



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

(21) PI 0816837-7 A2



(22) Data do Depósito: 26/09/2008

(43) Data da Publicação Nacional: 18/08/2020

(54) Título: ANTÍDOTOS PARA INIBIDORES DO FATOR XA E MÉTODOS PARA SUA UTILIZAÇÃO

(51) Int. Cl.: C12N 9/64; A61P 7/04.

(30) Prioridade Unionista: 20/08/2008 US 61/090,574; 28/09/2007 US 60/976,343.

(71) Depositante(es): PORTOLA PHARMACEUTICALS, INC..

(72) Inventor(es): GENMIN LU; DAVID R. PHILLIPS; PATRICK ANDRE; UMA SINHA.

(86) Pedido PCT: PCT US2008078014 de 26/09/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/042962 de 02/04/2009

(85) Data da Fase Nacional: 18/03/2010

(57) Resumo: ANTÍDOTOS PARA INIBIDORES DO FATOR XA E MÉTODOS PARA SUA UTILIZAÇÃO A presente invenção está relacionada aos antídotos para anticoagulantes que visam o fator Xa. Os antídotos são derivados da proteína do fator Xa que se ligam aos inibidores do fator Xa e, dessa forma, os neutralizam substancialmente, mas não se agregam ao complexo de protrombinase. Os derivados aqui descritos são desprovidos ou possuem atividade coagulante intrínseca reduzida. São aqui revelados métodos de interrupção ou prevenção de sangramento em um paciente está sendo submetido á terapia anticoagulante com uma inibidor do fator Xa.

1	41	179	183	235	488
PreFm	LC	RKR	AP	DOMÍNIO CATALÍTICO	

ANTÍDOTOS PARA INIBIDORES DO FATOR Xa E MÉTODOS PARA SUA UTILIZAÇÃO

REFERÊNCIA CRUZADA COM PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica o benefício sob 35 U.S.C. §
5 119(e) do Pedido U.S. Provisório N° de Série 60/976.343,
depositado em 28 de setembro de 2007, e do Pedido U.S.
Provisório N° de Série 61/090.574, depositado em 20 de
agosto de 2008, ambos incorporados por referência em sua
totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

10 A presente invenção está relacionada ao uso de
derivados do fator Xa (fXa) que possuem atividade pró-
coagulante intrínseca reduzida ou ausente, mas são capazes
de se ligar e/ou neutralizar inibidores de fXa, atuando,
15 dessa forma, como antídotos para anticoagulantes dirigidos
ao fXa.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Os anticoagulantes servem a uma necessidade no mercado
no tratamento ou prevenção de trombose indesejada em
20 pacientes com uma tendência a formar coágulos sangüíneos
como, por exemplo, aqueles pacientes que possuem distúrbios
da coagulação, confinados aos períodos de imobilidade ou
que passam por cirurgias médicas. Uma das principais
limitações da terapia anticoagulante, no entanto, é o risco
25 de sangramento associado aos tratamentos, e limitações
sobre a habilidade para reverter rapidamente a atividade
anticoagulante no caso de overdose ou caso seja necessário
um procedimento cirúrgico urgente. Dessa forma, são
altamente desejáveis antídotos específicos e eficazes para
30 todas as formas de terapia anticoagulante. Para

considerações em relação à segurança, também é vantajoso ter um par de anticoagulante-antídoto no desenvolvimento de novos fármacos anticoagulantes.

Os pares de anticoagulante-antídoto atualmente
5 disponíveis para o excesso de anticoagulação são heparina - protamina e warfarina - vitamina K. O plasma fresco congelado e o fator VIIa recombinante (rfVIIa) também foram usados como antídotos não específicos em pacientes sob
10 tratamento com heparina de baixo peso molecular, que sofrem de trauma importante ou hemorragia severa (Lauritzen, B. e col., *Blood*, 2005, 607A-608A). Também há relatos de fragmentos de protamina (Patente U.S. N° 6.624.141) e pequenos peptídeos sintéticos (Patente U.S. N° 6.200.955) como antídotos para heparina ou heparina de baixo peso
15 molecular; e muteínas de trombina (Patente U.S. N° 6.060.300) como antídotos para inibidor de trombina. Intermediários e derivados protrombina foram relatados como antídotos para hirudina e inibidores sintéticos de trombina (Patentes U.S. N°s: 5.817.309 e 6.086.871).

20 Uma forma de terapia anticoagulante promissora tem como alvo o fator Xa (fXa) e, na verdade, vários inibidores diretos de fXa estão atualmente em diferentes estágios de desenvolvimento clínico para uso na terapia anticoagulante. Muitos destes são pequenas moléculas. Embora esses novos
25 inibidores de fXa exibam boas perspectivas para o tratamento, ainda são necessários antídotos específicos e eficazes. No caso de hiperanticoagulação ou necessidade de cirurgia em pacientes tratados com esses inibidores de fXa, pode ser necessário um agente para neutralizar
30 substancialmente o inibidor ou inibidores de fXa

administrados e restaurar a hemostasia normal.

Os agentes atualmente disponíveis, por exemplo, fator VIIa recombinante (rfVIIa), são mecanisticamente limitados e não específicos para a reversão dos inibidores de fXa e, 5 dessa forma, são altamente desejáveis melhores opções para o médico. Em estudos em humanos, rfVIIa foi usado para reverter o efeito de inibidores indiretos de fXa antitrombina III-dependentes como, por exemplo, fondaparinux e idraparinux (Bijsterveld, N.R. e col., 10 *Circulation*, 2002, 106: 2.550-2.554; Bijsterveld, N.R. e col., *British J. of Haematology*, 2004(124): 653-658). O mecanismo de ação do fator VIIa (fVIIa) é atuar com fator tecidual para converter o fator X (fX) presente na circulação sangüínea em fXa para restaurar a hemostasia 15 normal em pacientes. Esse modo de ação necessariamente dita que a maior concentração potencial de fXa que poderia ser alcançada para neutralizar inibidores de fXa dirigidos ao sítio ativo é limitada pela concentração plasmática circulante de fX. Dessa forma, o potencial da utilização de rfVIIa para reverter o efeito de inibidores diretos de fXa 20 é mecanisticamente limitado. Na medida em que a concentração plasmática circulante de fX é de 150 nanomolar ("nM"), a quantidade máxima de fXa produzida por esse modo seria de 150 nM. Dessa forma, o potencial da utilização de rfVIIa para reverter o efeito de inibidores diretos de fXa 25 é mecanisticamente limitado. As concentrações terapêuticas relatadas de inibidores de fXa de pequena molécula como, por exemplo, rivaroxaban, eram maiores (aproximadamente 600 nM, Kubitza D, e col., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 2005, 61: 30 873-880) do que a quantidade potencial de fXa gerada por

rfVIIa. O uso de rfVIIa para a reversão de níveis terapêuticos ou supratherapêuticos da anticoagulação por inibidor de fXa forneceria, portanto, níveis inadequados de eficácia. Como mostrado na Figura 4, o uso de rfVIIa possui
5 um efeito limitado sobre a neutralização da atividade anticoagulante de um inibidor do fator Xa betrixaban (descrito abaixo). fVIIa recombinante mostrou uma atividade de antídoto dose-responsiva de 50 nM a 100 nM, mas o efeito se nivelou entre 100 nM a 200 nM, indicando que seu efeito
10 de antídoto é limitado por outros fatores além de sua concentração. Em todas as concentrações de rfVIIa testadas, betrixaban ainda mostrou uma inibição dose-resposta de fXa, até cerca de 75% de inibição em uma concentração de 250 nM. Essa observação é consistente com o mecanismo de ação de
15 fVIIa proposto. Isso também é apoiado por estudos que mostram que rfVIIa não revertia completamente o efeito inibidor de fondaparinux sobre os parâmetros da geração de trombina e ativação de protrombina (Gerotiafas, G.T., e col., *Thrombosis & Haemostasis* 2204(91): 531-537).

20 O fXa ativo exógeno não pode ser administrado diretamente a um indivíduo de uma forma similar ao rfVIIa. Diferentemente de rfVIIa, que possui atividade pró-coagulante muito baixa na ausência de seu fator tecidual co-fator, o fXa nativo é uma potente enzima e possui um
25 risco potencial de causar trombose. Dessa forma, o uso de rfVIIa ou fXa ativo como antídoto para uma terapia anticoagulante com fXa possui desvantagens.

Dessa forma, há a necessidade de agentes antídotos aprimorados que não causem trombose indesejada e que sejam
30 eficazes para substancialmente neutralizar a atividade

anticoagulante de um inibidor de fXa no caso de uma overdose do inibidor de fXa ou caso a hemostasia normal precise ser restaurada para evitar ou interromper um sangramento.

5 Qualquer uma e todas as publicações, patentes, pedidos de patente aqui mencionados são aqui incorporados por referência em sua totalidade.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

10 Foi agora descoberto que a administração de derivados modificados de proteínas de fXa é útil como antídoto para anticoagulantes dirigidos ao fXa. Os derivados modificados de proteínas de fXa não competem com fXa na montagem no complexo de protrombinase, mas, em vez disso, se ligam e/ou substancialmente neutralizam os anticoagulantes, por exemplo, inibidores de fXa. Os derivados úteis como antídotos são modificados para reduzir ou remover as atividades pró-coagulantes e anticoagulantes intrínsecas, mantendo a habilidade para se ligar aos inibidores. 15 Contempla-se que os derivados da invenção podem incluir a modificação do sítio ativo, ou alteração ou remoção de todo o domínio Gla de fXa, ou várias combinações destes. É ainda contemplado que a modificação do domínio Gla reduz ou remove o efeito anticoagulante do derivado de fXa sobre a hemostasia normal, pois um fXa de comprimento total com 20 sítio ativo modificado sabidamente é um anticoagulante. 25

 É ainda contemplado que a modificação do domínio EGF (por eliminação ou substituição do domínio EGF1, EGF2, ou ambos os domínios, EGF1 e EGF2) do fXa fornece um derivado útil para os métodos desta invenção. A modificação do 30 domínio EGF pode ser feita isoladamente ou em adição à

modificação do domínio Gla.

Em uma modalidade, o derivado mantém as características estruturais necessárias à ligação ao anticoagulante (ou inibidor de fXa) dirigido ao fXa. Pela
5 ligação do derivado, direta ou indiretamente, ao inibidor, o inibidor é substancialmente neutralizado.

Em um aspecto, a invenção fornece um método de prevenção ou redução de sangramento em um indivíduo submetido à terapia anticoagulante com um inibidor do fator
10 Xa, que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um derivado da proteína do fator Xa que se liga ao inibidor do fator Xa, mas não se agrega ao complexo de protrombinase. Em uma modalidade, o derivado possui uma ou mais das seguintes propriedades: atividade
15 pró-coagulante reduzida ou ausente; um domínio Gla modificado ou removido; e um sítio ativo modificado. O derivado da invenção se liga seletivamente e inibe um inibidor do fator Xa administrado exogenamente, neutralizando substancialmente, dessa forma, a atividade
20 anticoagulante de um inibidor de fXa. Esse método contempla métodos *in vitro* e *in vivo*. Várias modificações adicionais à proteína do fator Xa contempladas pela invenção são encontradas ao longo da descrição detalhada.

Deve-se entender que os derivados contemplados por
25 esta invenção não são fator VIIa derivado do plasma, fator VIIa recombinante, plasma fresco congelado, concentrados de complexo de protrombina ou sangue total.

Um aspecto da presente invenção consiste no uso dos derivados de fator Xa e composições que o contêm para o
30 tratamento de pacientes que receberam ou que estão

recebendo terapia de hiperanticoagulação com um inibidor do fator Xa, ou pacientes que receberam previamente a administração de um inibidor do fator Xa e depois precisam de hemostasia, por exemplo, como necessário para a
5 realização de cirurgia eletiva ou de emergência. Em um aspecto, as proteínas de fXa modificadas se distinguem de fXa de ocorrência natural pelo fato de terem atividade pró-coagulante intrínseca reduzida ou removida e não interferirem com a função fisiológica do fXa na hemostasia,
10 embora ainda sendo capazes de se ligar e neutralizar substancialmente os inibidores de fXa.

Em outro aspecto, a proteína do fator Xa modificada é co-administrada com um agente capaz de prolongar a meia-vida plasmática (ou meia-vida circulante) do derivado de
15 fator Xa. Ainda em outro aspecto, o antídoto é conjugado a uma porção para prolongar sua meia-vida plasmática.

Também são fornecidas composições farmacêuticas que contêm o derivado de fator Xa que se liga (e/ou substancialmente neutraliza) ao inibidor do fator Xa, mas
20 não se agrega ao complexo de protrombinase. A composição farmacêutica opcionalmente compreende um veículo farmaceuticamente aceitável.

Em outro aspecto, esta invenção fornece um kit que compreende um inibidor de fXa para uso anticoagulante e um
25 antídoto para o inibidor de fXa (ou derivado de fator Xa) para uso quando for necessária a neutralização substancial da atividade anticoagulante do inibidor de fXa.

Uma modalidade da invenção se dirige a um polipeptídeo isolado que compreende a seqüência de aminoácidos do ID. DE
30 SEQ. N°: 12 ou um polipeptídeo que possui pelo menos 80% de

homologia para o ID. DE SEQ. N°: 12. Outra modalidade se dirige a um polipeptídeo isolado de duas cadeias que compreende a seqüência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 13 ou um polipeptídeo que possui pelo menos 80% de homologia para o ID. DE SEQ. N°: 13. Ainda outra modalidade se dirige a um polipeptídeo isolado que compreende a seqüência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 15 ou um polipeptídeo que possui pelo menos 80% de homologia para o ID. DE SEQ. N°: 15.

10 Também é fornecida uma composição farmacêutica que compreende um veículo e um polipeptídeo descrito acima.

Também é fornecido um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo descrito acima.

15 É ainda aqui fornecido um conjugado peptídico que compreende um veículo ligado covalente ou não covalentemente a um polipeptídeo descrito acima. O veículo pode ser um lipossomo, uma micela, um polímero farmaceuticamente aceitável ou um veículo farmaceuticamente aceitável.

20 Esta invenção também é dirigida a um anticorpo que se liga a um polipeptídeo descrito acima. O anticorpo é um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo quimérico ou um anticorpo humanizado. Também é fornecido um fragmento biologicamente ativo do anticorpo. O anticorpo pode ser marcado de forma detectável. O anticorpo (ou fragmento de anticorpo) também é fornecido como parte de uma composição que ainda compreende um veículo.

25 Em uma modalidade, é fornecido um complexo anticorpo-peptídeo que compreende o anticorpo da invenção e um polipeptídeo que se liga especificamente ao anticorpo. O

polipeptídeo é o polipeptídeo contra o qual o anticorpo é desenvolvido. O anticorpo pode ser um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo quimérico ou um anticorpo humanizado.

5 Em outra modalidade, é fornecido um método para a preparação de um polipeptídeo da invenção que compreende a expressão de um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo em uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica. Em uma modalidade, a célula hospedeira é uma célula
10 eucariótica e, em particular, é uma célula de ovário de hamster chinês. Em uma modalidade, a cadeia pesada (ID. DE SEQ. N°: 15) é expressa em uma célula procariótica, por exemplo, *E. coli*. Em outra modalidade, o polipeptídeo está isolado.

15 Ainda em outra modalidade, é fornecida uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica isolada que compreende um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo da invenção. Em uma modalidade, a célula hospedeira está em uma composição que ainda compreende um veículo.

