

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

(51) Classificação Internacional:

A61K 38/00 (2013.01) **C07K 14/00** (2013.01)

C12N 9/00 (2013.01) **C12N 9/66** (2013.01)

A61K 47/48 (2013.01) **A61K 49/00** (2013.01)

C07K 14/81 (2013.01)

(22) Data de pedido: **2004.08.30**

(30) Prioridade(s): **2003.08.29 US 498845 P**
2004.08.04 US 598967 P

(43) Data de publicação do pedido: **2006.06.07**

(45) Data e BPI da concessão: **2013.12.25**
053/2014

(73) Titular(es):

DYAX CORP.

55 NETWORK DRIVE BURLINGTON, MA 01803-2756 **US**

(72) Inventor(es):

ROBERT CHARLES LADNER **US**

ARTHUR C. LEY **US**

AARON K. SATO **US**

MARK STOCHL **US**

(74) Mandatário:

ÁLVARO ALBANO DUARTE CATANA

AVENIDA MARQUÊS DE TOMAR, Nº 44, 6º 1069-229 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **INIBIDORES DE PROTEASES POLI-PEGUILADOS**

(57) Resumo:

SÃO REVELADOS COMPOSTOS QUE COMPREENDEM: (I) UM POLIPÉPTIDO COM UM DOMÍNIO DE KUNITZ QUE COMPREENDE UM DOMÍNIO DE KUNITZ QUE SE LIGA E INIBE UMA PROTEASE, E (II) UMA PLURALIDADE DE FRAÇÕES DE POLIETILENOGLICOL LIGADAS AO POLIPÉPTIDO COM UM DOMÍNIO DE KUNITZ. CADA AMINA PRIMÁRIA ACESSÍVEL DO POLIPÉPTIDO COM UM DOMÍNIO DE KUNITZ PODE SER LIGADA A UMA DAS FRAÇÕES. TAMBÉM SÃO REVELADOS MÉTODOS RELACIONADOS.

RESUMO

"INIBIDORES DE PROTEASES POLI-PEGUILLADOS"

São revelados compostos que compreendem: (i) um polipéptido com um domínio de Kunitz que compreende um domínio de Kunitz que se liga e inibe uma protease, e (ii) uma pluralidade de frações de polietilenoglicol ligadas ao polipéptido com um domínio de Kunitz. Cada amina primária acessível do polipéptido com um domínio de Kunitz pode ser ligada a uma das frações. Também são revelados métodos relacionados.

DESCRIÇÃO

"INIBIDORES DE PROTEASES POLI-PEGUILADOS"

ANTECEDENTES

A invenção refere-se a inibidores de proteases modificados.

SUMÁRIO

Num aspeto, a invenção apresenta um composto que inclui: a) um polipéptido incluindo um domínio de Kunitz que se liga especificamente e/ou inibe uma protease, e b) uma pluralidade de frações polietilenoglicol que estão fisicamente associadas ao polipéptido e aumentam o peso molecular do composto, como definido nas reivindicações. O termo "domínio de Kunitz poli-PEGuilado" refere-se aqui ao composto acima mencionado.

O composto (isto é, o polipéptido mais a pluralidade de frações não proteicas) tem um peso molecular maior do que 12, 14 ou 16 kDa. Numa forma de realização, cada fração não proteica tem um peso molecular médio entre 3 e 12 kDa, 3 e 10 kDa, 3 e 8 kDa, 4 e 6 kDa, por exemplo, cerca de 4, 5, 6, 7 ou 8 kDa.

A protease que é ligada e/ou inibida pode ser, por exemplo, uma elastase (por exemplo, elastase de neutrófilos humanos (hNE)), uma plasmina, uma calicreína ou outra protease, por exemplo, uma protease descrita aqui. Por exemplo, a protease pode ser uma serina protease.

Frações não proteicas são ligadas a cada amina primária disponível no domínio de Kunitz, isto é, a amina primária N-terminal e aminas primárias acessíveis de cadeias laterais de lisina no domínio de Kunitz. Por exemplo, todas as aminas primárias possíveis são conjugadas a uma das frações não proteicas. O domínio de Kunitz pode ter pelo menos três ou quatro lisinas. Por exemplo, o domínio de Kunitz pode ter apenas três, quatro ou cinco lisinas. Numa forma de realização, o polipéptido tem uma amina primária N-terminal. Noutra forma de realização, o polipéptido não inclui uma amina primária N-terminal (por exemplo, o polipéptido pode ser quimicamente modificado, por exemplo, com um composto não polimérico, na sua amina primária N-terminal de modo que o polipéptido não inclui uma amina primária nessa posição).

Uma fração não proteica pode ser ligada a 4 ou mais das aminas primárias do polipéptido. Por exemplo, todas as lisinas ou todas as lisinas que têm uma amina primária acessível ao solvente são ligadas a uma fração não proteica. De preferência, o domínio de Kunitz não inclui uma lisina no interior de uma das suas alças de ligação, por exemplo, cerca dos resíduos correspondentes aos aminoácidos 11-21 de BPTI e 31-42 de BPTI. Lisinas no interior de tais alças de ligação podem ser substituídas, por exemplo, por resíduos arginina. A menos que afirmado em contrário, quando for dito que uma amina primária, por exemplo, a de uma lisina particular ou no terminal N, está modificada ou tem uma fração não proteica a ela ligada, é entendido que a posição da amina primária especificada em cada molécula de uma preparação pode não estar modificada desse modo. Não é necessário que as preparações sejam perfeitamente homogêneas para pertencerem à invenção. A

homogeneidade é desejável nalgumas formas de realização, mas não é necessário que seja absoluta. Em formas de realização preferidas, pelo menos 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99 ou 100 % de uma amina primária que é designada como modificada terão uma fração não proteica a elas ligada. No entanto, outras formas de realização incluem preparações que contêm uma mistura de espécies nas quais a maior parte das moléculas, por exemplo, pelo menos 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99 ou 100 %, estão PEGuiladas em quatro ou mais sítios, mas os sítios (e, nalguns casos, o número de sítios modificados) em moléculas da preparação irão variar. Por exemplo, algumas moléculas terão as lisinas A, B e D modificadas, ao passo que outras moléculas terão o terminal amino e as lisinas A, B, C e D modificadas.

O polímero é polietilenoglicol. O polímero pode ser ramificado ou não ramificado. Por exemplo, a fração de polímero tem um peso molecular (por exemplo, um peso molecular médio das frações adicionadas ao composto) menor do que 12, 10, 8, 7 ou 6 ou pelo menos 1,5, 2, 2,5, 3, 5, 6, 10 kDa, por exemplo, cerca de 5 kDa. Numa forma de realização, a soma dos pesos moleculares das frações de PEG no composto é pelo menos 15, 20, 25, 30 ou 35 e/ou menor do que 60, 50, 40, 35, 30, 25 ou 23 kDa.

Numa forma de realização, o composto tem a estrutura seguinte:



em que P é o polipéptido,
a é pelo menos 4,
m está situado entre 0 e 5,

X^2 é O N- R^1 , S ou está ausente, em que R^1 é H, alquilo ou arilo,

X^0 é O, N- R^2 , S ou está ausente, em que R^2 é H, alquilo ou arilo, e

R^2 é H, C_1 - C_{12} alquilo ou arilo. Por exemplo, X^2 é O e R^1 é CH_3 . (É preferida a utilização de mPEG.)

Numa forma de realização, o peso molecular do polipéptido com um domínio de Kunitz é menor do que 14, 8 ou 7 kDa. Numa forma de realização, o polipéptido com um domínio de Kunitz inclui apenas um domínio de Kunitz. Em geral, o composto inclui apenas um domínio de Kunitz mas, nalgumas formas de realização, pode incluir mais do que um.

O domínio de Kunitz inclui a sequência de aminoácidos de DX-890, DX-88 ou DX-1000 ou uma sequência de aminoácidos que difere em pelo menos uma, mas menos do que seis, cinco, quatro, três ou duas diferenças de aminoácidos (por exemplo, substituições, inserções ou deleções) relativamente à sequência de aminoácidos de DX-890, DX-88 ou DX-1000. Tipicamente, o domínio de Kunitz não ocorre naturalmente em humanos. O domínio de Kunitz pode incluir uma sequência de aminoácidos que difere em menos do que dez, sete ou quatro aminoácidos relativamente a um domínio de Kunitz humano.

Numa forma de realização, o K_i do composto está dentro de um fator de 0,5 até 1,5, 0,8 até 1,2, 0,3 até 3,0, 0,1 até 10,0 ou 0,02 até 50,0 do K_i do polipéptido não modificado para elastase. Por exemplo, o K_i para hNE pode ser menor do que 100, 50, 18, 12, 10 ou 9 pM.

Numa forma de realização, o composto tem uma semivida em circulação do componente de vida mais longa ("semivida em circulação da fase mais longa") num modelo de coelho ou ratinho que é pelo menos 1,5, 2, 4 ou 8 vezes maior do que um composto substancialmente idêntico que não inclui o polímero. O composto pode ter uma semivida em circulação da fase mais longa num modelo de coelho ou ratinho que tem uma amplitude pelo menos 1,5, 2, 2,5 ou 4 vezes maior do que um composto substancialmente idêntico que não inclui a fração não proteica. O composto pode ter uma semivida em circulação de fase alfa num modelo de coelho ou ratinho que tem uma amplitude pelo menos 20, 30, 40 ou 50 % menor do que um composto substancialmente idêntico que não inclui a fração não proteica. Por exemplo, o composto tem uma semivida em circulação da fase mais longa com uma amplitude de pelo menos 40, 45, 46, 50, 53, 54, 60 ou 65 %. Numa forma de realização, o composto tem uma semivida em circulação de fase beta num modelo de ratinho ou coelho de pelo menos 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 horas. Numa forma de realização, o composto tem uma semivida em circulação da fase mais longa num sujeito humano de 70 kg de pelo menos 6 horas, 12 horas, 24 horas, 2 dias, 5 dias, 7 dias ou 10 dias.

Numa forma de realização, o composto tem uma semivida em circulação da fase mais longa num modelo de coelho de pelo menos 4200 minutos, 4700 minutos ou 4980 minutos (ou cerca de 83 horas). Numa forma de realização, o composto tem uma semivida em circulação da fase mais longa que é maior do que a de uma molécula de dimensão semelhante com o mesmo domínio de Kunitz mas apenas uma única fração PEG (isto é, uma versão mono-PEGuilada do mesmo domínio de Kunitz). A semivida da fase mais longa pode ser pelo menos 5, 10, 20,

30 ou 50 % maior. Numa forma de realização, num ratinho, a semivida em circulação da fase mais longa tem uma amplitude maior do que 50, 55, 60 ou 65 %. A semivida da fase mais longa pode ser, por exemplo, maior do que 550, 600, 700, 750, 900, 1000, 1100 minutos.

Numa forma de realização, o composto tem solubilidade aumentada (por exemplo, 1,5, 2, 4 ou 8 vezes maior), numa solução aquosa com um pH situado entre 5 e 8 e uma força iónica menor do que a força iónica de 0,5 M NaCl, relativamente ao polipéptido que não inclui a fração não proteica.

Numa forma de realização, o polietilenoglicol é ligado por acoplamento de monometoxi-PEG-propionaldeído ou ácido monometoxi-PEG-succinimidilpropiónico ao polipéptido. O composto pode ser formado por acoplamento de mPEG ($\text{CH}_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-$) a um pH que permite a ligação a grupos amino acessíveis em cadeias laterais de lisina e ao grupo amino N terminal, por exemplo, um pH 6,8 até 8,8, por exemplo, entre 7,4 e 8,8.

Noutro aspeto, a invenção apresenta um composto que inclui (1) um polipéptido incluindo a sequência de aminoácidos de DX-890, DX-88 ou DX-1000 ou uma sequência de aminoácidos que difere em pelo menos uma, mas menos do que seis, cinco, quatro, três ou duas diferenças de aminoácidos (por exemplo, substituições, inserções ou deleções) relativamente à sequência de aminoácidos de DX-890, DX-88 ou DX-1000, e (2) uma pluralidade de frações de polietilenoglicol, como definido nas reivindicações. O peso molecular de cada fração de polietilenoglicol pode ser menor do que 12, 11, 10, 9, 8, 7 ou 6 kDa, e cada fração é

ligada. Cada fração de polietileno pode ser ligada ao polipéptido por uma ligação covalente simples.

Numa forma de realização, uma molécula de polietilenoglicol é ligada a cada cadeia lateral de lisina do polipéptido, por exemplo, quando o polipéptido inclui três ou quatro lisinas. Numa forma de realização, o peso molecular das moléculas de polietilenoglicol está situado entre 4 e 12 kDa. Numa forma de realização, o polietilenoglicol é ligado ao terminal N e a cada cadeia lateral de lisina acessível.

Numa forma de realização, a sequência de aminoácidos difere em pelo menos um aminoácido relativamente à sequência de aminoácidos do DX-890. A sequência de aminoácidos é idêntica à sequência de aminoácidos do DX-890 em pelo menos dez, doze, treze, catorze, ou todos correspondentes às posições 5, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 30, 31, 32, 34, 38, 39, 51 e 55 de acordo com a numeração de BPTI.

Noutro aspeto, a invenção apresenta uma preparação que compreende polipéptidos com um domínio de Kunitz que se ligam especificamente e inibem uma protease. Pelo menos 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99 ou 99,5 % dos polipéptidos com um domínio de Kunitz presentes na preparação (i) ligam-se e inibem a protease, e (ii) têm uma fração polietilenoglicol ligada a pelo menos quatro amins primárias, em que as referidas amins primárias consistem numa amina primária N-terminal e/ou amins primárias de cadeias laterais de lisina, como definido nas reivindicações. Tipicamente, o peso molecular médio de cada fração de polietilenoglicol ligada é menor do que 12, 10 ou 8 kDa. Por exemplo, a população designada de polipéptidos com um domínio de

Kunitz tem uma fração polietilenoglicol ligada a cada amina primária acessível e/ou uma amina primária N-terminal.

Numa forma de realização, cada um dos polipéptidos com um domínio de Kunitz presentes na preparação liga-se e inibe a protease. Por exemplo, polipéptidos com um domínio de Kunitz que não são membros da população designada também se ligam e inibem uma protease, por exemplo, a mesma protease ou uma protease diferente.

Os polipéptidos com um domínio de Kunitz da população podem incluir, por exemplo, outras características descritas aqui.

A invenção também apresenta uma preparação que inclui um composto descrito aqui, por exemplo, acima. Por exemplo, o composto está presente a uma concentração de pelo menos 0,1, 1,2 ou 5 mg de polipéptido por mililitro, por exemplo, numa solução entre pH 6-8. Numa forma de realização, o composto produz um pico principal por cromatografia de exclusão por tamanho que inclui pelo menos 70 % do composto relativamente ao injetado. Numa forma de realização, o peso molecular de 95 % das espécies do composto está dentro de 5, 4, 3, 2 ou 1 kDa do peso molecular médio do composto.

Noutro aspeto, a preparação farmacêutica pode incluir (1) um composto descrito aqui, e (2) um transportador farmacêuticamente aceitável. Numa forma de realização, pelo menos 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 ou 100 % dos compostos presentes na preparação têm uma distribuição idêntica de moléculas de PEG a eles ligadas. A utilização de uma reação química em que todas as aminas primárias disponíveis (por exemplo, todas as aminas primárias

acessíveis ao solvente, ou todas as amins primárias) são modificadas pode ser utilizada para proporcionar uma preparação na qual os compostos têm uma distribuição idêntica de moléculas de PEG. Obviamente, estará presente alguma variação no peso molecular das frações ligadas a diferentes amins primárias numa dada molécula, ou entre moléculas, pois há uma variação em torno de um peso molecular médio do reagente de PEG utilizado na reação química. A preparação também pode ser produzida utilizando um processo que proporciona um rendimento maior do que 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80 ou 85 % para a proteína de entrada.

Numa forma de realização, a preparação é aquosa e o composto está presente a uma concentração de pelo menos 0,1 mg de polipéptido por mililitro. Numa forma de realização, a injeção da preparação num ratinho faz com que menos do que 50, 30, 25, 15 ou 10 % do composto seja um pico de SEC com maior mobilidade do que a preparação após 12 horas.

A preparação pode ser adequada para administração pulmonar ou para administração gastrointestinal (por exemplo, ingestão, retal, etc.).

Noutro aspeto, a preparação farmacêutica pode incluir (1) um composto descrito aqui, e (2) um transportador farmacêuticamente aceitável. Numa forma de realização, pelo menos 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 ou 100 % dos polipéptidos presentes na preparação têm pelo menos 4 amins primárias modificadas com uma fração não proteica. A preparação pode conter uma mistura de espécies na qual a maior parte das moléculas, por exemplo, pelo menos 60, 70, 80, 90 ou 95 %, são PEGuiladas em pelo menos sítios, mas os

sítios (e, nalguns casos, o número de sítios modificados) nas moléculas presentes na preparação irão variar. Por exemplo, algumas moléculas terão as lisinas A, B e D modificadas, ao passo que outras moléculas terão o terminal amino e as lisinas A, B, C e D modificadas. Nalgumas formas de realização, a preparação pode incluir um pequeno número de compostos que são inativos (por exemplo, menos do que 5, 2, 1 ou 0,1 %) mas, geralmente, a maior parte dos compostos (por exemplo, pelo menos 90, 95, 98, 99, 99,5 ou 99,9 %) presentes numa preparação são ativos, por exemplo, podem inibir uma protease.

Nalguns aspetos da invenção, a fração não proteica ligada a diferentes sítios será a mesma, em termos da identidade ou tamanho. Noutros aspetos, uma primeira fração não proteica é ligada a uma primeira amina primária, e uma segunda fração não proteica, que é diferente, por exemplo, quanto ao tipo ou tamanho, é ligada a uma amina primária diferente. Por exemplo, pode ser desejável ligar um PEG com um primeiro tamanho à amina primária do terminal N mas ligar um PEG de tamanho diferente a uma posição de lisina.

É adicionalmente revelado um dispositivo médico que inclui um distribuidor e um compartimento que inclui uma preparação farmacêutica descrita aqui. Por exemplo, o distribuidor é configurado para gerar uma forma apta a ser inalada da preparação farmacêutica. A descrição também revela um dispositivo médico implantável que inclui um distribuidor e um compartimento que inclui uma preparação farmacêutica descrita aqui, em que o distribuidor é configurado para administrar a preparação farmacêutica no sistema circulatório de um sujeito. Também é descrito um

supositório que inclui uma preparação farmacêutica descrita aqui.

Noutro aspeto, a invenção apresenta uma preparação que inclui um domínio de Kunitz poli-peguilado como definido nas reivindicações. A preparação pode ser substancialmente (por exemplo, pelo menos 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou 100 %) monodispersa. Por exemplo, o composto poli-PEGuilado está presente a uma concentração de pelo menos 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 0,8, 1,0, 1,5, 2,0, ou 2,5 miligramas de polipéptido por mililitro ou entre 0,05 e 10 miligramas de polipéptido por mililitro. Numa forma de realização, a preparação é seca. Por exemplo, a preparação inclui partículas ou está na forma de um pó.

Noutro aspeto, a invenção apresenta um composto que inclui um polipéptido incluindo a sequência de aminoácidos de DX-890, DX-88 ou DX-1000 descrita aqui, em que pelo menos uma lisina é substituída por um aminoácido diferente de lisina, por exemplo, arginina, como definido nas reivindicações. O composto é útil para reduzir o número de lisinas às quais PEG é acoplado, por exemplo, sem uma alteração substancial da atividade, para produzir um conjugado substancialmente homogéneo. Numa forma de realização, o composto inclui adicionalmente uma fração não proteica, por exemplo, um polímero hidrofílico descrito aqui. O polímero pode ser acoplado aos restantes resíduos de lisina, por exemplo, lisina única remanescente (por exemplo, a primeira, segunda, terceira ou quarta lisina).

Noutro aspeto, a invenção apresenta uma preparação (por exemplo, uma preparação aquosa) que inclui: um composto que inclui um domínio de Kunitz conjugado a uma pluralidade de

frações polietilenoglicol como definido nas reivindicações. Por exemplo, a concentração do componente isolado do domínio de Kunitz é maior do que 2 mg por mL, o pH da preparação é maior do que 3, e a força iónica da preparação é menor do que a força iónica de 0,5 M NaCl. Numa forma de realização, o domínio de Kunitz inclui a sequência de aminoácidos de DX-890, DX-88 ou DX-1000 ou uma sequência de aminoácidos que difere em pelo menos uma, mas menos do que seis, cinco, quatro, três ou duas diferenças de aminoácidos (por exemplo, substituições, inserções ou deleções) relativamente à sequência de aminoácidos do DX-890. Também é contemplado um recipiente selado que inclui a preparação. O recipiente pode ser opaco à luz. O recipiente pode incluir informação impressa numa região externa do recipiente.

Noutro aspeto, a invenção apresenta um método que inclui: proporcionar um polipéptido que inclui um domínio de Kunitz; contactar o polipéptido com um polímero hidrofílico (por exemplo, um óxido de polialquileno) incluindo um único grupo reativo que pode formar uma ligação covalente com o polipéptido em condições adequadas para a formação de ligações numa pluralidade de sítios disponíveis (por exemplo, uma pluralidade de amins primárias, por exemplo, todas as amins primárias disponíveis), desse modo proporcionando um inibidor de proteases modificado, como definido nas reivindicações.

O polímero é um polietilenoglicol, por exemplo, monometoxi-polietilenoglicol. Por exemplo, o polímero é mPEG-propionaldeído ou ácido mPEG-succinimidilpropiónico.

Numa forma de realização, as condições estão situadas entre pH 6,5 e 9,0, por exemplo, entre 7,5 e 8,5. Numa forma de realização, o polímero hidrofílico está ligado de modo covalente ao terminal N do polipéptido. Noutra forma de realização, o polímero hidrofílico está ligado de modo covalente a uma cadeia lateral de lisina do polipéptido, como definido nas reivindicações.

O método pode adicionalmente incluir separar polipéptidos com um único polímero ligado de outros produtos e reagentes. O método pode adicionalmente incluir separar cromatograficamente produtos do contacto, por exemplo, utilizando cromatografia de permuta iónica ou cromatografia de exclusão por tamanho.

A revelação também apresenta um domínio de Kunitz modificado preparado por um método descrito aqui, por exemplo, o método acima.

Noutro aspeto, a invenção apresenta um composto como definido nas reivindicações para utilização num método de tratamento de uma perturbação caracterizada por atividade excessiva ou indesejada de uma protease. O método inclui: administrar a um sujeito sofrendo da perturbação ou suspeito de sofrer da perturbação uma composição farmacêutica compreendendo um composto ou preparação descrito aqui. O composto ou preparação inclui um polipéptido com um domínio de Kunitz que inibe a protease. Por exemplo, uma preparação tem pelo menos uma certa percentagem de moléculas do polipéptido com um domínio de Kunitz nas quais um polímero hidrofílico é ligado a um primeiro sítio comum e a um segundo sítio comum. Por exemplo, pelo menos uma certa percentagem de moléculas do

polipéptido com um domínio de Kunitz inclui adicionalmente o polímero hidrofílico ligado a um terceiro, quarto e, opcionalmente, um quinto sítio comum.

Numa forma de realização, a protease é elastase. Por exemplo, o polipéptido com um domínio de Kunitz compreende a sequência de aminoácidos de DX-890 ou uma sequência que difere em pelo menos uma, mas menos do que seis alterações de aminoácidos relativamente ao DX-890. Perturbações exemplificativas que podem ser tratadas utilizando um domínio de Kunitz que inibe uma elastase (por exemplo, elastase de neutrófilos humanos) incluem fibrose quística, COPD e uma perturbação inflamatória.

Numa forma de realização, a protease é uma calicreína. Por exemplo, o polipéptido com um domínio de Kunitz compreende a sequência de aminoácidos de DX-88 que difere em pelo menos uma, mas menos do que seis alterações de aminoácidos relativamente ao DX-88. Perturbações exemplificativas que podem ser tratadas utilizando um domínio de Kunitz que inibe uma Calicreína incluem perturbações de coagulação, fibrinólise, hipotensões, inflamação, hemofilia, hemorragia pós-operatória, hemorragia peri-operatória e angioedema hereditário.

Numa forma de realização, a protease é plasmina e o polipéptido com um domínio de Kunitz compreende a sequência de aminoácidos de DX-1000 ou uma sequência que difere em pelo menos uma, mas menos do que seis alterações de aminoácidos relativamente ao DX-1000. Perturbações exemplificativas que podem ser tratadas utilizando um domínio de Kunitz que inibe plasmina incluem fibrinólise ou fibrinogénólise, hemorragia excessiva associada a

trombolíticos, hemorragia pós-operatória, hemorragia peri-operatória e androgénese inapropriada.

É adicionalmente revelado um método de tratamento ou prevenção de uma perturbação pulmonar. O método inclui administrar um composto descrito aqui a um sujeito, por exemplo, numa quantidade eficaz para melhorar pelo menos um sintoma da perturbação. Por exemplo, o composto inclui a) um polipéptido incluindo um domínio de Kunitz que se liga especificamente e inibe uma elastase (por exemplo, elastase de neutrófilos humanos (hNE)), e b) uma fração não proteica que está fisicamente associada ao polipéptido e aumenta o peso molecular do composto. Por exemplo, o composto inclui (1) um polipéptido incluindo a sequência de aminoácidos de DX-890 ou uma sequência de aminoácidos que difere em pelo menos uma, mas menos do que seis, cinco, quatro, três ou duas diferenças de aminoácidos (por exemplo, substituições, inserções ou deleções) relativamente à sequência de aminoácidos do DX-890, e (2) polietilenoglicol em que o peso molecular da soma das frações de polietilenoglicol é pelo menos 15, 18, 20, 25, 27 ou 30 kDa.

Numa forma de realização, o composto é administrado não mais do que uma vez a cada 12, 24, 36 ou 72 horas. Noutra forma de realização, o composto é administrado não mais do que uma vez a cada quatro, sete, dez, doze ou catorze dias. O composto pode ser administrado uma vez ou múltiplas vezes (por exemplo, regularmente).

Numa forma de realização, a administração inclui administração pulmonar. Por exemplo, a administração inclui acionamento de um inalador e/ou nebulização. Numa forma de realização, a administração inclui administração da

composição, direta ou indiretamente, no sistema circulatório. Por exemplo, a administração inclui injeção ou administração intravenosa.

Numa forma de realização, o sujeito sofre de fibrose quística ou de um defeito genético no gene da fibrose quística. Noutra forma de realização, o sujeito sofre de doença pulmonar obstrutiva crónica.

O sintoma pode consistir em integridade de tecido pulmonar ou um índice de destruição tecidual.

É adicionalmente revelado um método de tratamento ou prevenção de uma perturbação inflamatória. O método inclui: administrar um composto descrito aqui a um sujeito, por exemplo, numa quantidade eficaz para melhorar pelo menos um sintoma da perturbação. Por exemplo, o composto inclui a) um polipéptido incluindo um domínio de Kunitz que se liga especificamente e inibe uma elastase (por exemplo, elastase de neutrófilos humanos (hNE)), e b) uma pluralidade de frações não proteicas que estão fisicamente associadas ao polipéptido e aumentam o peso molecular do composto. Por exemplo, o composto inclui (1) um polipéptido incluindo a sequência de aminoácidos de DX-890 ou uma sequência de aminoácidos que difere em pelo menos uma, mas menos do que seis, cinco, quatro, três ou duas diferenças de aminoácidos (por exemplo, substituições, inserções ou deleções) relativamente à sequência de aminoácidos do DX-890, e (2) uma pluralidade de frações de polietilenoglicol, por exemplo, em que o peso molecular de cada fração de polietilenoglicol é menor do que 20, 18, 16, 12, 10, 9, 8 ou 7 kDa.

Numa forma de realização, a perturbação é uma perturbação inflamatória do intestino, por exemplo, doença de Crohn ou colite ulcerativa. Numa forma de realização, o composto é administrado através de um supositório.

Numa forma de realização, o composto é administrado não mais do que uma vez a cada 12, 24, 36 ou 72 horas. Noutra forma de realização, o composto é administrado não mais do que uma vez a cada quatro, sete, dez, doze ou catorze dias. O composto pode ser administrado uma vez ou múltiplas vezes (por exemplo, regularmente).

Também é descrito um método de tratamento ou prevenção de uma perturbação caracterizada, pelo menos em parte, por atividade de elastases ou atividade de neutrófilos inapropriada. O método inclui administrar um composto descrito aqui a um sujeito, por exemplo, numa quantidade eficaz para melhorar pelo menos um sintoma da perturbação ou para alterar a atividade de elastases ou neutrófilos, por exemplo, para reduzir proteólise mediada por elastases. Por exemplo, a perturbação é artrite reumatoide.

