutos em camundongos fêmeas) comparáveis ao tempo de sangramento obtido em camundongos normais, não hemofílicos (5,0±0,65 minutos). Esta redução no tempo de sangramento esteve associada com nenhuma mortalidade no grupo tratado com 6HT-TF enquanto todos os camundongos hemofílicos tratados com veículos sangraram até morrer. A Tabela 16 mostra os resultados em cinco/três experiências independentes para proteína de fusão de

marcador de histidina de TF-hexa microvesiculado purificado (6HT-TF).

Tabela 16

A proteína de fusão de marcador de histidina de TF-hexa microvesiculado purificado (6HT-TF) diminui o tempo de sangramento em modelo de hemorragia letal por seção próxima de caudas de camundongos deficientes em FVIII

	Tratamento	Peso de Animal (g)	6HT-TF (ng/camundongo)	Tempo de sangramento (min)		Mortalidade	
		Média+SEM	Média+SEM	Média+SEM	N	%	Média (min)
Camundongo macho de controle	Veículo	23,56±0,74	0+/-0	5±0,65	5	0	--
Camundongo macho hemofílico	Veículo	20,94±0,35	0+/-0	31,4±4,74	5	100	44,8±8,43
Camundongo macho	6HT-TF	21,04±0,49	1807+/-291	5,14±0,69	5	0	--

hemofí-lico							
Camun-dongo fêmea hemofí-lico	Veícu lo	19,7±1	0+/-0	43,33±13 ,48	3	10 0	50±16,0 4
Camun-dongo fêmea hemofí-lico	6HT-TF	19,43±0 ,29	1618+/-498	5±2	3	0	--

Média ± SEM (Controle machos hemofílicos, n=5; fêmeas hemofílicas, n=3)

[00299] Os resultados globais mostram o potencial hemostático poderoso do mTF em pacientes saudáveis e mesmo em pacientes hemofílicos, sendo isto demonstrado tanto *in vitro* (plasma e sangue total proveniente de pacientes hemofílicos) quanto de modelos *in vivo* utilizando-se o modelo de camundongo deficiente de gene A com hemofilia. Adicionalmente, o mTF é capaz de coagular plasmas com caminhos intrínsecos e extrínsecos bloqueados.

REIVINDICAÇÕES

1 - Microvesícula derivada de levedura carreadora de fator tissular (TF) com atividade pró-coagulante **caracterizada** por compreender (i) uma membrana de levedura, e (ii) uma proteína de fator tissular (TF) ou uma variante desta com atividade pró-coagulante, em que uma porção da dita proteína de fator tissular (TF) ou um fragmento desta com atividade pró-coagulante é integrada na dita membrana, em que a dita membrana é obtida por um processo que compreende:

a) submeter uma cultura de células de levedura recombinantes que expressam proteína TF ou um fragmento desta com atividade pró-coagulante à fermentação sob condições que permitem a expressão da dita proteína TF ou fragmento desta com atividade pró-coagulante;

b) peletizar o produto resultante da fermentação da etapa a) para obter um produto de fermentação;

c) submeter o dito produto de fermentação proveniente da etapa b) à homogeneização para obter um homogeneizado de fermentação; e

d) submeter o dito homogeneizado de fermentação da etapa c) à separação para obter um pellet e um extrato de levedura clarificado (CYE) contendo a dita microvesícula derivada de levedura carreadora de TF com atividade pró-coagulante;

e) coletar o dito extrato de levedura

clarificado (CYE) contendo a dita microvesícula derivada de levedura carreadora de TF com atividade pró-coagulante; e

f) isolar ou purificar as ditas microvesículas derivada de levedura carreadora de TF com atividade pró-coagulante.

2 - Microvesícula derivada de levedura, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a dita proteína de fator TF ou uma variante desta com atividade pró-coagulante é glicosilada.

3 - Microvesícula derivada de levedura, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que a dita proteína de fator TF ou uma variante desta com atividade pró-coagulante é um elemento de uma proteína de fusão, a dita proteína de fusão contendo uma primeira região que compreende a proteína TF ou um fragmento desta com atividade pró-coagulante ligada a uma segunda região que compreende outro peptídeo ou proteína.

4 - Microvesícula derivada de levedura, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada** pelo fato de que a dita proteína de fusão compreende uma proteína TF ou uma variante desta com atividade pró-coagulante e um marcador.

5 - Microvesícula derivada de levedura, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada** pelo fato de que o dito marcador é um marcador de histidina (His-tag).

6 - Microvesícula derivada de levedura, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizada** por compreender uma proteína TF madura, preferivelmente, uma proteína TF madura humana.

7 - Microvesícula derivada de levedura, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizada** por compreender uma proteína TF truncada com atividade pró-coagulante, em que todo ou parte do domínio responsável pela ligação a FVIIa (aa 32 a 174) está ausente.

8 - Microvesícula derivada de levedura, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada** pelo fato de que a dita proteína TF truncada compreende o domínio de interação para o Fator X, a região transmembrana e a cauda citoplasmática e carece, parcialmente ou totalmente, do domínio responsável pela ligação a FVIIa.

9 - Microvesícula derivada de levedura, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que a dita proteína truncada TF compreende o domínio de interação para o Fator X (aa 174-251), a região transmembrana (aa 252-274) e a cauda citoplasmática (aa 275-295) do TF humano e um marcador de histidina extra.

10 - Microvesícula derivada de levedura, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizada** pelo fato de que o TF contém pelo menos um sítio de N-glicosilação não funcional.

11 - Microvesícula derivada de levedura, de

acordo com a reivindicação 10, **caracterizada** pelo fato de que o dito sítio ou sítios de N-glicosilação não funcional(is) são aqueles correspondentes aos sítios de N-glicosilação NLT nas posições 11-13, NVT nas posições 124-126 ou NNT nas posições 137-139 na rTF humana madura.

12 - Microvesícula derivada de levedura, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizada** pelo fato de que o TF transporta uma ou mais mutações Asn-a-Ala nos resíduos Asn em posições correspondentes às posições 11, 124 ou 137 no TF humano maduro.

13 - Microvesícula derivada de levedura, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, **caracterizada** pelo fato de que o domínio N-terminal da dita proteína TF ou uma variante desta com atividade pró-coagulante fica voltado para o lado exoplasmático da dita membrana.

14 - Microvesícula derivada de levedura, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, **caracterizada** pelo fato de que o domínio N-terminal da dita proteína TF ou variante desta com atividade pró-coagulante fica voltado para o lado endoplasmático da dita membrana.

15 - Microvesícula derivada de levedura, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a dita purificação é realizada através de purificação por marcadores ou cromatografia por imunoafinidade.

16 – Composição **caracterizada** por compreender uma microvesícula derivada de levedura carreadora de TF, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 15.

17 – Microvesícula derivada de levedura carreadora de TF, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, **caracterizada** por ser para uso como um medicamento.

18 - Composição farmacêutica **caracterizada** por compreender uma microvesícula derivada de levedura carreadora de TF, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 15, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

19 - Microvesícula derivada de levedura carreadora de TF, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, **caracterizada** por ser para uso no tratamento de hemorragias em um paciente.

20 - Microvesícula derivada de levedura carreadora de TF, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizada** por ser para uso no tratamento tópico de hemorragias em um paciente.

21 - Microvesícula derivada de levedura carreadora de TF, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, **caracterizada** por ser para uso no tratamento de uma doença que requer promover migração celular e/ou angiogênese em um paciente, em que a dita doença é selecionada a partir de isquemia miocárdica, infarto do miocárdio, cardiomiopatia

isquêmica, claudicação isquêmica crônica de membros, dor em repouso/ulcera isquêmica/gangrena, acidente vascular cerebral isquêmico/neuropatia, penumbra isquêmica ao redor de acidente vascular cerebral/infarto, placa aterosclerótica instável/ulcerada em artérias coronárias/carótidas, trombose arterial e/ou venosa aguda ou crônica, cicatrização de feridas, acidente vascular cerebral isquêmico e hemorrágico, lesão traumática e úlceras.

22 - Microvesícula derivada de levedura carreadora de TF, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizada** pelo fato de que a lesão é selecionada a partir de lesões na córnea; danos; abrasões; incisões cirúrgicas; local doador de enxerto; lesão em um lúmen corporal como um vaso sanguíneo, artéria, artéria coronária, veia, lúmen esofágico e uretra; lesões causadas por agentes infecciosos; lesões de pele e superfície epitelial causadas por uma condição inflamatória persistente ou infecção; lesões de pele e da superfície epitelial causadas por um defeito genético, como formação de queloides e anormalidades na coagulação.

23 - Microvesícula derivada de levedura carreadora de TF, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizada** pelo fato de que a úlcera é selecionada dentre úlceras nas pernas, escaras, úlcera venosa crônica, úlcera diabética, úlcera por compressão, úlceras por pressão e úlceras ou feridas na superfície

de mucosas.

24 – Processo para a fabricação de uma microvesícula derivada de levedura carreadora de TF com atividade pró-coagulante que compreende (i) uma membrana de levedura, e (ii) uma proteína de fator tissular (TF) ou uma variante desta com atividade pró-coagulante, em que uma porção da dita proteína de fator tissular (TF) ou um fragmento desta com atividade pró-coagulante é integrada na dita membrana, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

a) submeter uma cultura de células de levedura recombinantes que expressam proteína TF ou um fragmento desta com atividade pró-coagulante à fermentação sob condições que permitem a expressão da dita proteína TF ou fragmento desta com atividade pró-coagulante;

b) peletizar o produto resultante da fermentação da etapa a) para fornecer um produto de fermentação;

c) submeter o dito produto de fermentação proveniente da etapa b) à homogeneização para obter-se um homogeneizado de fermentação; e

d) submeter o dito homogeneizado de fermentação proveniente da etapa c) à separação para obter-se um pellet e um extrato de levedura clarificado (CYE) que contém a dita microvesícula derivada de levedura carreadora de TF com atividade pró-coagulante;

e) coletar o dito extrato de levedura clarificado (CYE) que contém a dita microvesícula derivada de levedura carreadora de TF com atividade pró-coagulante; e,

f) isolar ou purificar as ditas microvesículas derivadas de levedura carreadora de TF com atividade pró-coagulante. 25 - Processo, de acordo com a reivindicação 24, **caracterizado** pelo fato de que a dita purificação é realizada através de purificação por marcador ou cromatografia por imunoafinidade.

26 - Processo para a preparação de microvesículas que compreendem uma proteína de membrana de interesse, em que a proteína de interesse é rTF, um fragmento desta ou um mutante da N-glicosilação desta, a partir de uma célula de levedura **caracterizado** pelo fato de que compreende as etapas de:

a) cultivar uma cultura da dita célula de levedura sob condições que permitem a expressão da dita proteína de membrana de interesse;

b) submeter a fração de célula da cultura de a) à homogeneização;

c) submeter o homogeneizado obtido a partir da etapa b) à separação para obter-se um pellet e um extrato de célula clarificado que contém as ditas microvesículas derivadas de células que contêm a proteína de membrana de interesse;

d) purificar as ditas microvesículas derivadas de células por partição de tamanho usando filtração de fluxo tangencial e/ou usando filtros de membrana que retêm microvesículas com um diâmetro de 0,11 a 0,2 µm.

27 - Processo, de acordo com a reivindicação

26, **caracterizado** por compreender uma etapa adicional de concentração por cromatografia de exclusão de tamanho ou uma etapa de purificação adicional por cromatografia de afinidade utilizando-se um ligante que apresenta afinidade pela proteína de membrana de interesse.