20 Ainda em outra modalidade, é fornecido um método de prevenção ou redução de sangramento em um indivíduo submetido à terapia anticoagulante com um inibidor do fator Xa que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de uma composição que compreende um
25 polipeptídeo da invenção e um veículo. É ainda fornecido um método de se ligar e inibir seletivamente um inibidor do fator Xa administrado exogenamente em um indivíduo submetido à terapia anticoagulante, que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de uma
30 composição descrita acima.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra esquematicamente a estrutura do domínio do fator X humano (ID. DE SEQ. N°: 1) mostrada na Tabela 1 como relatada em Leytus e col., *Biochem.*, 1986, 25, 5.098-5.102. O ID. DE SEQ. N°: 1 é a sequência de aminoácidos de fX humano codificada pela sequência de nucleotídeos de fX humano (ID. DE SEQ. N°: 2) como mostrada na Tabela 2 conhecida na técnica estabelecida. Por exemplo, a sequência de aminoácidos traduzida é relatada em Leytus e col., *Biochem.*, 1986, 25, 5.098-5.102 e pode ser encontrada em GenBank, "NM_000504" em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=89142731>>. A numeração de aminoácidos nessa sequência é baseada na sequência de fX. O precursor de fX humano (ID. DE SEQ. N°: 1) contém uma sequência pré-pró-líder (aminoácidos 1 a 40 do ID. DE SEQ. N°: 1), seguida por sequências que correspondem à cadeia leve de fX (LC) (aminoácidos 41 a 179 do ID. DE SEQ. N°: 1), ao triploto RKR (aminoácidos 180 a 182 do ID. DE SEQ. N°: 1) que é removido durante a secreção de fX, e à cadeia pesada de fX (aminoácidos 183 à 488 do ID. DE SEQ. N°: 1) que contém o peptídeo de ativação (AP) (aminoácidos 183 a 234 do ID. DE SEQ. N°: 1) e o domínio catalítico (aminoácidos 235 a 488 do ID. DE SEQ. N°: 1).

A Figura 2 (ID. DE SEQ. N°: 3) mostra a sequência de aminoácidos do fator X humano maduro. A numeração de aminoácidos nessa figura se baseia na sequência de fX maduro que começa no terminal N da cadeia leve de fX. O fator X circula no plasma como uma molécula de duas cadeias ligada por uma ligação dissulfeto. A cadeia leve (LC) possui 139 resíduos de aminoácidos (aminoácidos 41 a 179 do

ID. DE SEQ. N°: 1) e contém o domínio rico em ácido γ -carboxiglutâmico (Gla) (aminoácidos 1-45 do ID. DE SEQ. N°: 3), incluindo um *stack* aromático curto (AS) (aminoácidos 40-45 do ID. DE SEQ. N°: 3), seguido por dois domínios
 5 fator de crescimento epidérmico (EGF)-like (EGF1: aminoácidos 46-84, EGF2: aminoácidos 85-128 do ID. DE SEQ. N°: 3). A cadeia pesada (HC) possui 306 aminoácidos e contém um peptídeo de ativação de 52 aminoácidos (AP: aminoácidos 143-194 do ID. DE SEQ. N°: 3), seguido pelo
 10 domínio catalítico (aminoácidos 195-448 do ID. DE SEQ. N°: 3). Os equivalentes à tríade catalítica para H57-D102-S195 na numeração de quimotripsina estão localizados em His236, Asp282 e Ser379 na sequência de fX e estão sublinhados (aminoácidos 236, 282 e 379 do ID. DE SEQ. N°: 3).

15 A Figura 3 mostra esquematicamente a estrutura do domínio do fator X humano maduro mostrado na Figura 2. A numeração de aminoácidos nessa figura se baseia na sequência de fX maduro. Os sítios de clivagem para digestão por quimotripsina para remover o fragmento que contém o
 20 domínio Gla (aminoácido 1-44 do ID. DE SEQ. N°: 3) e ativação de fX para remover o peptídeo de ativação estão realçados. A digestão por quimotripsina de fXa resulta em um fXa sem domínio Gla desprovido dos resíduos de aminoácido 1-44 (ID. DE SEQ. N°: 4).

25 A Figura 4 mostra o efeito de concentrações variáveis de rfVIIa na presença de fator tecidual sobre a atividade anticoagulante de um inibidor de fXa betrixaban (descrito abaixo) na geração de trombina (expressa em um ensaio de unidades relativas de fluorescência (RFU) (como descrito no
 30 Exemplo 2)). Os dados mostram que uma combinação de rfVIIa

e fator tecidual foi incapaz de neutralizar completamente a atividade anticoagulante de um inibidor de fXa, betrixaban, em concentrações de até 200 nM.

5 A Figura 5 mostra que fXa anidro com seu domínio Gla intacto reverte a inibição de fXa por betrixaban em um sistema purificado contendo fXa ativo e betrixaban (círculo aberto), enquanto fXa anidro isoladamente possui atividade pró-coagulante desprezível (triângulo aberto) comparado com fXa ativo. A atividade cromogênica de fXa foi normalizada para o fXa ativo na ausência de qualquer inibidor (quadrado aberto). Isso é descrito com mais detalhes no Exemplo 2. Os dados mostram que fXa anidro é inativo contra o substrato de fXa, embora retenha a habilidade de ligação ao inibidor de fXa.

15 A Figura 6 mostra que o fXa anidro com domínio Gla intacto na Figura 5 é um inibidor potente em um ensaio de geração de trombina plasmática (expressa como unidades relativas de fluorescência (RFU)) (como descrito no Exemplo 2). Ele inibiu quase completamente a geração de trombina a cerca de 115 nM. Os dados mostram que fXa anidro sem modificação do domínio Gla não é adequado para uso como um antídoto para o inibidor de fXa.

25 A Figura 7 mostra a comparação da atividade de coagulação de fXa ativo em formato de uma placa de 96 poços antes da digestão por quimotripsina, e após 15 minutos e 30 minutos de digestão por quimotripsina. Como mostrado nessa figura, o tempo de coagulação (alteração da OD405) foi significativamente retardado após o fXa ser digerido por quimotripsina por 15 minutos e não foi observada nenhuma coagulação por até 20 minutos quando o fXa foi digerido por

30 minutos. Esse resultado também foi usado para estabelecer condições para a digestão por quimotripsina de fXa anidro, pois ele não possui atividade que possa ser monitorada durante a digestão. Isso é descrito com mais
5 detalhes no Exemplo 3.

A Figura 8 mostra a afinidade de ligação de fXa anidro des-Gla a um inibidor do fator Xa betrixaban, como descrito no Exemplo 4. Os dados mostram que fXa anidro des-Gla, preparado por digestão por quimotripsina de fXa anidro para
10 remover o fragmento que contém o domínio Gla (resíduos 1-44), é capaz de se ligar ao betrixaban com afinidade similar que o fXa nativo (fXa: $K_i = 0,12$ nM, fXa anidro des-Gla: $K_d = 0,32$ nM).

A Figura 9 mostra a reversão da atividade
15 anticoagulante de concentrações variáveis de betrixaban por adição de um concentrado de 680 nM do antídoto (fXa anidro des-Gla) em um ensaio de geração de trombina do Exemplo 2. Na concentração de 680 nM, fXa anidro des-Gla foi capaz de produzir restauração substancialmente completa da atividade
20 de fXa.

A Figura 10 mostra a reversão da atividade anticoagulante de 250 nM de betrixaban por concentrações variáveis do antídoto (fXa anidro des-Gla) em ensaios de prolongação da coagulação usando reagente aPTT em formato
25 de uma placa de 96 poços (como descrito no Exemplo 3). Os dados mostram que tempo de coagulação era comparável àquele de plasma de controle pobre em plaquetas quando cerca de 608 nM do antídoto eram usados para neutralizar 250 nM do inibidor de fXa betrixaban.

30 A Figura 11 mostra o efeito sobre a atividade

anticoagulante de enoxaparina (0,3125 - 1,25 U/ml) por 563 nM do antídoto (fXa anidro des-Gla) em ensaios de prolongação da coagulação usando reagente aPTT em formato de uma placa de 96 poços, expressa como alterações em número de vezes após normalização. O protocolo do ensaio é descrito no Exemplo 3. Os dados mostram que a adição de 563 nM do antídoto neutralizou significativamente a atividade de uma heparina de baixo peso molecular enoxaparina.

A Figura 12 mostra o efeito do antídoto, fXa anidro des-Gla, sobre a atividade de trombina (5 nM) e sua inibição por 50 nM de argatroban, um inibidor específico de trombina, em um ensaio cromogênico. Como esperado, o antídoto do inibidor de fXa não afeta de forma detectável a atividade de trombina ou sua inibição por pelo inibidor específico argatroban em concentrações de até 538 nM. Isso é descrito com mais detalhes no Exemplo 14.

A Figura 13 mostra o efeito sobre a atividade anticoagulante de 400 nM betrixaban por concentrações variáveis do antídoto, fXa anidro des-Gla, em um ensaio de aPTT usando um timer de coagulação padronizado. O protocolo do ensaio é descrito no Exemplo 3. Os dados mostram que o antídoto do inibidor de fXa reverte substancialmente a inibição de fXa por 400 nM de betrixaban. A EC_{50} do antídoto foi estimada como sendo de cerca de 656 nM com 400 nM de betrixaban.

A Figura 14 mostra o mapa da construção de DNA para a expressão do mutante triplo de fXa (ID. DE SEQ. N°: 12) em células CHO. DNA de plasmídeo foi linearizado e transfectado em células CHO dhfr(-). As células foram selecionadas usando meio deficiente em tetrahydrofolato

(HT) mais metotrexato (MTX). Os clones estáveis foram avaliados quanto à expressão de proteína elevada por ELISA. O mutante triplo de fXa foi produzido em meio sem soro e purificado por combinação de colunas de troca iônica e de afinidade. A numeração no mapa foi baseada na sequência de polinucleotídeos que codifica fX humano ID. DE SEQ. N°: 1. Por exemplo, uma mutação de alanina no sítio ativo S419 (ID. DE SEQ. N°: 1) é equivalente à mutação em S379 (ID. DE SEQ. N°: 3) de fX maduro humano discutida ao longo do pedido e, mais particularmente, no Exemplo 7.

A Figura 15 mostra um Western blot de Antídoto-r purificado usando anticorpos monoclonais que reconhecem a cadeia pesada e cadeia leve de fX, respectivamente. Mediante redução da ligação dissulfeto que conecta as cadeias leves e pesadas, a cadeia pesada do Antídoto-r migra em um peso molecular esperado similar àquele do derivado de fXa do plasma. A eliminação de 6-39 como no domínio Gla do fXa mutante resulta em uma banda de peso molecular menor da cadeia leve do Antídoto-r comparado com o fXa normal.

A Figura 16 mostra o nível plasmático de betrixaban em camundongos (n = 7-10 por grupo) após administração oral de betrixaban isoladamente (15 mg/kg), ou betrixaban (15 mg/kg), seguida por injeção intravenosa (300 µg, IV) de antídoto derivado do plasma (Antídoto-pd) preparado de acordo com o Exemplo 1. O Antídoto-pd foi administrado 5 minutos antes do ponto do tempo de 1,5 hora, e amostras de sangue de camundongo (0,5 ml) foram coletadas a 1,5, 2,0 e 4,0 horas após a administração oral de betrixaban. Os níveis plasmáticos da INR ("International Normalized Ratio"

- sistema que a Organização Mundial de Saúde e o "International Committee on Thrombosis and Hemostasis" estabeleceram para o relato de resultados de testes da coagulação sangüínea) do sangue total, betrixaban e antídoto foram analisados. O nível de betrixaban (média $\pm$ SEM) no plasma de camundongo foi tabulado em função do tempo para camundongos após 15 mg/kg (quadrado aberto) e 15 mg/kg seguidos por injeção do antídoto (círculo aberto). A correlação PK-PD do grupo tratado com antídoto no ponto do tempo de 1,5 hora (5 minutos após a injeção do antídoto) foi resumida na Tabela 13. Uma única injeção do antídoto resultou em uma redução $>50\%$ de betrixaban funcional com base nas medidas da INR. Isso é descrito com mais detalhes no Exemplo 8.

A Figura 17 mostra os resultados de um experimento em camundongo com Antídoto-r purificado ($n = 4-10$ por grupo). O nível de betrixaban no plasma de camundongo (Figura 17A) e INR do sangue total (Figura 17B) foram comparados após administração oral de betrixaban isoladamente (15 mg/kg) ou betrixaban (15 mg/kg) seguida por injeção intravenosa (300 μ g) de Antídoto-r. Os valores médios para cada grupo tratado foram indicados. Como resumido na Tabela 14, uma única injeção IV do Antídoto-r resultou em correção $>50\%$ da INR do sangue total ex vivo, justificando a neutralização eficaz de inibidores de fXa pelo antídoto por meio de injeções múltiplas ou outros regimes. Esses resultados demonstram que as variantes de fXa desta invenção possuem potencial para atuar como antídotos universais para reverter o efeito anticoagulante de inibidores de fXa em pacientes com sangramento ou outras emergências médicas.

Isso é descrito com mais detalhes no Exemplo 8.

A Figura 18 mostra reversão por Antídoto-r do efeito inibidor de enoxaparina em um ensaio de coagulação por mudança da turvação em 96 poços. Os resultados são basicamente similares aos do Antídoto-pd (Figura 11), o que indica que ambos os derivados de fXa possuem atividade de antídoto funcional comparável. Cinqüenta nM de Antídoto-r corrigiram substancialmente (>75%) o efeito inibidor de 1,25 U/ml de enoxaparina. O protocolo do ensaio é apresentado no Exemplo 11.

A Figura 19 mostra a reversão por Antídoto-r do efeito inibidor de heparina de baixo peso molecular (LMWH) testado em um ensaio de coagulação de plasma humano. As Figuras 18 e 19 são discutidas no Exemplo 11.

A Figura 20 mostra a reversão por Antídoto-r do efeito anticoagulação de rivaroxaban. Isso é discutido com mais detalhes no Exemplo 12.

A Figura 21 mostra o alinhamento da seqüência de polinucleotídeos e seqüência de polipeptídeos traduzida do Antídoto-r.

A Figura 22 mostra os resultados de um experimento em camundongo com uma única injeção IV (1 injeção) ou duas injeções (2 injeções) do Antídoto-r (n = 5 por grupo, 312 µg/200 µl Antídoto-r). O nível de betrixaban no plasma (Figura 22A) foi comparado após administração oral de betrixaban (15 mg/kg), seguida por injeção intravenosa de veículo ou Antídoto-r (veja o Exemplo 8 para detalhes). Como mostrado na Figura 22A, uma única injeção IV de Antídoto-r aumentou o nível de betrixaban no plasma em mais de 8 vezes comparado com controle de veículo (controle 1),

indicando a habilidade do antídoto para capturar eficazmente betrixaban *in vivo*. Uma segunda injeção do antídoto aumentou ainda mais o nível de betrixaban em menos de 2 vezes, comparada com uma única injeção, indicando uma
5 quantidade limitante de betrixaban no sangue de camundongo e possível reversão de seu efeito anticoagulante pelo antídoto. A Figura 22B demonstra que a INR medida diminui à medida que a proporção de antídoto/betrixaban aumenta no plasma de camundongo após injeções únicas e duplas do
10 antídoto.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

I. Definições

A prática da presente invenção empregará, a menos que indicado de forma diferente, técnicas convencionais de
15 cultura de tecido, imunologia, biologia molecular, microbiologia, biologia celular e DNA recombinante, que estão dentro do conhecimento da técnica. Veja, por exemplo, Sambrook e Russell eds. (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª Edição; a série Ausubel e col. eds.
20 (2007) "Current Protocols in Molecular Biology"; a série "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson e col. (1991) "PCR 1: A Practical Approach" (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson e col. (1995) "PCR 2: A Practical Approach"; Harlow e Lane eds. (1999)
25 "Antibodies, A Laboratory Manual"; Freshney (2005) "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique", 5ª Edição; Gait ed. (1984) "Oligonucleotide Synthesis"; Patente U.S. N° 4.683.195; Hames e Higgins eds. (1984) "Nucleic Acid Hybridization"; Anderson (1999) "Nucleic Acid
30 Hybridization"; Hames e Higgins eds. (1984) "Transcription

and Translation; Immobilized Cells and Enzymes" (IRL Press (1986)); Perbal (1984) "A Practical Guide to Molecular Cloning"; Miller e Calos eds. (1987) "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Cold Spring Harbor Laboratory);
5 Makrides ed. (2003) "Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells"; Mayer e Walker eds. (1987) "Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology" (Academic Press, Londres); Herzenberg e col. eds (1996) "Weir's Handbook of Experimental Immunology; Manipulating
10 the Mouse Embryo: A Laboratory Manual", 3ª Edição (Cold Spring Harbor Laboratory Press (2002)).