Numa forma de realização, o composto é administrado não mais do que uma vez a cada 12, 24, 36 ou 72 horas. Noutra forma de realização, o composto é administrado não mais do que uma vez a cada quatro, sete, dez, doze ou catorze dias. O composto pode ser administrado uma vez ou múltiplas vezes (por exemplo, regularmente).

Muitos dos exemplos proporcionados aqui descrevem métodos e composições relacionados com domínios de Kunitz e um alvo de protease particular - elastase. No entanto, estes métodos e composições podem ser modificados. Por exemplo,

as lisinas podem ser posicionadas num sítio onde a sua modificação não interfere na função. De modo semelhante, os métodos e composições descritos podem ser modificados em métodos e composições correspondentes relacionados com polipéptidos que incluem um domínio de Kunitz e outros tipos de domínios.

Como usado aqui, "afinidade de ligação" refere-se à constante de associação aparente ou K_a . O K_a é o recíproco da constante de dissociação (K_d). Um ligando, por exemplo, pode ter uma afinidade de ligação de pelo menos 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} ou 10^{12} M^{-1} para uma molécula alvo particular. Uma afinidade de ligação mais elevada de um ligando para um primeiro alvo relativamente a um segundo alvo pode ser indicada por um K_a maior (ou um valor numérico menor de K_d) para a ligação ao primeiro alvo do que o K_a (ou valor numérico de K_d) para ligação ao segundo alvo. Nesses casos, o ligando tem especificidade para o primeiro alvo relativamente ao segundo alvo. As medições de K_a para ligação a hNE são tipicamente efetuadas nas seguintes condições: 50 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl e 0,1 % Triton X-100 a 30 °C utilizando 100 pM da hNE.

A afinidade de ligação pode ser determinada por uma variedade de métodos, incluindo diálise de equilíbrio, ligação de equilíbrio, filtração em gel, ELISA, ressonância de plasmões de superfície ou espectroscopia (por exemplo, utilizando um ensaio de fluorescência). Estas técnicas podem ser utilizadas para medir a concentração de ligando ligado e livre em função da concentração do ligando (ou alvo). A concentração do ligando ligado ($[Ligado]$) está relacionada com a concentração do ligando livre ($[Livre]$) e a concentração de sítios de ligação para o ligando no alvo,

em que (N) é o número de sítios de ligação por molécula de alvo, é dada pela equação seguinte:

$$[\text{Ligado}] = N \cdot [\text{Livre}] / ((1/K_a) + [\text{Livre}])$$

No entanto, nem sempre é necessário determinar exatamente o K_a , pois por vezes é suficiente obter uma medição quantitativa da afinidade, por exemplo, determinada utilizando um método tal como ELISA ou análise de FACS, que é proporcional ao K_a e, assim, pode ser utilizada para comparações, tal como quando se determina se uma afinidade mais elevada é, por exemplo, 2 vezes maior.

Uma "composição isolada" refere-se a uma composição de onde são removidos pelo menos 90 % de pelo menos um componente de uma amostra natural de onde pode ser obtida a composição isolada. Composições produzidas artificial ou naturalmente podem ser "composições de pelo menos" um certo grau de pureza se a espécie ou população de espécies de interesse for pelo menos 5, 10, 25, 50, 75, 80, 90, 95, 98 ou 99 % pura numa base peso-peso.

Um "epítopo" refere-se ao sítio num composto alvo ao qual se liga um ligando, por exemplo, um ligando polipeptídico, tal como um domínio de Kunitz, péptido pequeno ou anticorpo. No caso de o composto alvo ser uma proteína, por exemplo, um epítopo pode referir-se aos aminoácidos aos quais se liga o ligando. Tais aminoácidos podem ser contíguos ou não contíguos relativamente à cadeia principal polipeptídica subjacente. Epítopos sobrepostos incluem pelo menos um resíduo de aminoácido comum.

Como usado aqui, o termo "substancialmente idêntico" (ou "substancialmente homólogo") é usado aqui para referir uma primeira sequência de aminoácidos ou nucleótidos que contém um número suficiente de resíduos de aminoácidos ou nucleótidos idênticos ou equivalentes (por exemplo, com uma cadeia lateral semelhante, por exemplo, substituições de aminoácidos conservadas) a uma segunda sequência de aminoácidos ou nucleótidos, de modo que a primeira e a segunda sequências de aminoácidos ou nucleótidos têm atividades semelhantes. No caso de domínios de Kunitz, o segundo domínio tem a mesma especificidade e, por exemplo, tem pelo menos 0,5, 5 ou 50 % da afinidade de ligação do primeiro domínio. Um grau suficiente de identidade pode ser cerca de 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ou maior.

Sequências semelhantes ou homólogas (por exemplo, pelo menos cerca de 85 % de identidade de sequências) às sequências reveladas aqui também fazem parte deste pedido. Nalgumas formas de realização, a identidade de sequências pode ser cerca de 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ou maior. Alternativamente, existe identidade substancial quando os segmentos de ácidos nucleicos hibridizarem em condições de hibridização seletivas (por exemplo, condições de hibridização altamente restritas) com o complemento do filamento. Os ácidos nucleicos podem estar presentes em células completas, num lisado celular ou numa forma parcialmente purificada ou substancialmente pura.

Os cálculos de "homologia" ou de "identidade de sequências" entre duas sequências (os termos são usados aqui indistintamente) são efetuados do modo seguinte. As

sequências são alinhadas para fins de comparação ótima (por exemplo, podem ser introduzidos hiatos numa ou em ambas de uma primeira e uma segunda sequências de aminoácidos ou ácidos nucleicos para um alinhamento ótimo, e sequências não homólogas podem ser ignoradas para fins comparativos). Numa forma de realização preferida, o comprimento de uma sequência de referência alinhada para fins comparativos é pelo menos 30 %, preferencialmente pelo menos 40 %, mais preferencialmente pelo menos 50 %, ainda mais preferencialmente pelo menos 60 % e ainda mais preferencialmente pelo menos 70 %, 80 %, 90 %, 100 % do comprimento da sequência de referência. Os resíduos de aminoácidos ou nucleótidos em posições de aminoácidos ou posições de nucleótidos correspondentes são então comparados. Quando uma posição na primeira sequência está ocupada pelo mesmo resíduo de aminoácido ou nucleótido relativamente à posição correspondente na segunda sequência, então as moléculas são idênticas nessa posição (como usado aqui, "identidade" de aminoácidos ou ácidos nucleicos é equivalente a "homologia" de aminoácidos ou ácidos nucleicos). A identidade percentual entre as duas sequências é uma função do número de posições idênticas partilhadas pelas sequências, tomando em consideração o número de hiatos, e o comprimento de cada hiato, que é necessário introduzir para um alinhamento ótimo das duas sequências.

A comparação de sequências e a determinação da identidade percentual entre duas sequências podem ser realizadas utilizando um algoritmo matemático. Numa forma de realização preferida, a identidade percentual entre duas sequências de aminoácidos é determinada utilizando o algoritmo de Needleman e Wunsch ((1970) J. Mol. Biol.

48:444-453), que foi incorporado no programa GAP do pacote de "software" do GCG, utilizando uma matriz Blossum 62 ou uma matriz PAM250, e um peso de hiatos de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ou 4 e um peso do comprimento de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6. Ainda noutra forma de realização preferida, a identidade percentual entre duas sequências de nucleótidos é determinada utilizando o programa GAP do pacote de "software" do GCG, utilizando uma matriz NWSgapdna.CMP e um peso de hiatos de 40, 50, 60, 70 ou 80 e um peso do comprimento de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6. Um conjunto de parâmetros particularmente preferido (e o que deve ser utilizado se o experimentalista estiver incerto quanto aos parâmetros que devem ser aplicados para determinar se uma molécula está dentro de uma limitação de identidade ou homologia de sequências da invenção) consiste numa matriz de pontuação Blossum 62 com uma penalidade de hiatos de 12, uma penalidade de extensão de hiatos de 4 e uma penalidade de deslocamento de hiatos de 5.

Como usado aqui, o termo "homólogo" é sinónimo de "semelhança" e significa que uma sequência de interesse difere de uma sequência de referência pela presença de uma ou mais substituições de aminoácidos (apesar de também poderem estar presentes inserções ou deleções de aminoácidos modestas). Meios presentemente preferidos de cálculo de graus de homologia ou semelhança com uma sequência de referência baseiam-se na utilização de algoritmos BLAST (disponibilizados pelo National Center of Biotechnology Information (NCBI), National Institutes of Health, Bethesda MD), em cada caso utilizando os parâmetros do algoritmo por defeito ou recomendados para determinar a significância da relação calculada das sequências. A identidade percentual entre duas sequências de aminoácidos

ou nucleótidos também pode ser determinada empregando o algoritmo de E. Meyers e W. Miller ((1989) CABIOS, 4:11-17), que foi incorporado no programa ALIGN (versão 2.0), utilizando uma tabela de resíduos de pesos PAM120, uma penalidade de extensão de hiatos de 12 e uma penalidade de hiatos de 4.

Como usado aqui, o termo "hibridiza em condições de baixa restrição, restrição média, restrição elevada ou restrição muito elevada" descreve condições de hibridização e lavagem. Diretrizes para a realização de reações de hibridização podem ser encontradas em "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, N.I. (1989), 6.3.1-6.3.6, que é incorporado a título de referência. Nesta referência são descritos métodos aquosos e não aquosos, e quaisquer deles podem ser utilizados. Condições de hibridização específicas descritas aqui são as seguintes: 1) condições de hibridização de baixa restrição em 6X cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) a cerca de 45 °C, seguido de duas lavagens em 0,2X SSC, 0,1 % SDS pelo menos a 50 °C (a temperatura das lavagens pode ser aumentada para 55 °C para condições de baixa restrição); 2) condições de hibridização de restrição média em 6X SSC a cerca de 45 °C, seguido de uma ou mais lavagens em 0,2X SSC, 0,1 % SDS a 60 °C; 3) condições de hibridização de restrição elevada em 6X SSC a cerca de 45 °C, seguido de uma ou mais lavagens em 0,2X SSC, 0,1 % SDS a 65 °C, e preferencialmente 4) condições de hibridização de restrição muito elevada são 0,5 M fosfato de sódio, 7 % SDS a 65 °C, seguido de uma ou mais lavagens a 0,2X SSC, 1 % SDS a 65 °C. Condições de restrição muito elevada (4) são as condições preferidas e as que devem ser utilizadas a menos que especificado em contrário. Em conformidade, são proporcionados ácidos

nucleicos que hibridizam com restrição apropriada com ácidos nucleicos que codificam um polipéptido descrito aqui, pois são polipéptidos que são codificados por tais ácidos nucleicos. Tais polipéptidos podem ser modificados de modo semelhante, como descrito aqui.

É entendido que um polipéptido descrito aqui (por exemplo, um polipéptido que inclui um domínio de Kunitz) pode ter mutações relativamente a um polipéptido particular descrito aqui (por exemplo, substituições de aminoácidos conservativas ou não essenciais), que não têm um efeito substancial nas funções do polipéptido. Se uma substituição particular será ou não tolerada, isto é, não afetará adversamente propriedades biológicas desejadas, como atividade de ligação, pode ser determinado como descrito em Bowie *et al.* (1990) *Science* 247:1306-1310. Uma "substituição de aminoácidos conservativa" é tal que o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido com uma cadeia lateral semelhante. Famílias de resíduos de aminoácidos com cadeias laterais semelhantes foram definidas na área. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais acídicas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares sem carga (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais com ramificação beta (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). É possível

que muitos resíduos de aminoácidos de arcabouço e CDR incluam uma ou mais substituições conservativas.

Um resíduo de aminoácido "não essencial" é um resíduo que pode ser alterado relativamente à sequência de tipo selvagem do agente de ligação, por exemplo, o anticorpo, sem abolir ou, mais preferencialmente, sem alterar substancialmente uma atividade biológica, ao passo que um resíduo de aminoácido "essencial" origina uma tal alteração.

Os termos "polipéptido" ou "péptido" (que podem ser usados indistintamente) referem-se a um polímero de três ou mais aminoácidos ligados por uma ligação peptídica, por exemplo, entre 3 e 30, 12 e 60 ou 30 e 300 ou mais de 300 aminoácidos de comprimento. O polipéptido pode incluir um ou mais aminoácidos não naturais. Tipicamente, o polipéptido inclui apenas aminoácidos naturais. Uma "proteína" pode incluir uma ou mais cadeias polipeptídicas. Em conformidade, o termo "proteína" abrange polipéptidos. Uma proteína ou polipéptido também pode incluir uma ou mais modificações, por exemplo, uma glicosilação, amidação, fosforilação e assim por diante. O termo "péptido pequeno" pode ser usado para descrever um polipéptido que tem entre 3 e 30 aminoácidos de comprimento, por exemplo, entre 8 e 24 aminoácidos de comprimento.

O termo "alquilo" refere-se a uma cadeia hidrocarbonada que pode ser uma cadeia linear ou uma cadeia ramificada, contendo o número indicado de átomos de carbono. Por exemplo, C₁-C₁₂ alquilo indica que o grupo pode ter desde 1 até 12 (inclusivamente) átomos de carbono.

O termo "arilo" refere-se a um sistema em anel hidrocarbonado monocíclico, bicíclico ou tricíclico aromático, em que qualquer átomo do anel apto a sofrer uma substituição pode estar substituído com um substituinte. Exemplos de frações arilo incluem mas não estão limitadas a fenilo, naftilo e antraceno.

Os pormenores de uma ou mais formas de realização da invenção são apresentados nas figuras adjuntas e na descrição abaixo. Outras características, objetivos e vantagens da invenção serão claros a partir da descrição e figuras, e a partir das reivindicações.

DESCRIÇÃO BREVE DAS FIGURAS

A FIG. 1 ilustra a estrutura do DX-890 (SEQ ID NO:23) e a posição dos seus quatro resíduos lisina.

A FIG. 2 ilustra a estrutura do DX-88 (SEQ ID NO:24) e a posição dos seus três resíduos lisina.

A FIG. 3 ilustra a estrutura do DX-1000 (SEQ ID NO:25) e a posição dos seus três resíduos lisina.

A FIG. 4 é um esquema de PEGuilação exemplificativo. O pH da reação pode ser um pH entre 7,8 e 8,5.

A FIG. 5 mostra os resultados de uma análise de MALDI exemplificativa.

A FIG. 6 mostra os resultados de rondas de GP-HPLC exemplificativas.

A FIG. 7 mostra resultados exemplificativos da análise de SDS-PAGE.

A FIG. 8a mostra resultados exemplificativos de estudos de eliminação em ratinhos e 8b mostra estudos de eliminação em coelhos. Os dados foram representados graficamente utilizando um decaimento exponencial duplo de 4 parâmetros.

A Fig 8c mostra uma extrapolação alométrica para humanos. Os valores extrapolados para a fase de eliminação de semivida longa num sujeito humano de 70 Kg foram os seguintes: DX-890, 8,4 horas; 5-PEG5-DX-890, 330 horas ou cerca de 14 dias; DX-1000, 1,7 horas; 4-PEGS-DX-1000, 210 horas ou cerca de 9 dias.

A FIG. 9 mostra resultados exemplificativos de poli-PEGuilação de DX-88 em várias proporções por análise de SDS-PAGE.

DESCRIÇÃO FORMENORIZADA

A invenção proporciona, em parte, compostos que se ligam e inibem uma protease (por exemplo, uma elastase, por exemplo, uma elastase de neutrófilos). Os compostos incluem (i) um polipéptido que inclui um domínio de Kunitz e (ii) uma pluralidade de frações (como frações poliméricas) que aumenta o peso molecular dos compostos relativamente ao polipéptido isoladamente, como definido nas reivindicações. A adição das frações ao composto pode aumentar a semivida em circulação *in vivo* do composto. Nalgumas formas de realização, os compostos podem inibir a elastase de neutrófilos com elevada afinidade e seletividade.

Polímeros

Pode ser utilizada uma variedade de frações para aumentar o peso molecular de um polipéptido que inclui um domínio de Kunitz ou outro inibidor de proteases. Numa forma de realização, a fração é polietilenoglicol, um polímero solúvel em água e/ou substancialmente não antigénico. A fração pode melhorar a estabilização e/ou retenção do domínio de Kunitz na circulação, por exemplo, em sangue,

soro, linfa ou outros tecidos, por exemplo, em pelo menos 1,5, 2, 5, 10, 50, 75 ou 100 vezes. Uma pluralidade de frações é ligada a um domínio de Kunitz. Por exemplo, o polipéptido é ligado a pelo menos quatro frações do polímero. Cada lisina do polipéptido pode ser ligada a uma fração do polímero.

O peso de polímeros adequados pode variar substancialmente. Por exemplo, é possível utilizar polímeros com pesos moleculares médios variando entre, por exemplo, 1-12 kDa, 4-12 kDa ou 3-8 kDa, por exemplo, cerca de 4, 5, 6 ou 7 kDa. Numa forma de realização, o peso molecular médio de frações individuais do polímero que são associadas ao composto é menor do que 12, 10, 8 ou 7 kDa. O peso molecular final também pode depender do tamanho efetivo desejado do conjugado, da natureza (por exemplo, estrutura, tal como linear ou ramificada) do polímero e do grau de derivatização.

O polipéptido que inclui um domínio de Kunitz pode ser fisicamente associado ao polímero de uma variedade de modos. Tipicamente, o polipéptido é ligado de modo covalente ao polímero numa pluralidade de sítios. Por exemplo, o polipéptido é conjugado ao polímero numa pluralidade de aminas primárias, por exemplo, todas as aminas primárias acessíveis ou todas as aminas primárias. Outros compostos também podem ser ligados ao mesmo polímero, por exemplo, uma citotoxina, uma etiqueta ou outro agente de direcionamento, por exemplo, outro ligando que se liga ao mesmo alvo do domínio de Kunitz ou um ligando que se liga a outro alvo, por exemplo, um ligando não relacionado. Outros compostos também podem ser ligados ao polipéptido.

Numa forma de realização, o polímero é solúvel em água antes da conjugação ao polipéptido (apesar de tal não ser necessário). Em geral, após a conjugação ao polipéptido, o produto é solúvel em água, por exemplo, exhibe uma solubilidade em água de pelo menos cerca de 0,01 mg/mL, e mais preferencialmente pelo menos cerca de 0,1 mg/mL, e ainda mais preferencialmente pelo menos cerca de 1 mg/mL. Adicionalmente, o polímero não deve ser altamente imunogénico na forma conjugada, nem deve possuir uma viscosidade que seja incompatível com infusão ou injeção intravenosa se o conjugado for destinado a ser administrado por tais vias.

Numa forma de realização, o polímero contém apenas um único grupo que é reativo. Isto ajuda a evitar conjugação de um polímero a múltiplas moléculas proteicas. Polietilenoglicóis com terminação monometoxi (mPEG's); polímeros com terminação C₁₋₄ alquilo, e óxidos de polietileno bis-ativados (glicóis) podem ser utilizados para conjugação ao polipéptido. Ver, por exemplo, U.S. 5,951,974.

Na sua forma mais comum, poli(etilenoglicol), PEG, é um poliéter linear ou ramificado terminado com grupos hidroxilo. O PEG linear pode ter a estrutura geral seguinte:



O PEG pode ser sintetizado por polimerização aniónica com abertura de anel de óxido de etileno iniciada por ataque nucleofílico de um ião hidróxido no anel epóxido.

Particularmente útil para modificação polipeptídica é monometoxi-PEG, mPEG, com a estrutura geral:



Quanto a descrições adicionais ver, por exemplo, Roberts *et al.* (2002) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54:459-476. Numa forma de realização, as unidades de polímero utilizadas para a conjugação estão monodispersas ou então são altamente homogéneas, por exemplo, estão presentes numa preparação em que 95 % ou todas as moléculas estão a 7, 5, 4, 3, 2 ou 1 kDa uma das outras. Noutra forma de realização, as unidades de polímero estão polidispersas.

É possível selecionar condições reacionais que reduzam a reticulação entre unidades de polímero ou conjugação a múltiplos polipéptidos, e purificar os produtos reacionais, através de filtração em gel ou cromatografia de permuta iónica, para recuperar derivados substancialmente homogéneos, por exemplo, derivados que incluem apenas um único polipéptido com um domínio de Kunitz. Noutras formas de realização, o polímero contém dois ou mais grupos reativos com a finalidade de ligar múltiplos polipéptidos (por exemplo, múltiplas unidades do polipéptido com um domínio de Kunitz) ao polímero. Mais uma vez, pode ser utilizada filtração em gel ou cromatografia de permuta iónica para recuperar o derivado desejado numa forma substancialmente homogénea.

O polipéptido que inclui um domínio de Kunitz é geralmente ligado a uma pluralidade de moléculas de PEG. Por exemplo, para formar um composto com mais de 20 ou 30 kDa, um domínio de Kunitz (cerca de 7 kDa) pode ser ligado a pelo

menos três moléculas de PEG de 8 kDa. São possíveis outras combinações, por exemplo, pelo menos duas, quatro ou cinco moléculas de PEG. O peso molecular das moléculas de PEG pode ser selecionado de modo que o peso molecular final do composto seja igual ou maior do que um peso molecular desejado (por exemplo, entre 17-35 ou 20-25 ou 27-33 kDa). A pluralidade de moléculas de PEG pode ser ligada a qualquer região do domínio de Kunitz, preferencialmente a pelo menos 5, 10 ou 15 Angströms de uma região que interage com um alvo, ou a pelo menos 2, 3 ou 4 resíduos de um aminoácido que interage com um alvo. As moléculas de PEG podem ser ligadas, por exemplo, a resíduos lisina ou a uma combinação de resíduos lisina e o terminal N.

Uma ligação covalente pode ser utilizada para ligar um polipéptido (por exemplo, um polipéptido que inclui um domínio de Kunitz) a um polímero, por exemplo, conjugação ao grupo amino N-terminal e grupos amino épsilon presentes em resíduos lisina, bem como outros grupos amino, imino, carboxilo, sulfidrilo, hidroxilo ou outros grupos hidrofílicos. O polímero pode ser ligado de modo covalente diretamente ao polipéptido sem a utilização de um agente de reticulação multifuncional (habitualmente bifuncional). A ligação covalente a grupos amino pode ser efetuada por químicas conhecidas com base em cloreto cianúrico, carbonildi-imidazolo, grupos reativos com aldeído (alcóxido de PEG mais dietilacetilo de bromoacetaldeído; PEG mais DMSO e anidrido acético, ou cloreto de PEG mais o fenóxido de 4-hidroxibenzaldeído, ésteres de succinimidilo ativados, ditiocarbonato-PEG ativado, PEG ativado com cloroformato de 2,4,5-triclorofenilo ou cloroformato de P-nitrofenilo). Grupos carboxilo podem ser derivatizados por acoplamento de PEG-amina primária utilizando carbodi-imida. Grupos

sulfidrilo podem ser derivatizado por acoplamento a PEG com substituição maleimido (ver, por exemplo, WO 97/10847) ou PEG-maleimida (por exemplo, disponibilizado comercialmente pela Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Ala.). Em alternativa, grupos amino livres no polipéptido (por exemplo, grupos amino épsilon em resíduos lisina) podem ser tiolados com 2-imino-tiolano (reagente de Traut) e depois acoplados a derivados de PEG contendo maleimida, por exemplo, como descrito em Pedley et al., Br. J. Cancer, 70: 1126-1130 (1994).

Polímeros de PEG funcionalizados que podem ser ligados a um polipéptido que inclui domínio de Kunitz incluem polímeros que são disponibilizados no mercado, por exemplo, pela Shearwater Polymers, Inc. (Huntsville, Ala.). Tais derivados de PEG incluem, por exemplo, amino-PEG, ésteres de PEG-aminoácidos, PEG-hidrazida, PEG-tiol, PEG-succinato, PEG carboximetilado, PEG-ácido propiônico, PEG-aminoácidos, PEG-succinato de succinimidilo, PEG-propionato de succinimidilo, éster de succinimidilo de PEG carboximetilado, carbonato de succinimidilo de PEG, ésteres de succinimidilo de aminoácidos-PEGs, PEG-oxicarbonilimidazolo, PEG-carbonato de nitrofenilo, PEG-tresilato, PEG-éter de glicidilo, PEG-aldeído, PEG-vinilsulfona, PEG-maleimida, PEG-dissulfureto de ortopiridilo, PEGs heterofuncionais, derivados de PEG-vinilo, PEG-silanos e PEG-fosfoletos. As condições reacionais para o acoplamento destes derivados de PEG podem variar, dependendo do polipéptido, do grau de PEGuilação desejado e do derivado de PEG utilizado. Alguns fatores envolvidos na escolha de derivados de PEG incluem: o ponto de ligação desejado (como grupos R de lisina ou cisteína), estabilidade hidrolítica e reatividade dos derivados,

estabilidade, toxicidade e antigenicidade da ligação, conveniência para análise, etc.

Os conjugados de um polipéptido que inclui um domínio de Kunitz e um polímero podem ser separados dos materiais de partida que não reagiram utilizando métodos cromatográficos, por exemplo, por filtração em gel ou cromatografia de permuta iônica, por exemplo, HPLC. Espécies heterólogas dos conjugados são purificadas umas das outras do mesmo modo. Também é possível a resolução de diferentes espécies (por exemplo, contendo um ou dois resíduos de PEG) devido à diferença das propriedades iônicas dos aminoácidos que não reagiram. Ver, por exemplo, WO 96/34015.

Domínios de Kunitz

Como usado aqui, um "domínio de Kunitz" é um domínio polipeptídico com pelo menos 51 aminoácidos e contendo pelo menos dois, e preferencialmente três dissulfuretos. O domínio é dobrado de modo que a primeira e a sexta cisteínas, a segunda e quarta, e a terceira e quinta cisteínas formem ligações dissulfureto (por exemplo, num domínio de Kunitz com 58 aminoácidos, podem estar presentes cisteínas nas posições correspondentes aos aminoácidos 5, 14, 30, 38, 51 e 55, de acordo com a numeração da sequência BPTI apresentada abaixo, e podem formar-se dissulfuretos entre as cisteínas nas posições 5 e 55, 14 e 38, e 30 e 51), ou, se estiverem presentes dois dissulfuretos, podem ser formados entre um subconjunto correspondente de cisteínas respectivas. O espaçamento entre cisteínas respectivas pode estar dentro de 7, 5, 4, 3 ou 2 aminoácidos do seguinte espaçamento entre posições correspondentes a: 5

a 55, 14 a 38 e 30 a 51, de acordo com a numeração da sequência BPTI apresentada abaixo. A sequência BPTI pode ser utilizada como referência para indicar posições específicas em qualquer domínio de Kunitz genérico. A comparação de um domínio de Kunitz de interesse com BPTI pode ser efetuada identificando o melhor alinhamento de ajustamento no qual o número de cisteínas alinhadas é maximizado.

A estrutura 3D (a alta resolução) do domínio de Kunitz de BPTI é conhecida. Uma das estruturas de raios X está depositada na Base de Dados de Proteínas de Brookhaven como "6PTI". A estrutura 3D de alguns homólogos de BPTI (Eigenbrot *et al.*, (1990) *Protein Engineering*, 3(7):591-598; Hynes *et al.*, (1990) *Biochemistry*, 29:10018-10022) é conhecida.

Tabela 1: Domínios de Kunitz Naturais Exemplificativos

BPTI (SEQ ID NO:2)	1	2	3	4	5
	123456789012345678901234567890123456789012345678				
	RPDFCLEPPFYTGPCXAKITRIFYNAAAGLQITPVYGGCRAKRNPFESARDCKRTCCGA				

Domínios de Kunitz úteis para selecionar inibidores de proteases podem incluir domínios de Kunitz que têm uma região de arcabouço com um número particular de resíduos lisina. Numa implementação, arcabouços com quatro resíduos lisina são úteis e podem ser modificados, por exemplo, por ligação de frações de PEG com peso molecular médio entre 3-8 kDa, por exemplo, cerca de 5 kDa. Por exemplo, o arcabouço ITI tem quatro lisinas. Noutra implementação, arcabouços com três lisinas são úteis e podem ser modificados, por exemplo, por ligação de frações de PEG com peso molecular médio entre 4-10 kDa, por exemplo, cerca de

5 kDa ou 7 kDa. LACI é um de tais arcabouços. Arcabouços também podem ser alterados de modo a incluírem menos lisinas ou lisinas adicionais, por exemplo, para reduzir o número de lisinas que estão dentro de cinco, quatro ou três resíduos de uma alça de ligação, ou para introduzir um número suficiente de lisinas de modo que a proteína possa ser modificada com pequenas frações de PEG (por exemplo, frações de PEG entre 3-8 kDa), para aumentar o tamanho da proteína e a estabilidade da proteína *in vivo*.