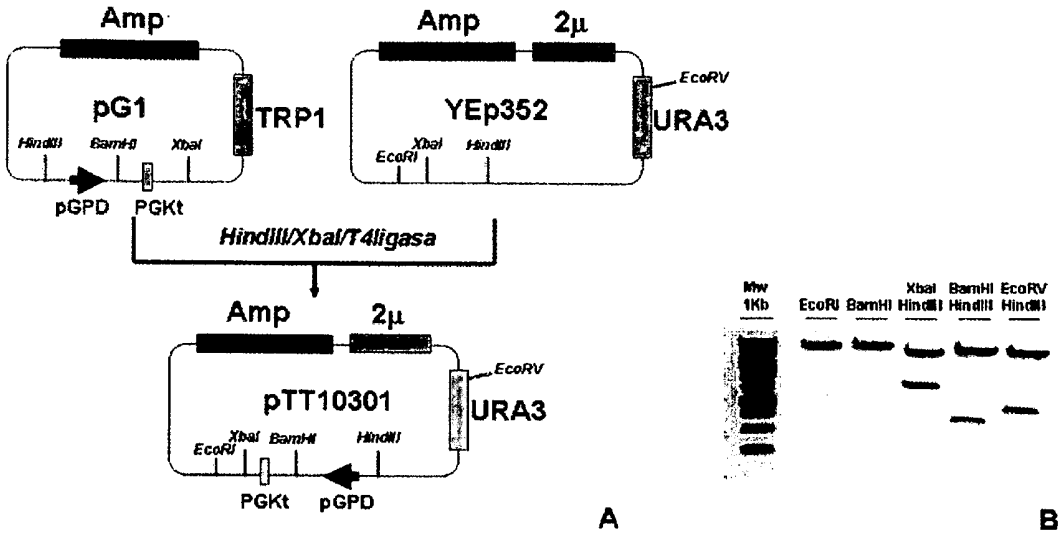

Amp
pG1
TRP1
HindIII
BamHI
XbaI
pGPD
PGKt
Amp
2µ
YEp352
EcoRV
URA3
EcoRI
XbaI
HindIII
HindIII/XbaI/T4ligasa
Amp
2µ
pTT10301
EcoRV
URA3
EcoRI
XbaI
BamHI
HindIII
PGKt
pGPD
A
Mw 1Kb
EcoRI
BamHI
XbaI HindIII
BamHI HindIII
EcoRV HindIII
B

Fig. 1

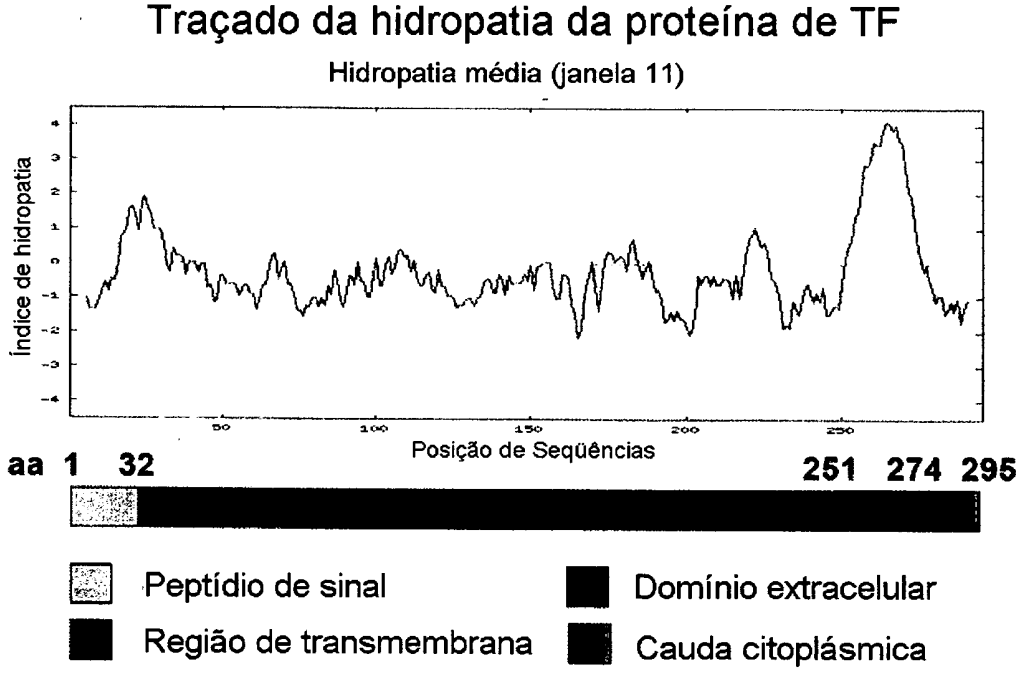

Traçado da hidropatia da proteína de TF
Hidropatia média (janela 11)
Índice de hidropatia
Posição de Seqüências
aa 1
32
251
274
295
Peptídio de sinal
Região de transmembrana
Domínio extracelular
Cauda citoplásmica

Fig. 2

cDNA de TF Humano GenBank # BC011029

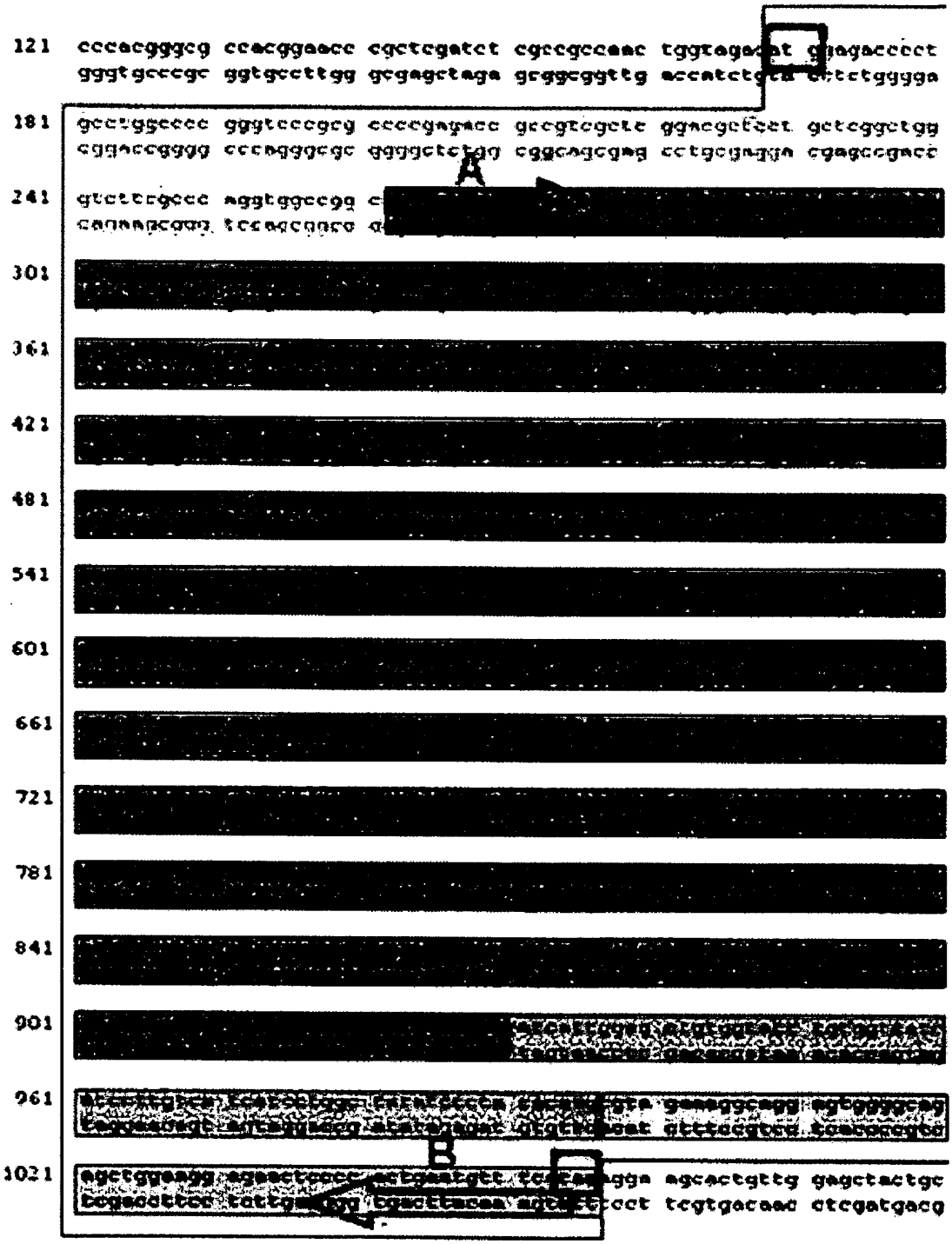


Fig. 3

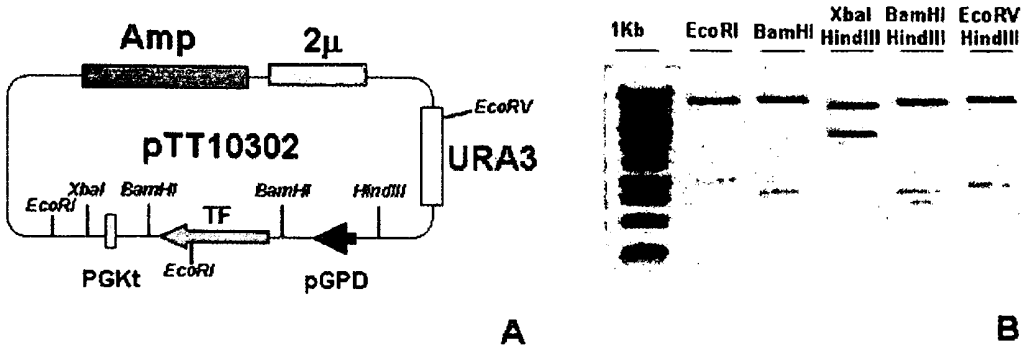

Amp
2µ
pTT10302
URA3
EcoRV
XbaI
BamHI
EcoRI
TF
BamHI
HindIII
PGKt
EcoRI
pGPD
A
1Kb
EcoRI
BamHI
XbaI HindIII
BamHI HindIII
EcoRV HindIII
B