Todas as designações numéricas, por exemplo, pH, temperatura, tempo, concentração e peso molecular, incluindo faixas, são aproximações que são variadas (+) ou
15 (-) por incrementos de 0,1. No entanto, deve-se entender que nem sempre seja estabelecido explicitamente que todas as designações numéricas são precedidas pelo termo "cerca de". Deve-se entender também que nem sempre seja estabelecido explicitamente que os reagentes aqui descritos
20 são meramente exemplares e que equivalentes destes são conhecidos na técnica.

Como usada na especificação e nas reivindicações, as formas no singular "um", "uma", "o" e "a" incluem referências no plural, a menos que o contexto determine
25 claramente de forma diferente. Por exemplo, o termo "um veículo farmacologicamente aceitável" inclui vários veículos farmacologicamente aceitáveis, incluindo misturas destes.

Como aqui usado, o termo "que compreende" visa significar que as composições e métodos incluem os
30 elementos citados, mas não excluem outros. O termo "que

consiste basicamente em", quando usado para definir composições e métodos, significa que exclui outros elementos de qualquer significância essencial à combinação para o uso a que se destina. Dessa forma, uma composição
5 que consiste basicamente nos elementos aqui definidos não excluiria contaminantes residuais do método de isolamento e purificação e veículos farmacêuticamente aceitáveis, por exemplo, solução salina tamponada com fosfato, conservantes, e semelhantes. O termo "que consiste em"
10 significa que exclui mais do que elementos residuais de outros ingredientes e etapas substanciais do método para administração das composições desta invenção.

As modalidades definidas por cada um desses termos de transição estão dentro do escopo desta invenção.

15 Um "objeto" de diagnóstico ou tratamento é uma célula ou um mamífero, incluindo um ser humano. Animais não humanos submetidos ao diagnóstico ou tratamento incluem, por exemplo, murídeos, por exemplo, ratos, camundongos, caninos, por exemplo, cães, leporídeos, por exemplo,
20 coelhos, animais de criação, animais de caça e animais de estimação.

O termo "proteína" e "polipeptídeo" são usados de forma intercambiável e em seu sentido mais amplo para se referir a um composto de duas ou mais subunidades de
25 aminoácidos, análogos de aminoácidos ou peptidomiméticos. As subunidades podem estar ligadas por ligações peptídicas. Em outra modalidade, a subunidade pode estar ligada por outras ligações, por exemplo, éster, éter etc. Uma proteína ou um peptídeo deve conter pelo menos dois aminoácidos e
30 não há limitação sobre o número máximo de aminoácidos que

podem compreender uma sequência de proteínas ou peptídeos. Como aqui usado, o termo "aminoácido" refere-se aos aminoácidos naturais e/ou não naturais ou sintéticos, incluindo glicina e tanto os isômeros ópticos D quanto L, análogos de aminoácido e peptidomiméticos. As abreviações de uma letra e de três letras dos aminoácidos de ocorrência natural estão listadas abaixo. Um peptídeo de três ou mais aminoácidos é comumente denominado um oligopeptídeo se a cadeia peptídica for curta. Se a cadeia peptídica é longa, o peptídeo é comumente denominado um polipeptídeo ou uma proteína.

1 letra	3 letras	Áminoacido
Y	Tyr	L-tirosina
G	Gly	L-glicina
F	Phe	L-fenilalanina
M	Met	L-metionina
A	Ala	L-alanina
S	Ser	L-serina
I	Ile	L-isoleucina
L	Leu	L-leucina
T	Thr	L-treonina
V	Val	L-valina
P	Pro	L-prolina
K	Lys	L-lisina
H	His	L-histidina
Q	Gln	L-glutamina
E	Glu	Ácido L-glutâmico
W	Trp	L-triptofano
R	Arg	L-arginina
D	Asp	Ácido L-aspártico

N	Asn	L-asparagina
C	Cys	L-cisteína

"Fator Xa" ou "fXa" ou "proteína de fXa" refere-se a uma serina-protease na via da coagulação sangüínea, que é produzida a partir do fator X inativo (fX). O Fator Xa é ativado pelo fator IXa com seu co-fator, fator VIIa, em um complexo conhecido como Xase intrínseca, ou fator VIIa com seu co-fator, fator tecidual, em um complexo conhecido como Xase extrínseca.

fXa forma um complexo de protrombinase ligado à membrana com fator Va e é o componente ativo no complexo de protrombinase que catalisa a conversão de protrombina em trombina. A trombina é a enzima que catalisa a conversão de fibrinogênio em fibrina, que, por fim, leva à formação do coágulo sangüíneo. Dessa forma, a atividade biológica de fXa algumas vezes é aqui denominada "atividade pró-coagulante".

A seqüência de nucleotídeos que codifica fator X humano ("fX") pode ser encontrada em GenBank, "NM_000504" em

<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=89142731)

[id=89142731](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=89142731)>, e está listada na Figura 1b e no ID. DE SEQ N°: 2. A seqüência de aminoácidos correspondente e a estrutura do domínio de fX estão descritas em Leytus e col., *Biochemistry*, 1986, 25: 5.098-5.102. A estrutura do domínio de fX maduro também está descrita em Venkateswarlu, D. e col., *Biophysical Journal*, 2002, 82: 1.190-1.206. Mediante a clivagem catalítica dos primeiros 52 resíduos (aminoácidos 143 a 194 do ID. DE SEQ. N°: 3) da cadeia pesada, fX é ativado em fXa (ID. DE SEQ. N°: 6). fXa contém

uma cadeia leve (ID. DE SEQ. N°: 8) e uma cadeia pesada (ID. DE SEQ. N°: 9). Os primeiros 45 resíduos de aminoácido (resíduos 1-45 do ID. DE SEQ. N°: 6) da cadeia leve são denominados domínio Gla pois contém 11 resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico modificados pós-tradução (Gla). Ele também contém uma sequência aromática *stack* curta (6 resíduos de aminoácido) (resíduos 40-45 do ID. DE SEQ. N°: 6). A digestão por quimotripsina remove seletivamente os resíduos 1-44 resultando em fXa sem domínio Gla (ID. DE SEQ. N°: 4).

10 O domínio catalítico de serina-protease de fXa se localiza na cadeia pesada do terminal C. A cadeia pesada de fXa é altamente homóloga às outras serina-proteases como, por exemplo, trombina, tripsina e proteína C ativada.

A estrutura do domínio de fator X maduro pode ser encontrada em Venkateswarlu D. e col., *Biophysical J.*, 2002, 82, 1.190-1.206, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade. A numeração de aminoácidos nessa figura é a mesma que na Figura 3. O tripeptídeo de Arg140-Lys141-Arg142 (o triplete RKR, como mostrado na

20 Figura 1) que conecta a cadeia leve ao peptídeo de ativação não é mostrado, pois a forma que não possui o tripeptídeo é predominante no plasma sanguíneo da circulação. Os domínios individuais são mostrados em caixas. Esses incluem aminoácidos 1-45 na Figura 2 (ID. DE SEQ. N°: 3). Resíduos catalíticos funcionalmente importantes estão circulados, e

25 "γ" representa o resíduo Gla (ácido γ -carboxiglutâmico).

O termo "fXa nativo" ou "fXa do tipo selvagem" refere-se ao fXa naturalmente presente no plasma ou que é isolado em sua forma original, não modificada, que processa a

30 atividade biológica de ativação de protrombina e, portanto,

promove a formação de coágulo sangüíneo. O termo inclui polipeptídeos de ocorrência natural isolados de amostras de tecido, além de fXa produzido recombinantemente. O termo "fXa ativo" refere-se ao fXa que possui a atividade biológica de ativação de protrombina. "fXa ativo" pode ser um fXa nativo ou fXa modificado que retenha a atividade pró-coagulante.

"Derivados de fXa" ou "fXa modificado" ou "derivados de uma proteína do fator Xa" refere-se às proteínas de fXa que foram modificadas de tal forma que se ligam, direta ou indiretamente, a um inibidor do fator Xa e não se agregam ao complexo de protrombinase. Estruturalmente, os derivados são modificados para não fornecer nenhuma atividade pró-coagulante ou atividade pró-coagulante reduzida. "Atividade pró-coagulante" é aqui citada como a habilidade de um agente para causar coagulação sangüínea ou formação de coágulo. Atividade pró-coagulante reduzida significa que a atividade pró-coagulante foi reduzida por pelo menos cerca de 50% ou mais do que cerca de 90% ou mais do que cerca de 95%, comparado com fXa do tipo selvagem. Por exemplo, fX-S395A recombinante basicamente não possui atividade pró-coagulante medida por ensaios *in vitro*, por exemplo, ensaios da atividade de fXa.

Os derivados possuem sítios ativos modificados ou domínios Gla modificados ou ambos. Modificações adicionais também são contempladas. Contempla-se que essas modificações podem ser feitas de uma ou mais das seguintes formas: eliminação de um ou mais dos aminoácidos da seqüência, substituição de um ou mais resíduos de aminoácido com um ou mais resíduos de aminoácidos

diferentes, e/ou manipulação de uma ou mais cadeias laterais de aminoácidos ou seus terminais "C" ou "N".

O termo "sítio ativo" refere-se à parte de uma enzima ou anticorpo onde ocorre uma reação química. Um "sítio ativo modificado" é um sítio ativo que foi modificado estruturalmente para dar ao sítio ativo reatividade ou especificidade química aumentada ou diminuída. Exemplos de sítios ativos incluem, sem limitação, o domínio catalítico de fator X humano que compreende os 235-488 resíduos de aminoácido (Figura 1), e o domínio catalítico do fator Xa humano que compreende os 195-448 resíduos de aminoácido (Figuras 2 e 3). Exemplos de sítio ativo modificado incluem, sem limitação, o domínio catalítico do fator Xa humano que compreende 195-448 resíduos de aminoácido nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 10, 11, 12, 13 ou 15 com pelo menos uma substituição de aminoácido na posição Arg306, Glu310, Arg347, Lys351, Lys414 ou Arg424.

Como estabelecido acima, os derivados da invenção podem ter domínios Gla modificados ou ter todo o domínio Gla removido. Exemplos de derivados de fXa adequados como antídotos nos métodos desta invenção são fXa sem domínio Gla (IDS. DE SEQ. N^{os}: 4 ou 5), fXa deficiente em Gla (ID. DE SEQ. N^o: 7 com modificações aqui descritas), fXa com modificações no sítio catalítico (IDS. DE SEQ. N^{os}: 10 ou 11) e fXa com modificações nos sítios sabidamente importantes para a interação fV/fVa ou para a interação fVIII/fVIIIa (IDS. DE SEQ. N^{os}: 4, 5, 7, 10 ou 11 com pelo menos uma substituição de aminoácido na posição Arg306, Glu310, Arg347, Lys351, Lys414 ou Arg424), como aqui descrito em detalhes. Exemplos adicionais dos derivados de

fXa contemplados por esta invenção serão fornecidos abaixo.

"fXa sem domínio Gla" ou "fXa des-Gla" refere-se ao fXa que não possui um domínio Gla e engloba derivados de fXa que abrigam outras modificações além da remoção do domínio Gla. Exemplos de fXa sem domínio Gla nesta invenção incluem, sem limitação, derivado de fXa desprovido dos 1-39 resíduos de aminoácido do ID. DE SEQ. N°: 3; derivado de fXa desprovido dos 6-39 resíduos de aminoácido do ID. DE SEQ. N°: 3, que corresponde a um fXa mutante expresso em células CHO descrito com mais detalhes abaixo (ID. DE SEQ. N°: 12, Tabela 12); derivado de fXa desprovido dos 1-44 resíduos de aminoácido do ID. DE SEQ. N°: 3, que corresponde ao fXa des-Gla após digestão por quimotripsina de fXa humano (ID. DE SEQ. N°: 4, Figura 3); e derivado de fXa desprovido de todos os resíduos do 1-45 domínio Gla do ID. DE SEQ. N°: 3 como descrito em Padmanabhan e col., *Journal Mol. Biol.*, 1993, 232: 947-966 (ID. DE SEQ. N°: 5). Outros exemplos incluem fXa des-Gla anidro (ID. DE SEQ. N°: 10, Tabela 10) e fXa des-Gla-S379A (ID. DE SEQ. N°: 11, Tabela 11).

Em algumas modalidades, o fXa des-Gla compreende pelo menos os resíduos de aminoácido 40 a 448 do ID. DE SEQ. N°: 3 ou um equivalente deste. Em algumas modalidades, o fXa des-Gla compreende pelo menos os resíduos de aminoácido 45 a 488 (ID. DE SEQ. N°: 4) ou 46 a 488 (ID. DE SEQ. N°: 5) do ID. DE SEQ. N°: 3 ou equivalentes destes.

Em algumas modalidades, o fXa des-Gla compreende pelo menos os resíduos de aminoácido 40 a 139 e 195 a 448 do ID. DE SEQ. N°: 3 ou equivalentes destes. Em algumas modalidades, o fXa des-Gla compreende pelo menos os

resíduos de aminoácido 45 a 139 e 195 a 448 do ID. DE SEQ. N°: 3 ou equivalentes destes. Em outra modalidade, o fXa des-Gla compreende pelo menos os resíduos de aminoácido 46 a 139 e 195 a 448 do ID. DE SEQ. N°: 3 ou equivalentes destes.

"fXa deficiente em Gla" refere-se a fXa com um número reduzido de grupos γ -carboxil livres na cadeia lateral em seu domínio Gla. Como o fXa sem domínio Gla, fXa deficiente em Gla também pode abrigar outras modificações. fXa deficiente em Gla inclui fXa não carboxilado, subcarboxilado e descarboxilado. "fXa não carboxilado" ou "fXa descarboxilado" refere-se aos derivados de fXa que não possuem os grupos γ -carbóxi dos resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico do domínio Gla, por exemplo, fXa que possui todo o seu ácido γ -carboxiglutâmico do domínio Gla substituído por aminoácidos diferentes, ou fXa que possui todo o seu γ -carboxil da cadeia lateral removido ou mascarado por meio, por exemplo, de aminação, esterificação etc. Para proteína expressa recombinantemente, fXa sem carboxilação também é denominado, algumas vezes, fXa não carboxilado. "fXa subcarboxilado" refere-se aos derivados de fXa que possuem um número reduzido de grupos γ -carbóxi no domínio Gla quando comparado com o fXa do tipo selvagem, por exemplo, fXa que possui um ou mais, mas nem todos, os seus ácidos γ -carboxiglutâmicos do domínio Gla substituídos por um ou mais aminoácidos diferentes, ou fXa que possui pelo menos um, mas nem todos, seus grupos γ -carboxil da cadeia lateral removido ou mascarado por meios como, por exemplo, aminação e esterificação etc.