Os domínios de Kunitz interagem com a protease alvo utilizando principalmente aminoácidos em duas regiões de alça ("alças de ligação"). A primeira região de alça está situada entre cerca dos resíduos correspondentes aos aminoácidos 11-21 de BPTI. A segunda região de alça está situada entre cerca dos resíduos correspondentes aos aminoácidos 31-42 de BPTI. Uma biblioteca exemplificativa de domínios de Kunitz varia uma ou mais posições de aminoácidos na primeira e/ou segunda regiões de alça. Posições particularmente úteis a serem variadas incluem: posições 13, 16, 17, 18, 19, 31, 32, 34 e 39 relativamente à sequência de BPTI. É esperado que pelo menos algumas destas posições estejam em contacto próximo com a protease alvo.

A "região de arcabouço" de um domínio de Kunitz é definida como consistindo naqueles resíduos que fazem parte do domínio de Kunitz mas excluindo especificamente resíduos na primeira e na segunda regiões de alças de ligação, isto é, cerca dos resíduos correspondentes aos aminoácidos 11-21 de BPTI e 31-42 de BPTI.

Inversamente, resíduos que não se encontram nestas posições particulares ou que não estão nas regiões de alça podem tolerar uma gama maior de substituições de aminoácidos (por exemplo, substituições conservativas e/ou não conservativas) do que estas posições de aminoácidos.

Domínios de Kunitz Inibidores de Elastase

Um polipéptido exemplificativo que se liga e inibe a elastase de neutrófilos humanos (hNE) é DX-890 (também designado "EPI-hNE4"). O DX-890 é um inibidor de elastase de neutrófilos humanos (hNE) altamente específico e potente ($K_i = 4 \times 10^{-12}$ M). O DX-890 inclui a seguinte sequência de aminoácidos:

Glu Ala Cys Asn Leu Pro Ile Val Arg Gly Pro Cys Ile Ala
 Phe
 Phe Pro Arg Trp Ala Phe Asp Ala Val Lys Gly Lys Cys Val
 Leu
 Phe Pro Tyr Gly Gly Cys Gln Gly Asn Gly Asn Lys Phe Tyr
 Ser
 Glu Lys Glu Cys Arg Glu Tyr Cys Gly Val Pro (SEQ ID NO:23)

O DX-890 é derivado do segundo domínio do tipo Kunitz da proteína inter- α -inibidora (ITI-D2) e pode ser produzido por fermentação em *Pichia pastoris*. Inclui 56 aminoácidos, com um PM previsto de 6 237 Daltons. O DX-890 é resistente a inativação oxidativa e proteolítica.

Estudos farmacológicos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* demonstraram a capacidade inibidora de hNE e o efeito protetor do DX-890 contra lesões induzidas por hNE de expetoração de crianças com fibrose quística (ver ref. Delacourt *et al.* 2002). Estudos agudos e subcrônicos durante 4 semanas de DX-890 aerossolizado em macacos

cynomolgus não revelaram sinais de toxicidade clínica ou biológica, nem de lesões histopatológicas induzidas pela administração do DX-890.

Em estudos clínicos utilizando voluntários humanos saudáveis verificou-se que o DX-890 é seguro para administração por inalação a 8 doses crescentes (em que até 120 minutos de DX-890 em solução salina se traduzem numa massa inalada de cerca de 72 mg).

Algumas das consequências da atividade de elastase incluem: clivagem de recetores do complemento e C3bi; clivagem de imunoglobulinas; degradação de elastina (e consequentemente obstrução das vias aéreas, danos estruturais, bronquiectasia); secreção de macromoléculas; interleuquina-8 aumentada; aumento de PMN (e consequentemente libertação de oxigénio, peróxido de hidrogénio, leucotrieno B4 e interleuquina-8), e persistência de bactérias. Inibidores de elastase podem ser utilizados para reduzir uma ou mais destas atividades.

O DX-890 pode ser utilizado como fármaco anti-inflamatório dirigido contra inflamação mediada por neutrófilos, por exemplo, em lesões de CF pulmonar. Indicações pulmonares exemplificativas incluem Fibrose Quística (CF), Síndrome da Dificuldade Respiratória Aguda (ARDS) e Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (COPD). Em pacientes com CF, o equilíbrio entre proteinases e seus inibidores pode ficar gravemente perturbado. Leucócitos polimorfonucleares (PMN) ativados produzem elastase de neutrófilos humanos (hNE) e outras proteases. A hNE é considerada uma causa chave de danos em tecidos pulmonares associados a fibrose quística. Em consequência, a inibição da hNE é uma via lógica para o

tratamento de doença pulmonar CF, pois ataca a fonte original dos danos em vez de melhorar sintomas e consequências dos danos.

É possível, por exemplo, administrar o DX-890 no pulmão por nebulização. Foi detetada atividade de DX-890 em lavagens bronco-alveolares de voluntários que inalaram DX-890 nebulizado. Doze voluntários saudáveis receberam durante 14 dias uma única dose diária de DX-890, por nebulização durante 5 ou 20 minutos, correspondentes a uma massa inalada estimada de 3,75 ou 15 mg, respetivamente. A tolerabilidade foi excelente; não foi relatado nenhum evento adverso significativo. Não foram observadas anormalidades clínicas ou biológicas.

Relativamente a indicações pulmonares, o DX-890 pode ser utilizado para tratar, por exemplo, Fibrose Quística (CF), Síndrome da Dificuldade Respiratória Aguda (ARDS) e Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (COPD).

Também há correlações conhecidas entre a estrutura do DX-890 e a sua capacidade para se ligar à hNE.

Tabela 3: Aminoácidos Exemplificativos para Inibidores de hNE

<p>Alguns Aminoácidos preferidos em domínios de Kunitz inibidores da hNE</p> <p>Posição Aminoácidos permitidos em posições de aminoácidos correspondentes a posições respetivas na BPTI</p>

5	C
10	YSVN
11	TARQP
12	G
13	PAV
14	C
15	IV
16	AG
17	FILVM
18	F
19	PSQKR
20	R
21	YWF
30	C
31	QEV
32	TLP
33	F
34	VQP
35	Y
36	G
37	G
38	C
39	MQ
40	GA
41	N
42	G
43	N
45	F
51	C
55	C

"Protection against acute lung injury by intravenous or intratracheal pretreatment with EPI-HNE4, a new potent neutrophil elastase inhibitor." Delacourt C, Herigault S, Delclaux C, *et al.* Am J Respir Cell Mol Biol 2002; 26: 290-7 e Grimbert *et al.* (2003) "Characteristics of EPI-hNE4 aerosol: a new elastase inhibitor for treatment of cystic fibrosis" J Aerosol Med. 16(2):121-9.

Identificação de Domínios de Kunitz e Outros Inibidores de Proteases

Pode ser utilizada uma variedade de métodos para identificar uma proteína que se liga e/ou inibe uma protease. Estes métodos podem ser utilizados para

identificar domínios de Kunitz de ocorrência natural e não natural que podem ser utilizados como componentes do compostos descritos aqui.

Por exemplo, um domínio de Kunitz pode ser identificado a partir de uma biblioteca de proteínas em que cada um de uma pluralidade de membros da biblioteca inclui um domínio de Kunitz variado. Uma variedade de aminoácidos pode ser variada no domínio. Ver, por exemplo, U.S. 5,223,409; U.S. 5,663,143, e U.S. 6,333,402. Domínios de Kunitz podem ser variados, por exemplo, utilizando mutagênese de DNA, mistura de DNA, síntese química de oligonucleótidos (por exemplo, utilizando codões como subunidades) e clonagem de genes naturais. Ver, por exemplo, U.S. 5,223,409 e U.S. 2003-0129659.

A biblioteca pode ser uma biblioteca de expressão que é utilizada para produzir proteínas. As proteínas podem ser dispostas em série, por exemplo, utilizando uma série proteica. US 5,143,854; De Wildt *et al.* (2000) *Nat. Biotechnol.* 18:989-994; Lueking *et al.* (1999) *Anal. Biochem.* 270:103-111; Ge (2000) *Nucleic Acids Res.* 28, e3, I-VII; MacBeath e Schreiber (2000) *Science* 289: 1760-1763; WO 0/98534, WO01/83827, WO02/12893, WO 00/63701, WO 01/40803 e WO 99/51773.

As proteínas também podem ser apresentadas num pacote genético replicável, por exemplo, na forma de uma biblioteca de fagos, como de apresentação em fagos, biblioteca de apresentação em levedura, biblioteca de apresentação em ribossomas ou de fusão ácido nucleico-proteína. Ver, por exemplo, U.S. 5,223,409; Smith (1985) *Science* 228:1315-1317; WO 92/18619; WO 91/17271; WO

92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; WO 90/02809; de Haard *et al.* (1999) *J. Biol. Chem* 274:18218-30; Hoogenboom *et al.* (1998) *Immunotechnology* 4:1-20; Hoogenboom *et al.* (2000) *Immunol Today* 2:371-8; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9: 1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrard *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Rebar *et al.* (1996) *Methods Enzymol.* 267:129-49; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137, e Barbas *et al.* (1991) *PNAS* 88: 7978-7982 quanto a exemplos de apresentação em fagos e outros métodos. Ver, por exemplo, Boder e Wittrup (1997) *Nat. Biotechnol.* 15: 553-557 e WO 03/029456 quanto a exemplos de apresentação em células de levedura e outros métodos. Ver, por exemplo, Mattheakis *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9022 e Hanes *et al.* (2000) *Nat Biotechnol.* 18:1287-92; Hanes *et al.* (2000) *Methods Enzymol.* 328:404-30. e Schaffitzel *et al.* (1999) *J Immunol Methods.* 231(1-2):119-35 quanto a exemplos de apresentação em ribossomas e outros métodos. Ver, por exemplo, Roberts e Szostak (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302, e Patente U.S. No. 6,207,446 quanto a exemplos de fusões ácido nucleico-proteína. Tais bibliotecas podem ser rastreadas num formato de alto rendimento. Ver, por exemplo, U.S. 2003-0129659.

Podem ser geradas bibliotecas de domínios de Kunitz variando um ou mais resíduos de aminoácidos de alças de sítios de ligação utilizando um domínio de Kunitz descrito aqui, por exemplo, um domínio de Kunitz com um arcabouço descrito aqui, por exemplo, uma região de arcabouço

modificada ou de ocorrência natural. Numa forma de realização, os resíduos que são variados são variados entre uma pluralidade de aminoácidos. A pluralidade é escolhida de modo que lisina não esteja disponível.

Rastreo de Bibliotecas de Apresentação

Esta secção descreve métodos exemplificativos de rastreo de uma biblioteca de apresentação para identificar um polipéptido que interage com uma elastase. Estes métodos podem ser modificados para identificar outros polipéptidos que interagem com outros alvos, por exemplo, outras proteases ou outras proteínas. Os métodos também podem ser modificados e utilizados em combinação com outros tipos de bibliotecas, por exemplo, uma biblioteca de expressão ou uma série proteica, e assim por diante.

Num rastreo exemplificativo de uma biblioteca de apresentação, uma biblioteca de fagos é contactada e deixada ligar-se à proteína elastase alvo (por exemplo, uma forma ativa ou inativada (por exemplo, proteína mutante ou quimicamente inativada) ou um respetivo fragmento). Para facilitar a separação ligantes e não ligantes no processo de rastreo é muitas vezes conveniente imobilizar a elastase num suporte sólido, apesar de também ser possível primeiramente permitir a ligação à elastase em solução e depois separar ligantes de não ligantes por acoplamento do composto alvo a um suporte. A título ilustrativo, quando incubados na presença da elastase, fagos que apresentam um polipéptido que interage com elastase formam um complexo com a elastase imobilizada num suporte sólido, ao passo que os fagos que não se ligaram permanecem em solução e podem ser removidos por lavagem com tampão. Os fagos que se

ligaram podem então ser libertados da elastase por alguns meios, como mudança do tampão para um pH ácido ou básico relativamente elevado (por exemplo, pH 2 ou pH 10), alteração da força iónica do tampão, adição de desnaturantes, adição de um competidor, adição de uma célula hospedeira que possa ser infetada ou outros meios conhecidos.

Por exemplo, para identificar péptidos de ligação a elastase, elastase pode ser adsorvida numa superfície sólida, como a superfície de plástico de cavidades de uma placa de ensaio de múltiplas cavidades. Subsequentemente, uma alíquota da biblioteca de apresentação em fagos é adicionada a uma cavidade em condições apropriadas que mantêm a estrutura da elastase imobilizada e do fago, como pH 6-7. Fagos das bibliotecas que apresentam polipéptidos que se ligam à elastase imobilizada ligam-se à elastase e ficam retidos na cavidade. Os fagos que não se ligam podem ser removidos. Também é possível incluir um agente bloqueador ou ligando competidor durante a ligação da biblioteca de fagos à elastase imobilizada.

Fagos ligados à elastase imobilizada podem então ser eluídos por lavagem com uma solução tampão com um pH ácido (por exemplo, pH 2) ou um pH alcalino (por exemplo, pH 8-9) relativamente forte. As soluções de fagos recuperados que são eluídas da elastase são depois neutralizadas e, se desejado, podem ser reunidas na forma de uma população da biblioteca mista enriquecida de fagos apresentando péptidos de ligação à elastase. Alternativamente, os fagos que eluíram de cada biblioteca podem ser mantidos separadamente como uma população enriquecida específica da biblioteca de ligantes de elastase. Populações enriquecidas de péptidos

de ligação à elastase de apresentação em fagos podem depois ser cultivadas por métodos comuns, para rondas adicionais de rastreio e/ou para análise de péptidos apresentados nos fagos e/ou para sequenciação do DNA que codifica o péptido de ligação apresentado.

Um de muitos protocolos de rastreio alternativos possíveis emprega moléculas de abordagem seletiva de elastase que são biotiniladas e que podem ser capturadas por ligação a estreptavidina, por exemplo, revestida em partículas.

Os fagos recuperados podem depois ser amplificados por infeção de células bacterianas, e o processo de rastreio pode ser repetido com a nova reunião de fagos que agora está depletada em não ligantes de elastase e enriquecida em ligantes de elastase. A recuperação de mesmo apenas alguns fagos de ligação pode ser suficiente para completar o processo. Após algumas rondas de seleção, as sequências genéticas que codificam as frações de ligação derivadas de clones de fagos selecionados na reunião de ligação são determinadas por métodos convencionais, revelando a sequência peptídica que confere afinidade de ligação do fago para o alvo. Um aumento do número de fagos recuperados após cada ronda de seleção e a recuperação de sequências proximamente relacionadas indicam que o rastreio é convergente em sequências da biblioteca possuindo uma característica desejada.

Depois de identificado um conjunto de polipéptidos de ligação, as informações das sequências podem ser utilizadas para conceber outras bibliotecas secundárias. Por exemplo, as bibliotecas secundárias podem explorar um segmento menor de espaços de sequências mais pormenorizadamente do que a

biblioteca inicial. Nalgumas formas de realização, a biblioteca secundária inclui proteínas polarizadas para membros possuindo propriedades adicionais desejadas, por exemplo, sequências que têm uma elevada identidade percentual com uma proteína humana.

A tecnologia de apresentação também pode ser utilizada para se obterem polipéptidos que são específicos para epítomos particulares de um alvo. Isto pode ser efetuado, por exemplo, utilizando moléculas competidoras diferentes do alvo desprovidas do epítomo particular ou que estão mutadas no epítomo, por exemplo, com alanina. Tais moléculas diferentes do alvo podem ser utilizadas num procedimento de seleção negativa como descrito abaixo, como moléculas competidoras aquando da ligação de uma biblioteca de apresentação ao alvo, ou como um agente pré-eluição, por exemplo, para capturar numa solução de lavagem que dissocia a biblioteca de apresentação.

Seleção Iterativa. Numa forma de realização preferida é utilizada tecnologia de bibliotecas de apresentação de um modo iterativo. Uma primeira biblioteca de apresentação é utilizada para identificar uma ou mais proteínas que interagem com um alvo. Estas proteínas identificadas são depois variadas utilizando um método de mutagénesse, para formar uma segunda biblioteca de apresentação. Então são selecionadas da segunda biblioteca proteínas com afinidade mais elevada, por exemplo, utilizando uma restrição mais elevada ou condições de ligação e lavagem mais competitivas.

Nalgumas implementações, a mutagénesse é dirigida a regiões que se sabe estarem ou que é provável que estejam na

interface de ligação. Algumas técnicas de mutagênese exemplificativas incluem: PCR sujeita a erros (Leung *et al.* (1989) *Technique* 1:11-15), recombinação, mistura de DNA utilizando clivagem aleatória (Stemmer (1994) *Nature* 389-391; denominada "mistura de ácidos nucleicos"), RACHITT™ (Coco *et al.* (2001) *Nature Biotech.* 19:354), mutagênese dirigida a sítios (Zoller *et al.* (1987) *Nucl Acids Res* 10: 6487-6504), mutagênese por cassete (Reidhaar-Olson (1991) *Methods Enzymol.* 208:564-586) e incorporação de oligonucleótidos degenerados (Griffiths *et al.* (1994) *EMBO J* 13:3245). Para domínios de Kunitz são conhecidas muitas posições perto da interface de ligação. Tais posições incluem, por exemplo, as posições 13, 16, 17, 18, 19, 31, 32, 34 e 39 relativamente à sequência de BPTI (de acordo com a numeração de BPTI em U.S. 6,333,402). Tais posições podem ser mantidas constantes e outras posições podem ser variadas, ou estas mesmas posições podem ser variadas.

Num exemplo de seleção iterativa, os métodos descritos aqui são utilizados para primeiramente identificar proteínas de uma biblioteca de apresentação que se ligam a uma elastase com pelo menos uma especificidade de ligação mínima para um alvo ou uma atividade mínima, por exemplo, uma constante de dissociação de equilíbrio para a ligação maior do que 1 nM, 10 nM ou 100 nM. As sequências de ácidos nucleicos que codificam as proteínas identificadas iniciais são utilizadas como ácido nucleico modelo para a introdução de variações, por exemplo, para identificar um segundo ligando proteico que tem propriedades melhoradas (por exemplo, afinidade de ligação, cinética ou estabilidade) relativamente ao ligando proteico inicial.

Seleção Pela Taxa de Dissociação. Uma vez que uma taxa de dissociação baixa pode prever elevada afinidade, particularmente no que se refere a interações entre proteínas e seus alvos, os métodos descritos aqui can podem ser utilizados para isolar proteínas com uma taxa de dissociação cinética desejada (isto é, reduzida) para uma interação de ligação a um alvo.

Para selecionar proteínas de dissociação lenta de uma biblioteca de apresentação, a biblioteca é contactada com um alvo imobilizado, por exemplo, elastase imobilizada. O alvo imobilizado é então lavado com uma primeira solução que remove biomoléculas inespecífica ou fracamente ligadas. Em seguida, o alvo imobilizado é eluído com uma segunda solução que inclui uma quantidade de saturação de alvo livre, isto é, réplicas do alvo que não estão ligadas à partícula. O alvo livre liga-se a biomoléculas que se dissociam do alvo. A nova ligação é eficazmente prevenida pela quantidade de saturação de alvo livre relativamente à concentração muito menor de alvo imobilizado.

A segunda solução pode ter condições de solução que são substancialmente fisiológicas ou que são restritas. Tipicamente, as condições de solução da segunda solução são idênticas às condições de solução da primeira solução. Frações da segunda solução são recolhidas por ordem temporal, para distinguir frações iniciais de posteriores. As frações posteriores incluem biomoléculas que se dissociam do alvo a uma taxa menor do que biomoléculas das frações iniciais.

Adicionalmente, também é possível recuperar membros da biblioteca de apresentação que permanecem ligados ao alvo

mesmo após incubação prolongada. Estes podem ser dissociados utilizando condições caotrópicas ou podem ser amplificados enquanto estão ligados ao alvo. Por exemplo, fagos ligados ao alvo podem ser contactados com células bacterianas.

Seleção ou Rastreo Quanto à Especificidade. Os métodos de rastreo de bibliotecas de apresentação descritos aqui podem incluir um processo de seleção ou rastreo que rejeita membros da biblioteca de apresentação que se ligam a uma molécula diferente do alvo, por exemplo, uma protease diferente de elastase, como tripsina. Numa forma de realização, a molécula diferente do alvo é elastase que foi ativada por tratamento com um inibidor irreversivelmente ligado, por exemplo, um inibidor covalente.

Numa implementação, um passo denominado "seleção negativa" ou "depleção" é utilizado para distinguir entre o alvo e moléculas diferentes do alvo relacionadas mas distintas ou não relacionadas. A biblioteca de apresentação, ou uma reunião respetiva, é contactada com a molécula diferente do alvo. Membros da amostra que não se ligam à molécula diferente do alvo são recolhidos e utilizados em seleções subsequentes para ligação à molécula alvo, ou mesmo para seleções negativas subsequentes. O passo de seleção negativa pode anteceder ou suceder à seleção de membros da biblioteca que se ligam à molécula alvo.

Noutra implementação é utilizado um passo de rastreo. Depois de isolados membros da biblioteca de apresentação para ligação à molécula alvo, cada membro isolado da biblioteca é testado quanto à sua capacidade para se ligar a uma molécula diferente do alvo (por exemplo, uma molécula

diferente do alvo listada acima). Por exemplo, pode utilizar-se um rastreio de ELISA de alto rendimento para se obterem estes dados. O rastreio de ELISA também pode ser utilizado para se obterem dados quantitativos da ligação de cada membro da biblioteca ao alvo. Os dados de ligação à molécula alvo e diferente do alvo são comparados (por exemplo, utilizando um computador e "software") para identificar membros da biblioteca que se ligam especificamente ao alvo.

Modificação e Variação de Polipéptidos

Também é possível variar uma proteína descrita aqui para se obter uma proteína variante útil que tem propriedades semelhantes ou melhoradas ou alteradas. Tipicamente são possíveis algumas variantes. Uma variante pode ser preparada e depois testada, por exemplo, utilizando um ensaio de ligação descrito aqui (como anisotropia de fluorescência).

Um tipo de variante é um truncamento de um ligando descrito aqui ou isolado por um método descrito aqui. Neste exemplo, a variante é preparada removendo um ou mais resíduos de aminoácidos do ligando do terminal N ou C. Nalguns casos, uma série de tais variantes é preparada e testada. A informação do teste da série é utilizada para determinar uma região do ligando que é essencial para a ligação da proteína elastase. Uma série de deleções ou inserções internas pode ser construída e testada de modo semelhante. Para domínios de Kunitz pode ser possível remover, por exemplo, entre um e cinco resíduos ou um e três resíduos que são N-terminais a C₅, a primeira cisteína, e entre um e cinco resíduos ou um e três resíduos que são C-terminais a

C₅₅, a cisteína final, em que cada uma das cisteínas corresponde a uma cisteína respetivamente numerada em BPTI.

Outro tipo de variante é uma substituição. Num exemplo, o ligando é sujeito a varrimento de alanina para identificar resíduos que contribuem para a atividade de ligação. Noutro exemplo é construída uma biblioteca de substituições numa ou mais posições. A biblioteca pode não estar polarizada ou, particularmente se forem variadas múltiplas posições, estar polarizada para um resíduo original. Nalguns casos, as substituições são todas substituições conservativas.

Outro tipo de variante inclui um ou mais aminoácidos de ocorrência não natural. Tais ligandos variantes podem ser produzidos por síntese química ou modificação. Uma ou mais posições podem ser substituídas por um aminoácido de ocorrência não natural. Nalguns casos, o aminoácido substituído pode estar quimicamente relacionado com o resíduo original de ocorrência natural (por exemplo, alifático, com carga, básico, ácido, aromático, hidrofílico) ou um isómero do resíduo original.

Também pode ser possível incluir ligações não peptídicas e outras modificações químicas. Por exemplo, parte ou a totalidade do ligando pode ser sintetizada como um péptido-mimético, por exemplo, um peptoide (ver, por exemplo, Simon *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9367-71 e Horwell (1995) *Trends Biotechnol.* 13:132-4). Ver também outras modificações discutidas abaixo.

Caracterização de Interações de Ligação

As propriedades de ligação de uma proteína (por exemplo, um polipéptido que inclui um domínio de Kunitz) podem ser facilmente avaliadas utilizando vários formatos de ensaio. Por exemplo, a propriedade de ligação de uma proteína pode ser medida em solução por anisotropia de fluorescência, que proporciona um método conveniente e rigoroso de determinar uma constante de dissociação (K_D) ou constante de associação (K_A) da proteína para um alvo particular. Num de tais procedimentos, a proteína a ser avaliada é etiquetada com fluoresceína. A proteína etiquetada com fluoresceína é misturada, em cavidades de uma placa de ensaio de múltiplas cavidades, com várias concentrações do alvo particular (por exemplo, elastase). As medições de anisotropia de fluorescência são realizadas utilizando um leitor de placas de polarização de fluorescência.

ELISA. As interações de ligação também podem ser analisadas utilizando um ensaio ELISA. Por exemplo, a proteína a ser avaliada é contactada com uma placa de microtitulação cuja superfície de base foi revestida com o alvo, por exemplo, uma quantidade limitante do alvo. A molécula é contactada com a placa. A placa é lavada com tampão, para remover moléculas ligadas de modo inespecífico. Depois determina-se a quantidade da proteína ligada à placa por sondagem da placa com um anticorpo que reconhece a proteína. Por exemplo, a proteína pode incluir uma cauda de epítipo. O anticorpo pode ser ligado a uma enzima, tal como fosfatase alcalina, que origina um produto colorimétrico quando são proporcionados substratos apropriados. No caso de um membro da biblioteca de apresentação incluir a proteína a ser testada, o anticorpo pode reconhecer uma região que é constante entre todos os membros da biblioteca de apresentação, por exemplo, para um membro de uma biblioteca

de apresentação em fagos, uma proteína de revestimento principal de fago.

Ensaio Homogêneo. Uma interação de ligação entre uma proteína e um alvo particular pode ser analisada utilizando um ensaio homogêneo, isto é, depois de adicionados todos os componentes do ensaio não são necessárias manipulações de fluidos adicionais. Por exemplo, pode ser utilizada transferência de energia por fluorescência (FET) como ensaio homogêneo (ver, por exemplo, Lakowicz *et al.*, Patente U.S. No. 5,631,169; Stavrianopoulos, *et al.*, Patente U.S. No. 4,868,103). É selecionada uma etiqueta de fluoróforo na primeira molécula (por exemplo, a molécula identificada na fração) de modo que a sua energia fluorescente emitida possa ser absorvida por uma etiqueta fluorescente numa segunda molécula (por exemplo, o alvo) se a segunda molécula estiver próxima da primeira molécula. A etiqueta fluorescente na segunda molécula dá uma resposta fluorescente quando absorve a energia transferida. Uma vez que a eficiência da transferência de energia entre as etiquetas está relacionada com a distância que separa as moléculas, a relação espacial entre as moléculas pode ser avaliada. Numa situação em que ocorre ligação entre as moléculas, a emissão fluorescente da etiqueta da molécula 'aceitadora' no ensaio deve ser máxima. Um evento de ligação de FET pode ser convenientemente medido por meios comuns de detecção fluorométrica bem conhecidos na área (por exemplo, utilizando um fluorímetro). Por titulação da quantidade da primeira ou segunda molécula de ligação pode gerar-se uma curva de ligação para estimar a constante de ligação de equilíbrio.

Ressonância de Plasmões de Superfície (SPR). Uma interação de ligação entre uma proteína e um alvo particular pode ser analisada utilizando SPR. Por exemplo, após a sequenciação de um membro de uma biblioteca de apresentação presente numa amostra, e opcionalmente verificado, por exemplo, por ELISA, a proteína apresentada pode ser produzida em quantidade e avaliada quanto à ligação ao alvo utilizando SPR. SPR ou Análise de Interação Biomolecular (BIA) em tempo real deteta interações bioespecíficas em tempo real, sem etiquetagem de quaisquer dos intervenientes (por exemplo, BIAcore). Alterações da massa na superfície de ligação (indicador de um evento de ligação) do "chip" de BIA conduzem a alterações do índice de refração da luz perto da superfície (o fenómeno ótico de ressonância de plasmões de superfície (SPR)). As alterações da refratividade geram um sinal detetável, que é medido como indicação de reações em tempo real entre moléculas biológicas. Métodos de utilização de SPR são descritos, por exemplo, na Patente U.S. No. 5,641,640; Raether (1988) "Surface Plasmons" Springer Verlag; Sjolander, S. e Urbaniczky, C. (1991) Anal. Chem. 63:2338-2345; Szabo et al. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705.

A informação de SPR pode ser utilizada para proporcionar uma medida rigorosa e quantitativa da constante de dissociação de equilíbrio (K_d) e parâmetros cinéticos, incluindo k_{on} e k_{off} , da ligação de uma biomolécula a um alvo. Tais dados podem ser utilizados para comparar diferentes biomoléculas. Por exemplo, proteínas selecionadas de uma biblioteca de apresentação podem ser comparadas para identificar indivíduos que têm elevada afinidade para o alvo ou que têm uma k_{off} baixa. Esta informação também pode ser utilizada para desenvolver uma

relação estrutura-atividade (SAR) se as biomoléculas estiverem relacionadas. Por exemplo, se as proteínas forem todas variantes mutadas de um único anticorpo paterno ou de um conjunto de anticorpos paternos conhecidos, podem ser identificados aminoácidos variantes em determinadas posições que estão correlacionados com parâmetros de ligação particulares, por exemplo, elevada afinidade e baixa k_{off} .