Fig. 4

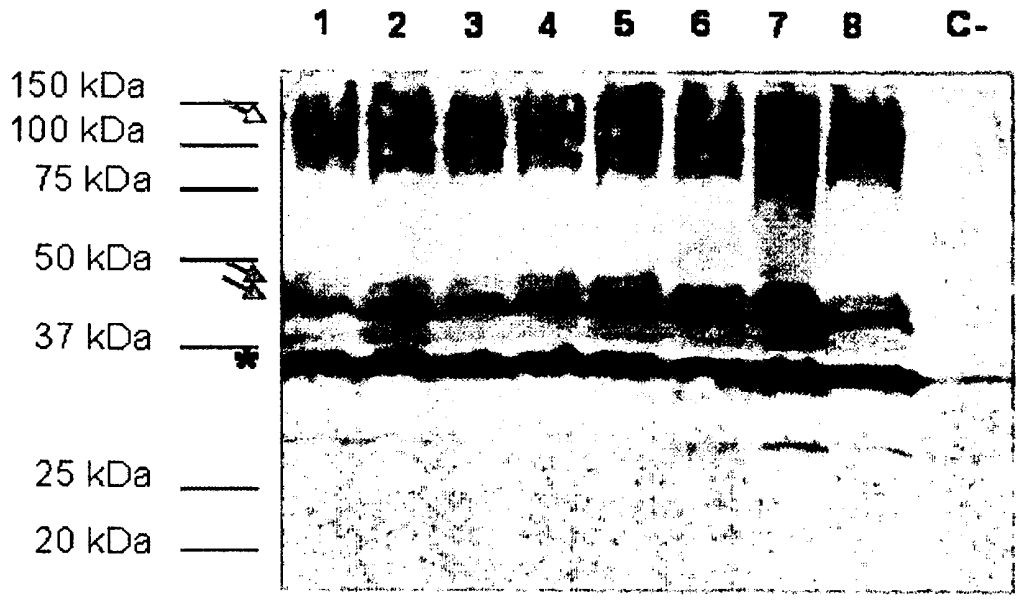

1
2
3
4
5
6
7
8
C-
150 kDa
100 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa
25 kDa
20 kDa

Fig. 5

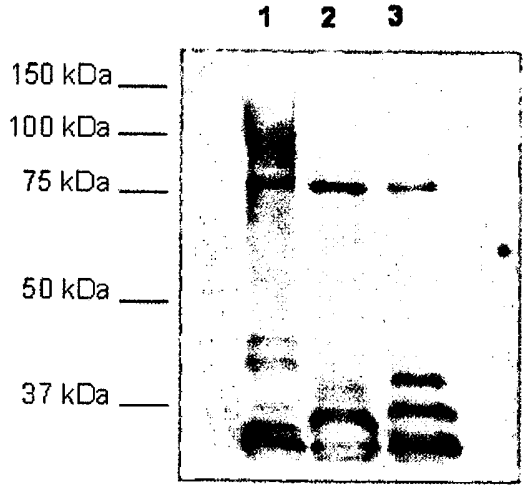

1
2
3
150 kDa
100 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa

Fig. 6

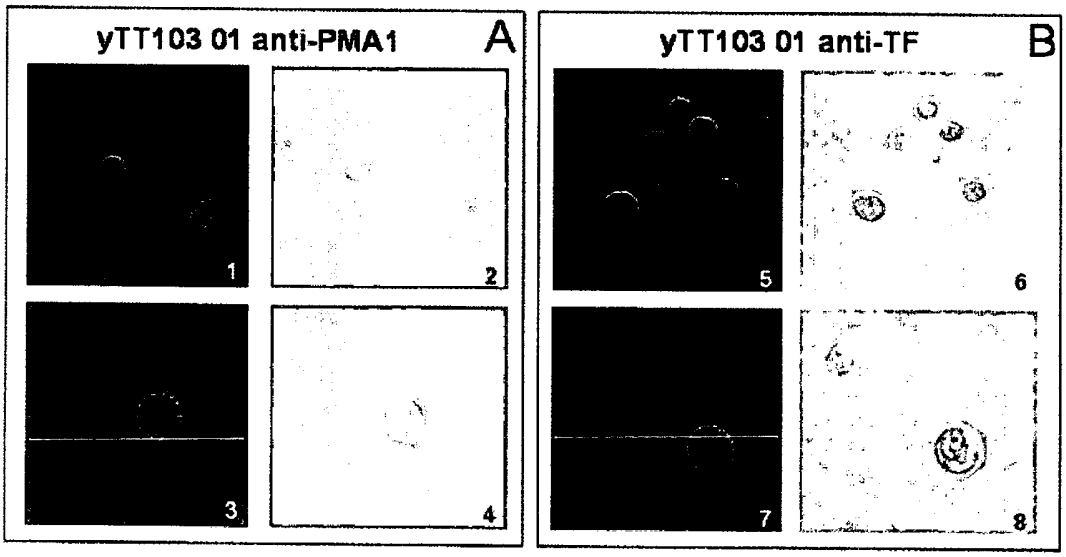

yTT103 01 anti-PMA1
A
yTT103 01 anti-TF
B
1
2
3
4
5
6
7
8

Fig. 7

10

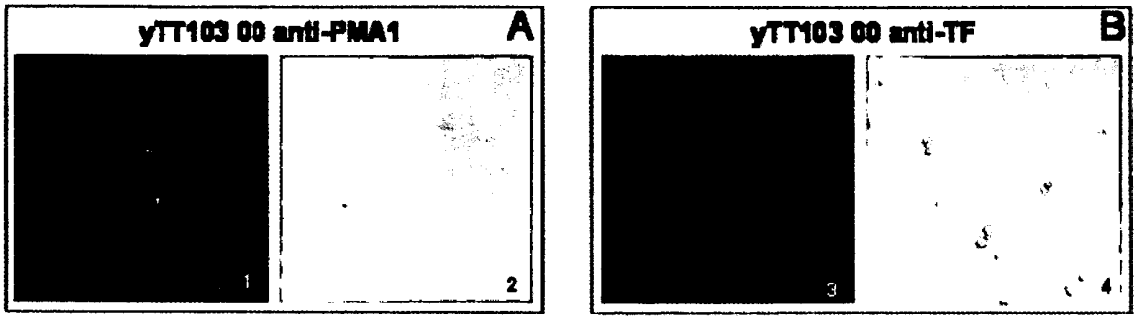

yTT103 00 anti-PMA1
A
1
2
yTT103 00 anti-TF
B
3
4

Fig. 8

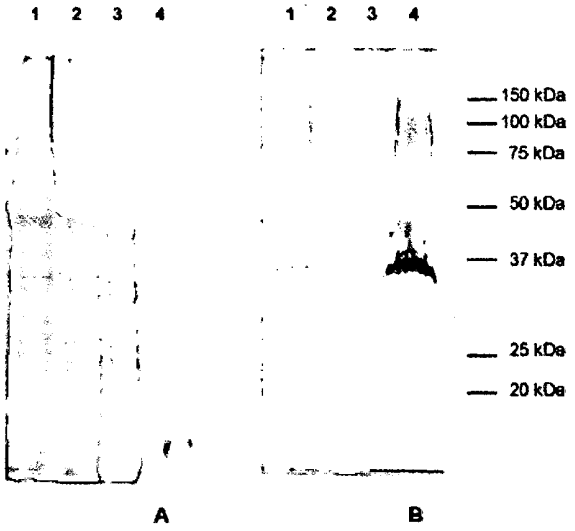

1 2 3 4
1 2 3 4
150 kDa
100 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa
25 kDa
20 kDa
A
B

Fig. 9

15

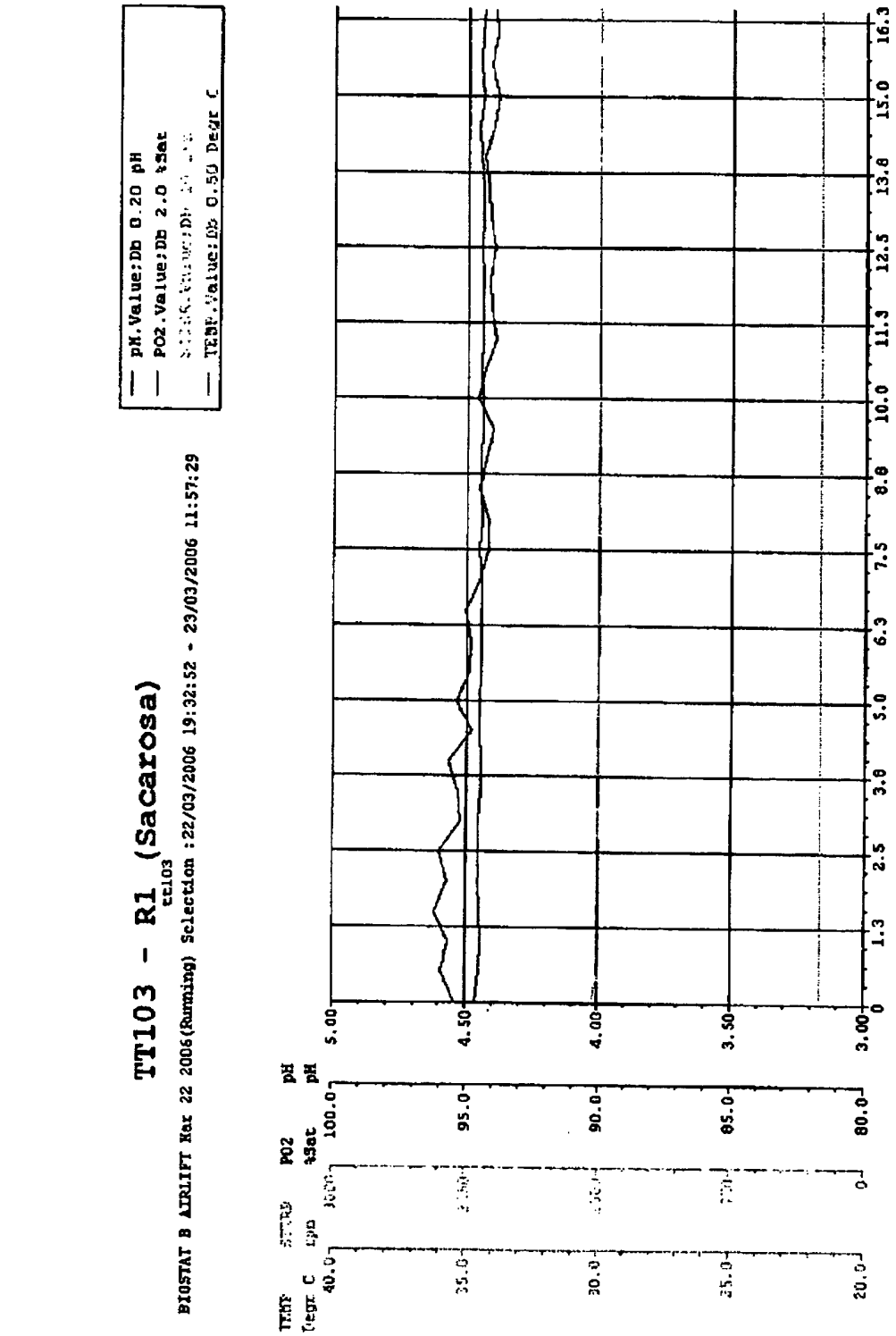

TT103 - R1 (Sacarosa)
tt103
BIOSTAT B AIRLIFT Mar 22 2006(Running) Selection :22/03/2006 19:32:52 - 23/03/2006 11:57:29
pH.Value:DB 0.20 pH
PO2.Value:DB 2.0 %Sat
TEMP.Value:DB 0.50 Degr C
TEMP Degr C
PO2 %Sat
pH
Batch Age [hours][GMT+1]