A estrutura do domínio do fator Xa humano sem domínio

Gla pode ser encontrada em Padmanabhan e col., *J. Mol. Biol.*, 1993, 232, 947-966, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade. A numeração do aminoácido se baseia em equivalências topológicas com quimotripsina, em
 5 que, por exemplo, Ser195 corresponde a Ser379 na Figura 2 quando é utilizada a numeração do fX maduro humano. Inserções são indicadas com letras, e eliminações são indicadas por 2 numerações sucessivas. "300" é adicionado à numeração da cadeia leve para diferenciar da numeração da
 10 cadeia pesada. β 363 é β -hidróxi aspartato.

Barras inclinadas (/) indicam clivagens proteolíticas observadas em material cristalino. A seqüência de fXa sem domínio Gla desprovida de 1-45 resíduos de aminoácido com base no fX maduro (ID. DE SEQ. N°: 3) está listada no ID.
 15 DE SEQ. N°: 5.

Em uma modalidade, o derivado de fXa pode não possuir uma cadeia leve de fXa, mas ainda contém um domínio catalítico de serina-protease presente na cadeia pesada. Além disso, quimeras com outro domínio catalítico de
 20 serina-protease podem ser usadas para a realização de substituições na cadeia pesada.

"Antídoto-pd" ou "antídoto derivado do plasma" refere-se ao derivado de fXa des-Gla anidro e possui os resíduos de aminoácido do ID. DE SEQ. N°: 10.

25 "Antídoto-r" ou "antídoto recombinante" refere-se a um derivado de fXa desprovido dos 6-39 resíduos de aminoácido do ID. DE SEQ. N°: 3, que corresponde a um fXa mutante expresso em células CHO descrito com mais detalhes abaixo (ID. DE SEQ. N°: 13, Tabela 12a).

30 "Agentes anticoagulantes" ou "anticoagulantes" são

agentes que inibem a formação do coágulo sangüíneo. Exemplos de agentes anticoagulantes incluem, sem limitação, inibidores específicos de trombina, fator IXa, fator Xa, fator XIa, fator XIIa ou fator VIIa, heparina e derivados, vitamina K antagonista, e anticorpos anti-fator tecidual. Exemplos de inibidores específicos de trombina incluem hirudina, bivalirudina (Angiomax®), argatroban e lepirudina (Refludan®). Exemplos de heparina e derivados incluem heparina não fracionada (UFH), heparina de baixo peso molecular (LMWH) como, por exemplo, enoxaparina (Lovenox®), dalteparina (Fragmin®) e danaparóide (Orgaran®); e pentassacarídeo sintético, como, por exemplo, fondaparinux (Arixtra®). Exemplos de antagonistas da vitamina K incluem warfarina (Coumadin®), fenocumarol, acenocumarol (SintromR), clorindiona, dicumarol, difenadiona, biscumacetato de etila, fenprocumon, fenindiona e tiocloamarol. Em uma modalidade, o anticoagulante é um inibidor do fator Xa. Em uma modalidade, o anticoagulante é betrixaban.

O termo "terapia anticoagulante" refere-se a um regime terapêutico que é administrado a um paciente para evitar coágulos sangüíneos indesejados ou trombose. Uma terapia anticoagulante compreende a administração de um ou uma combinação de dois ou mais agentes anticoagulantes ou outros agentes em uma dosagem e posologia adequada ao tratamento ou à prevenção dos coágulos sangüíneos indesejados ou de trombose no paciente.

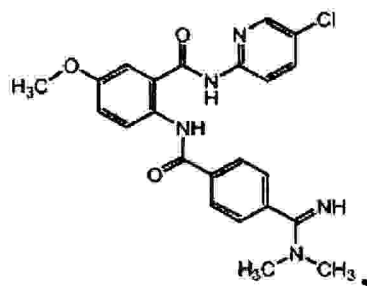
O termo "inibidores do fator Xa" ou "inibidores de fator Xa" refere-se aos compostos que podem inibir, direta ou indiretamente, a atividade do fator da coagulação Xa de

catalisação da conversão de protrombina em trombina *in vitro* e/ou *in vivo*. Exemplos de inibidores de fXa conhecidos incluem, sem limitação, fondaparinux, idraparinux, idraparinux biotinilado, enoxaparina, fragmina, NAP-5, rNAPc2, inibidor da via do fator tecidual, DX-9065a (como descrito, por exemplo, em Herbert, J.M., e col., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996 276(3): 10.308), YM-60828 (como descrito, por exemplo, em Taniuchi, Y., e col., *Thromb. Haemost.* 1998 79(3): 5.438), YM-150 (como descrito, por exemplo, em Eriksson, B.I. e cols., *Blood* 2005; 106(11), Resumo 1865), apixaban, rivaroxaban, PD-348292 (como descrito, por exemplo, em "Pipeline Insight: Antithrombotics - Reaching the Untreated Prophylaxis Market", 2007), otamixaban, razaxaban (DPC906), BAY 59-7939 (como descrito, por exemplo, em Turpie, A.G., e col., *J. Thromb. Haemost.* 2005, 3(11): 2.479-86), DU-176b (como descrito, por exemplo, em Hylek EM, *Curr. Opin. Invest. Drugs* 2007 8(9): 778-783), LY517717 (como descrito, por exemplo, em Agnelli, G., e col., *J. Thromb. Haemost.* 2007 5(4): 746-53), GSK913893, betrixaban (como descrito abaixo) e derivados destes. A heparina de baixo peso molecular ("LMWH") também é considerada um inibidor do fator Xa.

Em uma modalidade, o inibidor do fator Xa é selecionado de betrixaban, rivaroxaban, LMWH, e combinações destes.

O termo "betrixaban" refere-se ao composto "[2-({4-[(dimetilamino)iminometil]fenil}carbonilamino)-5-metoxifenil]-N-(5-cloro(2-piridil))carboxamida", ou sais farmacologicamente aceitáveis destes. "[2-({4-[(dimetilamino)iminometil]fenil}carbonilamino)-5-

metoxifenil]-N-(5-cloro(2-piridil))carboxamida" refere-se ao composto que possui a seguinte estrutura:



5

ou um tautômero ou sal farmaceuticamente aceitável
10 deste.

Betrixaban é descrito nas Patentes U.S. Nºs: 6.376.515 e 6.835.739 e Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº: 2007/0112039, depositado em 7 de novembro de 2006, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência. Betrixaban
15 sabidamente é um inibidor específico do fator Xa.

Como aqui usado, o termo "antídoto" ou "antídoto para um inibidor do fator Xa" refere-se às moléculas, por exemplo, derivados de fXa, que podem substancialmente neutralizar ou reverter a atividade inibidora da coagulação
20 de um inibidor de fXa por competição com fXa ativo para se ligar aos inibidores de fXa disponíveis. Exemplos dos antídotos desta invenção são derivados de fXa com ligação reduzida à membrana de fosfolípídeo, por exemplo, fXa des-Gla ou fXa deficiente em Gla, e derivados de fXa com
25 atividade catalítica reduzida, por exemplo, os derivados de fXa com sítio ativo modificado, e derivados com interação reduzida com fV/Va, ou fVIII/fVIIIa. Exemplos de antídotos da invenção com ligação à membrana reduzida e atividade catalítica reduzida incluem, sem limitação, fXa anidro des-Gla por digestão por quimotripsina de fXa anidro (como
30

descrito no Exemplo 1); fXa des-Gla-S379A (S195A na numeração de quimotripsina) por mutagênese (como descrito no Exemplo 6).

Outros exemplos de antídotos da invenção incluem
5 proteínas ou polipeptídeos que contêm domínios catalíticos de serina-protease que possuem similaridade estrutural suficiente com o domínio catalítico de fXa e são, portanto, capazes de se ligar aos inibidores de fXa de pequena molécula. Exemplos incluem, sem limitação, trombina, que se
10 liga ao inibidor de fXa GSK913893 (Young R., e col., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007, 17(10): 2.927-2.930); calicreína plasmática, que se liga ao inibidor de fXa apixaban (Luetzgen J., e col., *Blood*, 2006, 108(11) Resumo 4130); e tripsina (ou seu homólogo bacteriano subtilisina),
15 que se liga ao inibidor de fXa C921-78 com afinidade subnanomolar ($K_d = 500$ pM) (Betz A, e col., *Biochem.*, 1999, 38(44): 14.582-14.591).

Em uma modalidade, o derivado da invenção se liga, direta ou indiretamente, a um inibidor do fator Xa. Os
20 termos "ligação", "que se liga", "reconhecimento" ou "reconhece", como aqui usados, visam incluir interações entre moléculas que podem ser detectadas usando, por exemplo, um ensaio de hibridização. Os termos também visam incluir a "ligação" de interações entre moléculas. As
25 interações podem ser, por exemplo, de natureza proteína-proteína, proteína-ácido nucléico, proteína-pequena molécula ou pequena molécula-ácido nucléico. A ligação pode ser "direta" ou "indireta". A ligação "direta" compreende o contato físico direto entre moléculas. A ligação "indireta"
30 entre moléculas compreende o fato de que as moléculas têm

contato físico direto com uma ou mais moléculas intermediárias simultaneamente. Por exemplo, é contemplado que os derivados da invenção se ligam indiretamente e substancialmente neutralizam heparina de baixo peso molecular e outros inibidores indiretos do fator Xa. Essa ligação pode resultar na formação de um "complexo" que compreende as moléculas que interagem. Um "complexo" refere-se à ligação de duas ou mais moléculas mantidas juntas por ligações covalentes ou não covalentes, interações ou forças.

"Neutralizar", "reverter" ou "atuar contra" a atividade de um inibidor de fXa ou frases similares se referem à inibição ou ao bloqueio da função inibidora ou anticoagulante do fator Xa de um inibidor de fXa. Essas frases referem-se à inibição ou ao bloqueio parcial da função, bem como à inibição ou ao bloqueio da maioria ou de toda a atividade inibidora de fXa, *in vitro* e/ou *in vivo*.

Em certas modalidades, o inibidor do fator Xa é neutralizado substancialmente, o que significa que sua habilidade para inibir o fator Xa, direta ou indiretamente, é reduzida em pelo menos cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100%.

O termo "ligação à membrana de fosfolipídeo" refere-se à habilidade de um fXa ativo para se ligar à membrana de fosfolipídeo carregada negativamente ou a outra membrana celular, por exemplo, plaquetas, na presença de íons de Ca^{2+} . Essa ligação é mediada pelos resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico no domínio Gla de fXa.

O termo "interação reduzida" refere-se à habilidade

diminuída do derivado de fXa para se ligar ou formar um complexo com íons ou outros co-fatores que normalmente se liga ou forma complexos com IXa selvagem. Exemplos dessa interação incluem, sem limitação, a ligação de IXa com íons de Ca^{2+} e à membrana de fosfolípídeo, interação com fV/fVa, ou fVIII/f/VIIIa etc. Prefere-se que a interação de um derivado de fXa com os íons ou outros co-fatores seja reduzida a 50% daquela de um fXa selvagem. Mais preferivelmente, a interação é reduzida a 10%, 1% e 0,1% daquela de um fXa do tipo selvagem. Isso se refere à habilidade dos derivados para "se reunir no complexo de protrombinase".

O termo "atividade de ligação ao inibidor de fXa" refere-se à habilidade de uma molécula para se ligar a um inibidor de IXa. Um antídoto da presente invenção possui atividade de ligação ao inibidor de fXa, seja ela direta ou indiretamente.

O termo "meia-vida circulante" ou "meia-vida plasmática" refere-se ao tempo necessário para que a concentração plasmática de um antídoto que circula no plasma se reduza à metade de sua concentração inicial após uma única administração.

O termo "porção conjugada" refere-se a uma porção que pode ser adicionada a um derivado de fXa por formação de uma ligação covalente com a resíduo do derivado de fXa. A porção pode se ligar diretamente a um resíduo do derivado de fXa ou pode formar uma ligação covalente com um vinculador que, por sua vez, forma uma ligação covalente com um resíduo do derivado de fXa.

Como aqui usado, um "anticorpo" inclui anticorpos

inteiros e qualquer fragmento de ligação de antígeno ou uma cadeia única deste. Dessa forma, o termo "anticorpo" inclui qualquer proteína ou peptídeo que contenha uma molécula que compreenda pelo menos uma porção de uma molécula de imunoglobulina. Exemplos deste incluem, sem limitação, a região determinante de complementaridade (CDR) de uma cadeia pesada ou leve ou a porção de ligação de ligante desta, uma região variável da cadeia pesada ou cadeia leve, uma região constante da cadeia pesada ou cadeia leve, uma região *framework* (FR), ou qualquer porção desta, ou pelo menos uma porção de uma proteína de ligação.

Os anticorpos podem ser policlonais ou monoclonais, e podem ser isolados de qualquer fonte biológica adequada, por exemplo, de murídeos, rato, carneiro e caninos.

O termo "composição" visa significar uma combinação de agente ativo e outro composto ou composição, inerte (por exemplo, um agente ou marcador detectável) ou ativo, por exemplo, um adjuvante.

O termo "composição farmacêutica" visa incluir a combinação de um agente ativo com um veículo, inerte ou ativo, que torna a composição adequada para uso diagnóstico ou terapêutico *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*.

Uma "quantidade eficaz" refere-se à quantidade de derivado suficiente para induzir um resultado biológico e/ou terapêutico desejado. Aquele resultado pode ser o alívio dos sinais, sintomas ou causas de uma doença, ou qualquer outra alteração desejada de um sistema biológico. Na presente invenção, o resultado tipicamente envolverá um ou mais dos seguintes: neutralização de um inibidor de fXa que foi administrado a um paciente, reversão da atividade

anticoagulante do inibidor de fXa, remoção do inibidor de fXa do plasma, restauração da hemostasia, e redução ou cessação de sangramento. A quantidade eficaz irá variar, dependendo do agente do antídoto específico usado, do inibidor específico de fXa que foi administrado ao indivíduo, do regime de dosagem do inibidor de fXa, do momento da administração do antídoto, do indivíduo e da condição de doença que está sendo tratada, do peso e da idade do indivíduo, da gravidade da condição de doença, da forma de administração, e semelhantes, todos podendo ser determinados facilmente por aqueles habilitados na técnica.

Como aqui usado, os termos "que trata", "tratamento" e semelhantes são aqui usados para significar a obtenção de um efeito farmacológico e/ou fisiológico desejado. O efeito pode ser profilático, em termos de evitar completa ou parcialmente um distúrbio ou sinal ou sintoma deste, e/ou pode ser terapêutico, em termos de uma cura parcial ou completa para um distúrbio e/ou efeito adverso atribuível ao distúrbio.

"Tratamento" também cobre qualquer tratamento de um distúrbio em um mamífero, e inclui: (a) prevenção da ocorrência de um distúrbio em um indivíduo que pode estar predisposto a um distúrbio, mas pode ainda não ter recebido o diagnóstico do distúrbio, por exemplo, evitar sangramento em um paciente com overdose de anticoagulante; (b) inibição de um distúrbio, ou seja, interromper seu desenvolvimento, por exemplo, inibição de sangramento; ou (c) alívio ou atenuação do distúrbio, por exemplo, redução do sangramento.

Como aqui usado, "tratar" ainda inclui melhora

sistêmica dos sintomas associados à patologia e/ou um retardo no surgimento de sintomas. As evidências clínicas e subclínicas do "tratamento" irão variar com a patologia, com o indivíduo e com o tratamento.

5 A "administração" pode ser efetuada em uma dose, continuamente ou intermitentemente ao longo da evolução do tratamento. Métodos para determinação do meio e da dosagem de administração mais eficazes são conhecidos por aqueles habilitados na técnica, e irão variar com a composição
10 usada para terapia, com a finalidade da terapia, com a célula-alvo que está sendo tratada e com o indivíduo tratado. Administrações únicas ou múltiplas podem ser realizadas com o nível e padrão de dose sendo selecionados pelo médico responsável pelo tratamento. Formulações de
15 dosagem e métodos de administração dos agentes adequados são conhecidos na técnica.