Métodos adicionais de medição de afinidades de ligação incluem polarização de fluorescência (FP) (ver, por exemplo, Patente U.S. No. 5,800,989), ressonância magnética nuclear (NMR) e titulações de ligação (por exemplo, utilizando transferência de energia por fluorescência).

Outras medições de solução para estudar propriedades de ligação incluem transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET) e NMR.

Caracterização da Inibição de Elastase

Relativamente a formas de realização em que o composto inclui um polipéptido que tem um domínio de Kunitz específico para elastase, pode ser útil caracterizar a capacidade do polipéptido para inibir elastase.

Domínios de Kunitz podem ser rastreados quanto a ligação a elastase e quanto a inibição da atividade proteolítica de elastase. Domínios de Kunitz podem ser selecionados quanto à sua potência e seletividade de inibição de elastase. Num exemplo, elastase e seu substrato são combinados em condições de ensaio que permitem a reação da protease com o seu substrato. O ensaio é realizado na ausência do domínio

de Kunitz, e na presença de concentrações crescentes do domínio de Kunitz. A concentração do composto de teste à qual 50 % da atividade de elastase é inibida pelo composto de teste é o valor IC_{50} (Concentração Inibidora) ou valor EC_{50} (Concentração Efetiva) para esse composto. Numa série ou grupo de domínios de Kunitz, os que têm menores valores IC_{50} ou EC_{50} são considerados inibidores mais potentes da elastase do que aqueles compostos com valores IC_{50} ou EC_{50} mais elevados. Compostos preferidos de acordo com este aspeto têm um valor IC_{50} de 100 nM ou menos, medido num ensaio *in vitro* quanto a inibição da atividade de elastase.

Domínios de Kunitz também podem ser avaliados quanto à seletividade para elastase. Um composto de teste é avaliado quanto à sua potência para um painel de serina proteases e outras enzimas e um valor IC_{50} é determinado para cada péptido. Um domínio de Kunitz que exiba um valor IC_{50} baixo para a enzima elastase e um valor IC_{50} mais elevado para outras enzimas dentro do painel de teste (por exemplo, tripsina, plasmina, calicreína) é considerado seletivo para elastase. Em geral, um composto é considerado seletivo se o seu valor IC_{50} for pelo menos uma ordem de grandeza menor do que o seguinte menor valor IC_{50} medido no painel de enzimas.

Métodos específicos de avaliação da inibição de elastase são descritos no Exemplo abaixo.

Também é possível avaliar a atividade de domínios de Kunitz *in vivo* ou em amostras (por exemplo, lavagens pulmonares) de sujeitos aos quais foi administrado um composto descrito aqui.

Alvos de Proteases

Proteases estão envolvidas numa grande variedade de processos biológicos, incluindo inflamação e lesão em tecidos. Serina proteases produzidas por células inflamatórias, incluindo neutrófilos, estão implicadas em várias perturbações, como enfisema pulmonar. A elastase de neutrófilos é uma serina protease produzida por leucócitos polimorfonucleares com atividade contra componentes da matriz extracelular e patogénios. O enfisema pulmonar é caracterizado por destruição alveolar conducente a um grande enfraquecimento da função pulmonar.

Uma deficiência de um inibidor de serina proteases, inibidor de α 1-proteases (API ou α 1-PI, anteriormente conhecido como α -1 antitripsina) é um fator de risco para o desenvolvimento de enfisema pulmonar (Laurell, C. B. e Eriksson, S. (1963) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 15:132-140; Brantly, M. L., et al. (1988) Am. Rev. Respir. Dis. 138:327-336). A deficiência de API pode conduzir a atividade descontrolada de elastase de neutrófilos e contribuir para a destruição de tecido pulmonar em enfisema pulmonar. De igual modo, a inativação de API e inflamação crónica podem conduzir a atividade excessiva de elastase de neutrófilos e destruição patológica de tecido pulmonar.

A elastase de neutrófilos humanos consiste em aproximadamente 218 resíduos de aminoácidos, contém 2 cadeias laterais de hidratos de carbono ligadas por asparagina e é reunida por 2 ligações dissulfureto (Sinha, S., et al. Proc. Nat. Acad. Sci. 84: 2228-2232, 1987). É normalmente sintetizada nos neutrófilos em desenvolvimento como uma pró-enzima, mas é armazenada nos grânulos

primários na sua forma ativa, pronta com atividade enzimática completa quando é libertada dos grânulos, normalmente em sítios de inflamação (Gullberg U, *et al.* Eur J Haematol. 1997;58:137-153; Borregaard N, Cowland JB. Blood. 1997;89:3503-3521).

Outros alvos de proteases exemplificativos incluem: plasmina, calicreína, Fator VIIa, Fator XIa, trombina, uroquinase e Fator IIa. Classes de proteases relevantes incluem: proteases associadas a coagulação do sangue, proteases associadas ao complemento, proteases que digerem componentes da matriz extracelular, proteases que digerem membranas basais e proteases associadas a células endoteliais. Por exemplo, a protease é uma serina protease.

Produção de Proteínas

Produção recombinante de polipéptidos. Métodos comuns de ácidos nucleicos recombinantes podem ser utilizados para expressar um componente polipeptídico de um composto descrito aqui (por exemplo, um polipéptido que inclui um domínio de Kunitz). Em geral, uma sequência de ácido nucleico que codifica o polipéptido é clonada num vetor de expressão de ácido nucleico. Se o polipéptido for suficientemente pequeno, por exemplo, se a proteína for um péptido com menos do que 50 aminoácidos, a proteína pode ser sintetizada utilizando métodos automatizados de síntese orgânica.

O vetor de expressão para expressar o polipéptido pode incluir um segmento que codifica o polipéptido e sequências reguladoras, por exemplo, um promotor, operavelmente ligadas ao segmento codificador. Vetores e promotores

adequados são conhecidos dos profissionais e estão comercialmente disponíveis para gerar as construções recombinantes da presente invenção. Ver, por exemplo, as técnicas descritas em Sambrook & Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª Edição, Cold Spring Harbor Laboratory, N.I. (2001) e Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology" (Greene Publishing Associates e Wiley Interscience, N.Y. (1989).

Scopes (1994) "Protein Purification: Principles and Practice", Nova Iorque: Springer-Verlag e outros textos proporcionam alguns métodos gerais de purificação de proteínas recombinantes (e não recombinantes).

Produção sintética de péptidos. O componente polipeptídico de um composto também pode ser produzido por meios sintéticos. Ver, por exemplo, Merrifield (1963) J. Am. Chem.Soc., 85: 2149. Por exemplo, o peso molecular de péptidos ou péptido-miméticos sintéticos pode variar desde cerca de 250 até cerca de 8 0000 Daltons. Um péptido pode ser modificado, por exemplo, por ligação a uma fração que aumenta o peso molecular efetivo do péptido. Se o péptido for oligomerizado, dimerizado e/ou derivatizado, por exemplo, com um polímero hidrofílico (por exemplo, para aumentar a afinidade e/ou atividade dos péptidos), os seus pesos moleculares podem ser maiores e podem variar desde cerca de 500 até cerca de 50 000 Daltons.

Composições Farmacêuticas

Também é apresentada uma composição, por exemplo, uma composição farmacêuticamente aceitável, que inclui um domínio de Kunitz poli-PEGuilado. Numa forma de realização,

o domínio de Kunitz liga-se a uma protease, como elastase, plasmina ou calicreína. Como usado aqui, "composições farmacêuticas" abrange compostos (por exemplo, compostos etiquetados) para utilização de diagnóstico (por exemplo, imagiologia *in vivo*) bem como compostos para utilização terapêutica ou profilática.

Como usado aqui, "transportador farmacêuticamente aceitável" inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e retardadores da absorção e semelhantes que são fisiologicamente compatíveis. Numa forma de realização, o transportador é diferente de água. De preferência, o transportador é adequado para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parentérica, espinal ou epidérmica (por exemplo, por injeção ou infusão). Dependendo da via de administração, o composto ativo pode ser revestido num material para proteger o composto da ação de ácidos e outras condições naturais que podem inativar o composto.

Um "sal farmacêuticamente aceitável" refere-se a um sal que retém a atividade biológica desejada do composto paterno e não induz quaisquer efeitos toxicológicos indesejados (ver, por exemplo, Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Exemplos de tais sais incluem sais de adição de ácido e sais de adição de base. Sais de adição de ácido incluem os derivados de ácidos inorgânicos não tóxicos, como clorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromídrico, iodídrico, fosforoso e semelhantes, bem como de ácidos orgânicos não tóxicos, como ácidos mono- e dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos substituídos com fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos

sulfônicos alifáticos e aromáticos e semelhantes. Sais de adição de base incluem os derivados de metais alcalinoterrosos, como sódio, potássio, magnésio, cálcio e semelhantes, bem como de amins orgânicas não tóxicas, como N,N'-dibenziletilenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína e semelhantes.

As composições desta invenção podem estar numa variedade de formas. Estas incluem, por exemplo, formas galénicas líquidas, semissólidas e sólidas, tais como soluções líquidas (por exemplo, soluções injetáveis e aptas a serem infundidas), dispersões ou suspensões, comprimidos, pílulas, pós, lipossomas e supositórios. A forma preferida depende do modo de administração pretendido e da aplicação terapêutica. Composições preferidas típicas estão na forma de soluções injetáveis ou aptas a serem infundidas, como composições semelhantes às utilizadas para administração de anticorpos a sujeitos humanos. O modo de administração preferido é parentérico (por exemplo, intravenoso, subcutâneo, intraperitoneal, intramuscular). Numa forma de realização preferida, o composto é administrado por infusão ou injeção intravenosa. Noutra forma de realização preferida, o composto é administrado por injeção intramuscular ou subcutânea.

As frases "administração parentérica" e "administrado parentericamente" usadas aqui significam modos de administração diferentes de administração entérica e tópica, habitualmente por injeção, e incluem, sem limitação, injeção e infusão intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal,

transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e intraesterno.

Composições farmacêuticas devem tipicamente ser esterilizadas e estáveis nas condições de produção e armazenamento. Uma composição farmacêutica também pode ser testada para assegurar que cumpre padrões regulamentares e industriais para administração. Por exemplo, os níveis de endotoxinas na preparação podem ser testados utilizando o ensaio de lisados de amebócitos de *Limulus* (por exemplo, utilizando o estojo da Bio Whittaker lote # 7L3790, sensibilidade 0,125 EU/mL) de acordo com os métodos USP 24/NF 19. A esterilidade de composições farmacêuticas pode ser determinada utilizando meio de tioglicolato de acordo com os métodos de USP 24/NF 19. Por exemplo, a preparação é utilizada para inocular o meio de tioglicolato e é incubada a 35 °C durante 14 ou mais dias. O meio é periodicamente inspecionado para detetar o crescimento de um microrganismo.

A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, dispersão, lipossoma ou outra estrutura ordenada adequada para uma concentração elevada de fármaco. Soluções injetáveis esterilizadas podem ser preparadas incorporando o composto ativo, na quantidade requerida, num solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, consoante o necessário, seguido de esterilização com filtração. Em geral, dispersões são preparadas incorporando o composto ativo num veículo esterilizado que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes requeridos dos enumerados acima. No caso de pós esterilizados para a preparação de soluções

injetáveis esterilizadas, os métodos de preparação preferidos são secagem por vácuo e liofilização, que origina um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma respectiva solução previamente submetida a filtração esterilizada. A fluidez apropriada de uma solução pode ser mantida, por exemplo, utilizando um revestimento como lecitina, mantendo a dimensão requerida das partículas no caso de dispersão e utilizando tensioativos. Pode ser obtida absorção prolongada de composições injetáveis incluindo na composição um agente que retarda a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

Os domínios de Kunitz poli-PEGuilados descritos aqui podem ser administrados por uma variedade de métodos conhecidos na área. Para muitas aplicações, a via/modo de administração é injeção ou infusão intravenosa. Por exemplo, para aplicações terapêuticas, o composto pode ser administrado por infusão intravenosa a uma taxa menor do que 30, 20, 10, 5 ou 1 mg/minuto para se obter uma dose de cerca de 1 até 100 mg/m₂ ou 7 até 25 mg/m₂. A via e/ou modo de administração irão variar dependendo dos resultados desejados. Em certas formas de realização, o composto ativo pode ser preparado com um transportador que irá proteger o composto contra libertação rápida, como uma formulação de libertação controlada, incluindo implantes, e sistemas de administração microencapsulados. Podem ser utilizados polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, como etileno acetato de vinilo, polianidridos, ácido poliglicólico, colagénio, poliortoésteres e ácido poliláctico. Muitos métodos para a preparação de tais formulações estão patenteados ou são geralmente conhecidos. Ver, por exemplo, "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems",

J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1978. A formulação farmacêutica é uma área bem estabelecida e é adicionalmente descrita em Gennaro (editor), "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20ª edição, Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel *et al.*, "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems", 7ª Edição, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727); e Kibbe (editor), "Handbook of Pharmaceutical Excipients" American Pharmaceutical Association, 3ª edição (2000) (ISBN: 091733096X).

Em certas formas de realização, a composição pode ser administrada oralmente, por exemplo, com um diluente inerte ou um transportador comestível assimilável. O composto (e outros ingredientes, se desejado) também pode ser encerrado numa cápsula de gelatina de invólucro duro ou mole, pode ser comprimido em comprimidos ou incorporado diretamente na dieta do sujeito. Para administração terapêutica oral, o composto pode ser incorporado com excipientes e utilizado na forma de comprimidos aptos a serem ingeridos, comprimidos bucais, trociscos, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, hóstias e semelhantes. Para administrar um composto por uma via diferente de administração parentérica, pode ser necessário revestir o composto ou coadministrar o composto com um material para prevenir a sua inativação.

Composições farmacêuticas podem ser administradas com dispositivos médicos conhecidos na área. Por exemplo, numa forma de realização preferida, uma composição farmacêutica da invenção pode ser administrada com um dispositivo de injeção hipodérmica sem agulha, como os dispositivos

revelados nas Patentes U.S. Nos. 5,399,163, 5,383,851, 5,312,335, 5,064,413, 4,941,880, 4,790,824 ou 4,596,556. Exemplos de implantes e módulos bem conhecidos úteis na presente invenção incluem: Patente U.S. No. 4,487,603, que revela uma bomba de microinfusão implantável para distribuir medicação a uma taxa controlada; Patente U.S. No. 4,486,194, que revela um dispositivo terapêutico para administrar medicamentos através da pele; Patente U.S. No. 4,447,233, que revela uma bomba de infusão de medicação para administrar medicação a uma taxa de infusão precisa; Patente U.S. No. 4,447,224, que revela um aparelho de infusão implantável de fluxo variável para administração contínua de fármacos; Patente U.S. No. 4,439,196, que revela um sistema de distribuição osmótica de fármacos com compartimentos de múltiplas câmaras, e Patente U.S. No. 4,475,196, que revela um sistema de distribuição osmótica de fármacos. Obviamente, são igualmente conhecidos muitos outros de tais implantes, sistemas de distribuição e módulos.

Em certas formas de realização, o composto pode ser formulado para assegurar uma distribuição apropriada *in vivo*. Por exemplo, a barreira hematoencefálica (BBB) exclui muitos compostos altamente hidrofílicos. Para assegurar que os compostos terapêuticos da invenção atravessam a BBB (se desejado), podem ser formulados, por exemplo, em lipossomas. Quanto a métodos de preparação de lipossomas ver, por exemplo, Patentes U.S. 4,522,811; 5,374,548, e 5,399,331. Os lipossomas podem compreender uma ou mais frações que são seletivamente transportadas para o interior de células ou órgãos específicos, desse modo aumentando a distribuição direcionada do fármaco (ver, por exemplo, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685).

Também são contemplados estojos compreendendo um domínio de Kunitz poli-PEGuilado e instruções de utilização, por exemplo, utilização de tratamento, profilática ou de diagnóstico. Numa forma de realização, o estojo inclui (a) o composto, por exemplo, uma composição que inclui o composto, e, opcionalmente, (b) material informativo. O material informativo pode ser descritivo, educativo, de comercialização ou outro material que está relacionado com os métodos descritos aqui e/ou a utilização do composto para os métodos descritos aqui. Por exemplo, no caso de um domínio de Kunitz que inibe a atividade de elastase, o material informativo descreve métodos de administração do composto para reduzir a atividade de elastase ou para tratar ou prevenir uma perturbação pulmonar (por exemplo, CF ou COPD), uma perturbação inflamatória (por exemplo, IBD) ou uma perturbação caracterizada por atividade excessiva de elastase.

Numa forma de realização, o material informativo pode incluir instruções para administrar o composto de um modo adequado, por exemplo, numa dose, forma galénica ou modo de administração adequado (por exemplo, uma dose, forma galénica ou modo de administração descrito aqui). Noutra forma de realização, o material informativo pode incluir instruções para identificar um sujeito adequado, por exemplo, um sujeito humano, por exemplo, um sujeito humano sofrendo ou estando em risco de sofrer de uma perturbação caracterizada por atividade excessiva de elastase. O material informativo pode incluir informações sobre a produção do composto, peso molecular do composto, concentração, prazo de validade, informação sobre o lote ou sítio de produção e assim por diante. A forma do material

informativo dos estojos não está limitada. Em muitos casos, o material informativo, por exemplo, instruções, é proporcionado num modo impresso, por exemplo, um texto, figura e/ou fotografia impressos, por exemplo, uma etiqueta ou folheto impresso. No entanto, o material informativo também pode ser proporcionado noutros formatos, como Braille, material apto a ser lido por um computador, gravação de vídeo ou gravação de áudio. Noutra forma de realização, o material informativo do estojo é uma ligação ou informação de contacto, por exemplo, um endereço físico, endereço de "email", hiperligação, "website" ou número de telefone, onde um utilizador do estojo pode obter informação substantiva sobre o composto e/ou sua utilização nos métodos descritos aqui. Obviamente, o material informativo também pode ser proporcionado em qualquer combinação de formatos.

Para além do composto, a composição do estojo pode incluir outros ingredientes, tais como um solvente ou tampão, um estabilizador ou um conservante e/ou um segundo agente para tratar um estado ou perturbação descrito aqui, por exemplo, uma perturbação pulmonar (por exemplo, CF ou COPD) ou inflamatória (por exemplo, IBD ou RA). Alternativamente, os outros ingredientes podem ser incluídos no estojo mas em composições ou recipientes diferentes dos do composto. Em tais formas de realização, o estojo pode incluir instruções para misturar o composto e os outros ingredientes, ou para utilizar o composto juntamente com os outros ingredientes.

O composto pode ser proporcionado em qualquer forma, por exemplo, forma líquida, seca ou liofilizada. É preferido que o composto seja substancialmente puro e/ou esterilizado. Quando o composto é proporcionado numa

solução líquida, a solução líquida é preferencialmente uma solução aquosa, sendo preferida uma solução aquosa esterilizada. Quando o composto é proporcionado numa forma seca, a reconstituição é geralmente efetuada pela adição de um solvente adequado. O solvente, por exemplo, água ou tampão esterilizado, pode ser opcionalmente proporcionado no estojo.

O estojo pode incluir um ou mais recipientes para a composição que contém o composto. Nalgumas formas de realização, o estojo contém recipientes, divisórias ou compartimentos separados para a composição e material informativo. Por exemplo, a composição pode estar contida numa garrafa, frasco ou seringa e o material informativo pode estar contido numa manga ou bolsa de plástico. Noutras formas de realização, os elementos separados do estojo estão contidos num único recipiente não dividido. Por exemplo, a composição está contida numa garrafa, frasco ou seringa no qual está fixado o material informativo na forma de uma etiqueta. Nalgumas formas de realização, o estojo inclui uma pluralidade (por exemplo, uma embalagem) de recipientes individuais, cada um contendo uma ou mais formas galénicas unitárias (por exemplo, uma forma galénica descrita aqui) do composto. Por exemplo, o estojo inclui uma pluralidade de seringas, ampolas, pacotes de folha metálica ou embalagens alveolares, cada uma contendo uma única dose unitária do composto. Os recipientes dos estojos podem ser estanques ao ar, à prova de água (por exemplo, impermeáveis a alterações da humidade ou evaporação) e/ou opacos.

Numa forma de realização em que o composto contém um polipéptido que se liga a uma elastase, as instruções para

aplicações de diagnóstico incluem a utilização do composto para detetar elastase, *in vitro*, por exemplo, numa amostra, por exemplo, uma biópsia ou células de um paciente com uma perturbação pulmonar, ou *in vivo*. Noutra forma de realização, as instruções para aplicações terapêuticas incluem dosagens e/ou modos de administração sugeridos num paciente com uma perturbação pulmonar. O estojo também pode conter pelo menos um reagente adicional, como um agente de diagnóstico ou terapêutico, por exemplo, um agente de diagnóstico ou terapêutico como descrito aqui, e/ou um ou mais agentes adicionais para tratar a perturbação pulmonar (por exemplo, outro inibidor de elastase), formulados consoante o apropriado, numa ou mais preparações farmacêuticas separadas.

Tratamentos

Um domínio de Kunitz poli-PEGuilado tem aplicações terapêuticas e profiláticas.

Numa forma de realização, um domínio de Kunitz poli-PEGuilado inibe uma elastase, por exemplo, uma elastase de neutrófilos. O composto pode ser administrado a um sujeito para tratar, prevenir e/ou diagnosticar uma variedade de perturbações, tais como doenças caracterizadas por atividade indesejada ou aberrante de elastase. Por exemplo, a doença ou perturbação pode ser caracterizada por atividade elastolítica aumentada de neutrófilos. A doença ou perturbação pode resultar de uma carga aumentada de neutrófilos num tecido, por exemplo, um tecido epitelial, como a superfície epitelial do pulmão. Por exemplo, o polipéptido que inibe elastase pode ser utilizado para tratar ou prevenir doenças pulmonares, tais como fibrose

quística (CF) ou perturbação pulmonar obstrutiva crónica (COPD), por exemplo, enfisema. O composto também pode ser administrado em células, tecidos ou órgãos em cultura, por exemplo, *in vitro* ou *ex vivo*.

Domínios de Kunitz poli-PEGuilados que inibem outras proteases também podem ser utilizados para tratar ou prevenir perturbações associadas à atividade de tais proteases diferentes respetivas.

Como usado aqui, o termo "tratar" ou "tratamento" é definido como a aplicação ou administração a um sujeito, por exemplo, um paciente, de um domínio de Kunitz poli-PEGuilado, isoladamente ou em combinação com um segundo agente, ou aplicação ou administração do agente num tecido ou célula isolado, por exemplo, linha de células, de um sujeito, por exemplo, um paciente, que sofre de uma perturbação (por exemplo, uma perturbação descrita aqui), um sintoma de uma perturbação ou uma predisposição para uma perturbação, com a finalidade de curar, sarar, aliviar, atenuar, alterar, remediar, melhorar, aperfeiçoar ou afetar a perturbação, os sintomas da perturbação ou a predisposição para a perturbação. O tratamento de uma célula refere-se à inibição, ablação, morte de uma célula *in vitro* ou *in vivo* ou então redução da capacidade de uma célula, por exemplo, uma célula aberrante, para mediar uma perturbação, por exemplo, uma perturbação descrita aqui (por exemplo, uma perturbação pulmonar). Numa forma de realização, "tratamento de uma célula" refere-se a uma redução da atividade e/ou proliferação de uma célula, por exemplo, um leucócito ou neutrófilo. Tal redução não indica necessariamente uma eliminação total da célula, mas uma

redução, por exemplo, uma redução estatisticamente significativa, da atividade ou dos números da célula.

Como usado aqui, uma quantidade de um domínio de Kunitz poli-PEGuilado eficaz para tratar uma perturbação ou uma "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade do composto que é eficaz, por administração de uma única ou de múltiplas doses a um sujeito, no tratamento de um sujeito, por exemplo, cura, alívio, atenuação ou melhoria de pelo menos um sintoma de uma perturbação num sujeito num grau para além do esperado na ausência de tal tratamento. Por exemplo, a perturbação pode ser uma perturbação pulmonar, por exemplo, uma perturbação pulmonar descrita aqui.

Uma "quantidade localmente eficaz" refere-se à quantidade (por exemplo, concentração) do composto que é eficaz para modular de modo detetável a atividade de uma proteína alvo (por exemplo, elastase) num tecido, por exemplo, numa região do pulmão exposta a elastase ou uma célula produtora de elastase, tal como um neutrófilo. Evidências da modulação podem incluir, por exemplo, uma quantidade aumentada do substrato, por exemplo, proteólise reduzida da matriz extracelular.

Como usado aqui, uma quantidade de um domínio de Kunitz poli-PEGuilado eficaz para prevenir uma perturbação ou uma "a quantidade profilaticamente eficaz" do composto refere-se a uma quantidade de um composto que se liga a elastase, por exemplo, um composto de polipéptido-polímero descrito aqui, que é eficaz, por administração de uma única ou de múltiplas doses a um sujeito, na prevenção ou retardamento

da ocorrência do surgimento ou recorrência de uma perturbação, por exemplo, uma perturbação pulmonar.

Os termos "induzir", "inibir", "potenciar", "elevar", "aumentar", "diminuir" ou semelhantes, por exemplo, que designam diferenças quantitativas entre dois estados, referem-se a uma diferença, por exemplo, uma diferença estatisticamente significativa (por exemplo, $P < 0,05$, $0,02$ ou $0,005$), entre os dois estados.

Os regimes de dosagem são ajustados para proporcionar a resposta ótima desejada (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo, pode ser administrado um único *bolus*, várias doses divididas podem ser administradas ao longo do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada consoante o indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parentéricas em forma galénica unitária por facilidade de administração e uniformidade da dosagem. Forma galénica unitária, como usado aqui, refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para os sujeitos a serem tratados; cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo, calculada para produzir o efeito terapêutico desejado, associada ao necessário transportador farmacêutico.

Um intervalo exemplificativo e não limitador para uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz de um composto descrito aqui é $0,1-20$ mg/kg, mais preferencialmente $1-10$ mg/kg. O composto pode ser administrado por infusão intravenosa a uma taxa menor do que 20 , 10 , 5 ou 1 mg/minuto para se obter uma dose de cerca de 1 até 50 mg/m² ou cerca de 5 até 20 mg/m². Deve

notar-se que os valores de dosagens podem variar com o tipo e gravidade do estado a ser aliviado. Também deve ser entendido que, para qualquer sujeito particular, os regimes de dosagem específicos devem ser ajustados ao longo do tempo de acordo com a necessidade individual e a avaliação profissional da pessoa que administra ou supervisiona a administração das composições, e que os intervalos de dosagem apresentados aqui são apenas exemplificativos.

Uma composição farmacêutica pode incluir uma "quantidade terapêuticamente eficaz" ou uma "quantidade profilaticamente eficaz" de um composto descrito aqui, por exemplo, um composto que inclui um polipéptido que se liga e inibe uma protease (por exemplo, elastase). Uma "quantidade terapêuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens e durante períodos de tempo necessários, para atingir o resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapêuticamente eficaz da composição pode variar de acordo com fatores tais como o estado de doença, idade, sexo e peso do indivíduo, e a capacidade do composto para induzir uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapêuticamente eficaz também é tal que quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais da composição são ultrapassados pelos efeitos terapêuticamente benéficos. Uma "dosagem terapêuticamente eficaz" preferencialmente inibe um parâmetro mensurável, por exemplo, um aumento da função pulmonar, relativamente a sujeitos não tratados. A capacidade de um composto para inibir um parâmetro mensurável pode ser avaliada num sistema de modelo animal que prevê a eficácia numa perturbação humana. Alternativamente, esta propriedade de uma composição pode ser avaliada examinando a capacidade do composto para

inibir, tal inibição *in vitro*, por ensaios conhecidos do profissional, por exemplo, um ensaio descrito aqui.

Uma "quantidade profilaticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens e durante períodos de tempo necessários, para atingir o resultado profilático desejado. Tipicamente, uma vez que uma dose profilática é utilizada em sujeitos antes ou numa fase precoce da doença, a quantidade profilaticamente eficaz pode ser menor do que a quantidade terapêuticamente eficaz.

Como usado aqui, o termo "sujeito" destina-se a incluir sujeitos humanos e animais não humanos. O termo "animais não humanos" da invenção inclui todos os vertebrados, por exemplo, não mamíferos (como galinhas, anfíbios, répteis) e mamíferos, como primatas não humanos, ovelhas, cão, vaca, porco, etc.