Fig. 10

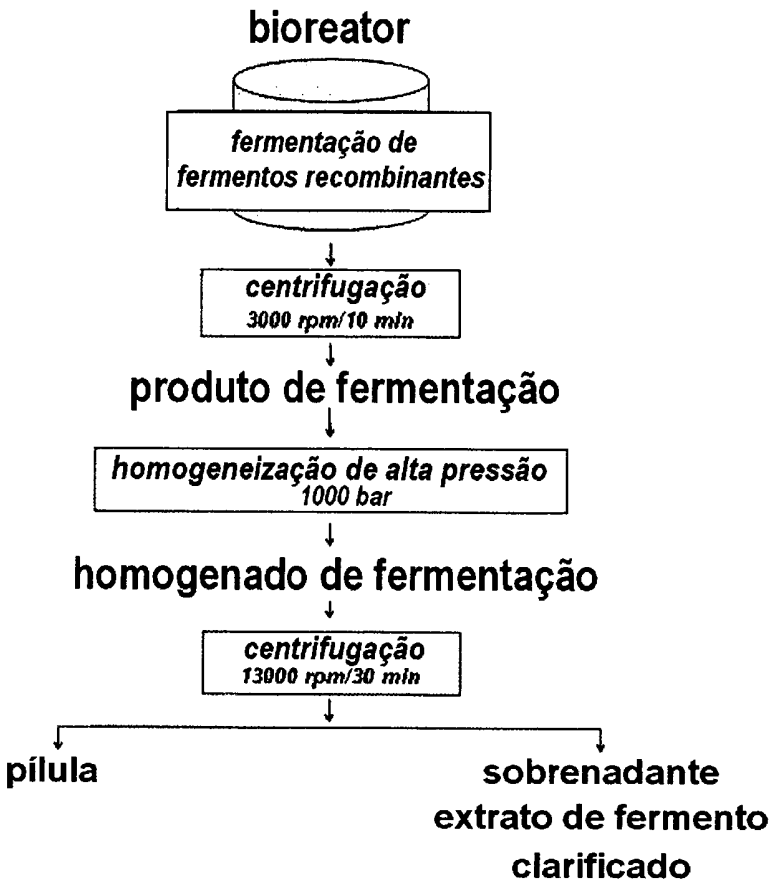

bioreator
fermentação de fermentos recombinantes
centrifugação 3000 rpm/10 min
produto de fermentação
homogeneização de alta pressão 1000 bar
homogenado de fermentação
centrifugação 13000 rpm/30 min
pílula
sobrenadante extrato de fermento clarificado

Fig. 11

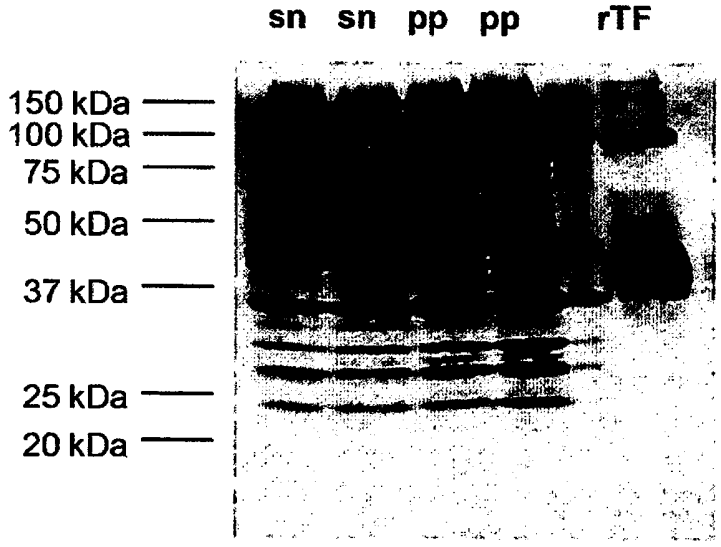
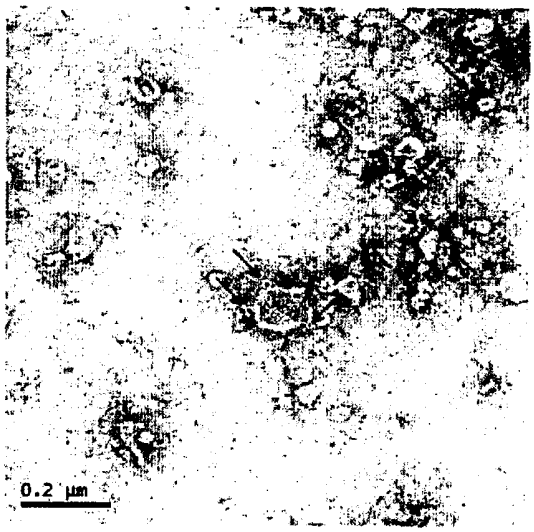

sn
sn
pp
pp
rTF
150 kDa
100 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa
25 kDa
20 kDa

Fig. 12



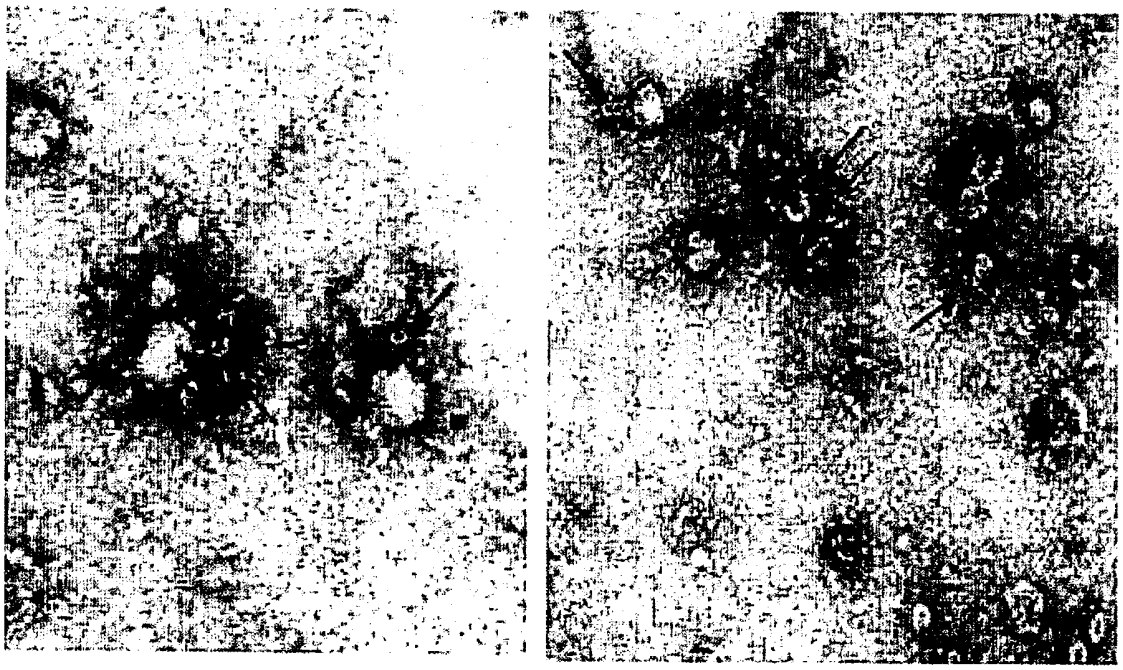


Fig. 13

20

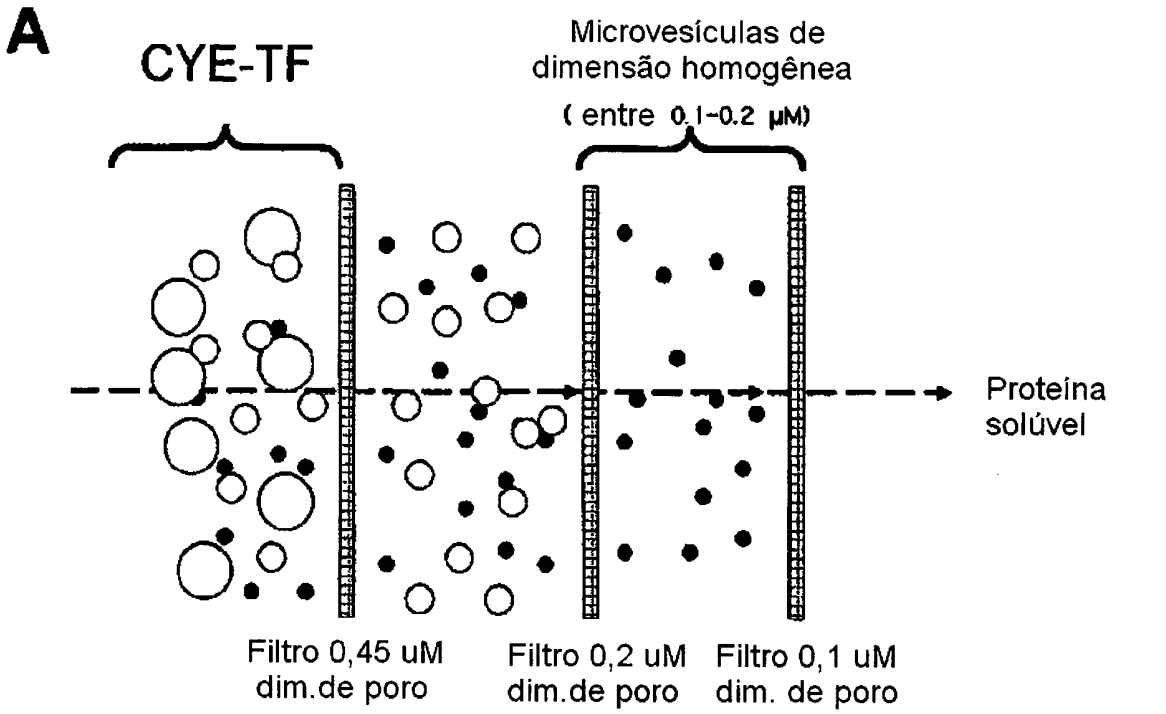

A
CYE-TF
Microvesículas de
dimensão homogênea
(entre 0,1-0.2 µM)
Proteína
solúvel
Filtro 0,45 uM
dim.de poro
Filtro 0,2 uM
dim.de poro
Filtro 0,1 uM
dim. de poro
B
0.45 µM Retenção
0.1 µM Retenção
0.1 µM Permeação