Os agentes e as composições da presente invenção podem ser usados na fabricação de medicamentos e para o tratamento de humanos e outros animais por administração de
20 acordo com procedimentos convencionais, por exemplo, um ingrediente ativo em composições farmacêuticas.

Um agente da presente invenção pode ser administrado para terapia por qualquer via adequada, especificamente por administração parental (incluindo subcutânea,
25 intramuscular, intravenosa e intradérmica). Também será observado que a via preferida irá variar com a condição e a idade do receptor, e com a doença tratada.

Pode-se determinar se o método, ou seja, inibição ou reversão de um inibidor do fator Xa, é obtido por diversos
30 ensaios *in vitro*, por exemplo, ensaio de geração de

trombina, e ensaios clínicos de coagulação como, por exemplo, aPTT, PT e ACT.

O termo "isolado" como aqui usado em relação aos ácidos nucleicos, por exemplo, DNA ou RNA, refere-se às moléculas separadas de outros DNAs ou RNAs, respectivamente, que estão presentes na fonte natural da macromolécula. O termo "ácido nucleico isolado" visa incluir fragmentos de ácido nucleico que não são de ocorrência natural como fragmentos e não seriam encontrados no estado natural. O termo "isolado" também é aqui usado para se referir aos polipeptídeos e proteínas que são isolados de outras proteínas celulares, e visa englobar polipeptídeos tanto purificados quanto recombinante. Em outras modalidades, o termo "isolado" significa separado de constituintes celulares aos quais a célula, tecido, polinucleotídeo, peptídeo, polipeptídeo, proteína, anticorpo ou fragmento(s) destes, está normalmente associado na natureza. Por exemplo, uma célula isolada é uma célula que é separada de tecido ou células de fenótipo ou genótipo diferente. Como é evidente para aqueles habilitados na técnica, um polinucleotídeo, peptídeo, polipeptídeo, proteína, anticorpo de ocorrência não natural, ou fragmento(s) destes, não exige o "isolamento" para distingui-lo de sua contraparte de ocorrência natural.

Como aqui usado, o termo "equivalente destes", quando se refere a uma proteína, polipeptídeo ou ácido nucleico de referência, significa aqueles que possuem homologia mínima, embora ainda mantenham a funcionalidade desejada. Contempla-se que qualquer proteína modificada aqui mencionada também inclui equivalentes desta. Por exemplo, a

homologia pode ser pelo menos 75% de homologia e, alternativamente, pelo menos 80% ou, alternativamente, pelo menos 85% ou, alternativamente, pelo menos 90% ou, alternativamente, pelo menos 95% ou, alternativamente, 98 por cento de homologia e exibir atividade biológica substancialmente equivalente ao polipeptídeo ou proteína de referência.

Um polinucleotídeo ou uma região do polinucleotídeo (ou um polipeptídeo ou região do polipeptídeo) que possui certa percentagem (por exemplo, 80%, 85%, 90% ou 95%) de "identidade de seqüência" para outra seqüência significa que, quando alinhadas, aquela percentagem de bases (ou de aminoácidos) é igual na comparação das duas seqüências. Deve-se observar que, quando apenas a cadeia pesada de fXa (ou uma serina-protease relacionada) é usada, a homologia global pode ser menor do que 75% como, por exemplo, 65% ou 50%; no entanto, a funcionalidade desejada permanece. Esse alinhamento e o percentual de homologia ou identidade de seqüência podem ser determinados com o uso de programas de computador conhecidos na técnica, por exemplo, aqueles descritos em "CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY" (F.M. Ausubel e col., eds., 1987) Suplemento 30, seção 7.7.18, Tabela 7.7.1. De preferência, são usados os parâmetros padronizados para o alinhamento. Um programa de alinhamento preferido é BLAST, com a utilização dos parâmetros padronizados. Em particular, programas preferidos são BLASTN e BLASTP, com o uso dos seguintes parâmetros padronizados: Código genético = padrão; filtro = nenhum; fita = ambas; valor de corte = 60; esperado = 10; Matriz = BLOSUM62; Descrições = 50 seqüências; classificar por =

HIGH SCORE; Bases de dados = não redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + traduções GenBank CDS + SwissProtein + SPupdate + PIR. Detalhes desses programas podem ser encontrados no seguinte endereço da Internet:

5 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>.

Os termos "polinucleotídeo" e "oligonucleotídeo" são usados de forma intercambiável e referem-se a uma forma polimérica de nucleotídeos de qualquer comprimento, desoxirribonucleotídeos ou ribonucleotídeos ou análogos
10 destes. Os polinucleotídeos podem ter qualquer estrutura tridimensional e podem realizar qualquer função, conhecida ou desconhecida. A seguir serão apresentados exemplos não limitantes de polinucleotídeos: um gene ou fragmento gênico (por exemplo, uma sonda, um iniciador, tag EST ou SAGE),
15 éxons, íntrons, RNA mensageiro (mRNA), RNA de transferência, RNA ribossômico, ribozimas, cDNA, polinucleotídeos recombinantes, polinucleotídeos ramificados, plasmídeos, vetores, DNA isolado de qualquer sequência, RNA isolado de qualquer sequência, sondas e
20 iniciadores de ácido nucléico. Um polinucleotídeo pode compreender nucleotídeos modificados, por exemplo, nucleotídeos metilados, e análogos de nucleotídeos. Se presentes, as modificações à estrutura do nucleotídeo podem ser efetuadas antes ou depois da montagem do
25 polinucleotídeo. A sequência de nucleotídeos pode ser interrompida por componentes não nucleotídicos. Um polinucleotídeo pode ainda ser modificado após polimerização, por exemplo, por conjugação com um componente de marcação. O termo também se refere às
30 moléculas de fita dupla ou de fita simples. A menos que

especificado ou necessário de forma diferente, qualquer modalidade desta invenção que seja um polinucleotídeo engloba tanto a forma de fita dupla quanto cada uma das duas formas complementares de fita dupla conhecidas ou que
5 prevê-se que constituam a forma de fita dupla.

Um polinucleotídeo é composto por uma sequência específica de quatro bases nucleotídicas: adenina (A); citosina (C); guanina (G); timina (T); e uracil (U) para timina quando o polinucleotídeo é RNA. Dessa forma, o termo
10 "sequência de polinucleotídeos" é a representação alfabética de uma molécula de polinucleotídeo. Essa representação alfabética pode ser inserida em bases de dados em um computador que possui uma unidade de processamento central e usada para aplicações de
15 bioinformática como, por exemplo, genômica funcional e pesquisa de homologia.

O termo "homologia" ou "identidade" ou "similaridade" refere-se à similaridade de sequência entre dois peptídeos ou entre duas moléculas de ácido nucléico. A homologia pode
20 ser determinada por comparação de uma posição em cada sequência que pode ser alinhada para fins de comparação. Quando uma posição na sequência comparada é ocupada pela mesma base ou aminoácido, então as moléculas são homólogas naquela posição. Um grau de homologia entre sequências é
25 uma função do número de posições combinadas ou homólogas compartilhado pelas sequências. Uma sequência "não relacionada" ou "não homóloga" compartilha menos de 40% de identidade ou, alternativamente, menos de 25% de identidade, com uma das sequências da presente invenção.

30 Uma região do polinucleotídeo ou do polinucleotídeo

(ou uma região polipeptídeo ou do polipeptídeo) que possui certa percentagem (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99%) de "identidade de seqüência" para outra seqüência significa que, quando alinhada, aquela percentagem de bases (ou aminoácidos) é igual na comparação das duas seqüências. Esse alinhamento e o percentual de homologia ou identidade de seqüência podem ser determinados com o uso de programas de computador conhecidos na técnica, por exemplo, aqueles descritos em Ausubel e col. eds. (2007) "Current Protocols in Molecular Biology". De preferência, são usados parâmetros padronizados para o alinhamento. Um programa de alinhamento é BLAST, com a utilização dos parâmetros padronizados. Em particular, os programas são BLASTN e BLASTP, com o uso dos seguintes parâmetros padronizados: Código genético = padrão; filtro = nenhum; fita = ambas; valor de corte = 60; esperado = 10; Matriz = BLOSUM62; Descrições = 50 seqüências; classificar por = HIGH SCORE; Bases de dados = não redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + traduções GenBank CDS + SwissProtein + SPupdate + PIR. Detalhes desses programas podem ser encontrados no seguinte endereço da Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>, acessado pela última vez em 26 de novembro de 2007.

Polinucleotídeos biologicamente equivalentes são aqueles que possuem o percentual de homologia especificado e que codificam um polipeptídeo que possui a mesma atividade biológica ou uma atividade biológica similar.

O termo "um homólogo de um ácido nucléico" refere-se a um ácido nucléico que possui uma seqüência de nucleotídeos que possui certo grau de homologia com a seqüência de

nucleotídeos do ácido nucléico ou complemento desta. Um homólogo de um ácido nucléico de fita dupla visa incluir ácidos nucléicos que possuem uma seqüência de nucleotídeos que possui certo grau de homologia com ele ou com o
5 complemento deste. Em um aspecto, homólogos de ácidos nucléicos são capazes de hibridizar para o ácido nucléico ou complemento deste.

O termo "gene" refere-se a um polinucleotídeo que contém pelo menos um quadro de leitura aberta (ORF) que é
10 capaz de codificar um polipeptídeo ou uma proteína em particular após ser transcrito e traduzido. Qualquer uma das seqüências de polinucleotídeos ou polipeptídeos aqui descritas pode ser usada para identificar fragmentos maiores ou seqüências codificadoras de comprimento total do
15 gene com o qual estão associadas. Métodos de isolamento de seqüências de fragmentos maiores são conhecidos por aqueles habilitados na técnica.

O termo "expressar" refere-se à produção de um produto gênico.

20 Como aqui usado, o termo "expressão" refere-se ao processo pelo qual polinucleotídeos são transcritos em mRNA e/ou ao processo pelo qual o mRNA transcrito é subsequentelemente traduzido em peptídeos, polipeptídeos ou proteínas. Caso o polinucleotídeo seja derivado de DNA
25 genômico, a expressão poderá incluir o *splicing* do mRNA em uma célula eucariótica.

O termo "codificar", como aplicado aos polinucleotídeos, refere-se a um polinucleotídeo que supostamente "codifica" um polipeptídeo se, em seu estado
30 nativo ou quando manipulado por métodos bem conhecidos por

aqueles habilitados na técnica, ele pode ser transcrito e/ou traduzido para produzir o mRNA para o polipeptídeo e/ou um fragmento deste. A fita anti-senso é o complemento desse ácido nucléico, e a seqüência codificadora pode ser deduzida a partir dela.

Um "conjugado peptídico" refere-se à associação por ligação covalente ou não covalente de um ou mais polipeptídeos e outro composto químico ou biológico. Em um exemplo não limitante, a "conjugação" de um polipeptídeo com um composto químico resulta no aumento da estabilidade ou eficácia do polipeptídeo para sua finalidade desejada. Em uma modalidade, um peptídeo é conjugado a um veículo, em que o veículo é um lipossomo, uma micela ou um polímero farmaceuticamente aceitável.

"Lipossomos" são vesículas microscópicas que consistem em bicamadas lipídicas concêntricas. Estruturalmente, lipossomos variam em termos de tamanho e formato desde tubos longos a esferas, com dimensões de poucas centenas de Angstroms a frações de um milímetro. Lipídeos formadores de vesícula são selecionados para se obter um grau de fluidez ou rigidez especificado do complexo final que fornece a composição lipídica da camada externa. Esses são neutros (colesterol) ou bipolares, e incluem fosfolipídeos, por exemplo, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) e esfingomielina (SM), e outros tipos de lipídeos bipolares que incluem, sem limitação, dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), com um comprimento da cadeia de hidrocarboneto na faixa de 14-22, e saturada, ou com uma ou mais ligações duplas C=C. Exemplos de lipídeos capazes de produzir um lipossomo estável, isoladamente ou

em combinação com outros componentes lipídicos, são fosfolipídeos, por exemplo, fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), lecitina, fosfatidiletanolamina, lisolecitina, lisofosfatidiletanol-amina, fosfatidilserina, 5 fosfatidilinositol, esfingomielina, cefalina, cardiolipina, ácido fosfatídico, cerebrosídeos, diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), 10 palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE) e dioleoilfosfatidiletanolamina 4-(N-maleimido-metil)ciclohexano-1-carboxilato (DOPE-mal). Lipídeos adicionais que não contêm fósforo que podem ser 15 incorporados em lipossomos incluem estearilamina, dodecilamina, hexadecilamina, miristato de isopropila, trietanolamina-lauril sulfato, alquil-aril sulfato, acetil palmitato, ricinoleato de glicerol, hexadecil estearato, polímeros anfotéricos acrílicos, amidas de ácido graxo 20 polietiloxiladas, e os lipídeos catiônicos mencionados acima (DDAB, DODAC, DMRIE, DMTAP, DOGS, DOTAP (DOTMA), DOSPA, DPTAP, DSTAP, DC-Chol). Lipídeos carregados negativamente incluem ácido fosfatídico (PA), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), 25 dioleoilfosfatidilglicerol e (DOPG), dicetilfosfato que são capazes de formar vesículas. Tipicamente, os lipossomos podem ser divididos em três categorias com base em seu tamanho global e na natureza da estrutura lamelar. As três classificações, como desenvolvidas pelo "New York Academy 30 Sciences Meeting", "Liposomes and Their Use in Biology and

Medicine", dezembro de 1977, são vesículas multilamelares (MLVs), vesículas unilamelares pequenas (SUVs) e vesículas unilamelares grandes (LUVs).

Uma "micela" é um agregado de moléculas tensoativas dispersas em um colóide líquido. Uma micela típica em solução aquosa forma um agregado com as regiões hidrofílicas da "cabeça" em contato com o solvente circundante, seqüestrando as regiões hidrofílicas da cauda no centro da micela. Esse tipo de micela é conhecido como uma micela de fase normal (micela óleo-em-água). Micelas inversas possuem os grupos da cabeça no centro com as caudas se estendendo para fora (micela água-em-óleo). As micelas podem ser usadas para anexar um polinucleotídeo, polipeptídeo, anticorpo ou composição aqui descritos para facilitar a liberação eficiente à célula ou tecido-alvo.

A frase "polímero farmacêuticamente aceitável" refere-se ao grupo de compostos que pode ser conjugado a um ou mais polipeptídeos aqui descritos. Contempla-se que a conjugação de um polímero ao polipeptídeo é capaz de prolongar a meia-vida do polipeptídeo *in vivo* e *in vitro*. Exemplos não limitantes incluem polietileno glicóis, polivinilpirrolidonas, alcoóis polivinílicos, derivados de celulose, poliacrilatos, polimetacrilatos, açúcares, polióis e misturas destes.

Um "veículo de liberação gênica" é definido como qualquer molécula que possa carregar polinucleotídeos inseridos em uma célula hospedeira. Exemplos de veículos de liberação gênica são lipossomos, polímeros de micelas biocompatíveis, incluindo polímeros naturais e polímeros sintéticos; lipoproteínas; polipeptídeos; polissacarídeos;

lipopolissacarídeos; envelopes virais artificiais; partículas de metal; e bactérias ou vírus como, por exemplo, baculovírus, adenovírus e retrovírus, bacteriófago, cosmídeo, plasmídeo, vetores fúngicos e outros veículos de recombinação tipicamente usados na técnica que foram descritos para expressão em diversos hospedeiros eucarióticos e procarióticos, e podem ser usados para terapia gênica, bem como para simples expressão de proteína.