Numa forma de realização, o sujeito é um sujeito humano. Alternativamente, o sujeito pode ser um mamífero não humano que expressa uma elastase de neutrófilos humanos ou uma proteína endógena de elastase de neutrófilos não-humanos ou um antígeno do tipo elastase com o qual um composto de ligação a elastase reage de forma cruzada. Um composto da invenção pode ser administrado a um sujeito humano para fins terapêuticos (discutidos adicionalmente abaixo). Além disso, um composto de ligação a elastase pode ser administrado a um mamífero não humano que expressa o antígeno do tipo elastase ao qual o composto se liga (por exemplo, um primata, porco ou ratinho) para fins veterinários ou como um modelo animal de doença humana. Relativamente ao último, tais modelos animais podem ser

úteis para avaliar a eficácia terapêutica do composto (por exemplo, teste de dosagens e períodos de administração).

O presente método pode ser utilizado em células em cultura, por exemplo, *in vitro* ou *ex vivo*. O método pode ser implementado em células presentes num sujeito, como parte de um protocolo *in vivo* (por exemplo, terapêutico ou profilático). Para formas de realização *in vivo*, o passo de contacto é efetuado num sujeito e inclui administrar ao sujeito o composto de ligação a elastase em condições eficazes para permitir a ligação do composto a um alvo (por exemplo, uma elastase) no sujeito.

Os compostos que inibem elastase podem reduzir degradação mediada por elastase e suas sequelas, como infeção e inflamação persistentes, conducentes a destruição de tecido (por exemplo, destruição de epitélio das vias aéreas).

Métodos de administração de compostos são descritos em "Composições farmacêuticas". Dosagens adequadas dos compostos utilizados dependerão da idade e peso do sujeito e do fármaco particular utilizado. Os compostos podem ser utilizados como agentes competitivos para inibir, reduzir uma interação indesejável, por exemplo, entre um agente natural ou patológico e a elastase, por exemplo, entre a matriz extracelular e elastase.

Numa forma de realização, os compostos são utilizados para matar ou efetuar a ablação de células que expressam elastase *in vivo*. Os compostos podem ser utilizados por si próprios ou conjugados a um agente, por exemplo, um fármaco citotóxico, radioisótopo. Este método inclui: administrar o

composto, isoladamente ou ligado a um fármaco citotóxico, a um sujeito necessitado de tal tratamento.

Os termos "agente citotóxico" e "agente citostático" referem-se a agentes que têm a propriedade de inibir o crescimento ou proliferação (por exemplo, um agente citostático) ou de induzir a morte de células.

Um domínio de Kunitz poli-PEGuilado também pode ser utilizado para administrar uma variedade de fármacos, incluindo fármacos terapêuticos, um composto que emite radiação, moléculas de plantas, de origem fúngica ou bacteriana, proteínas biológicas e respectivas misturas. Por exemplo, o domínio de Kunitz pode ser utilizado para dirigir a carga útil para uma região de um sujeito que inclui uma protease que interage especificamente com o domínio de Kunitz.

Toxinas enzimaticamente ativas e respectivos fragmentos são exemplificados pelo fragmento da toxina da difteria A, fragmentos ativos não de ligação da toxina da difteria, exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia de ricina A, cadeia de abrina A, cadeia de modicina A, α -sacrina, certas proteínas de *Aleurites fordii*, certas proteínas Diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAP, PAPII e PAP-S), inibidor de *Morodica charantia*, curcina, crotina, inibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogilina, restrictocina, fenomicina e enomicina. Procedimentos de preparação de polipéptidos enzimaticamente ativos das imunotoxinas são descritos em WO 84/03508 e WO 85/03508. Exemplos de frações citotóxicas que podem ser conjugadas aos anticorpos incluem adriamicina, clorambucil, daunomicina, metotrexato, neocarzinostatina e platina.

No caso de toxinas polipeptídicas, técnicas de ácidos nucleicos recombinantes podem ser utilizadas para construir um ácido nucleico que codifica o polipéptido incluindo um domínio de Kunitz e a citotoxina (ou um respetivo componente polipeptídico) na forma de fusões de tradução. O ácido nucleico recombinante é então expresso, por exemplo, em células, e o polipéptido de fusão codificado é isolado. Seguidamente, a proteína de fusão é fisicamente associada a uma fração que aumenta o peso molecular do composto, por exemplo, para estabilizar a semivida *in vivo*, e depois é ligada a uma fração (por exemplo, um polímero).

Procedimentos de conjugação de proteínas aos agentes citotóxicos foram previamente descritos. Para a conjugação de clorambucil a proteínas ver, por exemplo, Flechner (1973) *European Journal of Cancer*, 9:741-745; Ghose *et al.* (1972) *British Medical Journal*, 3:495-499, e Szekerke, *et al.* (1972) *Neoplasma*, 19:211-215. Para conjugação de daunomicina e adriamicina a proteínas ver, por exemplo, Hurwitz, E. *et al.* (1975) *Cancer Research*, 35:1175-1181 e Arnon *et al.* (1982) *Cancer Surveys*, 1:429-449. Para a preparação de conjugados proteína-ricina ver, por exemplo, U.S. 4,414,148 e por Osawa, T., *et al.* (1982) *Cancer Surveys*, 1:373-388 e as referências aí citadas. Procedimentos de acoplamento também como descritos em EP 226 419.

Também é revelado um método de morte ou ablação, que envolve utilizar o composto para profilaxia. Por exemplo, estes materiais podem ser utilizados para prevenir ou retardar o desenvolvimento ou progressão de uma doença pulmonar.

A utilização dos métodos terapêuticos da presente invenção para tratar doenças pulmonares tem alguns benefícios. Uma vez que a porção polipeptídica do composto reconhece especificamente a elastase, outros tecidos são poupados e níveis elevados do agente são distribuídos diretamente no sítio onde é necessária a terapia. O tratamento de acordo com a presente invenção pode ser eficazmente monitorizado com parâmetros clínicos. Alternativamente, estes parâmetros podem ser utilizados para indicar quando tal tratamento deve ser empregue.

Perturbações Pulmonares e Métodos e Formulações

Polipéptidos inibidores da hNE que estão fisicamente associados a uma fração (por exemplo, um polímero) podem ser utilizados para tratar perturbações pulmonares tais como enfisema, fibrose quística, COPD, bronquite, hipertensão pulmonar, síndrome da dificuldade respiratória aguda, doença pulmonar intersticial, asma, intoxicação por fumo, displasia broncopulmonar, pneumonia, lesão térmica e rejeição de transplante pulmonar.

Fibrose Quística. Fibrose quística (CF) é uma doença genética que afeta aproximadamente 30 000 crianças e adultos nos Estados Unidos. Um defeito no gene de CF faz com que o corpo produza um muco anormalmente espesso e pegajoso que obstrui os pulmões e conduz a infecções pulmonares com risco de vida. Um diagnóstico da perturbação genética inclui uma prova de suor que pode incluir medir a concentração de cloreto em suor recolhido em gaze ou papel de filtro, medir a concentração de sódio em suor recolhido em gaze ou papel de filtro, e distribuição de pilocarpina e

densidade de corrente numa recolha de suor. O gene que causa CF foi identificado e algumas mutações do gene são conhecidas.

Numa forma de realização, um polipéptido inibidor da hNE que é fisicamente associado a uma fração (por exemplo, um polímero) é utilizado para melhorar pelo menos um sintoma de CF, por exemplo, para reduzir lesões pulmonares nos pulmões de um paciente com CF.

Este composto também pode ser utilizado para melhorar pelo menos um sintoma de uma doença pulmonar obstrutiva crónica (COPD). Enfisema, juntamente com bronquite crónica, faz parte de doença pulmonar obstrutiva crónica (COPD). É uma doença pulmonar grave e é progressiva, ocorrendo habitualmente em pacientes idosos. COPD causa superdilatação de estruturas nos pulmões conhecidas como alvéolos ou sacos aéreos. As paredes dos alvéolos sofrem rutura, causando uma diminuição da capacidade respiratória dos pulmões. Os pacientes que sofrem desta doença podem primeiramente sofrer de falta de fôlego e tosse. Um índice clínico para a avaliação de COPD é o índice destrutivo, uma medida de danos no septo alveolar e enfisema, e foi proposto como índice de sensibilidade de destruição pulmonar que reflete de perto anormalidades funcionais, especialmente perda de retrocesso elástico. Ver, por exemplo, *Am Rev Respir Dis* 1991 Jul;144(1):156-9. O composto pode ser utilizado para reduzir o índice destrutivo num paciente, por exemplo, uma quantidade estatisticamente significativa, por exemplo, pelo menos 10, 20, 30 ou 40 % ou pelo menos dentro de 50, 40, 30 ou 20 % do normal de um indivíduo de idade correspondente e do mesmo sexo.

Num aspeto, a invenção proporciona uma composição que compreende um domínio de Kunitz poli-PEGuilado como definido nas reivindicações, que é um inibidor da hNE, para tratamento de uma perturbação pulmonar (por exemplo, fibrose quística, COPD). A composição pode ser formulada para inalação ou outro modo de administração pulmonar. Em conformidade, os compostos descritos aqui podem ser administrados por inalação em tecido pulmonar. O termo "tecido pulmonar", como usado aqui, refere-se a qualquer tecido do trato respiratório e inclui o trato respiratório superior e inferior, exceto quando indicado em contrário. Um polipéptido inibidor da hNE que está fisicamente associado a uma fração (por exemplo, um polímero) pode ser administrado em combinação com uma ou mais das modalidades existentes de tratamento de doenças pulmonares.

Num exemplo, o composto é formulado para um nebulizador. Numa forma de realização, o composto pode ser armazenado numa forma liofilizada (por exemplo, à temperatura ambiente) e reconstituído em solução antes da inalação. Noutra forma de realização, o composto é armazenado a um pH ácido (por exemplo, um pH menor do que 5, 4 ou 3) e depois é combinado com um tampão neutralizador, possuindo um pH básico, antes da inalação.

Também é possível formular o composto para inalação utilizando um dispositivo médico, por exemplo, um inalador. Ver, por exemplo, U.S. 6,102,035 (um inalador de pó) e 6,012,454 (um inalador de pó seco). O inalador pode incluir compartimentos separados para o composto ativo a um pH ácido e o tampão neutralizador e um mecanismo para combinar o composto com um tampão neutralizador

imediatamente antes da atomização. Numa forma de realização, o inalador é um inalador de dose calibrada.

Os três sistemas comuns utilizados para administrar fármacos localmente nas passagens aéreas pulmonares incluem inaladores de pó seco (DPIs), inaladores de dose calibrada (MDIs) e nebulizadores. Os MDIs, o método mais popular de administração por inalação, podem ser utilizados para administrar medicamentos numa forma solubilizada ou como uma dispersão. Tipicamente, os MDIs compreendem um Fréon ou outro impulsor de pressão de vapor relativamente elevada que força a medicação aerossolizada para o interior do trato respiratório por ativação do dispositivo. Ao contrário dos MDIs, em geral os DPIs baseiam-se inteiramente nos esforços de inspiração do paciente para introduzir nos pulmões um medicamento numa forma de pó seco. Os nebulizadores formam um aerossol medicamentoso a ser inalado conferindo energia a uma solução líquida. Também tem sido explorada a administração pulmonar direta de fármacos durante ventilação líquida ou lavagem pulmonar utilizando um meio fluoroquímico. Estes e outros métodos podem ser utilizados para administrar um polipéptido inibidor da hNE que está fisicamente associado a uma fração (por exemplo, um polímero).

Por exemplo, para administração por inalação, um domínio de Kunitz poli-PEGuilado que inibe a hNE é administrado na forma de uma pulverização de aerossol a partir de um recipiente ou distribuidor pressurizado que contém um impulsor apropriado, ou de um nebulizador. O composto pode estar na forma de uma partícula seca ou de um líquido. Partículas que incluem o composto podem ser preparadas, por exemplo, por secagem por pulverização, por secagem de uma

solução aquosa do domínio de Kunitz poli-PEGuilado que inibe a hNE com um agente neutralizador de carga e depois criando partículas a partir do pó seco, ou por secagem de uma solução aquosa num modificador orgânico e depois criando partículas a partir do pó seco.

O composto pode ser convenientemente administrado na forma de uma apresentação de pulverização de aerossol a partir de embalagens pressurizadas ou de um nebulizador, utilizando um impulsor adequado, por exemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dielilorotetrafluoroctilano, dióxido de carbono ou outro gás adequado. No caso de um aerossol pressurizado, a unidade de dosagem pode ser determinada proporcionando uma válvula para distribuir uma quantidade calibrada. Podem ser formuladas cápsulas e cartuchos para utilização num inalador ou insuflador contendo uma mistura em pó do domínio de Kunitz poli-PEGuilado que inibe a hNE e uma base em pó adequada, tal como lactose ou amido, se a partícula for uma partícula formulada. Para além do composto formulado ou não formulado, outros materiais, tais como 100 % DPPC ou outros tensioativos, podem ser misturados com o domínio de Kunitz poli-PEGuilado que inibe a hNE para promover a distribuição e dispersão do composto formulado ou não formulado. Métodos de preparação de partículas secas são descritos, por exemplo, na Publicação PCT WO 02/32406.

O domínio de Kunitz poli-PEGuilado que inibe a hNE, por exemplo, na forma de partículas de aerossol seco, quando administrado, pode ser rapidamente absorvido e pode produzir um resultado terapêutico local ou sistémico rápido. A administração pode ser ajustada para proporcionar atividade detetável em 2 minutos, 5 minutos, 1 hora ou 3

horas após a administração. Nalgumas formas de realização, a atividade máxima pode ser atingida ainda mais rapidamente, por exemplo, em meia hora ou mesmo em dez minutos. Alternativamente, um domínio de Kunitz poli-PEGuilado que inibe a hNE pode ser formulado de modo a ter uma semivida biológica mais longa e pode ser utilizado como alternativa a outros modos de administração, por exemplo, de modo que o composto entra na circulação a partir do pulmão e é distribuído noutros órgãos ou num órgão alvo particular.

Numa forma de realização, um domínio de Kunitz poli-PEGuilado que inibe a hNE é distribuído numa quantidade tal que pelo menos 5 % da massa do polipéptido é administrada no trato respiratório inferior ou no pulmão profundo. O pulmão profundo tem uma rede capilar extremamente rica. A membrana respiratória que separa o lúmen capilar do espaço aéreo alveolar é muito fina ($\leq 6 \mu\text{m}$) e extremamente permeável. Adicionalmente, a camada líquida que reveste a superfície alveolar é rica em tensioativos pulmonares. Noutras formas de realização, pelo menos 2 %, 3 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % ou 80 % da composição de um domínio de Kunitz poli-PEGuilado que inibe a hNE são distribuídos no trato respiratório inferior ou no pulmão profundo. A distribuição num ou nestes dois tecidos conduz a uma absorção eficiente do composto e elevada biodisponibilidade. Numa forma de realização, o composto é proporcionado numa dose calibrada utilizando, por exemplo, um inalador ou nebulizador. Por exemplo, o composto é administrado numa forma galénica unitária de pelo menos cerca de 0,02, 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2, 5, 10, 20, 40 ou 50 mg/aspiração ou mais.

A biodisponibilidade percentual pode ser calculada do modo seguinte: a biodisponibilidade percentual = $(ADC_{\text{não invasivo}}/ADC_{\text{i.v. ou s.c.}}) \times (dose_{\text{i.v. ou s.c.}}/dose_{\text{não invasivo}}) \times 100$.

Apesar de não ser necessário, intensificadores da distribuição, tais como tensioativos, podem ser utilizados para intensificar adicionalmente a distribuição pulmonar. Um "tensioativo", como usado aqui, refere-se a um composto possuindo uma fração hidrofílica e lipofílica, que promove a absorção de um fármaco ao interagir com uma interface entre duas fases imiscíveis. Os tensioativos são úteis nas partículas secas por vários motivos, por exemplo, redução da aglomeração das partículas, redução da fagocitose por macrófagos, etc. Quando acoplado a um tensioativo pulmonar pode ser obtida uma absorção mais eficiente do composto porque os tensioativos, como DPPC, irão facilitar muito a difusão do composto. Os tensioativos são bem conhecidos na área e incluem mas não estão limitados a fosfoglicéridos, por exemplo, fosfatidilcolinas, dipalmitoil-L-alfa-fosfatidilcolina (DPPC) e difosfatidilglicerol (DPPG); hexadecanol; ácidos gordos; polietilenoglicol (PEG); polioxietileno-9-; éter de laurilo; ácido palmítico; ácido oleico; trioleato de sorbitano (Span 85); glicocolato; surfactina; poloxâmero; éster de ácido gordo e sorbitano; trioleato de sorbitano; tiloxapol, e fosfolípidos.

IBD e Respetivos Métodos e Formulações

Numa forma de realização, um domínio de Kunitz poli-PEGuilado que inibe a hNE é utilizado para melhorar pelo menos um sintoma de uma doença inflamatória do intestino, por exemplo, colite ulcerativa ou doença de Crohn.

Doenças inflamatórias do intestino (IBD) são geralmente inflamações intestinais crônicas recorrentes. IBD refere-se a duas perturbações distintas, doença de Crohn e colite ulcerativa (UC). Ambas as doenças podem envolver uma resposta imunológica desregulada a antígenos do trato GI, uma quebra na barreira mucosa e/ou uma reação inflamatória adversa a uma infecção intestinal persistente (ver, por exemplo, MacDermott, R. P., *J Gastroenterology*, 31:907-916 (1996)).

Em pacientes com IBD, úlceras e inflamação do revestimento interno dos intestinos conduzem a sintomas de dor abdominal, diarreia e hemorragia retal. A colite ulcerativa ocorre no intestino grosso ao passo que, em doença de Crohn, a doença pode envolver todo o trato GI bem como os intestinos delgado e grosso. Para a maior parte dos pacientes, a IBD é um estado crônico com sintomas que perduram durante meses até anos. Os sintomas clínicos de IBD são hemorragia retal intermitente, dor abdominal com câibras, perda de peso e diarreia. O diagnóstico de IBD baseia-se nos sintomas clínicos, na utilização de um enema de bário, mas a visualização direta (sigmoidoscopia ou colonoscopia) é o teste mais rigoroso.

Os sintomas de IBD incluem, por exemplo, dor abdominal, diarreia, hemorragia retal, perda de peso, febre, perda de apetite e outras complicações mais graves, tais como desidratação, anemia e desnutrição. Alguns desses sintomas estão sujeitos a análise quantitativa (por exemplo perda de peso, febre, anemia, etc.). Alguns sintomas são facilmente determinados a partir de um teste sanguíneo (por exemplo, anemia) ou um teste que deteta a presença de sangue (por exemplo, hemorragia retal). Também pode ser utilizado um

índice clínico para monitorizar IBD, como o Índice Clínico de Atividade de Colite Ulcerativa. Ver também, por exemplo, Walmsley *et al.* Gut. 1998 Jul;43(1):29-32 e Jowett *et al.* (2003) Scand J Gastroenterol. 38(2):164-71.

Numa forma de realização, a administração do composto a um sujeito sofrendo ou com predisposição para sofrer de colite ulcerativa causa melhoria do índice, por exemplo, uma alteração estatisticamente significativa do índice. O composto inclui um polipéptido inibidor da hNE que está fisicamente associado a uma fração (por exemplo, um polímero hidrofílico).

Numa forma de realização, a administração do composto a um sujeito sofrendo ou com predisposição para sofrer de IBD causa melhoria de pelo menos um sintoma de IBD.

A doença de Crohn, uma doença inflamatória do intestino idiopática, é caracterizada por inflamação crónica em vários sítios do trato gastrointestinal. Não obstante a doença de Crohn afetar muito habitualmente o íleo distal e cólon, pode manifestar-se em qualquer parte do trato gastrointestinal, desde a boca até ao ânus e área perianal. O prognóstico e diagnóstico de doença de Crohn podem ser medidos usando um índice clínico, por exemplo, Índice de Atividade de Doença de Crohn. Ver, por exemplo, American Journal of Natural Medicine, julho/agosto 1997, e Best WR, *et al.*, "Development of a Crohn's disease activity index." Gastroenterology 70:439-444, 1976. Numa forma de realização, a administração do composto a um sujeito sofrendo ou com predisposição para sofrer de doença de Crohn causa melhoria do índice, por exemplo, uma alteração

estatisticamente significativa do índice, ou melhoria de pelo menos um sintoma de doença de Crohn.

Em conformidade, também é proporcionada uma composição que inclui um domínio de Kunitz poli-PEGuilado que inibe a hNE para o tratamento de uma doença intestinal (por exemplo, uma colite, tal como colite ulcerativa, doença de Crohn ou IBP) ou outra doença gastrointestinal ou retal. A composição pode ser formulada como um supositório. Supositórios podem ser formulados com ingredientes de base, tais como ceras, óleos e álcoois gordos, com características de permanecerem no estado sólido à temperatura ambiente e fundindo a temperaturas corporais. Os ingredientes ativos desta invenção, com ou sem ingredientes terapêuticos opcionais, como hidrocortisona (1,0 %), anestésicos tópicos, como benzocaína (1,0 até 6,0 %) ou outros já listados, podem ser preparados a valores apropriados de pH, por exemplo, pH 5, álcoois gordos líquidos, como álcool oleílico (gama 45 % até 65 %) ou álcoois gordos sólidos de cadeia mais longa, como álcool de cetilo ou estearilo (30 % até 50 %). Os ingredientes de base são bem conhecidos na área desta indústria. Ver, por exemplo, U.S. 4,945,084 e 5,196,405.

A composição também pode ser utilizada como ingrediente ativo em cremes, loções, unguentos, pulverizações, compressas, emplastros, enemas, espumas e supositórios e outros, ou em veículos de distribuição, como microencapsulação em lipossomas ou glicoesferas. Outras tecnologias de distribuição incluem microesponjas ou a membrana celular substituta (Completech™), que encerram os ingredientes ativos por motivos de proteção e libertação mais lenta. Espumas retais que podem ser preparadas como

composições de aerossol tópicas também podem ser utilizadas, por exemplo, para tratamento (colite ulcerativa, colite de Crohn e outras).

Utilizações de Diagnóstico

Um domínio de Kunitz poli-PEGuilado tem aplicações de diagnóstico.

Num aspeto, a presente revelação proporciona um método de diagnóstico para detetar a presença de uma proteína elastase, *in vitro* (por exemplo, uma amostra biológica, como tecido, biopsia) ou *in vivo* (por exemplo, imagiologia *in vivo* num sujeito). O método inclui: (i) contactar uma amostra com um domínio de Kunitz poli-PEGuilado, por exemplo, um domínio de Kunitz que se liga a uma protease alvo, por exemplo, elastase, plasmina ou calicreína, e (ii) detetar a formação de um complexo entre o ligando de elastase e a amostra. O método também pode incluir contactar uma amostra de referência (por exemplo, uma amostra de controlo) com o ligando, e determinar a extensão da formação do complexo entre o ligando e a amostra relativamente ao mesmo para a amostra de referência. Uma alteração, por exemplo, uma alteração estatisticamente significativa, na formação do complexo na amostra ou sujeito relativamente à amostra ou sujeito de controlo pode indicar a presença de elastase na amostra.

Outro método inclui: (i) administrar o composto a um sujeito, e (iii) detetar a formação de um complexo entre o composto e a protease alvo. A deteção pode incluir determinar a localização ou altura da formação do complexo.

O composto pode ser etiquetado, direta ou indiretamente, com uma substância detetável para facilitar a deteção do anticorpo ligado ou não ligado. Substâncias detetáveis adequadas incluem várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes e materiais radioativos.

A formação de um complexo entre o composto e protease alvo pode ser detetada medindo ou visualizando o ligando ligado à protease alvo ou ligando não ligado. Podem ser utilizados ensaios de deteção convencionais, por exemplo, um ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA), um radioimunoensaio (RIA) ou imuno-histoquímica tecidual. Para além da etiquetagem do composto, a presença da protease alvo pode ser avaliada numa amostra por um imunoensaio de competição utilizando padrões etiquetados com uma substância detetável e um ligando de protease não etiquetado. Num exemplo deste ensaio, a amostra biológica, os padrões etiquetados e o composto são combinados e determina-se a quantidade de padrão etiquetado ligado ao ligando não etiquetado. A quantidade de protease alvo presente na amostra é inversamente proporcional à quantidade de padrão etiquetado ligado ao composto.

Podem ser preparados ligandos de proteínas etiquetados com fluoróforos e cromóforos. Uma variedade de agentes fluorescentes e cromóforos adequados é descrita por Stryer (1968) *Science*, 162:526 e Brand, L. et al. (1972) *Annual Review of Biochemistry*, 41:843-868. Os ligandos de proteínas podem ser etiquetados com grupos cromóforos fluorescentes por procedimentos convencionais, como os revelados nas Patentes U.S. Nos. 3,940,475, 4,289,747, e 4,376,110. Um grupo de agentes fluorescentes com algumas

das propriedades desejáveis descritas acima é o dos corantes de xanteno, que incluem as fluoresceínas e rodaminas. Outro grupo de compostos fluorescentes consiste nas naftilaminas. Depois de etiquetado com um fluoróforo ou cromóforo, o ligando de proteína pode ser utilizado para detetar a presença ou localização da protease alvo numa amostra, por exemplo, utilizando microscopia fluorescente (como microscopia confocal ou de desconvolução).

Séries de Proteínas. O composto também pode ser imobilizado numa série de proteínas. A série de proteínas pode ser utilizada como ferramenta de diagnóstico, por exemplo, para rastrear amostras médicas (como células isoladas, sangue, soros, biópsias e semelhantes). Métodos de produção de séries de polipéptidos são descritos, por exemplo, acima.

Imagiologia *In vivo*. Ainda noutra forma de realização, a revelação proporciona um método para detetar a presença de uma protease alvo ou de um tecido que expressa uma protease alvo *in vivo*. O método inclui (i) administrar a um sujeito (por exemplo, um paciente com uma perturbação pulmonar ou respiratória) um composto que inclui um domínio de Kunitz e que está poliPEGuilado, conjugado a um marcador detetável; (ii) expor o sujeito a um meio para detetar o referido marcador detetável nos tecidos ou células que expressam a protease alvo. Por exemplo, o sujeito é submetido a imagiologia, por exemplo, por NMR ou outros meios tomográficos.

Exemplos de etiquetas úteis para imagiologia de diagnóstico de acordo com a presente invenção incluem etiquetas radioativas, tais como ^{131}I , ^{111}In , ^{123}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{32}P , ^{125}I , ^3H , ^{14}C e ^{188}Rh , etiquetas fluorescentes, tais como fluoresceína

e rodamina, etiquetas ativas por ressonância magnética nuclear, isótopos emissores de positrões detetáveis por um dispositivo de varrimento de tomografia por emissão de positrões ("PET"), agentes quimioluminescentes, tais como luciferina, e marcadores enzimáticos, tais como peroxidase ou fosfatase. Também podem ser empregues emissores de radiação de curto alcance, como isótopos detetáveis por sondas detetoras de curto alcance. O composto que inclui o domínio de Kunitz pode ser etiquetado com tais reagentes utilizando técnicas conhecidas. Por exemplo, ver Wensel e Meares (1983) "Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy", Elsevier, Nova Iorque, quanto a técnicas relacionadas com a etiquetagem radioativa de proteínas e D. Colcher *et al.* (1986) *Meth. Enzymol.* 121: 802-816.

Um composto etiquetado de modo radioativo desta invenção também pode ser utilizado para testes de diagnóstico *in vitro*. A atividade específica de um composto etiquetado de modo isotópico depende da semivida, da pureza isotópica da etiqueta radioativa e do modo como a etiqueta é incorporada no composto.

Procedimentos de etiquetagem de polipéptidos (por exemplo, a porção polipeptídica do composto) com os isótopos radioativos (tais como ^{14}C , ^3H , ^{35}S , ^{125}I , ^{32}P , ^{131}I) são genericamente conhecidos. Por exemplo, procedimentos de etiquetagem com trítio são descritos na Patente U.S. No. 4,302,438. Procedimentos de iodação, etiquetagem com trítio e etiquetagem com ^{35}S , por exemplo, adaptados para anticorpos monoclonais murinos, são descritos, por exemplo, por Goding, J.W. ("Monoclonal antibodies: principles and practice: production and application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry, and immunology",

2ª edição Londres; Orlando: Academic Press, 1986. páginas 124-126) e nas referências aí citadas. Outros procedimentos de iodação de polipéptidos são descritos por Hunter e Greenwood (1962) *Nature* 144:945, David et al. (1974) *Biochemistry* 13:1014-1021, e Patentes U.S. Nos. 3,867,517 e 4,376,110. Elementos de etiquetagem radioativa que são úteis em imagiologia incluem ^{123}I , ^{131}I , ^{111}In e $^{99\text{m}}\text{Tc}$, por exemplo. Procedimentos de iodação de polipéptidos são descritos por Greenwood, F. et al. (1963) *Biochem. J.* 89:114-123; Marchalonis, J. (1969) *Biochem. J.* 113:299-305; e Morrison, M. et al. (1971) *Immunochemistry* 289-297. Procedimentos de etiquetagem com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ são descritos por Rhodes, B. et al. em Burchiel, S. et al. (editores), "Tumor Imaging: The Radioimmunochemical Detection of Cancer", Nova Iorque: Masson 111-123 (1982) e nas referências aí citadas. Procedimentos adequados para a etiquetagem de anticorpos com ^{111}In são descritos por Hnatowich, D.J. et al. (1983) *J. Immunol. Methods*, 65: 147-157, Hnatowich, D. et al. (1984) *J. Applied Radiation*, 35:554-557, e Buckley, R. G. et al. (1984) *F.E.B.S.* 166: 202-204.