Fig. 14

25

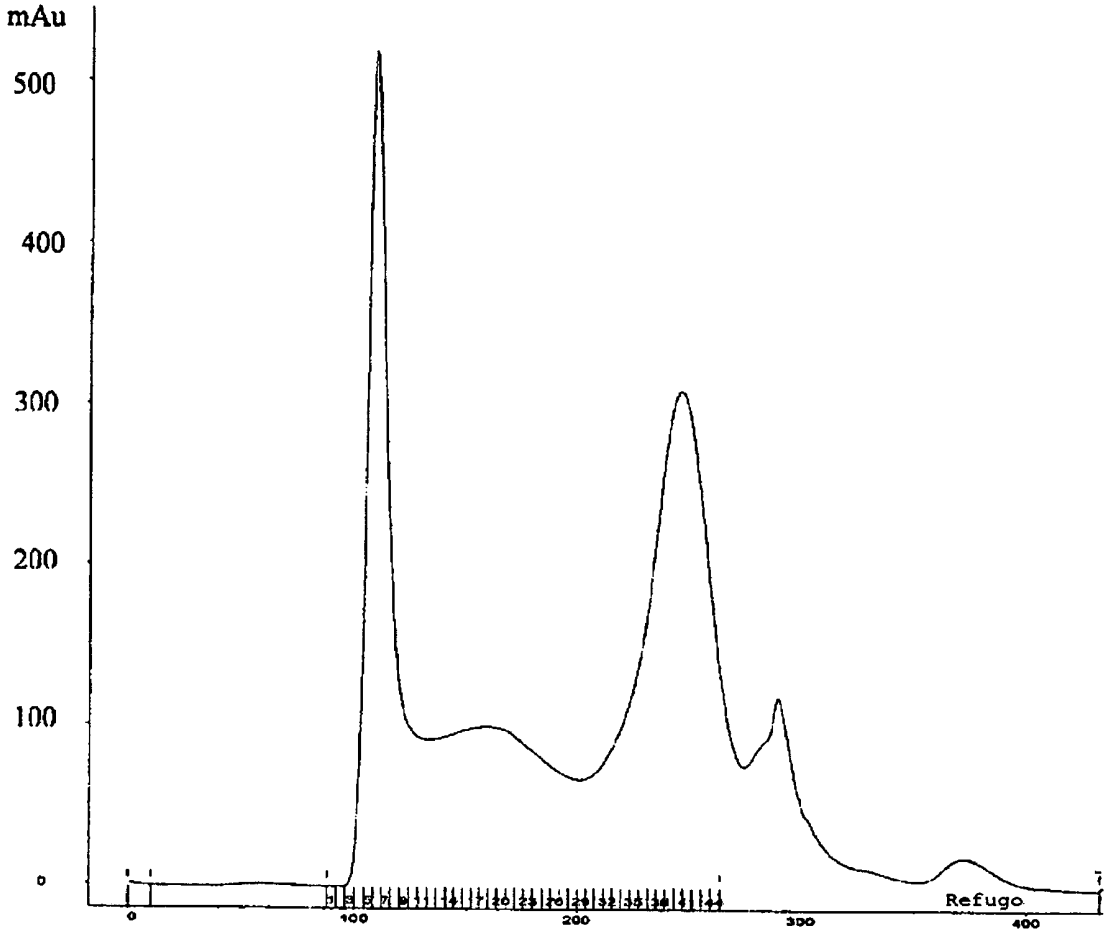


Fig. 15

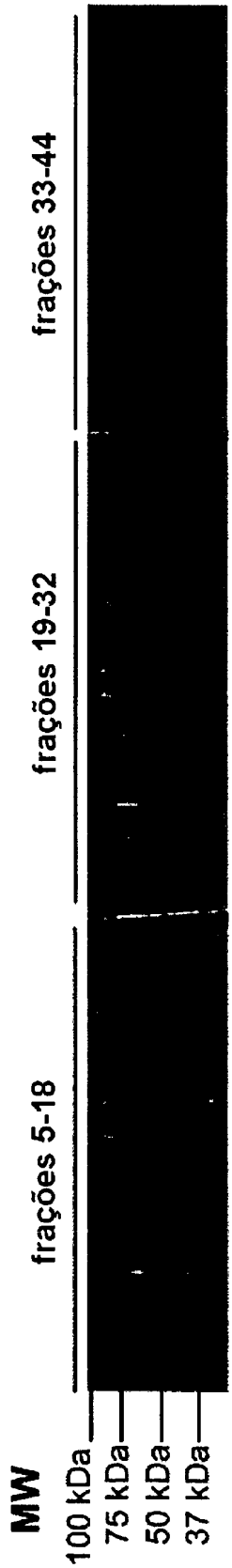
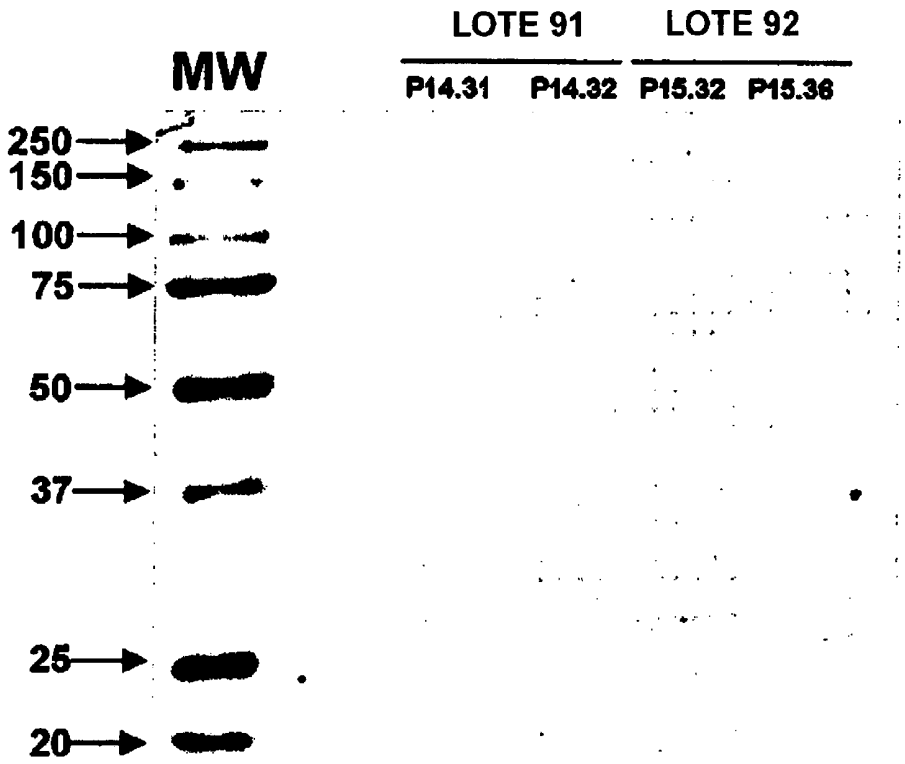
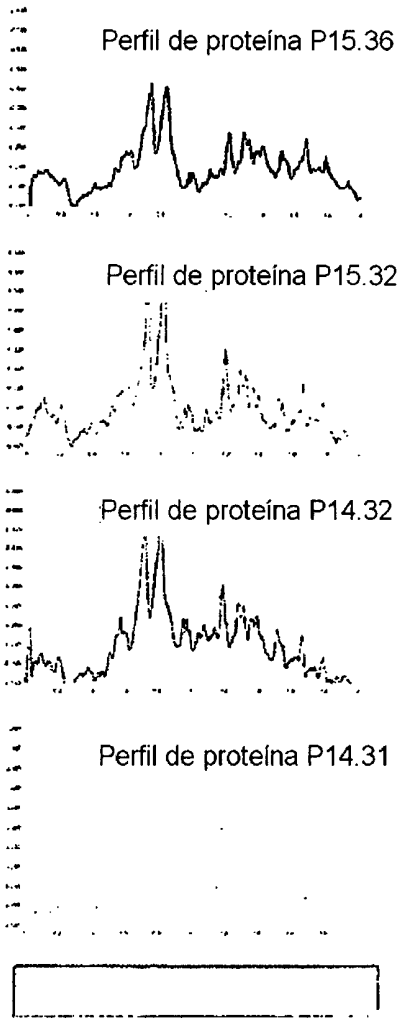

MW
100 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa
frações 5-18
frações 19-32
frações 33-44

Fig. 16

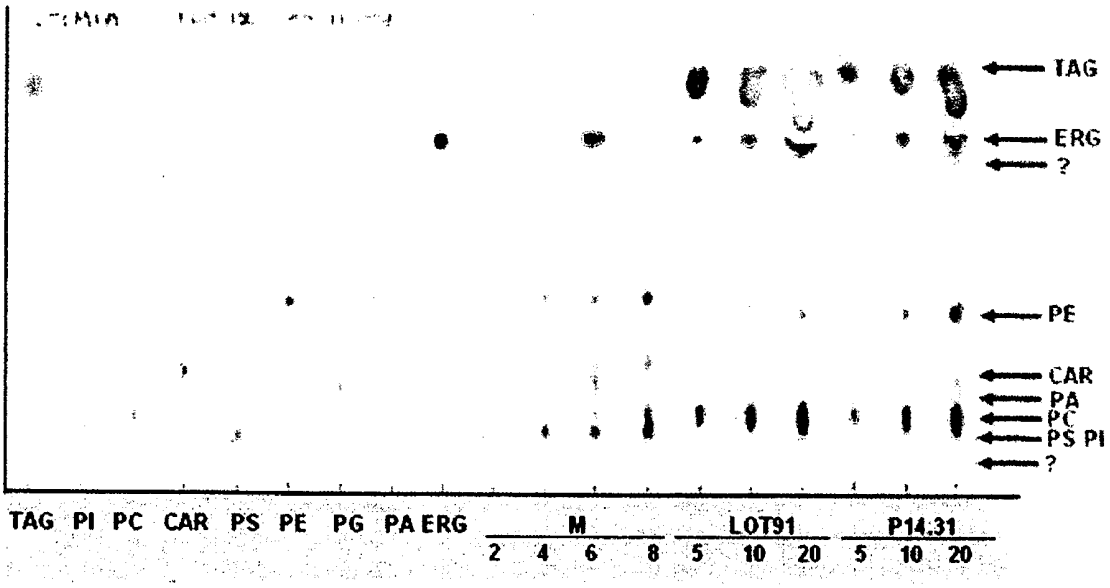

LOTE 91
LOTE 92
MW
P14.31
P14.32
P15.32
P15.36
250
150
100
75
50
37
25
20

A


Perfil de proteína P15.36
Perfil de proteína P15.32
Perfil de proteína P14.32
Perfil de proteína P14.31

B

Fig. 17



TAG:Triacilgliceridios
ERG:Ergosterol
PE:Fosfatidiletanolamina
CAR:Cardiolipin
PA:Ácido fosfatídico
PC:Fosfatidilcolina
PS/PI:Fosfatidilserina/Fosfatidilinositol

TLC:Clorofórmio:Metanol:Água (C:M:W.345:133: 21.vvv)