Um polinucleotídeo desta invenção pode ser liberado a uma célula ou tecido usando um veículo de liberação gênica. "Liberação gênica", "transferência gênica", "transdução", e semelhantes, como aqui usados, são termos que se referem à introdução de um polinucleotídeo exógeno (algumas vezes denominado um "transgene") em uma célula hospedeira, independentemente do método usado para a introdução. Esses métodos incluem diversas técnicas bem conhecidas como, por exemplo, transferência gênica mediada por vetor (por exemplo, por infecção/transfecção viral, ou vários outros complexos de liberação gênica à base de proteína ou lipídeo), além de técnicas que facilitam a liberação de polinucleotídeos "desnudos" (*naked*) (por exemplo, eletroporação, liberação por pistola gênica (*gene gun*) e várias outras técnicas usadas para a introdução de polinucleotídeos). O polinucleotídeo introduzido pode ser mantido estavelmente ou transitoriamente na célula hospedeira. A manutenção estável tipicamente exige que o polinucleotídeo introduzido contenha uma origem de replicação compatível com a célula hospedeira ou se integre em um replicon da célula hospedeira como, por exemplo, um

replícon extracromossômico (por exemplo, um plasmídeo) ou um cromossomo nuclear ou mitocondrial. Diversos vetores são conhecidos como sendo capazes de mediar a transferência de genes às células de mamíferos, como é conhecido na técnica e aqui descrito.

Um "vetor viral" é definido como um vírus ou partícula viral produzido recombinantemente que compreende um polinucleotídeo a ser liberado em uma célula hospedeira, *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro*. Exemplos de vetores virais incluem vetores retrovirais, vetores adenovirais, vetores de vírus adeno-associado, vetores de alfavírus e semelhantes. Vetores de alfavírus, por exemplo, vetores baseados no vírus de Semliki Forest e no vírus Sindbis, também foram desenvolvidos para uso em terapia gênica e imunoterapia. Veja Schlesinger e Dubensky (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* 5: 434-439 e Ying, e col. (1999) *Nat. Med.* 5(7): 823-827. Em aspectos nos quais a transferência gênica é mediada por um vetor retroviral, uma construção de vetor refere-se ao polinucleotídeo que compreende o genoma retroviral, ou parte deste, e um gene terapêutico. Como aqui usado, "transferência gênica por mediação retroviral" ou "transdução retroviral" possui o mesmo significado e refere-se ao processo pelo qual um gene ou seqüências de ácidos nucléicos são transferidos estavelmente na célula hospedeira em virtude da entrada do vírus na célula e a integração de seu genoma no genoma da célula hospedeira. O vírus pode entrar na célula hospedeira por meio de seu mecanismo normal de infecção ou ser modificado de tal forma que se ligue a um receptor de superfície diferente da célula hospedeira ou ligante para entrar na célula. Como

aqui usado, o termo "vetor retroviral" refere-se a uma partícula viral capaz de introduzir ácido nucléico exógeno em uma célula por meio de um mecanismo de entrada viral ou viral-like.

5 Retrovírus carregam sua informação genética na forma de RNA; no entanto, depois que o vírus infecta uma célula, o RNA é transcrito de forma reversa na forma de DNA que se integra no DNA genômico da célula infectada. A forma de DNA integrada é denominada um pró-vírus.

10 Em aspectos nos quais a transferência gênica é mediada por um vetor viral de DNA, por exemplo, um adenovírus (Ad) ou vírus adeno-associado (AAV), uma construção de vetor refere-se ao polinucleotídeo que compreende o genoma viral, ou parte deste, e um transgene. Adenovírus (Ads) são um
15 grupo de vírus relativamente bem caracterizado, homogêneo, que inclui mais de 50 sorotipos. Veja, por exemplo, Pedido PCT International N° WO 95/27071. O Ads não precisa ser integrado no genoma da célula hospedeira. Vetores derivados de Ad recombinante, particularmente aqueles que reduzem o
20 potencial para recombinação e geração de vírus do tipo selvagem, também foram construídos. Veja Pedidos de PCT International N°s WO 95/00655 e WO 95/11984. AAV do tipo selvagem possui infectividade e especificidade altas na integração no genoma da célula hospedeira. Veja Hermonat e
25 Muzyczka (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6.466-6.470 e Lebkowski e col. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8: 3.988-3.996.

Vetores que contêm tanto um promotor quanto um sítio de clonagem no qual um polinucleotídeo pode ser ligado operacionalmente são bem conhecidos na técnica. Esses
30 vetores são capazes de transcrever RNA *in vitro* ou *in vivo*,

e estão disponíveis comercialmente por fontes como Stratagene (La Jolla, CA) e Promega Biotech (Madison, WI). A fim de otimizar a expressão e/ou transcrição *in vitro*, pode ser necessário remover, adicionar ou alterar porções 5' e/ou 3' não traduzidas dos clones para eliminar códons de iniciação da tradução potenciais inadequados alternativos extras, ou outras seqüências que possam interferir ou reduzir a expressão, tanto no nível da transcrição quanto da tradução. Alternativamente, sítios de ligação de ribossomo de consenso podem ser inseridos imediatamente 5' do códon de partida para intensificar a expressão.

Veículos de liberação gênica também incluem complexos de DNA/lipossomo, micelas e complexos direcionados de proteína viral-DNA. Lipossomos que também compreendem um anticorpo de direcionamento ou fragmento deste podem ser usados nos métodos desta invenção. Para aumentar a liberação a uma célula, o ácido nucléico ou as proteínas desta invenção podem ser conjugados aos anticorpos ou fragmentos de ligação destes que se ligam aos antígenos da superfície celular, por exemplo, um marcador da superfície celular encontrado em células-tronco ou cardiomiócitos. Além da liberação de polinucleotídeos a uma célula ou população de células, a introdução direta das proteínas aqui descritas à célula ou população de células pode ser feita pela técnica não limitante de transfecção de proteína; alternativamente, condições de cultivo que podem aumentar a expressão e/ou promover a atividade das proteínas desta invenção são outras técnicas não limitantes.

A frase "suporte sólido" refere-se às superfícies não aquosas como, por exemplo, "placas de cultura", "chips gênicos" ou "microarranjos". Esses chips gênicos ou microarranjos podem ser usados para fins diagnósticos e terapêuticos por diversas técnicas conhecidas por aqueles habilitados na técnica. Em uma técnica, oligonucleotídeos são dispostos em um chip gênico para determinação da sequência de DNA pela abordagem de hibridização, por exemplo, aquela apresentada nas Patentes U.S. Nºs: 6.025.136 e 6.018.041. Os polinucleotídeos desta invenção podem ser modificados em sondas, as quais, por sua vez, podem ser usadas para detecção de uma sequência genética. Essas técnicas foram descritas, por exemplo, nas Patentes U.S. Nºs: 5.968.740 e 5.858.659. Uma sonda também pode ser afixada à superfície de um eletrodo para a detecção eletroquímica de sequências de ácidos nucleicos, como descrito por Kayem e col. Patente U.S. Nº 5.952.172 e por Kelley e col. (1999) *Nucleic Acids Res.* 27: 4.830-4.837.

Vários "chips gênicos" ou "microarranjos" e tecnologias similares são bem conhecidos na técnica. Exemplos destes incluem, sem limitação, LabCard (ACLARA Bio Sciences Inc.); GeneChip (Affymetric, Inc); LabChip (Caliper Technologies Corp); um arranjo de baixa densidade com sensores eletroquímicos (Clinical Micro Sensors); LabCD System (Gamera Bioscience Corp.); Omni Grid (Gene Machines); Q Array (Genetix Ltd.); sistemas automatizados de espectrometria de massa de alto rendimento, com tecnologia de expressão de fase líquida (Gene Trace Systems, Inc.); um sistema de reconhecimento por jato térmico (Hewlett Packard Company); Hyseq HyChip (Hyseq,

Inc.); BeadArray (Illumina, Inc.); GEM (Incyte Microarray Systems); um sistema de microarranjo de alto rendimento que pode dispensar de 12 a 64 spots sobre múltiplas lâminas de vidro (Intelligent Bio-Instruments); Molecular Biology Workstation e NanoChip (Nanogen, Inc.); um chip de vidro microfluídico (Orchid biosciences, Inc.); BioChip Arrayer com quatro pontas piezelétricas drop-on-demand PiezoTip (Packard Instruments, Inc.); FlexJet (Rosetta Inpharmatic, Inc.); espectrômetro de massa MALDI-TOF (Sequenome); ChipMaker 2 e ChipMaker 3 (TeleChem International, Inc.); e GenoSensor (Vysis, Inc.), como identificados e descritos em Heller (2002) *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4: 129-153. Exemplos de "chips gênicos" ou de "microarranjos" também são descritos nas Publicações de Patente U.S. N^{os}: 2007-0111322, 2007-0099198, 2007-0084997, 2007-0059769 e 2007-0059765 e Patentes U.S. N^{os}: 7.138.506, 7.070.740 e 6.989.267.

Em um aspecto, são preparados "chips gênicos" ou "microarranjos" contendo sondas ou iniciadores homólogos a um polinucleotídeo, polipeptídeo ou anticorpo aqui descrito. Uma amostra adequada é obtida do paciente, é feita a extração de DNA genômico, RNA, proteína ou qualquer combinação destes e amplificada, se necessário. A amostra é colocada em contato com o painel do chip gênico ou microarranjo sob condições adequadas à hibridização do(s) gene(s) ou produto(s) gênico(s) de interesse para a sonda(s) ou iniciador(s) contido no chip gênico ou microarranjo. As sondas ou iniciadores podem ser marcados de forma detectável, identificando, dessa forma, o(s) gene(s) de interesse. Alternativamente, pode ser usada uma

reação química ou biológica para identificar as sondas ou iniciadores que hibridizaram com o DNA ou RNA do(s) gene(s) de interesse. Os genótipos ou fenótipo do paciente são então determinados com o auxílio dos aparelhos e métodos mencionados anteriormente.

Outros exemplos não limitantes de um suporte de fase sólida incluem vidro, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrana, náilon, amilases, celulosas naturais e modificadas, poliacrilamidas, gabros e magnetita. A natureza do veículo pode ser solúvel em algum grau ou insolúvel. O material de suporte pode ter praticamente qualquer configuração estrutural possível, desde que a molécula acoplada seja capaz de se ligar a um polinucleotídeo, polipeptídeo ou anticorpo. Dessa forma, a configuração do suporte pode ser esférica, como em um glóbulo, ou cilíndrica, como na superfície interior de um tubo de ensaio, ou a superfície externa de um bastão. Alternativamente, a superfície pode ser plana como, por exemplo, uma folha, fita de teste etc. ou, alternativamente, glóbulos de poliestireno. Aqueles habilitados na técnica conhecerão muitos outros veículos adequados para ligação do anticorpo ou antígeno, ou serão capazes de verificar os mesmos pelo uso de experimentação de rotina.

"Células eucarióticas" compreendem todos os reinos de vida, exceto *Monera*. Elas podem ser facilmente distinguidas por meio de um núcleo ligado à membrana. Animais, plantas, fungos e protistas são eucariotas ou organismos cujas células são organizadas em estruturas complexas por membranas internas e citoesqueleto. A estrutura ligada à

membrana mais característica é o núcleo. Um hospedeiro eucariótico inclui, por exemplo, levedura, planta superior, células de insetos e de mamíferos ou, alternativamente, de células procarióticas, como descrito acima. Exemplos não
5 limitantes incluem símios, bovinos, suínos, murídeos, ratos, aves, répteis e humanos.

"Células procarióticas", que normalmente não possuem um núcleo ou nenhuma outra organela ligada à membrana, são divididas em dois domínios, bactérias e archaea.

10 Adicionalmente, em vez de terem DNA cromossômico, as informações genéticas dessas células estão em uma alça circular denominada plasmídeo. As células bacterianas são muito pequenas, aproximadamente com o tamanho de uma mitocôndria animal (cerca de 1-2 μm de diâmetro e 10 μm de
15 comprimento). As células procarióticas apresentam três formatos principais: em forma de bastão, esféricas e em espiral. Em vez de passarem por processos de replicação elaborados como os eucariotas, as células bacterianas se dividem por fissão binária. Exemplos incluem, sem
20 limitação, bactérias *Bacillus*, bactéria *E. coli* e bactéria *Salmonella*.

O termo "anticorpo humano", como aqui usado, visa incluir anticorpos que possuem regiões variáveis e constantes derivadas de seqüências de imunoglobulina da
25 linhagem germinativa humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácido não codificados por seqüências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou sítio-específica *in vitro* ou por
30 mutação somática *in vivo*). No entanto, o termo "anticorpo

humano", como aqui usado, não visa incluir anticorpos nos quais as seqüências de CDR derivadas da linhagem germinativa de outra espécie mamífera, por exemplo, camundongo, foram enxertadas em seqüências *framework* humanas. Dessa forma, como aqui usado, o termo "anticorpo humano" refere-se a um anticorpo no qual substancialmente todas as partes da proteína (por exemplo, CDR, *framework*, domínios C_L, C_H (por exemplo, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}), dobradiça, (VL, VH)) são substancialmente não imunogênicas em seres humanos, apenas com pequenas alterações ou variações de seqüência. Similarmente, anticorpos designados de primatas (macaco, babuíno, chimpanzés etc.), de roedores (camundongo, rato, coelho, porquinho-da-índia, hamster, e semelhantes) e outros mamíferos designam esses anticorpos específicos para a espécie, subgênero, gênero, subfamília, família. Além disso, anticorpos quiméricos incluem qualquer combinação dos citados acima. Essas alterações ou variações opcionalmente e preferivelmente retêm ou reduzem a imunogenicidade em seres humanos ou em outras espécies em relação aos anticorpos não modificados. Dessa forma, um anticorpo é distinto de um anticorpo quimérico ou humanizado. Ressalta-se que um anticorpo humano pode ser produzido por um animal não humano ou uma célula procariótica ou eucariótica que é capaz de expressar genes de imunoglobulina humana funcionalmente rearranjados (por exemplo, cadeia pesada e/ou cadeia leve). Além disso, quando um anticorpo humano é um anticorpo de cadeia única, ele pode compreender um peptídeo vinculador que não é encontrado em anticorpos humanos nativos. Por exemplo, um Fv pode compreender um peptídeo vinculador, por exemplo,

dois a cerca de oito resíduos de glicina ou de outro aminoácido, que conecta a região variável da cadeia pesada e a região variável da cadeia leve. Esses peptídeos vinculadores são considerados como sendo de origem humana.

5 Como aqui usado, um anticorpo humano é "derivado de" sequência de uma linhagem germinativa em particular se o anticorpo é obtido de um sistema usando sequências de imunoglobulina humana, por exemplo, por imunização de um camundongo transgênico que carrega genes de imunoglobulina

10 humana ou por avaliação de uma biblioteca de genes de imunoglobulina humana. Um anticorpo humano que é "derivado de" uma sequência de imunoglobulina da linhagem germinativa humana pode ser identificado como tal por comparação da sequência de aminoácidos do anticorpo humano com a

15 sequência de aminoácidos de imunoglobulinas da linhagem germinativa humana. Um anticorpo humano selecionado tipicamente é pelo menos 90% idêntico em termos de sequência de aminoácidos com uma sequência de aminoácidos codificada por um gene de imunoglobulina da linhagem

20 germinativa humana e contém resíduos de aminoácido que identificam o anticorpo humano como sendo humano, quando comparado com as sequências de aminoácidos de imunoglobulina da linhagem germinativa de outras espécies (por exemplo, sequências da linhagem germinativa murídea).

25 Em certos casos, um anticorpo humano pode ser pelo menos 95% ou até pelo menos 96%, 97%, 98% ou 99% idêntico em termos de sequência de aminoácidos à sequência de aminoácidos codificada pelo gene de imunoglobulina da linhagem germinativa. Tipicamente, um anticorpo humano

30 derivado de uma sequência da linhagem germinativa humana em

particular exibirá no máximo 10 diferenças de aminoácidos em relação à sequência de aminoácidos codificada pelo gene de imunoglobulina da linhagem germinativa humana. Em certos casos, o anticorpo humano pode exibir no máximo 5, ou até mesmo no máximo 4, 3, 2 ou 1 diferença de aminoácido em relação à sequência de aminoácidos codificada pelo gene de imunoglobulina da linhagem germinativa.