No caso de um composto etiquetado de modo radioativo, o composto é administrado ao paciente, é localizado no tecido do antígeno com o qual o composto interage e é detectado ou "captada a sua imagem" *in vivo* utilizando técnicas conhecidas, tais como varrimento radionuclear utilizando, por exemplo, uma câmara gama ou tomografia por emissão. Ver, por exemplo, A.R. Bradwell et al., "Developments in Antibody Imaging", "Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy", R.W. Baldwin et al., (editores), páginas 65-85 (Academic Press 1985). Alternativamente, pode ser utilizado um dispositivo de varrimento de tomografia transaxial por emissão de positrões, como o designado Pet

VI localizado no Brookhaven National Laboratory, em que a etiqueta radioativa emite positrões (por exemplo, ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O e ^{13}N).

Agentes de Contraste de MRI. A Imagiologia por Ressonância Magnética (MRI) emprega NMR para visualizar características internas de um sujeito vivo, e é útil para prognóstico, diagnóstico, tratamento e cirurgia. A MRI pode ser utilizada sem compostos marcadores radioativos, o que é um benefício óbvio. Algumas técnicas de MRI são resumidas em EP-A-0 502 814. Em geral, as diferenças relacionadas com constantes de tempo de relaxação T1 e T2 de prótons da água em ambientes diferentes são utilizadas para gerar uma imagem. No entanto, estas diferenças podem ser insuficientes para proporcionar imagens nítidas de alta resolução.

As diferenças nestas constantes de tempos de relaxação podem ser intensificadas por agentes de contraste. Exemplos de tais agentes de contraste incluem alguns agentes magnéticos, agentes paramagnéticos (que alteram principalmente T1) e ferromagnéticos ou superparamagnéticos (que alteram principalmente a resposta de T2). Podem ser utilizados quelatos (por exemplo, quelatos de EDTA, DTPA e NTA) para ligar (e reduzir a toxicidade) de algumas substâncias paramagnéticas (por exemplo, Fe^{+3} , Mn^{+2} , Gd^{+3}). Outros agentes podem estar na forma de partículas, por exemplo, com um diâmetro menor do que 10 μm até cerca de 10 nM. As partículas podem ter propriedades ferromagnéticas, antiferromagnéticas ou superparamagnéticas. As partículas podem incluir, por exemplo, magnetite (Fe_3O_4), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, ferrites, e outros compostos minerais magnéticos de elementos de transição. Partículas magnéticas podem

incluir: um ou mais cristais magnéticos com e sem material não magnético. O material não magnético pode incluir polímeros sintéticos ou naturais (tais como sefarose, dextrano, dextrina, amido e semelhantes).

Os compostos também podem ser etiquetados com um grupo indicador contendo o átomo ^{19}F ativo em NMR ou uma pluralidade de tais átomos, visto que (i) substancialmente todos os átomos de flúor naturalmente abundantes são o isótopo ^{19}F e, assim, substancialmente todos os compostos contendo flúor são ativos em NMR; (ii) muitos compostos polifluorados quimicamente ativos, como anidrido trifluoroacético, estão disponíveis no mercado com um custo relativamente baixo, e (iii) verificou-se que muitos compostos fluorados são medicamente aceitáveis para utilização em humanos, como os poliéteres perfluorados utilizados para transportar oxigênio como substitutos de hemoglobina. Depois de permitir um tal tempo de incubação é realizada uma MRI de corpo completo utilizando um aparelho como um dos descritos por Pykett (1982) *Scientific American*, 246:78-88 para localizar e proceder à imagiologia de tecidos cancerosos.

Também são contemplados estojos compreendendo o composto que se liga a uma protease alvo e instruções de utilização, por exemplo, a utilização do composto (por exemplo, domínio de Kunitz poli-PEGuilado) para detetar a protease alvo, *in vitro*, por exemplo, numa amostra, por exemplo, uma biopsia ou células de um paciente com uma perturbação pulmonar, ou *in vivo*, por exemplo, por imagiologia de um sujeito. O estojo também pode conter pelo menos um reagente adicional, como uma etiqueta ou agente de

diagnóstico adicional. Para utilização *in vivo*, o composto pode ser formulado como uma composição farmacêutica.

Uma sequência de aminoácidos exemplificativa de uma elastase de neutrófilos humanos:

(Também listada na GenBank® com a referência: gi|4503549|ref|NP_001963.1| elastase 2, neutrófilo [*Homo sapiens*])

```

NTLGRRLACIPLACVLPALLGGTALASEIVGERRASPHANPFMVSLLQAGGHFCGATLIAPNPFYMSAAH
CVANFNVRAVRRVVLGAMNLSRREPTROVFVORIFENGYDPVHLINDIVYLQDLSATINAVQVAQLPA
QGERLNGVQCILAMGNLLGRNRGIASVLLQELNVTIVTSLCRRSNVCTLVGRQAGVCFQDSGSLVLCNG
LINGIASFYRGGCASGLYPDAFAPVAQFVNHIDEIIGREEDNFCPPHPRSPDPASRTN (SER NO:22)

```

Os seguintes exemplos ilustram adicionalmente aspectos da invenção:

Exemplo

Péptidos e pequenas proteínas são rapidamente eliminados da circulação *in vivo*. É frequente a eliminação rápida limitar muito a potência terapêutica. São necessárias doses elevadas e administração frequente para se obterem efeitos terapêuticos.

O DX-890 consiste em 56 aminoácidos, contém três ligações dissulfureto intramoleculares e tem um peso molecular de 6 237 Da. Para acoplamento à base de amina primária, há cinco sítios potenciais de PEGuilação no DX-890, cada um dos quatro resíduos lisina e o terminal N. Pode utilizar-se ácido mPEG-succinimidilpropiónico para acoplar PEG a cada um destes sítios, por exemplo, nos quatro resíduos lisina e no terminal N. O reagente de PEG que pode ser utilizado

pode ser mPEG que tem um peso molecular médio de cerca de 5 kDa.

A reação pode ser deixada prosseguir até estar completada a um pH que permite a modificação dos grupos amino nas cadeias laterais de lisina e no terminal N. Por exemplo, o pH pode ser maior do que 7,5, por exemplo, entre 7,8 e 8,5. A reação é rapidamente arrefecida, por exemplo, com Tris. A reação pode ser carregada numa coluna de permuta iônica ou de exclusão por tamanho e recolhem-se frações que contêm DX-890 PEGuilado. Estas frações relevantes podem ser submetidas a diálise, adicionalmente purificadas e depois armazenadas ou analisadas.

O DX-1000, um inibidor de plasmina humana, é um domínio de Kunitz com menos lisinas do que o DX-890. Tem três lisinas disponíveis e um terminal N para modificação com mPEG. O DX-1000 pode ser combinado com um reagente de ácido mPEG-succinimidilpropiónico com um peso molecular médio de cerca de 5 kDa ou 7 kDa. O DX-1000 pode ser modificado e purificado, por exemplo, como descrito para o DX-890. O documento US 6,103,499 também descreve outros inibidores de plasmina, incluindo inibidores relacionados com o DX-1000. Domínios de Kunitz possuindo sequências ou conformes a motivos descritos em US 6,103,499 podem ser modificados como descrito aqui.

O DX-88, um inibidor de calicreína, é um domínio de Kunitz com menos lisinas do que o DX-890. Tem três lisinas disponíveis e um terminal N para modificação com mPEG. O DX-88 pode ser combinado com um reagente de ácido mPEG-succinimidilpropiónico com um peso molecular médio de cerca de 5 kDa ou 7 kDa. O DX-88 pode ser modificado e

purificado, por exemplo, como descrito para o DX-890. O documento US 6,333,402 também descreve outros inibidores de calicreína, incluindo inibidores relacionados com o DX-88. Ver, por exemplo, Tabelas 6 e 103 descritas aqui. Domínios de Kunitz possuindo sequências ou conformes a motivos descritos em US 6,333,402 podem ser modificados como descrito aqui.

As estruturas previstas ou reais do DX-890, DX-88 e DX-1000 são apresentadas com os resíduos lisina indicados nas FIG. 1, 2, e 3, respetivamente.

Exemplo

O Exemplo é adicionalmente pormenorizado pelos seguintes métodos de PEGuilação de uma proteína de interesse em múltiplos ou em todos os sítios reativos possíveis, nas seguintes implementações; o método é utilizado para efetuar a poli-PEGuilação de domínios de Kunitz em múltiplas ou em todas as amins primárias possíveis.

Foi utilizado um PEG monofuncional amino-reativo com 5 kDa (mPEG-SPA) da NEKTAR Therapeutics (catálogo nº: 2M4M0H01) como material das reações de PEGuilação.

Verificámos que é possível efetuar a poli-PEGuilação do DX-88, DX-890 e DX-1000 com quatro ou cinco PEGs de 5 kDa. Além disso, as proteínas poli-PEGuiladas mantiveram a atividade terapêutica desejada, exibindo uma semivida em circulação aumentada. Adicionalmente, as condições reacionais foram muito eficientes em termos da conversão da proteína não modificada na forma PEGuilada desejada. As reações podem ser utilizadas ou escaladas positivamente

para proporcionar preparações consistentemente homogêneas de produto poli-PEGuilado. Devido a esta grande eficiência e poucos produtos reacionais secundários, preparações dos produtos poli-PEGuilados podem ser sintetizadas com maior rendimento e menor custo do que domínios de Kunitz que incluem uma única fração de PEG. Esta abordagem facilita a capacidade de preparação, com consistência lote-para-lote mais controlada e um produto final que é mais fácil de caracterizar completamente.

Materiais

- mPEG-SPA, PM 5 000 Da, NEKTAR Therapeutics, catálogo no.: 2M4M0H01 (éster de succinimidilo de ácido propiónico e polietilenoglicol recoberto com metoxi)
- DX-88 API, PM 7 054 Da, ~10 mg/mL em PBS, pH 7,0
- DX-890 API, PM 6 231 Da, ~10 mg/mL em 10 mM NaAc, pH 3,0
- DX-1000 API, PM 7 167 Da, ~10 mg/mL em PBS, pH 7,0
- 0,2-0,3 M HEPES, pH 7,8-8,5
- 1 M Tris, pH 8,0
- 1 N HCl

Reação de PEGuilação I:

1) Calcular a quantidade de PEG necessária para fazer reagir o polipéptido com um domínio de Kunitz numa proporção molar de aproximadamente 10:1 de PEG:grupo reativo. Por exemplo, o DX-890 tem um total de 5 grupos reativos, de modo que é utilizada uma proporção molar 50:1 de PEG:DX-890. Dependendo do polipéptido com um domínio de Kunitz e/ou das condições reacionais, é tipicamente utilizada uma proporção de 25:1 até 50:1. Por exemplo, para a PEGuilação de 10 mg de DX-890 (PM 6 231 Da) a uma

proporção molar 50:1 de PEG:péptido serão utilizados 401 mg de PEG (PM 5 000 Da).

2) Imediatamente antes de fazer reagir o polipéptido com um domínio de Kunitz com o PEG, diluir o volume requerido do lote do polipéptido com um domínio de Kunitz 1:1 com tampão 0,2 M HEPES, pH 7,8-8,5. O lote do péptido é tipicamente ~10,0 mg/mL. Em consequência, após a diluição, a concentração do polipéptido com um domínio de Kunitz é ~ 5,0 mg/mL em tampão 0,1 M HEPES, pH 7,8-8,5. O DX-88 e o DX-1000 são relativamente estáveis em termos de solubilidade por diluição. O DX-890, sendo inicialmente solúvel por diluição, pode contudo precipitar ao longo do tempo. Os tempos reacionais podem ser escolhidos para minimizar a precipitação.

3) Adicionar imediatamente a solução diluída 1:1 do polipéptido com um domínio de Kunitz diretamente ao PEG em pó e dissolver rapidamente o PEG por aplicação de vórtice. Após a dissolução completa, tapar o tubo, enrolar em folha metálica e permitir a reação com oscilação/revolução lenta durante 2,5-3 horas a 2-8 °C até 25 °C.

4) Arrefecer rapidamente a reação por adição de 1/9º do volume de 1 M Tris, pH 8,0 durante 30-60 minutos a 2-8 °C até 25 °C com oscilação/revolução lenta.

5) Ajustar, cuidadosa e lentamente, o pH da mistura reacional rapidamente arrefecida para ~ pH 7 com pequenas adições de 1 N HCl enquanto o sistema é misturado.

6) A reação neutralizada pode ser armazenada a 2-8 °C ou congelada a -20 °C até -80 °C até à purificação.

A adição direta da solução do polipéptido com um domínio de Kunitz a PEG em pó pode ajudar a simplificar o número de passos do processo reacional e reduzir a hidrólise antes da reação.

Reação de PEGuilação II:

Apresenta-se em seguida outro método de poli-PEGuilação de um polipéptido.

- 1) PEG é pesado, como descrito para a Reação I, e é colocado de lado para utilização imediatamente antes da reação.
- 2) Diluir o polipéptido com um domínio de Kunitz para 3-5 mg/mL em 0,3 M HEPES, pH 7,8-8,5.
- 3) Imediatamente antes da reação, preparar rapidamente uma solução 200-250 mg/mL de PEG (em excesso ligeiro) em dH₂O que foi previamente desgaseificada e saturada com N₂. Adicionar a água ao PEG e dissolvê-lo, rápida e completamente, por aplicação de vórtice.
- 4) Adicionar imediatamente o volume requerido da solução de PEG à solução do polipéptido com um domínio de Kunitz enquanto o sistema é misturado. Tapar o tubo, enrolar em folha metálica e permitir a reação com oscilação/revolução lenta durante 2,5-3 horas a 2-8 °C até 25 °C.
- 5) Continuar com os passos 4) até 6) acima.

Exemplo: Métodos Analíticos

Domínios de Kunitz modificados podem ser analisados e caracterizados por uma variedade de métodos. Métodos exemplificativos incluem os seguintes:

A mistura reacional não purificada pode ser analisada quanto à extensão da PEGuilação por análise de SDS-PAGE redutora/não redutora com coloração com Coomassie e iodo, como descrito num protocolo separado, e cromatografia

líquida de alto desempenho por exclusão de tamanho (SEC-HPLC), por monitorização do índice de refração (RI) e absorvância a 280 nm (UV). A análise de SDS-PAGE por coloração com Coomassie deteta apenas o componente polipeptídico da mistura reacional (livre e acoplado), ao passo que a coloração com iodo deteta preferencialmente o PEG (livre e acoplado). A análise de SEC-HPLC por UV (absorvância a 280 nm) deteta o péptido (livre e acoplado) e RI deteta o péptido e PEG. A deteção por dispersão dinâmica da luz (LS) permite determinar o PM absoluto e a distribuição do PM.

SDS-PAGE e SEC-HPLC podem revelar a distribuição de produtos PEGuilados, mas os pesos moleculares absolutos devem ser determinados por MALDI-TOF ou outros métodos. O motivo é que proteínas PEGuiladas percorrem mais lentamente géis e SEC-HPLC do que proteínas não PEGuiladas, devido ao grande raio hidrodinâmico das frações de PEG, conduzindo a uma estimativa exagerada do peso molecular. Este problema pode ser ultrapassado utilizando como padrões domínios de Kunitz PEGuilados de peso molecular absoluto conhecido.

Coloração com Iodo

Géis são carregados com aproximadamente 2-3 µg de proteína inicialmente (para DX-1000, DX-88 e DX-890) para amostras PEGuiladas que serão resolvidas apenas numa ou duas bandas. Esta carga é muitas vezes apropriada para as reações de 25:1 e 50:1 de PEG:proteína se o acoplamento tiver sido bem-sucedido. No entanto, para amostras que foram PEGuiladas às proporções reacionais mais baixas (1:1, 5:1 e 10:1) e que é esperado que exibam múltiplas espécies PEGuiladas, 10-15 µg de proteína por via é mais apropriado

(uma vez que podem aparecer 4-5 bandas). As amostras são misturadas com a quantidade apropriada de Tampão de Amostras NuPAGE LDS. As amostras são submetidas a vórtice e aquecidas a 70 °C durante 10 minutos antes da carga.

Os géis podem ser preparados e resolvidos de acordo com métodos comuns, por exemplo, utilizando o sistema Invitrogen NuPAGE com géis 4-12 % Bis-Tris. Ver, por exemplo, "NuPAGE Novex Bis-Tris Gels Quick Reference Card", Invitrogen Life Technologies.

Os géis são brevemente enxaguados em água desionizada, depois são cobertos com uma solução 5 % de cloreto de bário durante 10 minutos no agitador. O gel é novamente enxaguado com água desionizada e depois é imerso numa solução 0,1 N de Iodo durante pelo menos 10 minutos no agitador. Devem ser visíveis bandas quase imediatamente. A coloração total estará completada após 10 minutos. O gel é então fotografado, por exemplo, com UVP Epi Chem II Darkroom e o filtro de Brometo de etídio.

Após a coloração com iodo, a proteína pode ser corada quanto a proteínas com Coomassie. O gel é primeiramente enxaguado em água, para efetuar a descoloração, depois é misturado com Coomassie e seguidamente descorado em 300 mL de metanol, 100 mL de ácido acético glacial e 600 mL de água. As bandas de proteínas não PEGuiladas aparecem a azul-escuro, e proteína PEGuilada pode, mas não é necessário, aparecer a azul muito claro.

Cromatografia

O Sistema de cromatografia (Waters Corporation) utilizado aqui foi o sistema 600 (bomba/controlador) empregando "software" EMPOWER™ com sistema de autoamostragem 717 plus, detetor de arranjo de fotodíodos 996 (PDA) e detetor do índice de refração 2414. Adicionalmente, um detetor de dispersão dinâmica da luz (LS) PD2010+ (Precision Detectors, Inc.) também foi operado em série.

Cromatografia em coluna SEC pode incluir as seguintes características: coluna de SEC: TSK G3000SW_{x1} (7,8 mm DI x 30 cm C) com guarda (Tosoh Bioscience, catálogo n°: 08541 e 08543); Taxa de fluxo: 0,5 mL/minuto; tempo de processamento: 35 minutos; Fase móvel: PBS, pH 7,2 com 0,05 % NaN₃; Volume de injeção de amostras: 25 - 100 µL; Carga de amostras: 50-100 µg por injeção; Deteção: UV (280 nm), RI e LS; Padrões de SEC: BioRad, catálogo n°: 151-1901

MALDI-TOF

Espetrometria de Massa MALDI-TOF (tempo de voo de desorção ionização com laser assistido por matriz) (ABI, Applied Biosystems Voyager-DE) pode ser utilizada para avaliar a massa real de produtos reacionais e sujeitos. Para análise do polipéptido (por exemplo, antes da reação) pode utilizar-se ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico como matriz. Para a análise de produtos reacionais ou espécies poli-PEGuiladas pode utilizar-se ácido 2,5-di-hidroxibenzoico (DHB) como matriz. Os "chips" podem ser carregados com 1:1 (0,5 µL:0,5 µL) de amostra:matriz e secos ao ar antes da análise.

Medição de K_i

As constantes de inibição de equilíbrio (K_i) para uma proteína poli-PEGuilada (por exemplo, um DX-890 poli-PEGuilado) podem ser determinadas de acordo com o modelo de inibição de ligação forte com formação de um complexo reversível (estequiometria 1:1). As reações são montadas com 100 pM enzima (por exemplo, elastase) e uma gama de concentrações de inibidor (0-4 nM) a 30 °C em 50 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl e 0,1 % Triton X-100. Após uma incubação durante 24 horas adiciona-se substrato (25 μ M) à solução de inibidor enzimático e a taxa de hidrólise do substrato é monitorizada a uma excitação de 360 nm e uma emissão de 460 nm. Gráficos da atividade percentual remanescente *versus* concentração de inibidor ativo são ajustados, por análise de regressão não linear, à Equação 1 para determinar constantes de dissociação de equilíbrio. Proteína não modificada e proteína poli-PEGuilada podem ser analisadas para comparação.

$$\%A = 100 - \left(\frac{(I + E + K_i) - \sqrt{(I + E + K_i)^2 - 4 \cdot E \cdot I}}{2 \cdot E} \right) \cdot 100$$

Equação 1

Em que:

%A = atividade percentual

I = concentração de proteína com domínio de Kunitz (por exemplo, DX-890)

E = concentração de enzima (por exemplo, HNE)

K_i = constante de inibição de equilíbrio

Farmacocinética em Animais

Os métodos seguintes podem ser utilizados para avaliar a farmacocinética (PK) de proteínas, tais como proteínas poli-PEGuiladas, em animais, por exemplo, ratinhos e coelhos.

A proteína a ser testada é etiquetada com iodo (^{125}I) utilizando o método de iodogénio (Pierce). O tubo reacional é enxaguado com tampão reacional (25 mM Tris, 0,4 M NaCl, pH 7,5). O tubo é esvaziado e depois substituído com 0,1 mL de tampão reacional e 12 μL de transportador de iodo-126 livre, cerca de 1,6 mCi. Passados seis minutos, o iodo ativado é transferido para um tubo contendo a proteína a ser testada. Após nove minutos, a reação é terminada com 25 μL de solução saturada de tirosina. A reação pode ser purificada numa coluna de 5 mL de sal D de poliacrilamida 6000 em Tris/NaCl. Pode utilizar-se HSA para minimizar a aderência ao gel.

Obtém-se um número suficiente de ratinhos (cerca de 36). Regista-se o peso de cada animal. No caso de ratinhos, os animais são injetados na veia da cauda com cerca de 5 μg da proteína a ser testada. Recuperam-se amostras em cada instante por animal, com quatro animais por instante, aproximadamente aos 0, 7, 15, 30 e 90 minutos, 4 horas, 8 horas, 16 horas e 24 horas pós-injeção. Recolhem-se amostras (cerca de 0,5 mL) em anticoagulante (0,02 mL de EDTA). As células são submetidas a vórtice e separadas de plasma/soro. As amostras podem ser analisadas por contagem de radiação e coluna peptídica de SEC em HPLC com deteção de radiação incorporada.

Para coelhos, o material é injetado na veia da orelha. Podem recolher-se amostras aos 0, 7, 15, 30, 90 minutos, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas pós-injeção. As amostras podem ser recolhidas e analisadas tal como para os ratinhos.

Os dados podem ser ajustados a uma curva de decaimento biexponencial (equação 2) ou triexponencial (equação 3), descrevendo as fases de eliminação *in vivo* "rápida", "lenta" e "mais lenta":

Equação 2
$$y = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$$

Equação 3
$$y = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} + Ce^{-\gamma t}$$

Em que:

y = Quantidade de etiqueta remanescente no plasma no instante = t pós-administração

A = Etiqueta total na fase de eliminação "rápida"

B = Etiqueta total na fase de eliminação "lenta"

C = Etiqueta total na fase de eliminação "mais lenta"

α = Constante de decaimento da fase de eliminação "Rápida"

β = Constante de decaimento da fase de eliminação "Lenta"

γ = Constante de decaimento da fase de eliminação "Mais lenta"

t = Tempo pós-administração

As constantes de decaimento das fases α , β e γ podem ser convertidas em semividas para as suas fases respetivas do modo seguinte:

Semivida da Fase α = 0,69 (1/ α)

Semivida da Fase β = 0,69 (1/ β)

Semivida da Fase γ = 0,69 (1/ γ)

No caso de os dados serem ajustados utilizando a equação biexponencial, as percentagens da etiqueta total eliminada da circulação *in vivo* através das fases α e β são calculadas do modo seguinte:

$$\% \text{ Fase } \alpha = \frac{A}{A+B} \times 100$$

$$\% \text{ Fase } \beta = \frac{B}{A+B} \times 100$$

No caso de os dados serem ajustados utilizando a equação triexponencial, as percentagens da etiqueta total eliminada da circulação *in vivo* através das fases α e β são calculadas do modo seguinte:

$$\% \text{ Fase } \alpha = \frac{A}{A+B+C} \times 100$$

$$\% \text{ Fase } \beta = \frac{B}{A+B+C} \times 100$$

$$\% \text{ Fase } \gamma = \frac{C}{A+B+C} \times 100$$

Tabela 4: Eliminação do Plasma em Ratinhos

	$T_{1/2}$ alfa (minutos)	Eliminação (%)	$T_{1/2}$ beta (minutos)	Eliminação (%)
DX-890	1,3	79	59,2	21
DX-1000	1,5	87	26,9	13
	$T_{1/2}$ alfa (horas)	Eliminação (%)	$T_{1/2}$ beta (horas)	Eliminação (%)

5xPEG5- DX-890	1,1	33	20,2	67
4xPEG5- DX-1000	0,3	38	12,5	62

Tabela 5: Eliminação do Plasma em Coelhos

	T _{1/2} alfa (minutos)	Eliminação (%)	T _{1/2} beta (horas)	Eliminação (%)	T _{1/2} gama (horas)	Eliminação (%)
DX-890	1,7	83	3,4	17		
DX-1000	0,9	85	1	15		
	T _{1/2} alfa (minutos)	Eliminação (%)	T _{1/2} beta (horas)	Eliminação (%)	T _{1/2} gama (horas)	Eliminação (%)
5xPEG5-DX-890	2,8	28	4,5	34	97,6	38
4xPEG5-DX-1000	1,9	34	3	32	69,3	34

No caso do ratinho (Tabela 4) e coelho (Tabela 5), a PEGuilação de DX-890 ou de DX-1000 resulta num decréscimo da fração de eliminação através da via alfa. Ao mesmo tempo, a fração de eliminação através das vias com maior tempo de vida (beta e gama) aumenta.

As proteínas poli-PEGuiladas também exibiram boa estabilidade *in vivo* por análise de SEC.

Purificação:

Um método de purificação exemplificativo é o seguinte:

- 1) A purificação de proteína poliPEGuilada a partir de PEG em excesso/que não reagiu e quantidades vestigiais de espécies PEGuiladas de elevado peso molecular e menor peso molecular pode ser realizada por cromatografia de permuta iónica num sistema de cromatografia AKTA Basic 10/100 (Amersham).
- 2) Por exemplo, uma coluna de dimensão e capacidade apropriadas pode ser empacotada com uma resina de permuta catiónica forte (isto é: Poros 50HS, Applied Biosystems, código do produto: 1-3359-11) no caso de pelo menos DX-88 e DX-1000 PEGuilados.
- 3) Em resumo, um volume da mistura reacional de PEGuilação é diluído 5-15 vezes, ou consoante o necessário, com água seguido de ajustamento do pH para pH ~ 3,0 com 1 M ácido acético (100-200 mM final) e condutividade < 3 mS/cm.
- 4) A coluna é primeiramente equilibrada com 100 mM ácido acético, pH 3,0. Taxa de fluxo linear de 100 cm/hora.
- 5) Carregada e lavada com a mesma para ~5 volumes da coluna. A taxa de fluxo linear durante a carga é 50 cm/hora.
- 6) A proteína PEGuilada é eluída da coluna numa série de gradientes em passos.
- 7) A eluição do primeiro passo é 100 mM ácido acético, com 20 mM NaCl, pH 3,2 para ajudar a remover componentes HPM (~20 VC a 100 cm/hora).
- 8) A eluição do segundo passo é 100 mM ácido acético com 50 mM NaCl, pH 3,8 (~10 VC a 100 cm/hora), elui o produto

principal (isto é: 4 x 5kDa PEG/péptido para DX-88 e DX-1000).

9) A eluição do terceiro passo final é PBS, pH 7,2 (~5 VC 100 cm/hora), para ajudar a remover quantidades vestigiais de espécies PEGuiladas BPM.

10) Seguido de limpeza com 0,2 M NaOH (~5 VC com tempo de contacto de 30 minutos).

11) Seguido de armazenamento da coluna em 20 % etanol (~10 VC).

12) Recolhem-se frações ao longo do perfil, sendo analisadas por SDS-PAGE antes da reunião.

13) A reunião final de proteína PEGuilada purificada é depois UF/DF para PBS, pH 7,2, utilizando meios convencionais disponíveis. O material final é então filtrado em 0,22 um, quantificado pela absorvância a 280 nm (como previamente descrito), separado em alíquotas e congelado a -20 °C até -80 °C até à utilização.

Outro método de purificação exemplificativo, e que pode ser utilizado para purificar DX-88 poli-PEGuilado, é o seguinte.