Fig. 18

cDNA de TF Humano GenBank #BC011029

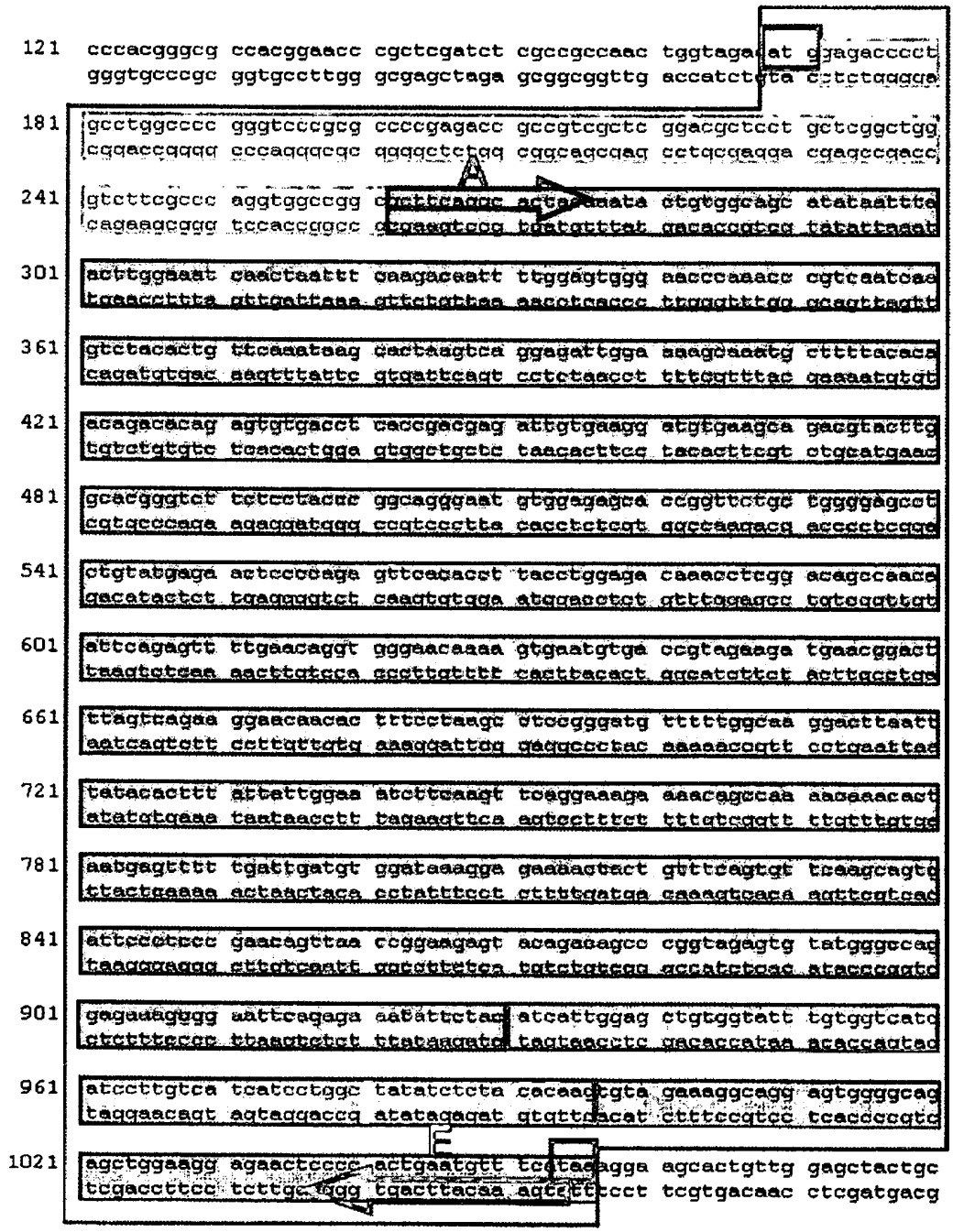


Fig. 19

40

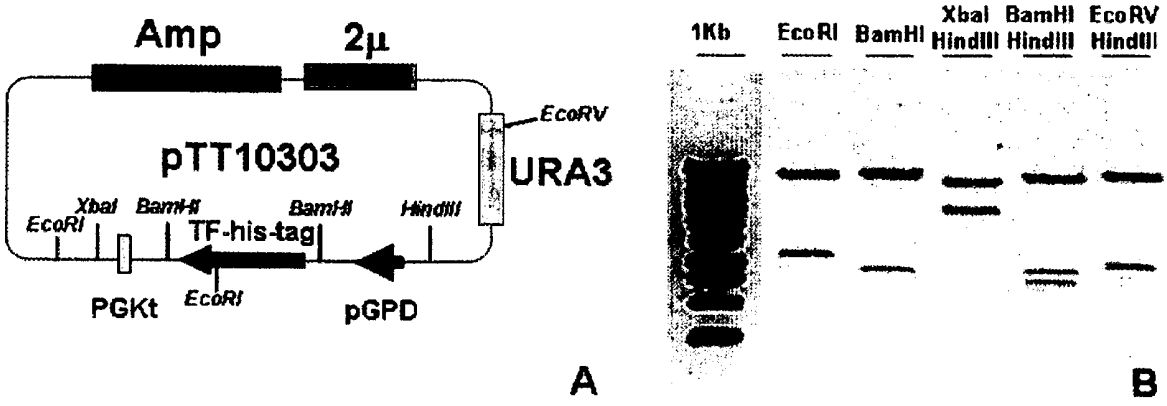

Amp
2μ
pTT10303
URA3
EcoRV
XbaI
BamHI
EcoRI
TF-his-tag
BamHI
HindIII
PGKt
EcoRI
pGPD
A
1Kb
EcoRI
BamHI
XbaI HindIII
BamHI HindIII
EcoRV HindIII
B

Fig. 20

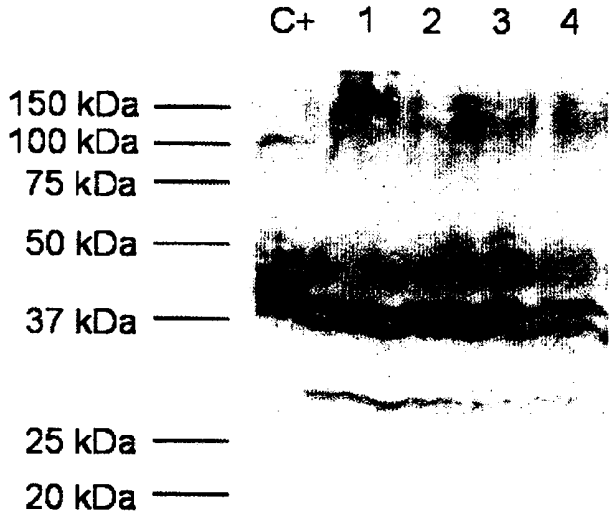

C+ 1 2 3 4
150 kDa
100 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa
25 kDa
20 kDa

Fig. 21

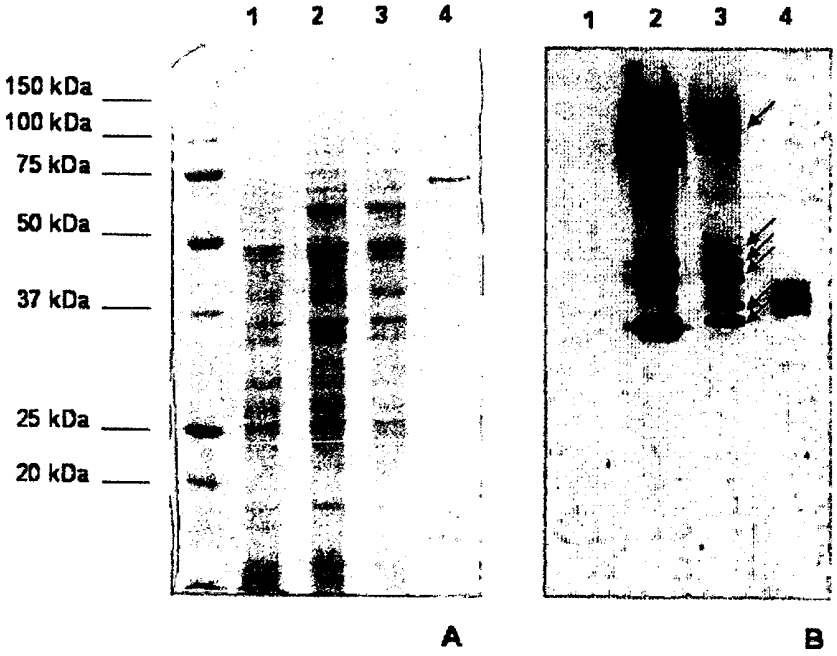

1 2 3 4
150 kDa
100 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa
25 kDa
20 kDa
A
1 2 3 4
B

Fig. 22

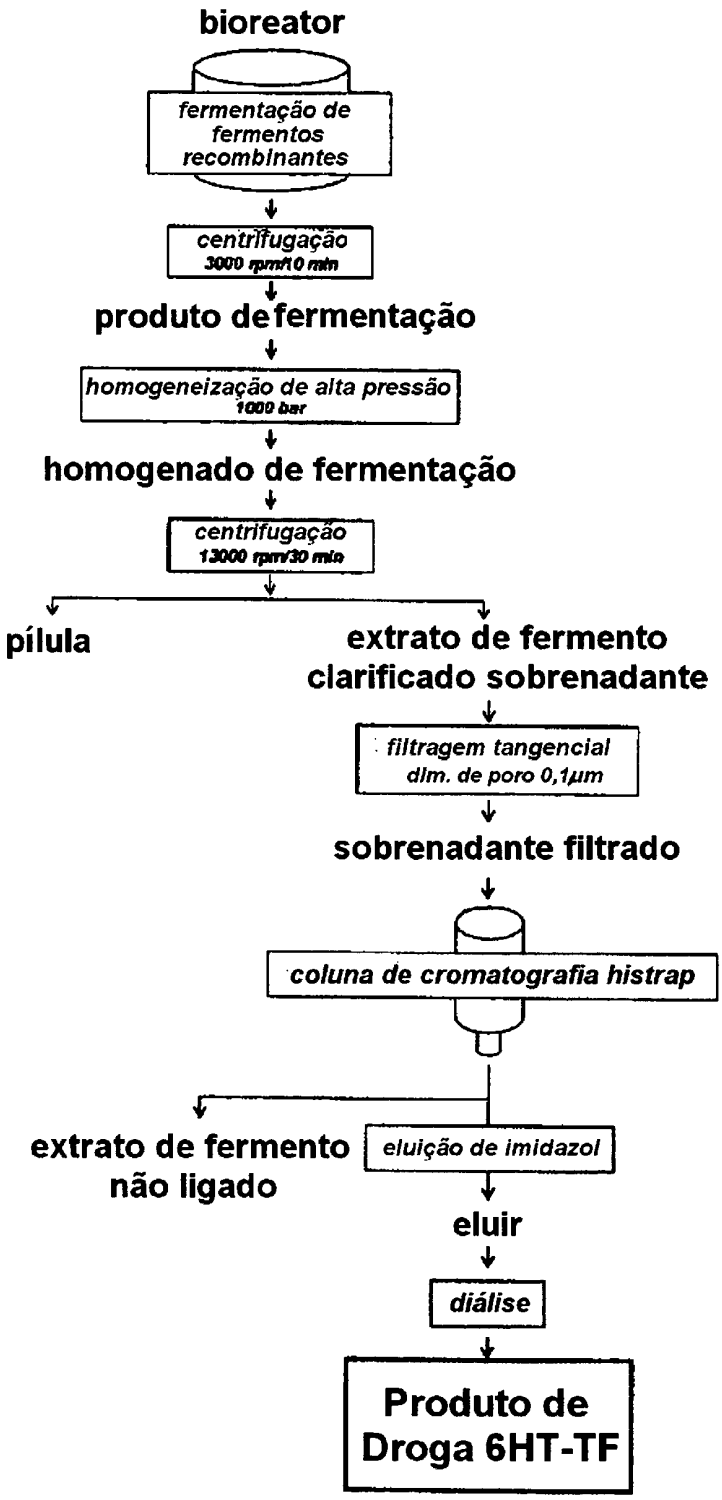

bioreator
fermentação de fermentos recombinantes
centrifugação
3000 rpm/10 min
produto de fermentação
homogeneização de alta pressão
1000 bar
homogenado de fermentação
centrifugação
13000 rpm/30 min
pílula
extrato de fermento clarificado sobrenadante
filtragem tangencial
dim. de poro 0,1µm
sobrenadante filtrado
coluna de cromatografia histrap
extrato de fermento não ligado
eluição de imidazol
eluir
diálise
Produto de Droga 6HT-TF