Um "anticorpo monoclonal humano" refere-se aos anticorpos que exibem uma única especificidade de ligação que possuem regiões variáveis e constantes derivadas de seqüências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana. O termo também engloba anticorpos humanos recombinantes. Métodos para produção desses anticorpos são aqui descritos.

O termo "anticorpo humano recombinante", como aqui usado, inclui todos os anticorpos humanos que são preparados, expressos, criados ou isolados por meios recombinantes, por exemplo, anticorpos isolados de um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico ou transcromossômico para genes de imunoglobulina humana ou para um hibridoma preparado a partir deles, anticorpos isolados de uma célula hospedeira transformada para expressar o anticorpo, por exemplo, a partir de um transfectoma, anticorpos isolados de uma biblioteca combinatória de anticorpos humanos recombinantes, e anticorpos preparados, expressos, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolva a junção (*splicing*) de seqüências gênicas de imunoglobulina humana com outras seqüências de DNA. Esses anticorpos humanos recombinantes possuem regiões variáveis e constantes derivadas de

seqüências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana. Em certas modalidades, no entanto, esses anticorpos humanos recombinantes podem ser submetidos à mutagênese *in vitro* (ou, quando é usado um animal transgênico para seqüências de Ig humana, mutagênese somática *in vivo*) e, dessa forma, as seqüências de aminoácidos das regiões VH e VL dos anticorpos recombinantes são seqüências que, embora derivadas e relacionadas com as seqüências de VH e VL da linhagem germinativa humana, podem não existir naturalmente dentro do repertório de anticorpos da linhagem germinativa humana *in vivo*. Métodos para produção desses anticorpos são aqui descritos.

Como aqui usado, "isótipo" refere-se à classe de anticorpo (por exemplo, IgM ou IgG1) que é codificado por genes da região constante de cadeia pesada.

Os termos "anticorpo policlonal" ou "composição de anticorpo policlonal", como aqui usados, referem-se a uma preparação de anticorpos que são derivados de diferentes linhagens de células B. Eles são uma mistura de moléculas de imunoglobulina secretada contra um antígeno específico, cada um reconhecendo um epítipo diferente.

Os termos "anticorpo monoclonal" ou "composição de anticorpo monoclonal", como aqui usados, referem-se a uma preparação de moléculas de anticorpo de composição molecular única. Uma composição de anticorpo monoclonal exibe especificidade e afinidade de ligação únicas para um epítipo em particular.

Como aqui usado, o termo "marcador" significa um composto ou composição detectável direta ou indiretamente que é conjugado direta ou indiretamente à composição a ser

detectada, por exemplo, polinucleotídeo ou proteína, por exemplo, um anticorpo, de modo a gerar uma composição "marcada". O termo também inclui seqüências conjugadas ao polinucleotídeo que gerarão um sinal mediante expressão das seqüências inseridas, por exemplo, a proteína fluorescente verde (GFP), e semelhantes. O marcador pode ser detectável por si próprio (por exemplo, marcadores de radioisótopo ou marcadores fluorescentes) ou, no caso de um marcador enzimático, pode catalisar a alteração química de um composto ou composição substrato que seja detectável. Os marcadores podem ser adequados para a detecção em pequena escala ou mais adequados para a triagem de alto rendimento. Dessa forma, marcadores adequados incluem, sem limitação, radioisótopos, fluoróforos, compostos quimioluminescentes, corantes e proteínas, incluindo enzimas. O marcador pode ser simplesmente detectado ou pode ser quantificado. Uma resposta que é simplesmente detectada geralmente compreende uma resposta cuja existência meramente é confirmada, enquanto uma resposta que é quantificada geralmente compreende uma resposta que possui um valor quantificável (por exemplo, que pode ser relatado numericamente), por exemplo, intensidade, polarização e/ou outra propriedade. Em ensaios de luminescência ou fluorescência, a resposta detectável pode ser gerada diretamente com o uso de um luminóforo ou fluoróforo associado a um componente do ensaio realmente envolvido na ligação, ou indiretamente usando um luminóforo ou fluoróforo associado a outro componente (por exemplo, repórter ou indicador).

Exemplos de marcadores luminescentes que produzem sinais incluem, sem limitação, bioluminescência e

quimioluminescência. A resposta detectável por luminescência geralmente compreende uma alteração, ou uma ocorrência de um sinal de luminescência. Métodos e luminóforos adequados para marcar de forma luminescente componentes do ensaio são conhecidos na técnica e descritos, por exemplo, em Haugland, Richard P. (1996) "Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals" (6ª Edição). Exemplos de sondas luminescentes incluem, sem limitação, aequorina e luciferases.

Exemplos de marcadores fluorescentes adequados incluem, sem limitação, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarinas, pireno, verde Malacita, estilbeno, Amarelo Lucifer, Cascade BlueTM e Vermelho Texas. Outros corantes ópticos adequados são descritos em Haugland, Richard P. (1996) "Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals" (6ª Edição).

Em outro aspecto, o marcador fluorescente é funcionalizado para facilitar a adesão covalente a um componente celular presente dentro ou na superfície da célula ou tecido, por exemplo, um marcador da superfície celular. Grupos funcionais adequados incluem, sem limitação, grupos isotiocianato, grupos amino, grupos haloacetil, maleimidas, succinimidil ésteres e haletos de sulfonila, todos podendo ser usados para anexar o marcador fluorescente a uma segunda molécula. A escolha do grupo funcional do marcador fluorescente dependerá do local de adesão a um vinculador, ao agente, ao marcador ou ao segundo agente de marcação.

II. Métodos da invenção

Um aspecto da presente invenção está relacionado a um método de prevenção ou redução de sangramento em um indivíduo submetido à terapia anticoagulante pela administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um derivado da proteína do fator Xa. Em uma modalidade, o derivado possui um sítio ativo modificado e/ou um domínio Gla modificado, possuindo, dessa forma, atividade pró-coagulante reduzida ou ausente. O derivado atua como um antídoto e substancialmente neutraliza a atividade anticoagulante do inibidor. Em uma modalidade, o derivado é deficiente em Gla ou sem domínio Gla. O indivíduo pode ser um mamífero ou, mais particularmente, um ser humano.

Em outra modalidade, a invenção é dirigida a um método para ligar e inibir seletivamente um inibidor do fator Xa administrado exogenamente em um indivíduo. O método compreende a administração ao paciente de uma quantidade eficaz de um derivado de um derivado de fator Xa como descrito acima. O indivíduo pode ser uma célula ou um mamífero como, por exemplo, um ser humano.

Pacientes adequados para essa terapia foram submetidos a terapia anticoagulante prévia, por exemplo, receberam a administração de um ou mais anticoagulantes, por exemplo, um inibidor do fator Xa. Exemplos de anticoagulantes que são inibidores do fator Xa incluem, sem limitação, fondaparinux, idraparinux, idraparinux biotinilado, enoxaparina, fragmina, NAP-5, rNAPc2, inibidor da via do fator tecidual, DX-9065a, YM-60828, YM-150, apixaban, rivaroxaban, PD-348292, otamixaban, DU-176b, LY517717, GSK913893, heparina de baixo peso molecular e betrixaban, ou qualquer combinação destes. A fonte de vários

anticoagulantes é encontrada ao longo da descrição.

Em um aspecto, o derivado possui um sítio ativo modificado e/ou um domínio Gla modificado ou removido. Em um aspecto, o derivado de fator Xa não possui ou exibe nenhuma atividade pró-coagulante. Nesse aspecto, o derivado compreende pelo menos os resíduos de aminoácido 40 a 448, 45 a 448, ou 46 a 448 do ID. DE SEQ. N°: 3 ou equivalentes destes. Em outro aspecto, o derivado compreende pelo menos os resíduos de aminoácido 45 a 139 e 195 a 448 ou 46 a 139 e 195-448 do ID. DE SEQ. N°: 3 ou equivalentes destes.

Em outro aspecto da invenção, o derivado de fXa retém a estrutura tridimensional do sítio ativo da proteína de fXa. Informações em relação à estrutura tridimensional do fXa des-Gla podem ser encontradas em Brandstetter, H. e col. *J. Bio. Chem.*, 1996, 271: 29.988-29.992.

Em outro aspecto da invenção, os derivados de fXa podem não possuir o domínio Gla, além de um dos dois domínios EGF. Em outro aspecto da invenção, os derivados de fXa são completamente desprovidos da cadeia leve. Outras modificações da cadeia pesada podem compreender o domínio catalítico de serina-proteases relacionadas que são capazes de se ligar aos inibidores. As serina-proteases relacionadas possuem domínios catalíticos que possuem similaridade estrutural suficiente com o domínio catalítico de fXa e são, portanto, capazes de se ligar aos inibidores de fXa de pequena molécula. Exemplos de serina-proteases relacionadas incluem, sem limitação, proteases de mamíferos como, por exemplo, calicreína plasmática, trombina e tripsina ou a protease bacteriana subtilisina. Esses derivados ainda incluem modificações nos resíduos de

aminoácidos equivalentes aos resíduos de serina (SER379) ou de ácido aspártico (ASP282) do sítio ativo aqui descritos.

Em algumas modalidades, a proteína do fator Xa com atividade pró-coagulante reduzida compreende uma cadeia leve modificada, em que a modificação é substituição, 5 adição ou eliminação do domínio Gla para reduzir a ligação à membrana de fosfolípídeo de fXa. Em algumas modalidades, a sequência de aminoácidos principal de fXa não é alterada, mas a cadeia lateral de certos aminoácidos foi alterada.

10 Exemplos do domínio Gla modificado que reduz a ligação à membrana de fosfolípídeo de fXa compreendem polipeptídeos ou proteínas que possuem a sequência de aminoácidos primária do ID. DE SEQ. N°: 3 ou um equivalente deste, com pelo menos uma substituição, adição ou eliminação de

15 aminoácido, quando comparado com o domínio Gla de uma proteína do fator Xa humano do tipo selvagem. Em algumas modalidades, pelo menos um aminoácido que é substituído ou eliminado é um ácido γ -carboxiglutâmico (Gla). Resíduos de Gla são mostrados no ID. DE SEQ. N°: 3 nas posições de

20 aminoácido 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29, 32 e 39. Em algumas modalidades, a sequência de aminoácidos primária do antídoto é idêntica ao ID. DE SEQ. N°: 3 ou equivalente deste, mas é uma proteína do fator Xa não carboxilada, subcarboxilada ou descarboxilada. Em algumas modalidades, o

25 antídoto é um fXa anidro des-Gla ou des-Gla fX-S379A. Em algumas modalidades, a proteína do fator Xa com ligação reduzida à membrana de fosfolípídeo ainda compreende modificação ou eliminação dos domínios EGF1 e/ou EGF2 (mostrados na Figura 3 como aminoácidos 46 a 84 e 85 a 128,

30 respectivamente) ou uma parte, ou seja, fragmento dos

domínios EGF1 e/ou EGF2. Em algumas modalidades, toda a cadeia leve ou substancialmente toda a cadeia leve é modificada ou removida. Por exemplo, a proteína de fXa modificada com ligação reduzida à membrana de fosfolipídeo

5 pode conter apenas a cadeia pesada, ou o fXa modificado pode conter a cadeia pesada e um fragmento da cadeia leve que contém Cys132, o resíduo de aminoácido que forma a ligação dissulfeto simples com Cys302 da cadeia pesada no ID. DE SEQ. N°: 3. Em algumas modalidades, o derivado

10 compreende a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 12. Em algumas modalidades, o derivado é o polipeptídeo de duas cadeias que compreende o ID. DE SEQ. N°: 13. Em outras modalidades, o derivado é o polipeptídeo do ID. DE SEQ. N°: 15.

15 Em algumas modalidades, o derivado da proteína do fator Xa compreende uma cadeia pesada modificada que contém o domínio catalítico da referida proteína do fator Xa. Em algumas modalidades, pelo menos uma substituição de aminoácido está presente em uma ou mais posições de

20 aminoácido de fXa selecionado do grupo que consiste em Glu216, Glu218, Arg332, Arg347, Lys351 e Ser379 nos IDS. DE SEQ. N°s: 3 e 7 (Glu37, Glu39, Arg150, Arg165, Lys169 e Ser195 na numeração de quimotripsina, respectivamente). Em algumas modalidades, o antídoto é uma proteína do fator Xa

25 com o resíduo de serina do sítio ativo (Ser379 nos IDS. DE SEQ. N°s: 3 e 7, Ser195 na numeração de quimotripsina) modificado para desidro-alanina ou alanina. Essas modificações podem ser feitas na proteína de fXa do tipo selvagem ou em qualquer uma das proteínas de fXa

30 modificadas ou fragmentos descritos acima. Por exemplo, o

fXa anidro des-Gla com os resíduos de serina do sítio ativo substituídos por desidro-alanina descrito no Exemplo 1 não demonstrou atividade de antídoto.

Em outras modalidades, o derivado possui interação
5 reduzida com ATIII, co-fatores fV/fVa e fVIII/fVIIIa, quando comparado com fator Xa do tipo selvagem ou de ocorrência natural. Em algumas modalidades, pelo menos uma substituição de aminoácido está presente na posição de aminoácido Arg306, Glu310, Arg347, Lys351, Lys414 ou Arg424
10 nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 3 e 7 (Arg125, Glu129, Arg165, Lys169, Lys230 ou Arg240 na numeração de quimotripsina, respectivamente). Essas modificações podem ser feitas na proteína de fXa do tipo selvagem ou em qualquer uma das proteínas de fXa modificadas ou fragmentos descritos acima.

15 Em outras modalidades, o antídoto é uma proteína que compreende a seqüência de aminoácidos de um domínio catalítico de serina-protease que pode mimetizar a capacidade de ligação ao inibidor da cadeia pesada de fXa. Essas proteínas podem incluir proteases de mamíferos como,
20 por exemplo, calicreína plasmática, trombina, tripsina (ou seu homólogo bacteriano subtilisina) que foram modificadas recombinantemente para perderem atividade de serina-protease capazes de clivar substratos de proteína, mas ainda possuem as características estruturais da fenda do
25 sítio ativo.

Também são fornecidas por esta invenção composições farmacêuticas que contêm um ou mais dos derivados de fator Xa modificados e um veículo farmaceuticamente aceitável. As composições são administradas a um indivíduo que necessita
30 em uma quantidade que fornecerá o benefício desejado, uma

redução ou interrupção do sangramento. As composições podem ser co-administradas com qualquer agente ou terapia adequada que complemente ou aumente a atividade do derivado de fator Xa. Um exemplo disso é um segundo agente capaz de
5 prolongar a meia-vida plasmática do antídoto. Exemplos de segundos agentes adequados incluem, sem limitação, um anticorpo anti-fXa que reconhece o exosítio de cadeia pesada de fXa ou um derivado de fXa ligado à alfa-2-macroglobulina. A formação do complexo entre o derivado de
10 fXa e um segundo agente (anticorpo de exosítio ou alfa-2-macroglobulina) bloquearia interações macromoleculares, mas reteria a habilidade de ligações ao inibidor dependentes do sítio ativo. Exemplos de anticorpos anti-fXa adequados à co-administração incluem, sem limitação, aqueles descritos
15 em Yang Y.H., e col., *J. Immunol.* 2006, 1; 177(11): 8.219-25, Wilkens, M. e Krishnaswamy, S., *J. Bio. Chem.*, 2002, 277 (11), 9.366-9.374 e Church W.R., e col., *Blood*, 1988, 72(6), 1.911-1.921.