Os produtos reacionais são carregados numa coluna de permuta catiónica. Verificou-se que Poros 50HS tem uma capacidade de ligação razoável (~3 mg DX88-PEG5K/mL resina) a esta pequena escala, que permite a separação de PEG livre, e um eluato razoavelmente concentrado que inclui a espécie poli-PEGuilada. A condutividade pode ser mantida menor do que 2 mS/cm. Por exemplo, pode ser utilizada uma coluna de 9,5 cm AKTA Poros 50HS (1,1cm l. x 10 cm a.). A coluna é lavada e limpa, para remover endotoxinas e outros contaminantes. A coluna pode ser equilibrada e carregada em 10 mM acetato de sódio pH 3,5.

UF/DF e Análise da Reunião Final de DX-88-PEG5K

Frações contendo DX-88 poli-PEGuilado foram reunidas para um volume total de amostra de ~6 mL. O tampão da amostra foi permutado para 1X DPBS pH 7,2 (não modificado) da Invitrogen (especificação de endotoxinas < 0,25 EU/mL) e a amostra foi concentrada utilizando dois Dispositivos de Filtração Centrífuga Amicon Ultra-15 com um limite de peso molecular de 10 000 kDa e uma força centrífuga de 4500 x g. Os CENTRICONs™ foram lavados com 0,1 N NaOH (diluído a partir de 1 N NaOH, Acros, para baixa produção de endotoxinas) durante uma hora, seguido de vários enxaguamentos com água HyClone antes da utilização. O fator de permuta final foi 300 vezes para 1X DPBS. Um total de 3 mL de DX-88-PEG5K concentrado e purificado foi recuperado dos centricons. A concentração final da amostra, 4,97 mg/mL, foi determinada diluindo a amostra 1:10 e medindo a O.D. a 280 nm contra 1X DPBS, utilizando um coeficiente de extinção para o DX-88 de 0,954. O pH da amostra final foi ~2, medido utilizando tiras Indicadoras do pH Whatman (pH 0-14). Todos os filtrados (33 mL no total) foram analisados quanto ao teor proteico e exibiram uma O.D. a 280 nm de 0,003 ou menos, medida contra 1X DPBS. A amostra de DX-88-PEG5K purificada foi separada em alíquotas em frações de 0,5 mL (2,5 mg cada) em tubos esterilizados e foi congelada a -80 °C. A amostra diluída 1:10 foi analisada por SDS-PAGE numa série de diluições para estimar a pureza do produto principal de interesse, 4-PEG5K-DX-88. A pureza do 4-PEG5K-DX-88 é aproximadamente 90 %.

DX-890. Preparámos um DX-890 poli-PEGuilado. Eletroforese em gel e análise cromatográfica indicaram que uma reação

com uma proporção de 1:50 ou 1:63 de DX-890 para reagente 5K PEG originou um produto reacional que consistiu predominantemente (> 85 %) num DX-890 modificado com cinco frações de PEG ligadas. O DX-890 peguilado numa variedade de proporções manteve a sua atividade específica relativamente a um controlo (cerca de 10 U/mg).

Prevê-se que o DX-890 poli-peguilado tenha cinco frações de PEG (cada uma com um peso molecular de cerca de 5 266 Daltons) mais a massa do DX-890 (6 237 Daltons, teórica; 6 229 Daltons, observada). A massa total prevista é 34 682 Daltons. A massa da espécie observada por MALDI-TOF era cerca de 34 219 Daltons, de acordo com a previsão teórica, pois a massa de frações de PEG individuais pode variar.

DX-88. Preparámos um DX-88 poli-PEGuilado. Eletroforese em gel e análise cromatográfica indicaram que uma reação com uma proporção de 1:50 de DX-890 para reagente 5K PEG a pH 7,8 originou um produto reacional que consistiu predominantemente (> 85 %) num DX-88 modificado com quatro frações de PEG ligadas.

Prevê-se que o DX-88 Poli-peguilado tenha quatro frações de PEG (cada uma com um peso molecular de cerca de 5 266 Daltons) mais a massa do DX-88 (7 054 Daltons). A massa total prevista é 28 126 Daltons. A massa da espécie observada por MALDI-TOF era cerca de 29 680 Daltons, de acordo com a previsão teórica, pois a massa de frações de PEG individuais pode variar.

Outras formas de realização são apresentadas nas reivindicações seguintes.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto compreendendo:

(i) um polipéptido que compreende um domínio de Kunitz que se liga e inibe uma protease, em que o domínio de Kunitz é selecionado do grupo que consiste nos seguintes:

(a) um péptido compreendendo a sequência de aminoácidos do DX-890 apresentada na SEQ ID NO:23 ou uma sequência de aminoácidos que difere em pelo menos um, mas não mais do que cinco aminoácidos relativamente à sequência de aminoácidos do DX-890 apresentada na SEQ ID NO:23;

(b) um péptido compreendendo a sequência de aminoácidos do DX-88 apresentada na SEQ ID NO:24 ou uma sequência de aminoácidos que difere em pelo menos um, mas não mais do que cinco aminoácidos relativamente à sequência de aminoácidos do DX-88 apresentada na SEQ ID NO:24, e

(c) um péptido compreendendo a sequência de aminoácidos do DX-1000 apresentada na SEQ ID NO:25 ou uma sequência de aminoácidos que difere em pelo menos um, mas não mais do que cinco aminoácidos relativamente à sequência de aminoácidos do DX-1000 apresentada na SEQ ID NO:25,

em que o péptido não inclui uma amina primária em nenhuma das regiões de alça de ligação do domínio de Kunitz,

em que as referidas regiões de alça de ligação correspondem (i) às posições de aminoácidos 11 até 21, e (ii) às posições de aminoácidos 31 até 42 da sequência de aminoácidos do inibidor de tripsina pancreática de bovino (BPTI) apresentada na SEQ ID NO:2, e

(ii) uma pluralidade de frações de polietilenoglicol, em que o peso molecular médio de cada fração de polietilenoglicol é menor do que 12 kDa, e cada uma de pelo menos quatro aminas primárias do polipéptido está ligada a uma fração de polietilenoglicol, em que as referidas aminas primárias consistem numa amina primária N-terminal e/ou aminas primárias de cadeias laterais de lisina.

2. Composto de acordo com a reivindicação 1,

(a) em que o peso molecular médio de cada fração de polietilenoglicol é menor do que 8 kDa;

(b) em que cada fração de polietilenoglicol tem um peso molecular entre 3-8 kDa, ou

(c) em que o polipéptido tem um peso molecular menor do que 8 kDa, e o composto tem um peso molecular maior do que 16 kDa.

3. Composto de acordo com a reivindicação 1,

(a) em que o polipéptido não inclui uma lisina em nenhuma das regiões de alça de ligação do domínio de Kunitz;

(b) em que o polipéptido inclui pelo menos duas lisinas na região de arcabouço do domínio de Kunitz, em que a referida região de arcabouço não inclui nenhuma das

regiões de alça de ligação que correspondem (i) às posições de aminoácidos 11 até 21, e (ii) às posições de aminoácidos 31 até 42 da sequência de aminoácidos do inibidor de tripsina pancreática de bovino (BPTI) apresentada na SEQ ID NO:2;

(c) em que o polipéptido compreende três ou quatro lisinas na região de arcabouço do domínio de Kunitz, em que a referida região de arcabouço não inclui nenhuma das regiões de alça de ligação que correspondem (i) às posições de aminoácidos 11 até 21, e (ii) às posições de aminoácidos 31 até 42 da sequência de aminoácidos do inibidor de tripsina pancreática de bovino (BPTI) apresentada na SEQ ID NO:2, ou

(d) em que o polipéptido compreende uma região de arcabouço que é idêntica a uma região correspondente de um domínio de Kunitz humano, em que a referida região de arcabouço é definida de modo a não incluir nenhuma das regiões de alça de ligação que correspondem (i) às posições de aminoácidos 11 até 21, e (ii) às posições de aminoácidos 31 até 42 da sequência de aminoácidos do inibidor de tripsina pancreática de bovino (BPTI) apresentada na SEQ ID NO:2.

4. Composto de acordo com a reivindicação 1,

(a) em que o péptido compreende a sequência de aminoácidos do DX-890 apresentada na SEQ ID NO:23, ou uma sequência de aminoácidos que difere em pelo menos um, mas não mais do que cinco aminoácidos relativamente à sequência de aminoácidos do DX-890 apresentada na SEQ ID NO:23, e a protease é elastase;

(b) em que o péptido compreende a sequência de aminoácidos do DX-88 apresentada na SEQ ID NO:24, ou

uma sequência de aminoácidos que difere em pelo menos um, mas não mais do que cinco aminoácidos relativamente à sequência de aminoácidos do DX-88 apresentada na SEQ ID NO:24, e a protease é calicreína, ou

(c) em que o péptido compreende a sequência de aminoácidos do DX-1000 apresentada na SEQ ID NO:25, ou uma sequência de aminoácidos que difere em pelo menos um, mas não mais do que cinco aminoácidos relativamente à sequência de aminoácidos do DX-1000 apresentada na SEQ ID NO:25, e a protease é plasmina.

5. Preparação que compreende o composto de acordo com a reivindicação 1, em que pelo menos 80 % do polipéptidos presentes na preparação

(i) se ligam e inibem a protease, em que os péptidos que se ligam especificamente e inibem a protease não incluem uma amina primária em nenhuma das regiões de alça de ligação do domínio de Kunitz, em que as referidas regiões de alça de ligação correspondem (i) às posições de aminoácidos 11 até 21, e (ii) às posições de aminoácidos 31 até 42 da sequência de aminoácidos do inibidor de tripsina pancreática de bovino (BPTI) apresentada na SEQ ID NO:2, e

(ii) têm uma fração de polietilenoglicol ligada a cada uma de pelo menos quatro aminas primárias, em que as referidas aminas primárias consistem numa amina primária N-terminal e/ou aminas primárias de cadeias laterais de lisina.

6. Preparação de acordo com a reivindicação 5, em que o peso molecular médio de cada uma das frações de

polietilenoglicol ligadas é menor do que 10 kDa, particularmente menor do que 8 kDa.

7. Preparação de acordo com a reivindicação 5, em que pelo menos 95 % dos polipéptidos com um domínio de Kunitz presentes na preparação têm uma fração de polietilenoglicol ligada a cada uma das pelo menos quatro aminas primárias.

8. Preparação de acordo com a reivindicação 5,

(a) em que os péptidos que se ligam especificamente e inibem a protease não incluem uma lisina nas regiões de alça de ligação do domínio de Kunitz;

(b) em que os péptidos que se ligam especificamente e inibem a protease incluem pelo menos duas lisinas na região de arcabouço do domínio de Kunitz, em que a referida região de arcabouço não inclui nenhuma das regiões de alça de ligação que correspondem às (i) posições de aminoácidos 11 até 21, e (ii) posições de aminoácidos 31 até 42 da sequência de aminoácidos do inibidor de tripsina pancreática de bovino (BPTI) apresentada na SEQ ID NO:2;

(c) em que os péptidos que se ligam especificamente e inibem a protease incluem três lisinas na região de arcabouço do domínio de Kunitz, em que a referida região de arcabouço não inclui nenhuma das regiões de alça de ligação que correspondem às (i) posições de aminoácidos 11 até 21, e (ii) posições de aminoácidos 31 até 42 da sequência de aminoácidos do inibidor de tripsina pancreática de bovino (BPTI) apresentada na SEQ ID NO:2;

(d) em que os péptidos que se ligam especificamente e inibem o polipéptido protease incluem quatro lisinas na região de arcabouço do domínio de Kunitz, em que a referida região de arcabouço é definida de modo a não incluir nenhuma das regiões de alça de ligação que correspondem às (i) posições de aminoácidos 11 até 21, e (ii) posições de aminoácidos 31 até 42 da sequência de aminoácidos do inibidor de tripsina pancreática de bovino (BPTI) apresentada na SEQ ID NO:2, ou

(e) em que os péptidos que se ligam especificamente e inibem a protease compreendem uma região de arcabouço que é idêntica a uma região correspondente de um domínio de Kunitz humano, em que a referida região de arcabouço é definida de modo a não incluir nenhuma das regiões de alça de ligação que correspondem às (i) posições de aminoácidos 11 até 21, e (ii) posições de aminoácidos 31 até 42 da sequência de aminoácidos do inibidor de tripsina pancreática de bovino (BPTI) apresentada na SEQ ID NO:2.

9. Preparação de acordo com a reivindicação 5,

(a) em que o péptido compreende a sequência de aminoácidos do DX-890 apresentada na SEQ ID NO:23, ou uma sequência de aminoácidos que difere em pelo menos um, mas não mais do que cinco aminoácidos relativamente à sequência de aminoácidos do DX-890 apresentada na SEQ ID NO:23, e a protease é elastase;

(b) em que o péptido compreende a sequência de aminoácidos do DX-88 apresentada na SEQ ID NO:24, ou uma sequência de aminoácidos que difere em pelo menos um, mas não mais do que cinco aminoácidos relativamente

à sequência de aminoácidos do DX-88 apresentada na SEQ ID NO:24, e a protease é calicreína, ou

(c) em que o péptido compreende a sequência de aminoácidos do DX-1000 apresentada na SEQ ID NO:25, ou uma sequência de aminoácidos que difere em pelo menos um, mas não mais do que cinco aminoácidos relativamente à sequência de aminoácidos do DX-1000 apresentada na SEQ ID NO:25, e a protease é plasmina.

- 10.** Preparação de acordo com a reivindicação 5, em que os polipéptidos com um domínio de Kunitz compreendem a sequência de aminoácidos do DX-890 e em que pelo menos 80 % dos polipéptidos contendo DX-890 presentes na preparação têm uma fração de polietilenoglicol ligada a cada um de quatro resíduos lisina e ao terminal N do polipéptido.
- 11.** Preparação de acordo com a reivindicação 5, em que os polipéptidos compreendem a sequência de aminoácidos do DX-88 e em que pelo menos 80 % dos polipéptidos com um domínio de Kunitz contendo DX-88 presentes na preparação têm uma fração de polietilenoglicol ligada a cada um de três resíduos lisina e ao terminal N do polipéptido.
- 12.** Preparação de acordo com a reivindicação 5, em que os polipéptidos com um domínio de Kunitz compreendem a sequência de aminoácidos do DX-1000 e em que pelo menos 80 % dos polipéptidos com um domínio de Kunitz contendo DX-1000 presentes na preparação têm uma fração de polietilenoglicol ligada a cada um de três resíduos lisina e ao terminal N do polipéptido.

13. Método para proporcionar um domínio de Kunitz peguilado que se liga e inibe uma protease, em que o método compreende:

- proporcionar um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada das seguintes:

a) a sequência de aminoácidos do DX-890 apresentada na SEQ ID NO:23 ou uma sequência de aminoácidos que difere em pelo menos um, mas não mais do que cinco aminoácidos relativamente à sequência de aminoácidos do DX-890 apresentada na SEQ ID NO:23;

(b) a sequência de aminoácidos do DX-88 apresentada na SEQ ID NO:24 ou uma sequência de aminoácidos que difere em pelo menos um, mas não mais do que cinco aminoácidos relativamente à sequência de aminoácidos do DX-88 apresentada na SEQ ID NO:24, e

(c) a sequência de aminoácidos do DX-1000 apresentada na SEQ ID NO:25 ou uma sequência de aminoácidos que difere em pelo menos um, mas não mais do que cinco aminoácidos relativamente à sequência de aminoácidos do DX-1000 apresentada na SEQ ID NO:25, e

- contactar o polipéptido com polietilenoglicol ativado, de peso molecular médio menor do que 12 kDa, em condições em que cada uma das pelo menos quatro aminas primárias do polipéptido é ligada a uma fração de polietilenoglicol, em que as referidas aminas primárias consistem numa amina primária N-terminal e/ou aminas primárias de cadeias laterais de lisina.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, em que o domínio de Kunitz tem pelo menos três grupos de amina primária na região de arcabouço do domínio de Kunitz.

15. Método de acordo com a reivindicação 14,

(a) em que o arcabouço compreende pelo menos três lisinas, particularmente em que a amina primária de cada lisina do polipéptido é ligada a uma fração de polietilenoglicol;

(b) em que o rendimento é maior do que 40 %, ou

(c) em que as condições do contacto são um pH maior do que 7,5.

16. Método de acordo com a reivindicação 14,

(a) em que as condições são tais que pelo menos 70 % das moléculas são peguiladas em cada uma de pelo menos quatro aminas primárias;

(b) em que as condições são tais que pelo menos 85 % das moléculas são peguiladas em cada uma de pelo menos quatro aminas primárias;

(c) em que as condições são tais que pelo menos 70 % das moléculas peguiladas têm o mesmo número de frações de PEG ligadas, em que as frações estão ligadas nas mesmas posições, ou

(d) em que as condições são tais que pelo menos 85 % das moléculas peguiladas têm o mesmo número de frações de PEG ligadas, em que as frações estão ligadas nas mesmas posições.

17. Método de acordo com a reivindicação 14, que também compreende formular o polipéptido peguilado como uma composição farmacêutica.
18. Composto de acordo com a reivindicação 1 para utilização no tratamento de uma perturbação **caracterizada por** atividade excessiva ou indesejada de uma protease, em que o composto se destina a ser administrado a um sujeito que sofre da perturbação ou suspeito de sofrer da perturbação, em que o polipéptido do composto inibe a protease.
19. Composto para utilização de acordo com a reivindicação 18,
- (a) em que a protease é elastase e o polipéptido compreende a sequência de aminoácidos do DX-890 ou uma sequência que difere em pelo menos uma, mas menos do que seis alterações de aminoácidos relativamente ao DX-890, particularmente em que a perturbação é fibrose quística, COPD ou uma perturbação inflamatória;
- (b) em que a protease é calicreína e o polipéptido compreende a sequência de aminoácidos do DX-88 ou uma sequência que difere em pelo menos uma, mas menos do que seis alterações de aminoácidos relativamente ao DX-88, particularmente em que a perturbação é hemofilia, hemorragia pós-operatória, hemorragia peri-operatória ou angioedema hereditário, ou
- (c) em que a protease é plasmina e o polipéptido compreende a sequência de aminoácidos do DX-1000 ou uma sequência que difere em pelo menos uma, mas menos do que seis alterações de aminoácidos relativamente ao DX-1000, particularmente em que a perturbação é

fibrinólise ou fibrinogenólise, hemorragia excessiva associada a trombolíticos, hemorragia pós-operatória, hemorragia peri-operatória e androgénese inapropriada.

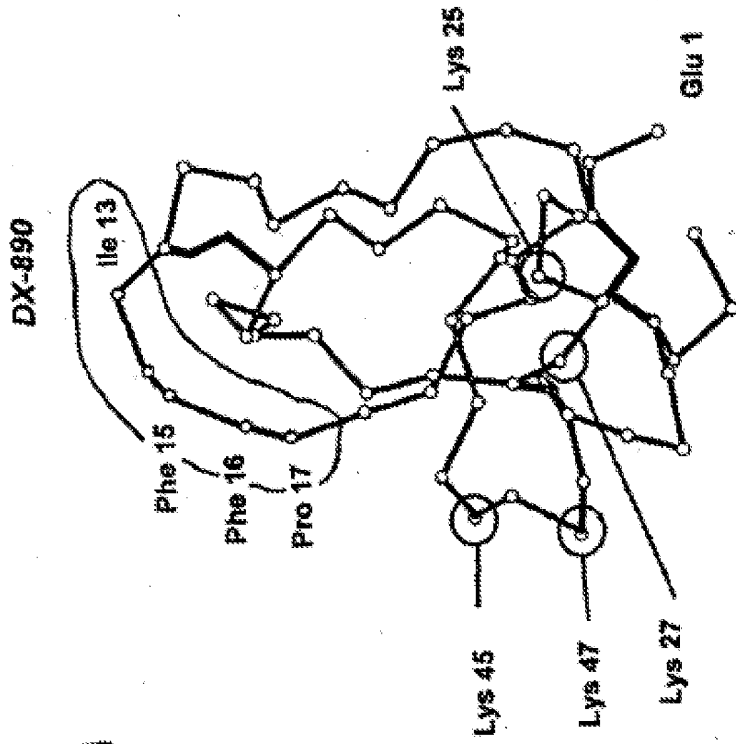
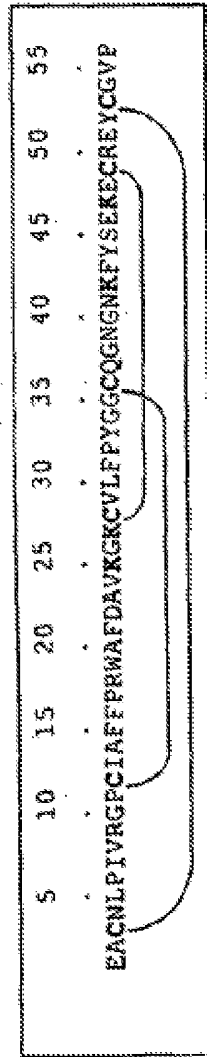


FIG. 1



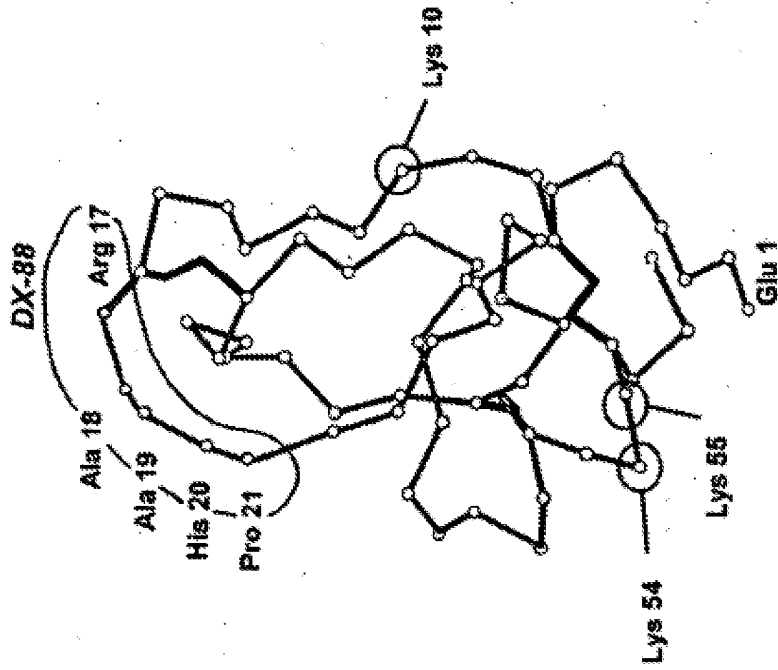
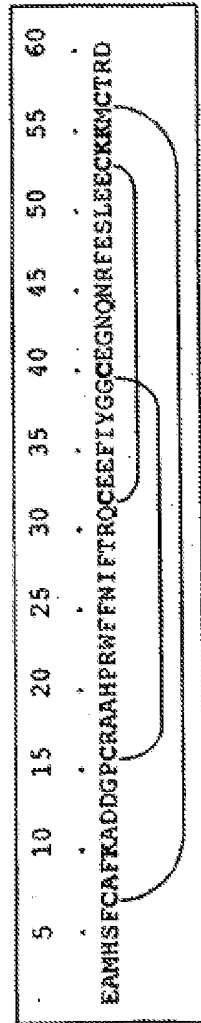


FIG. 2



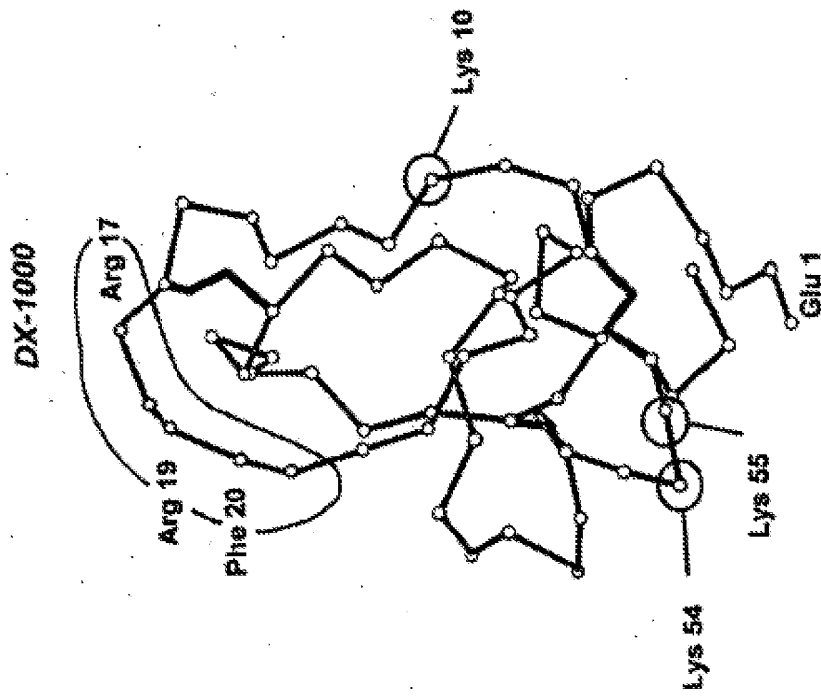


FIG. 3

5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	
E	A	M	H	S	F	C	A	K	A	E	T	G
.	
P	C	R	A	R	F	D	R	W	F	N	I	
F	T	R	Q	E	E	F	I	G	G	C	E	
G	N	Q	N	R	F	E	S	L	E	E	C	
K	K	M	C	T	R	D	