Fig. 23

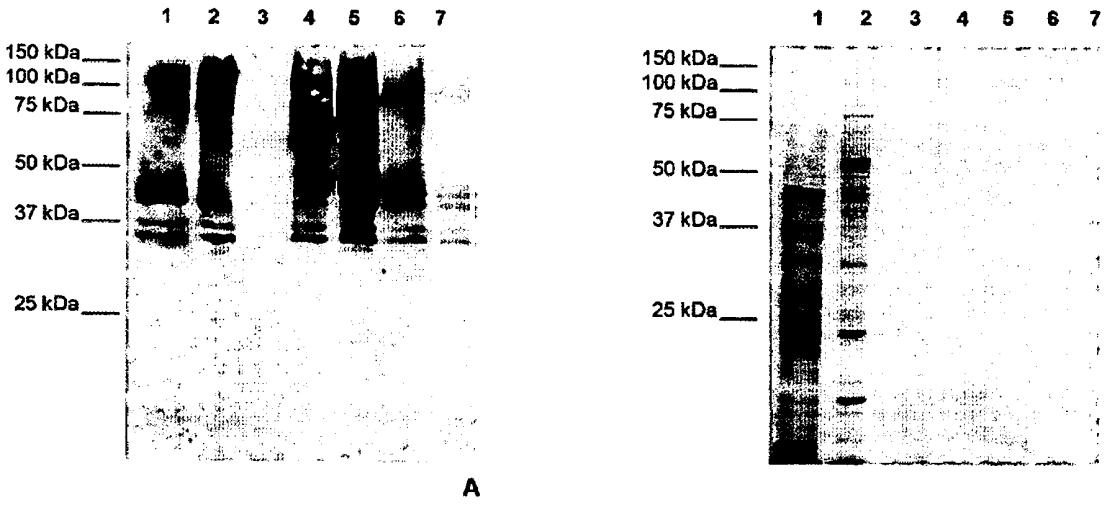

1 2 3 4 5 6 7
150 kDa
100 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa
25 kDa
A
1 2 3 4 5 6 7
150 kDa
100 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa
25 kDa

Fig. 24

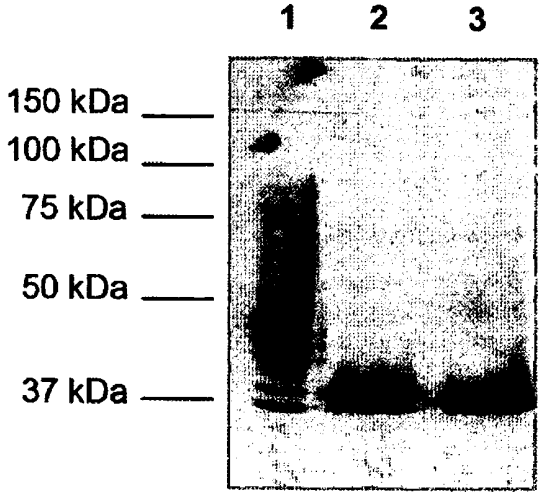

1 2 3
150 kDa
100 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa

Fig. 25

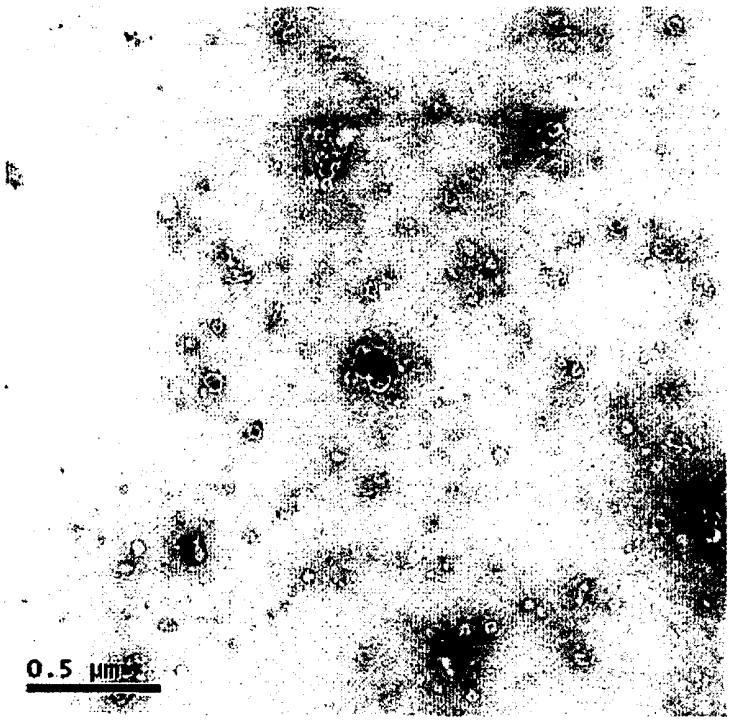


Fig. 26

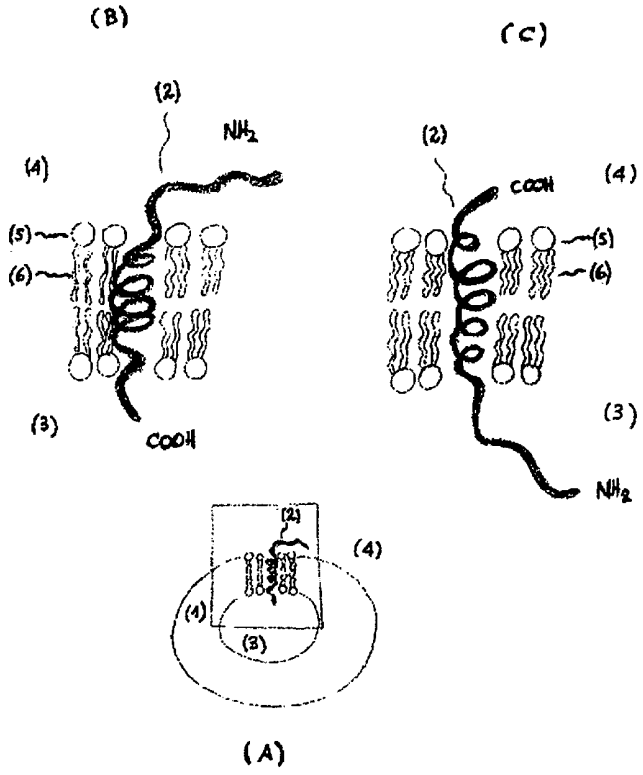


Fig. 27

cDNA de TF humano GeneBank #BC011029

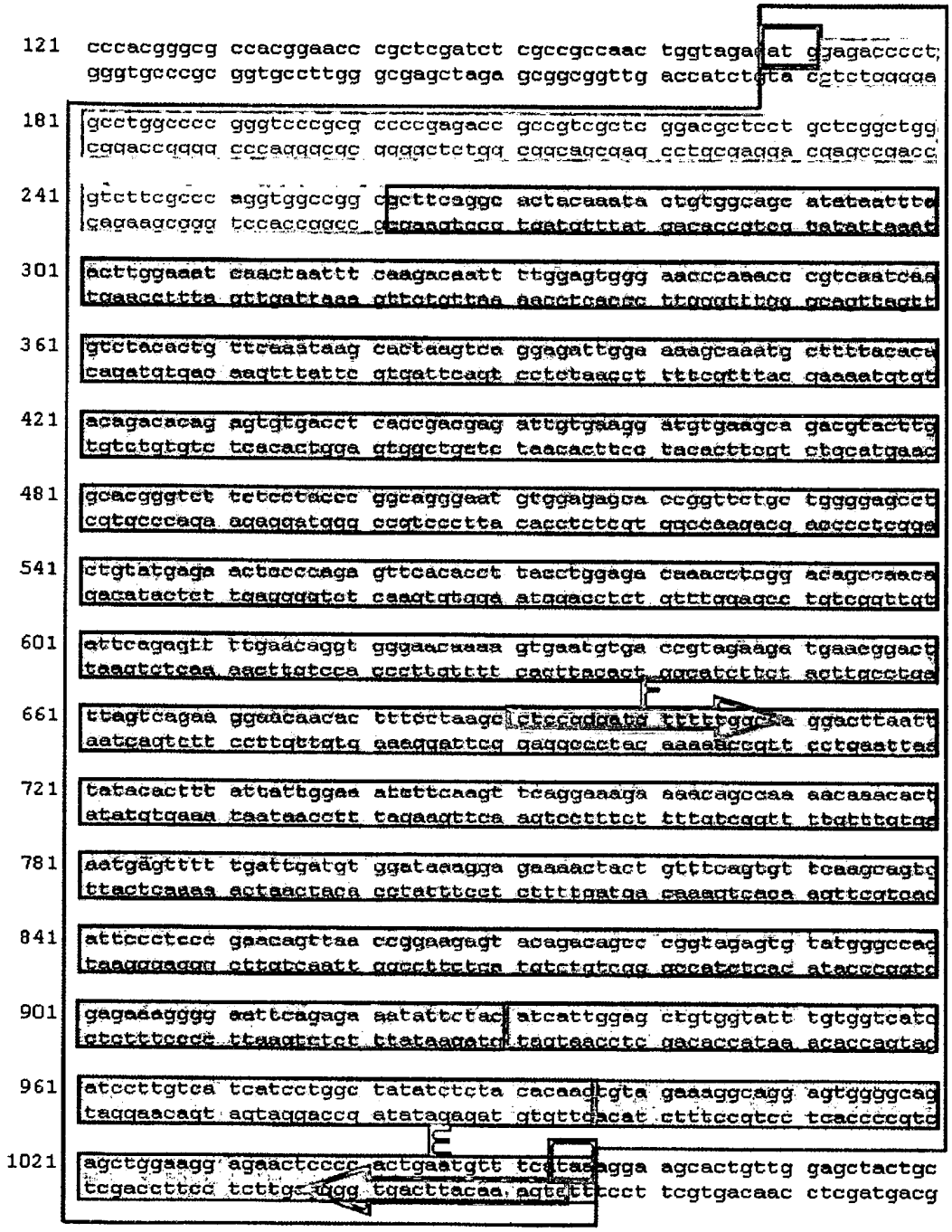
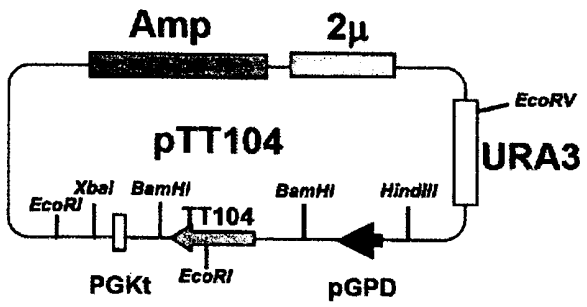


Fig. 28

50


Amp
2µ
pTT104
URA3
EcoRV
EcoRI
XbaI
BamHI
T104
BamHI
HindIII
PGKt
EcoRI
pGPD

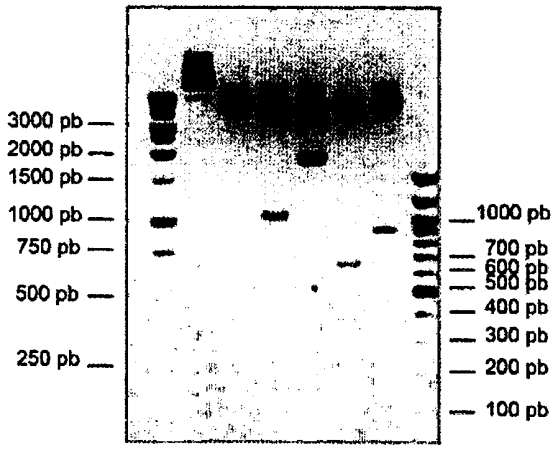

3000 pb
2000 pb
1500 pb
1000 pb
750 pb
500 pb
250 pb
1000 pb
700 pb
600 pb
500 pb
400 pb
300 pb
200 pb
100 pb

Fig. 29

55

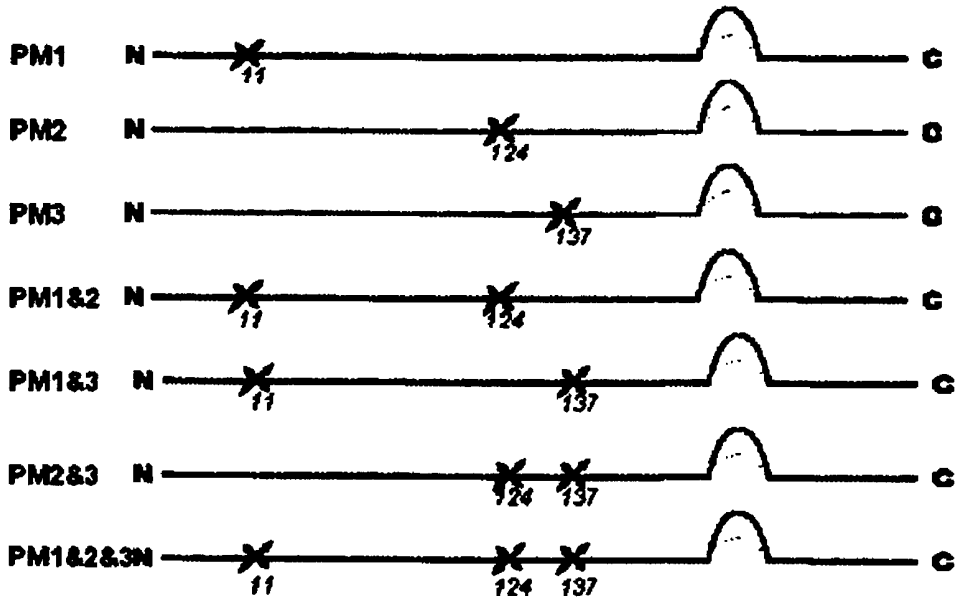

PM1
N
11
C
PM2
N
124
C
PM3
N
137
C
PM1&2
N
11
124
C
PM1&3
N
11
137
C
PM2&3
N
124
137
C
PM1&2&3N
N
11
124
137
C

Fig. 30

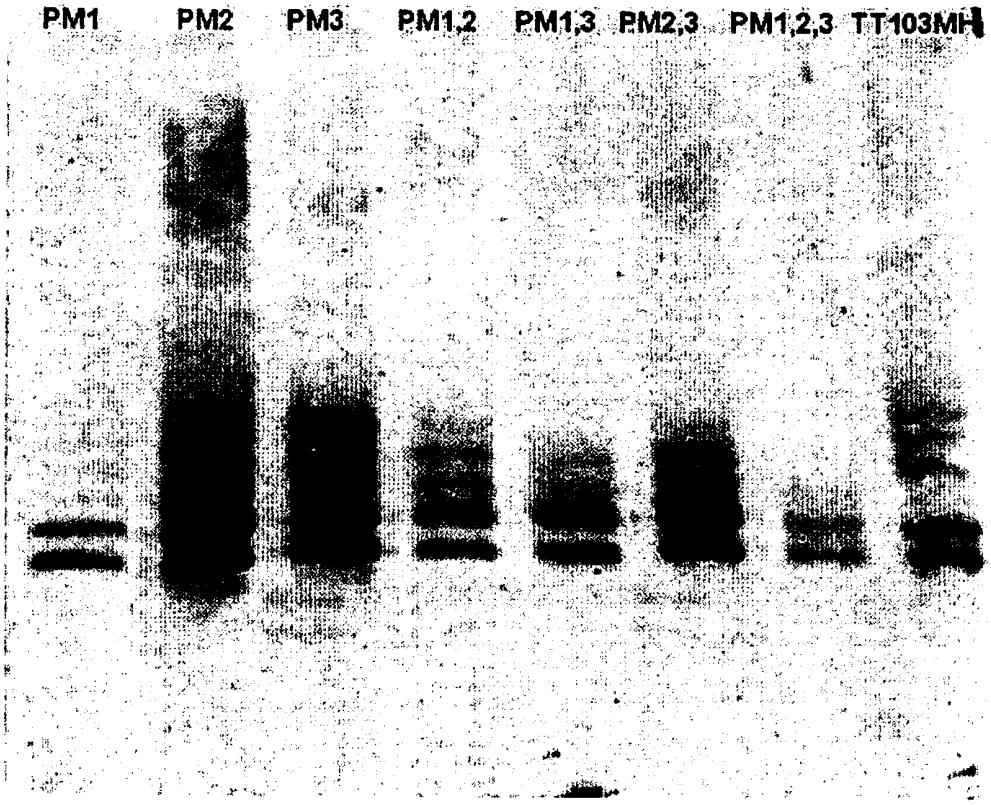


Fig. 31

60

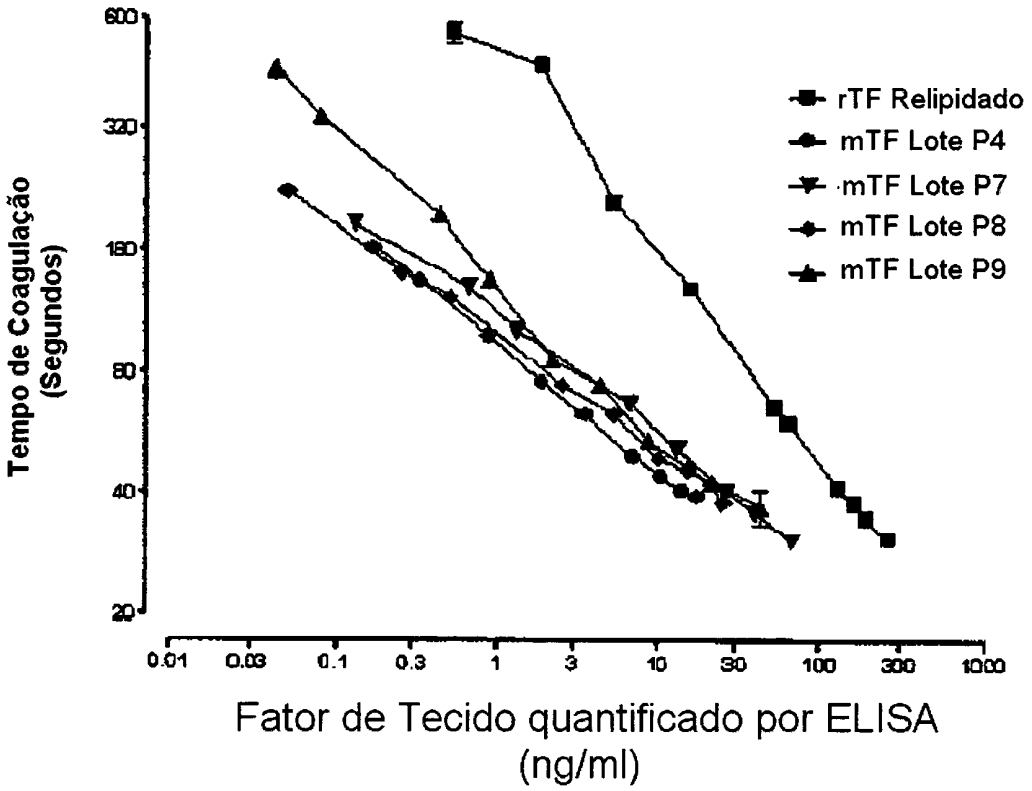
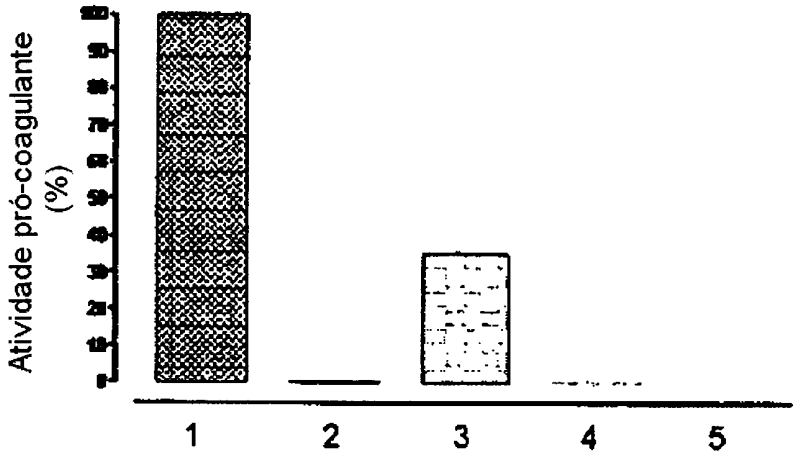

Tempo de Coagulação (Segundos)
600
320
160
80
40
20
0.01
0.03
0.1
0.3
1
3
10
30
100
300
1000
rTF Relipidado
mTF Lote P4
mTF Lote P7
mTF Lote P8
mTF Lote P9
Fator de Tecido quantificado por ELISA (ng/ml)

Fig. 32

65



rTF conjugado em microvesículas de fermento (mTF)(1)
rTF extraído de microvesículas de fermento (mTF) com TritonX-100 e relipidado (3)
rTF extraído de microvesículas de fermento (mTF) com TritonX-100 (2)
Lipossomos Vazios (4)
Microvesículas de Controle (5)

Fig. 33

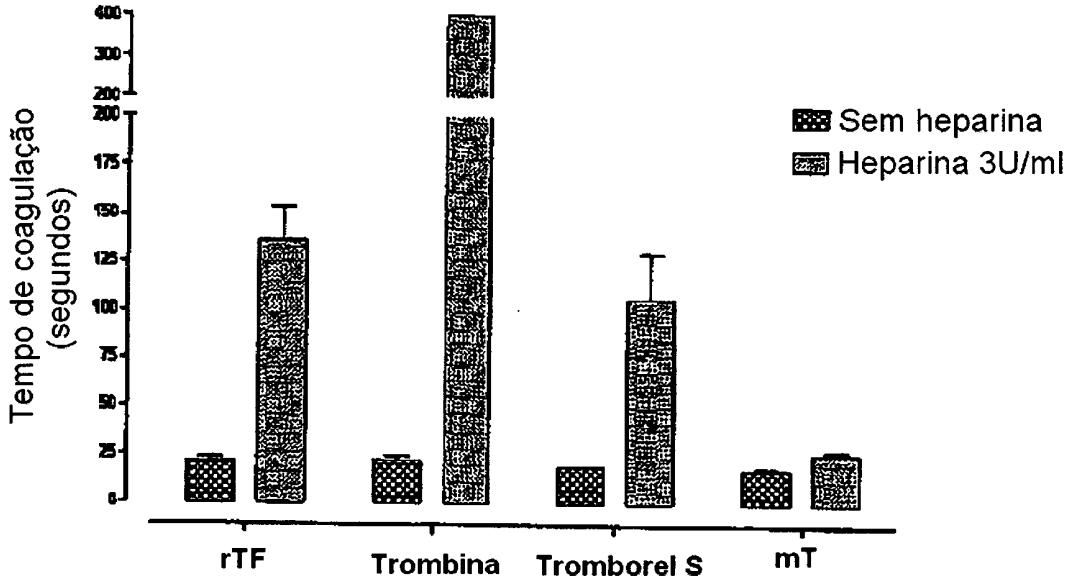

Tempo de coagulação (segundos)
400
300
200
200
175
150
125
100
75
50
25
0
Sem heparina
Heparina 3U/ml
rTF
Trombina
Tromborel S
mT

Fig. 34

70