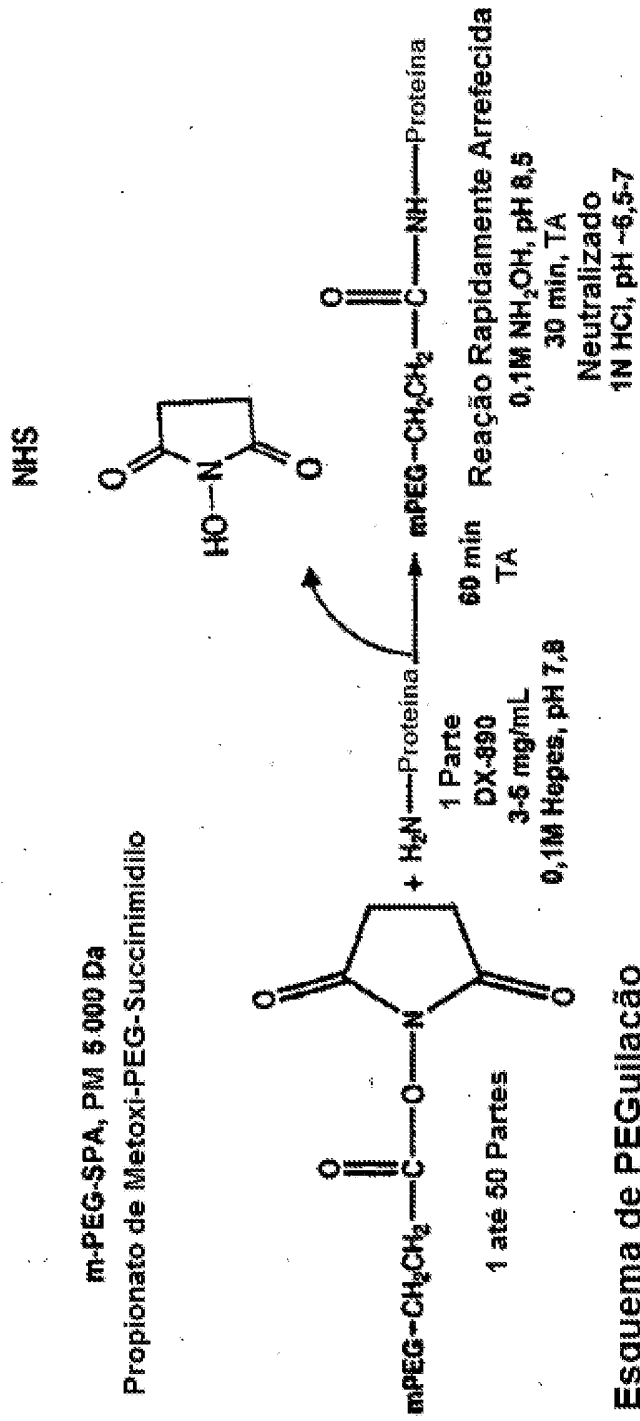


FIG. 4

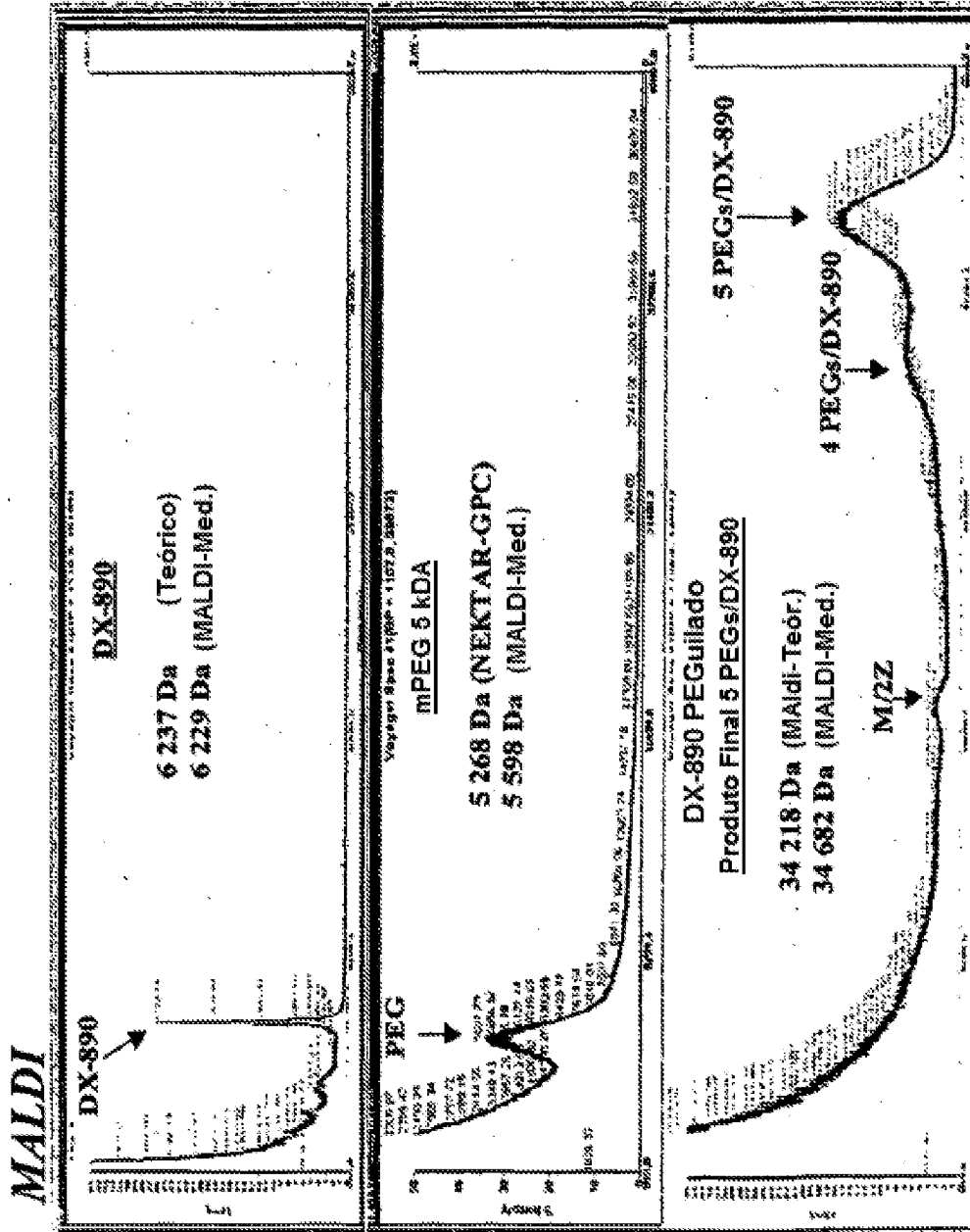


FIG. 5

GP-HPLC **A₂₈₀**

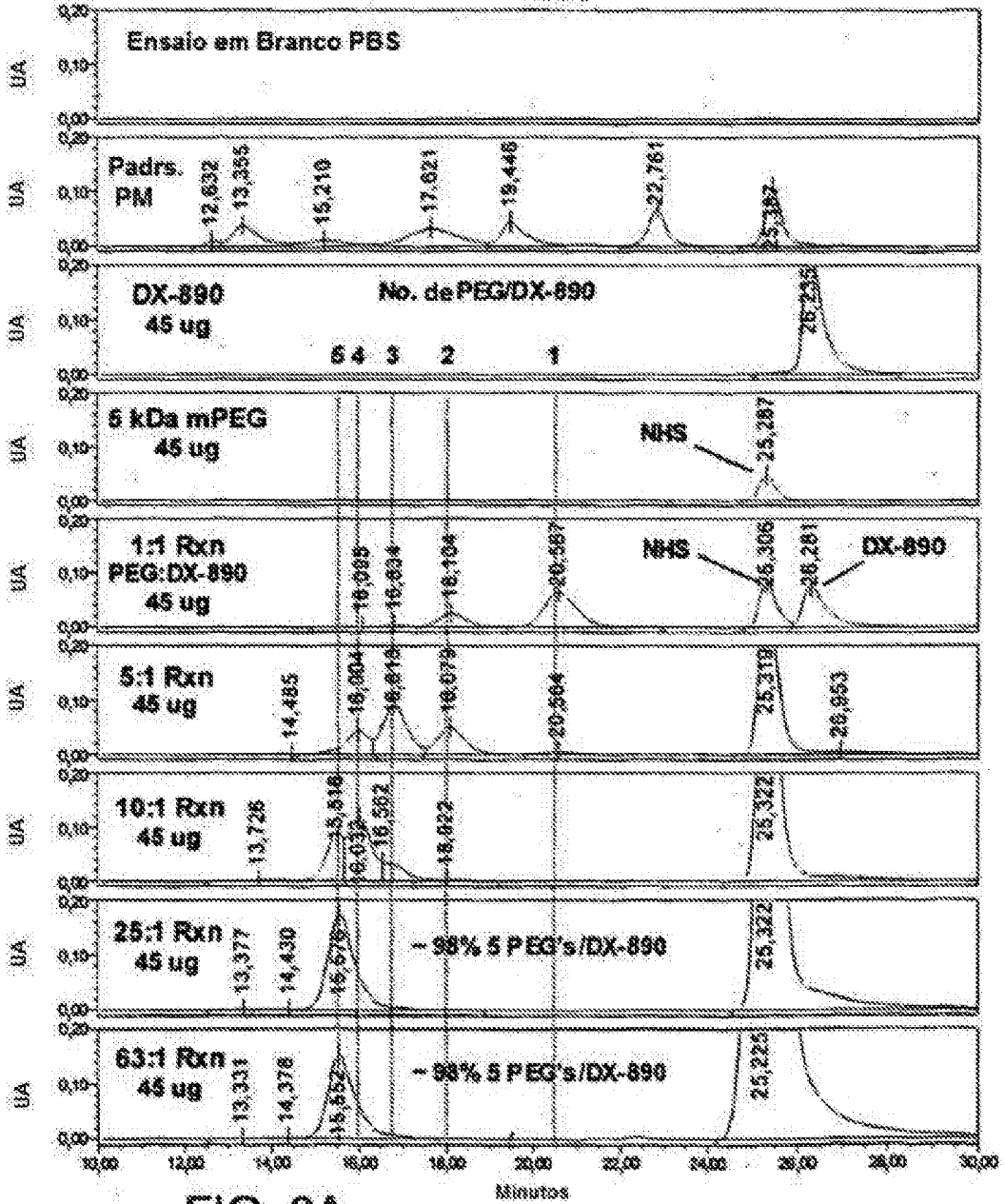


FIG. 6A

GP-HPLC

Índice de Refração

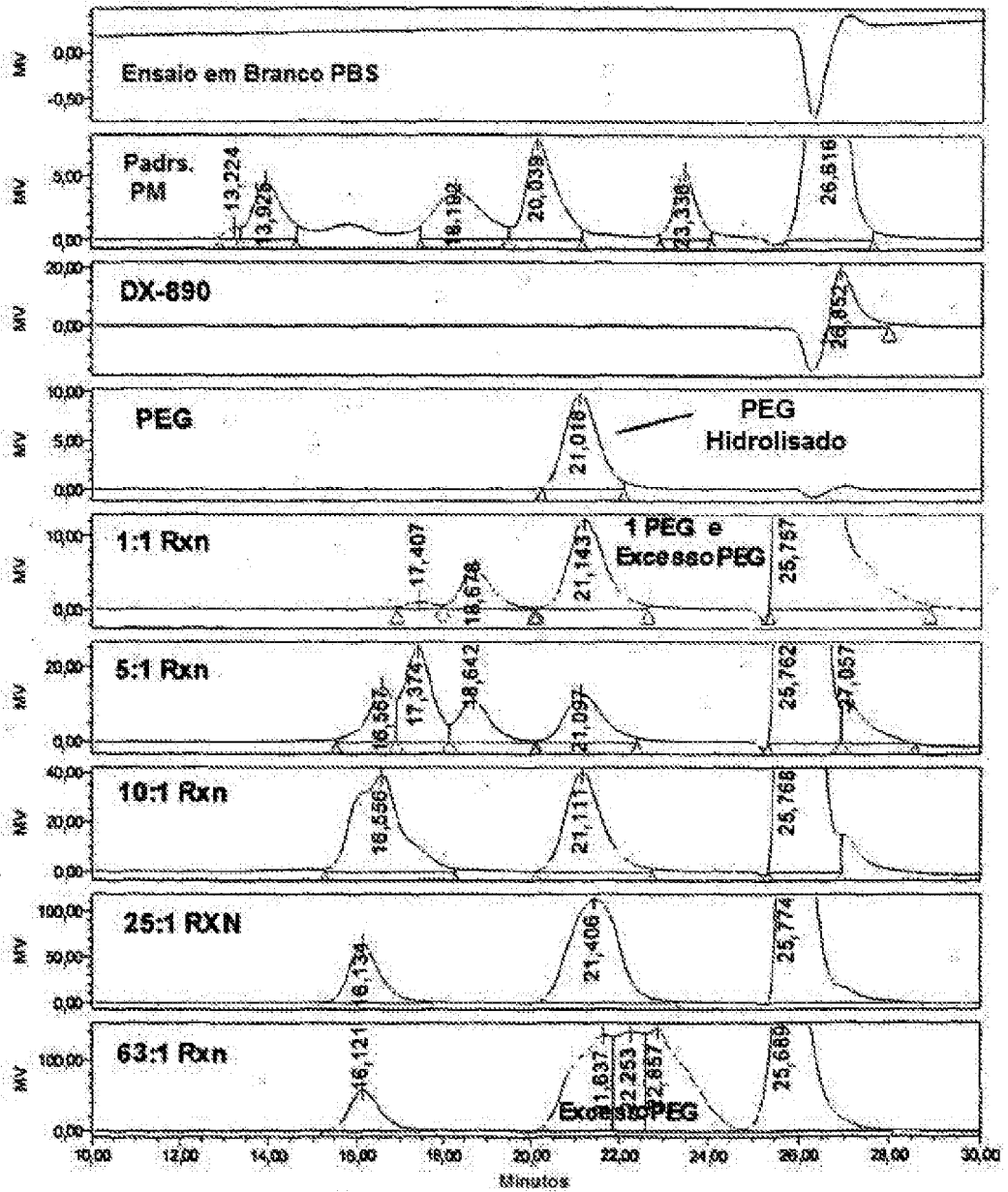


FIG. 6B

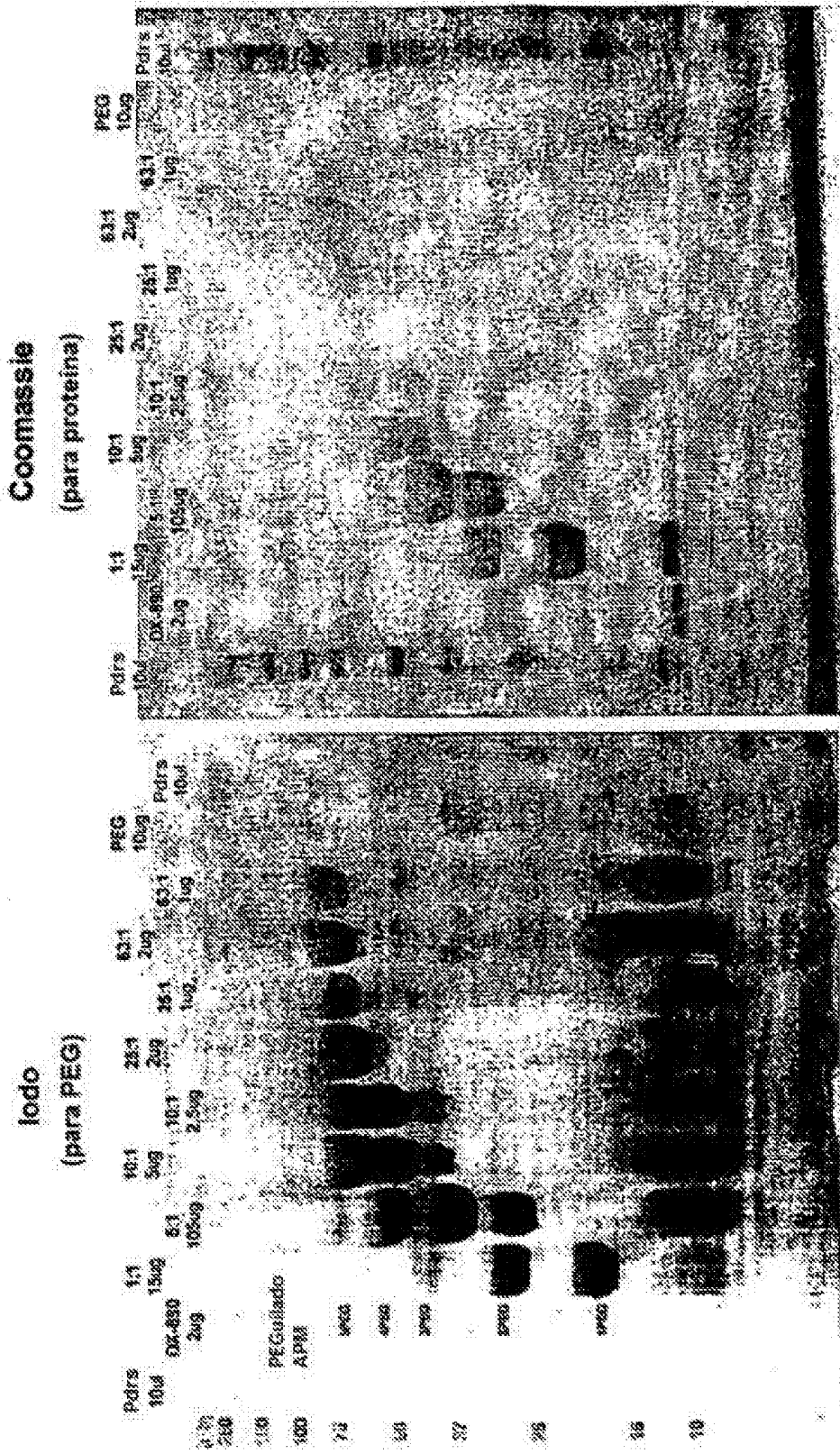


FIG. 7

FIG. 8a

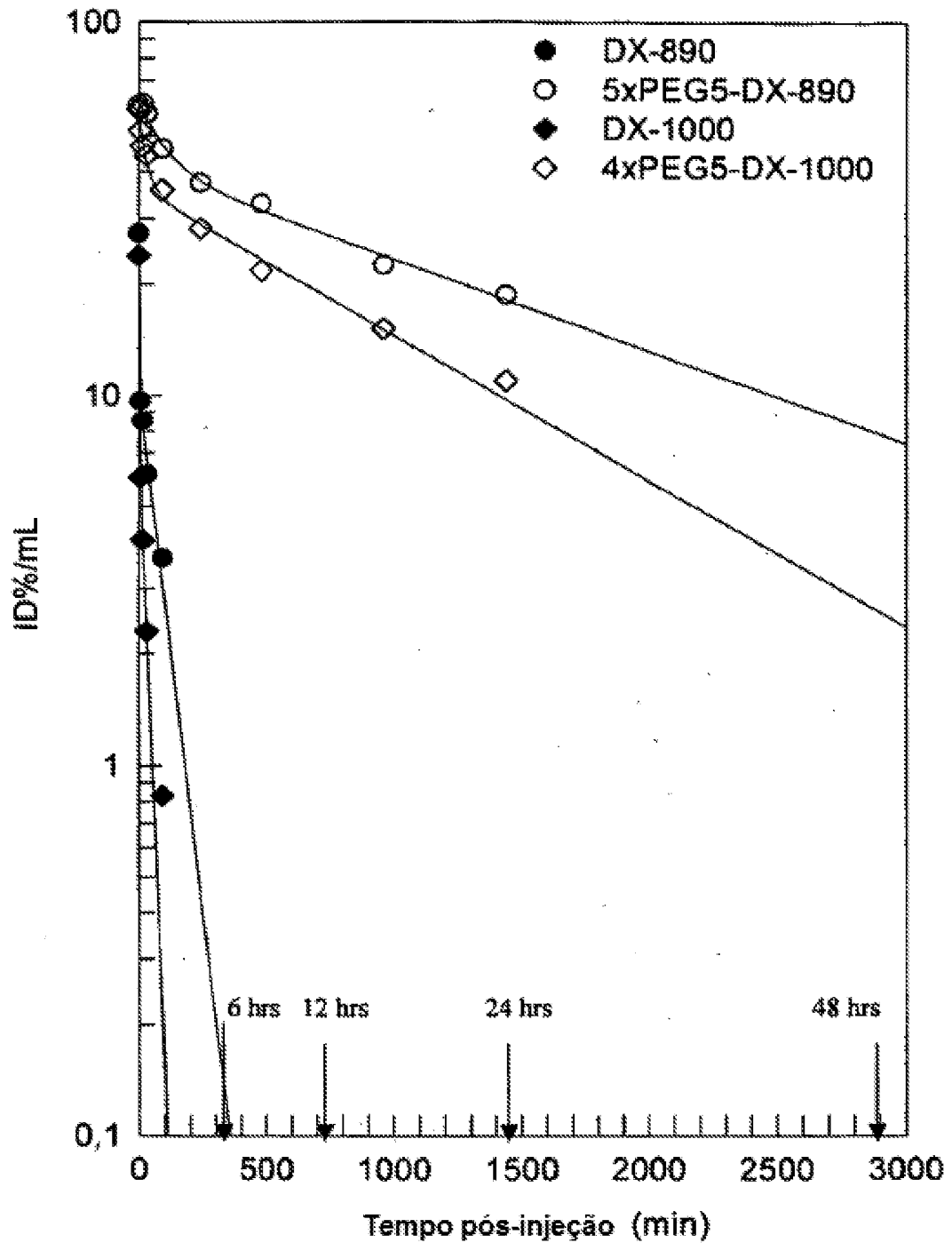


FIG. 8b

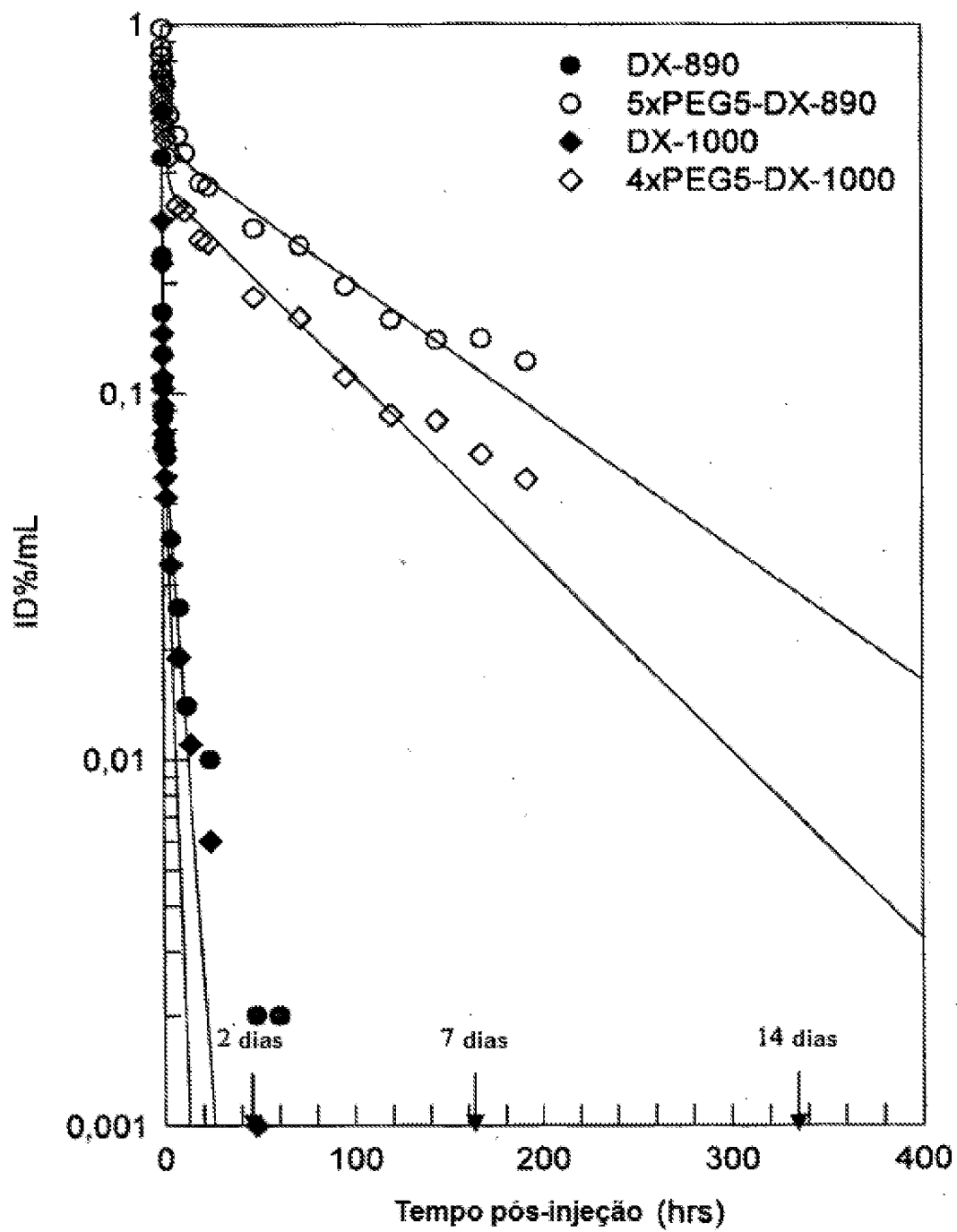
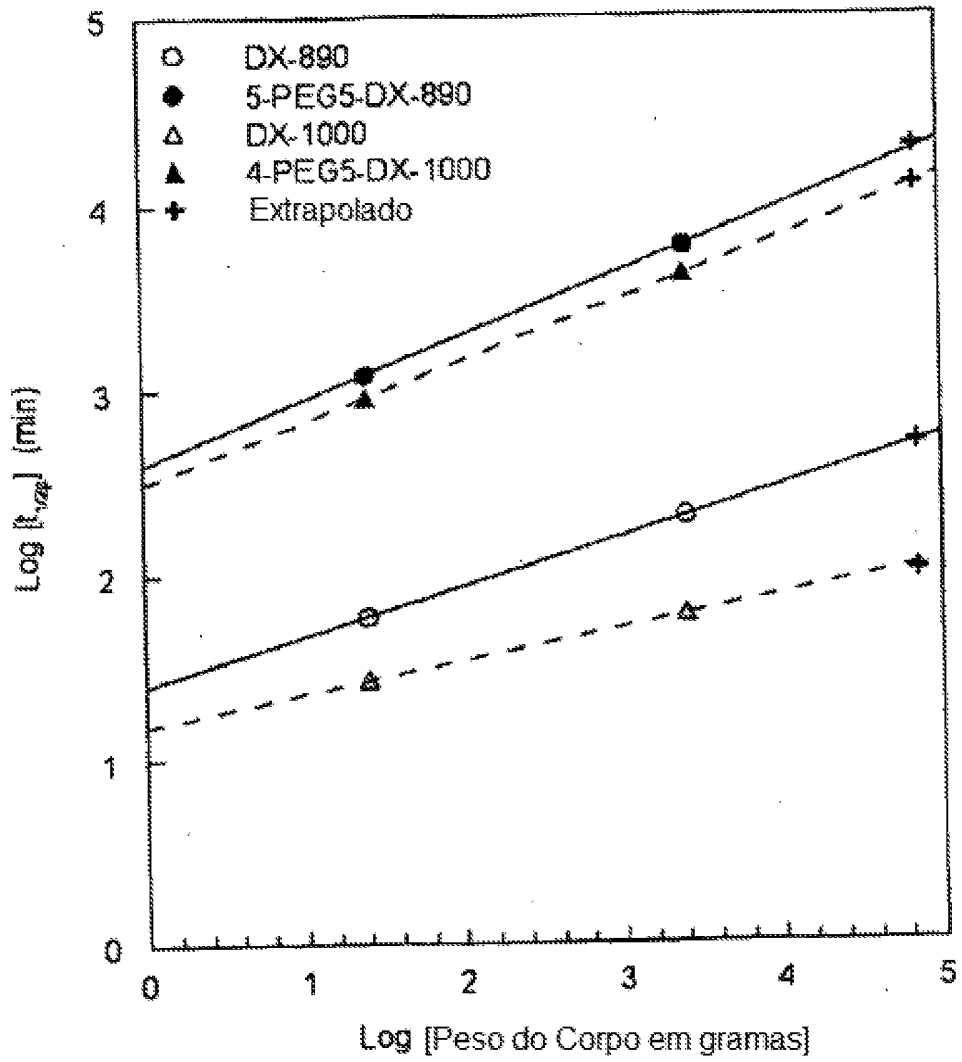


FIG. 8c

Extrapolação Alométrica para $t_{1/2\beta}$



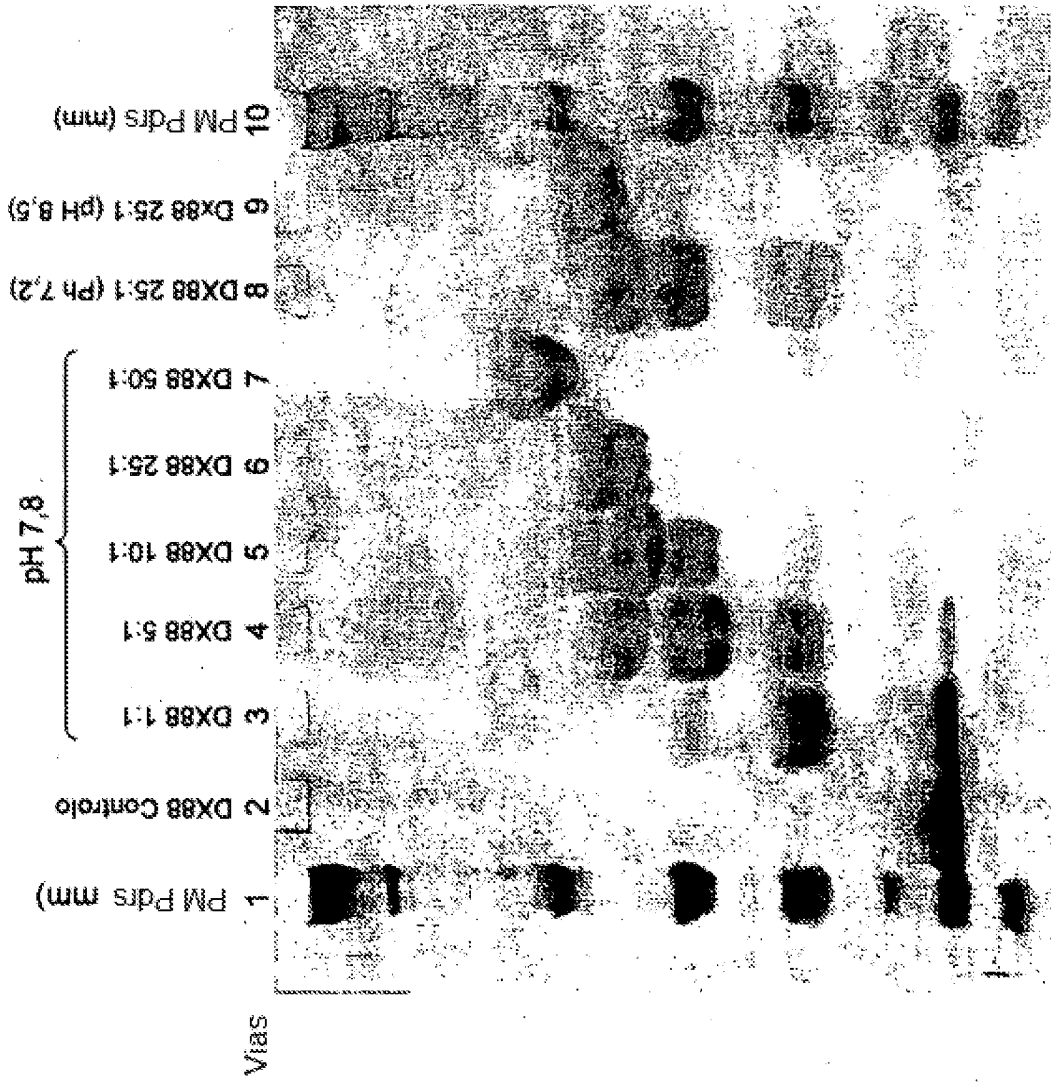


FIG. 9