Em algumas modalidades, uma proteína do fator Xa é
20 modificada por meios químicos, enzimáticos ou recombinantes. Por exemplo, a Ser379 do sítio ativo pode ser modificada quimicamente em desidroalanina, e o domínio Gla pode ser removido enzimaticamente por digestão por quimotripsina, como descrito no Exemplo 1. Um fXa
25 modificado aqui descrito também pode ser produzido por meio recombinante por modificação de sequência do cDNA que codifica fX do tipo selvagem (ID. DE SEQ. N°: 2), descrito com mais detalhes no Exemplo 7, para expressão direta do antídoto recombinante (Antídoto-r) ou, alternativamente,
30 uma proteína de fX com a modificação desejada pode ser

produzida por meio recombinante seguida por ativação no fXa modificado por um ativador, por exemplo, veneno de cobra, por exemplo, veneno de víbora de Russel, e complexos de fVIIa/fator tecidual ou fIXa/fVIIIa.

- 5 Os indivíduos que se beneficiarão da administração das composições aqui descritas e dos métodos que as acompanham incluem aqueles que apresentam, ou estão predispostos, a um quadro clínico de sangramento importante ou um quadro de sangramento não importante clinicamente significativo.
- 10 Exemplos de quadros clínicos de sangramento importante são selecionados do grupo que consiste em hemorragia, sangramento em órgãos vitais, sangramento que necessite de reoperação ou de um novo procedimento terapêutico, e um índice de sangramento $\geq 2,0$ com um sangramento observável
- 15 associado (Turpie AGG, e col., *NEJM*, 2001, 344: 619-625). Adicionalmente, o indivíduo pode estar apresentando ou estar predisposto a um quadro de sangramento não importante selecionado do grupo que consiste em epistaxe persistente ou recorrente e em quantidade substancial ou que não será
- 20 interrompida ser intervenção, sangramento retal ou do trato urinário que não aumenta até um nível que necessite de um procedimento terapêutico, hematomas substanciais no local de injeções ou em outros locais que sejam espontâneos ou ocorram com trauma trivial, perda sangüínea substancial
- 25 mais do que normalmente associada a um procedimento cirúrgico que não exija frenagem, e sangramento que exija transfusão não planejada.

Em algumas modalidades, o antídoto é administrado após a administração de uma overdose de um inibidor de fXa ou

30 antes de uma cirurgia que possa expor indivíduos ao risco

de hemorragia.

Em qualquer um dos métodos aqui descritos, deve-se entender, mesmo que nem sempre explicitamente estabelecido, que uma quantidade eficaz do derivado é administrada ao indivíduo. A quantidade pode ser determinada empiricamente pelo médico responsável pelo tratamento e irá variar com a idade, o sexo, o peso e a saúde do indivíduo. Fatores adicionais a serem considerados pelo médico responsável pelo tratamento incluem, sem limitação, a identidade e/ou quantidade do inibidor do fator Xa que pode ter sido administrada, o método ou modo pelo qual o antídoto será administrado ao indivíduo, a formulação do antídoto e o resultado terapêutico final para o paciente. Tendo em mente essas variáveis, aqueles habilitados na técnica administrarão uma quantidade terapeuticamente eficaz ao indivíduo a ser tratado. Contempla-se que uma quantidade terapeuticamente eficaz dos antídotos aqui descritos suficiente para se contrapor, ou substancialmente neutralizar, um anticoagulante em um indivíduo pode conter desde cerca de 0,01 miligrama de antídoto por quilograma do peso corporal de um indivíduo até 1 grama de antídoto por quilograma do peso corporal de um indivíduo de antídoto. É ainda contemplado que o antídoto pode ser fornecido ao indivíduo em uma concentração que varia de cerca de 10 nanomolar a cerca de 100 micromolar, ou cerca de 10 nanomolar a cerca de 5 micromolar, ou cerca de 100 nanomolar a cerca de 2,5 micromolar.

As composições podem ser administradas em quantidades que sejam eficazes para que o antídoto reconheça e se ligue seletivamente, direta ou indiretamente, ao inibidor do

fator Xa no indivíduo. Elas também podem ser administradas em quantidades para inibir substancialmente ou neutralizar substancialmente inibidores do fator Xa administrados exogenamente em um indivíduo.

5 Ainda em outro aspecto, a invenção está relacionada a uma composição farmacêutica para a reversão ou neutralização da atividade anticoagulante de um inibidor do fator Xa administrado a um indivíduo, que compreende a administração de uma quantidade eficaz de um antídoto para
10 o inibidor do fator Xa e um veículo farmacêuticamente aceitável, desde que o antídoto não seja fator VIIa derivado do plasma, fator VIIa recombinante, plasma fresco congelado, concentrados de complexo de protrombina e sangue total.

15 Em algumas modalidades, o antídoto é qualquer um dos antídotos descritos acima. Em algumas modalidades, o antídoto é conjugado a uma porção capaz de prolongar a meia-vida circulante do antídoto. Em algumas modalidades, a porção é selecionada do grupo que consiste em polietileno
20 glicol, um grupo acil, um lipossomo, uma proteína transportadora, uma membrana de fosfolípídeo artificial e uma nanopartícula. Por exemplo, um resíduo de lisina ou cisteína que não é do sítio ativo de um derivado de fXa aqui descrito pode ser modificado quimicamente para se
25 anexar a uma molécula de polietileno glicol. Outros métodos fornecidos em Werle, M. & Bemkop-Schniirch, A. "Strategies to Improve Plasma Half Life Time of Peptide and Protein Drugs", *Amino Acids* 2006, 30(4): 351-367 podem ser usados para prolongar a meia-vida plasmática dos antídotos desta
30 invenção.

Em outras modalidades da invenção, a meia-vida do derivado de fXa é aumentada por acoplamento do antídoto aos domínios do transportador de Fc. Em uma modalidade, o antídoto é acoplado a um fragmento Fc, por exemplo, uma
5 porção do peptídeo de imunoglobulina ou um fragmento de IgG1. Em uma modalidade, é contemplada uma proteína quimérica que compreende o derivado de fXa e a porção do peptídeo de imunoglobulina. Ainda em outra modalidade, o derivado de fXa e o peptídeo de imunoglobulina são
10 acoplados por uma reação química, por exemplo, uma ligação dissulfeto, com as regiões constantes da cadeia pesada e cadeia leve kappa de IgG humana.

Em algumas modalidades, a composição farmacêutica ainda compreende um agente capaz de prolongar a meia-vida
15 plasmática do antídoto. Em outro aspecto, a composição farmacêutica foi co-formulada com um agente capaz de prolongar a meia-vida plasmática do antídoto. Em algumas modalidades, o agente co-administrado ou co-formulado é um anticorpo anti-fXa que reconhece o exosítio de fXa ou um
20 derivado de fXa ligado à alfa-2-macroglobulina.

III. Antídotos

Derivados do Fator Xa

Um aspecto da presente invenção consiste no uso de derivados de fXa, por exemplo, fXa deficiente em domínio
25 Gla ou fXa des-Gla, como antídotos seguros e eficazes para substancialmente neutralizar a atividade de um inibidor do fator da coagulação fXa para evitar ou interromper sangramento. Contempla-se que os antídotos da presente invenção serão úteis na reversão do efeito anticoagulante
30 de um inibidor de fXa, especialmente de um inibidor de

pequena molécula dirigido ao sítio ativo.

Contempla-se que um antídoto para um inibidor de fXa possui atividade pró-coagulante reduzida ou ausente, mas é capaz de se ligar a um inibidor de fXa. Contempla-se que
5 essa atividade limitada permite a dosagem do antídoto em um nível maior do que o fXa do tipo selvagem circulante. Certos derivados de fXa como, por exemplo, fXa des-Gla e fXa deficiente em Gla, são antídotos adequados desta invenção. Além de terem atividade pró-coagulante reduzida
10 ou diminuída, os antídotos da presente invenção também devem ser substancialmente não imunogênicos para o indivíduo. Um antídoto pode conter uma combinação de duas ou mais das mutações e/ou modificações acima. Além disso, qualquer um dos derivados de fXa acima pode ser
15 administrado isoladamente ou em combinação com outro.

O Fator Xa é uma serina-protease na via da coagulação sangüínea responsável pela conversão de protrombina em trombina. Ele é produzido a partir do fator X inativo mediante ativação pela Xase intrínseca (complexo formado
20 por fator IXa com seu co-fator, fator VIIIa) ou pela Xase extrínseca (complexo formado por fator VIIa com seu co-fator, fator tecidual). O fX ativado (fXa) podem passar por uma clivagem autocatalítica adicional no terminal C de sua cadeia pesada, convertendo fXa α na subforma fXa β (Jesty, J
25 e col. *J. Biol. Chem.* 1975, 250(12): 4.497-4.504). fXa α e fXa β são materiais adequados para a presente invenção. O próprio fXa converte protrombina em uma taxa baixa que não é suficiente para apoiar a coagulação. Apenas quando forma um complexo de protrombinase com co-fatores Ca²⁺,
30 fosfolipídeo e fator Va, fXa pode ativar protrombina em uma

taxa suficientemente rápida para apoiar a coagulação (Skogen, W.F., e col., *J. Biol. Chem.* 1984, 259(4): 2.306-10). O complexo exige a ligação entre o fosfolipídeo carregado negativamente e os resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico no domínio Gla de fXa via ponte de Ca^{2+} .

Portanto, embora o domínio Gla não contenha o sítio ativo de fXa, ele permite que fXa forme o complexo de protrombinase por meio dos resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico. Isso é demonstrado por remoção seletiva do domínio Gla de fXa por digestão por quimotripsina (veja a Figura 7 e o Exemplo 1). Foram feitos ensaios de coagulação em fXa durante um período de duração da clivagem do domínio Gla por digestão por quimotripsina. Foi relatado (Skogen e cols. *J. Biol. Chem.* 1984, 259(4): 2.306-10) que um complexo de protrombinase reconstituído composto por fXa sem domínio Gla, fVa, fosfolipídeos e íons de cálcio produz trombina em uma taxa significativamente reduzida (0,5% de produto gerado, comparada com complexo de controle contendo fXa nativo). Como mostrado na Figura 7, a atividade de fXa na formação de coágulo era parcialmente reduzida após o fXa ser digerido por quimotripsina por 15 minutos, e a atividade era perdida completamente após 30 minutos de digestão. Verificou-se, portanto, que fXa subcarboxilado ou descarboxilado, que não possui os resíduos de ácido gama-carboxiglutâmico apropriados necessários para a ligação à membrana dependente de íon cálcio, é incapaz de montagem de complexo da coagulação dependente da membrana e não apóia a coagulação sangüínea (Mann, K.G. e col., *Blood*, 1990, 76: 1-16).

Também foi estabelecido que fXa deficiente em domínio

Gla é capaz de se ligar aos inibidores de IXa dirigidos ao sítio ativo (Brandstetter, H e col., *J. Bio. Chem.*, 1996, 271: 29.988-29.992). Houve relatos de cristalografia de inibidor de fXa de pequena molécula ligado ao IXa des-Gla humano, que forneceram descrição estrutural da fenda do sítio ativo (Brandstetter, *J. Bio. Chem.*, 1996, 271: 29.988-29.992 e Roehrig, *J. Med. Chem.* 2005, 48(19): 5.900-8). A Figura 8 mostra que um fXa anidro des-Gla exibiu afinidade de ligação de 0,319 nM com um inibidor de fXa betrixaban, comparável com aquela de um fXa nativo.

Foi agora descoberto que des-Gla IXa, e outros derivados de fXa que possuem atividade pró-coagulante reduzida, mas são capazes de ligação ao inibidor de fXa, podem ser usados como um antídoto para um inibidor de fXa. Como mostrado na Figura 9, o fXa anidro des-Gla exibiu reversão completa da atividade anticoagulante de betrixaban em uma concentração de 680 nM. Como detalhado no Exemplo 2, a geração de trombina foi iniciada pela adição de reagente contendo TF (Innovin) e, dessa forma, indicativo da função de fatores da coagulação na via da coagulação extrínseca. Também foi demonstrado nos Exemplos 9-13 que o antídoto recombinante é útil para reverter uma ampla variedade de anticoagulantes.

Ensaio de prolongação da coagulação com o reagente de tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) (Actina FS), que determina a função do fator da coagulação na via da coagulação intrínseca, também indicam que o fXa anidro des-Gla possui atividade de antídoto. A Figura 10 mostra o efeito de dose-resposta do antídoto de fXa anidro des-Gla contra 250 nM de betrixaban, com reversão completa a 600

nM. A Figura 11 mostra que fXa anidro des-Gla também foi capaz de reverter a atividade anticoagulante de outro inibidor de fXa, enoxaparina. A Figura 12 mostra que fXa anidro des-Gla não exibiu atividade de antídoto significativa contra um inibidor direto de trombina, argatroban. Dessa forma, o fXa anidro des-Gla é um antídoto seletivo para inibidores de fXa e é capaz de restaurar a atividade de fXa pró-coagulante iniciada pela via extrínseca ou pela via intrínseca.

Além disso, a atividade de antídoto de fXa anidro des-Gla foi demonstrada pelos ensaios de prolongação com aPTT medida com um cronômetro de coagulação tradicional. Como mostrado na Figura 13, o próprio fXa anidro des-Gla não tem nenhum efeito sobre aPTT de plasma de controle nas maiores concentrações testadas (2.576 nM). Quatrocentos nM de betrixaban prolongaram aPTT em mais de duas vezes. Esse efeito anticoagulante de betrixaban é revertido por fXa anidro des-Gla de forma dose-dependente, com o retorno da aPTT ao nível quase normal do plasma de controle em concentrações de antídoto acima de 1.610 nM.

Contempla-se que truncamentos adicionais na cadeia leve de fXa, por exemplo, eliminação adicional do domínio EGF1, domínios EGF1 mais EGF2, ou fragmentos destes, e a inativação de fXa apenas com a cadeia pesada, possam ser antídotos úteis desta invenção.

fXa deficiente em domínio Gla não apóia a coagulação normal sob concentração fisiologicamente relevante. No entanto, a proteína possui a habilidade para clivar muitos substratos e causar coagulação em concentrações maiores.

Por exemplo, Skogen e cols. (Skogen, W.F., e col., *J. Biol.*

Chem. 1984, 259(4): 2.306-10) mostraram que fXa des-Gla bovina possui cerca de 0,5-1,0% de atividade de complexo de protrombinase em relação ao fXa do tipo selvagem. Dessa forma, modificações que reduzam ainda mais ou eliminem completamente a atividade pró-coagulante de um derivado de fXa são contempladas pelos métodos da invenção. Essas modificações podem ser, por exemplo, em um domínio catalítico de fXa.

São contempladas várias formas de modificação do domínio catalítico na cadeia pesada de fXa para reduzir sua atividade pró-coagulante. O resíduo S379 do sítio ativo de fXa (como mostrado no ID. DE SEQ N°: 7), por exemplo, pode ser substituído seletivamente por desidro-alanina (veja o Exemplo 1) ou alanina (veja o Exemplo 6) para reduzir ou eliminar a atividade pró-coagulante. Sabe-se também que a formação de complexo entre fXa e um reagente que visa o exossítio de fXa pode bloquear a habilidade de ligação macromolecular de fXa, reduzindo, dessa forma, sua atividade pró-coagulante, mantendo a habilidade de ligação à pequena molécula no sítio ativo. Esse reagente que visa o exossítio inclui, sem limitação, anticorpos monoclonais que visam uma região removida do sítio ativo (Wilkins, M. e Krishnaswamy, S, *J. Bio. Chem.*, 2002, 277 (11), 9.366-9.374), ou α -2-macroglobulina. Sabe-se que o complexo de α -2-macroglobulina-serina-protease, por exemplo, com tripsina, trombina ou fXa, é capaz de se ligar aos substratos de pequena molécula (Kurolwa, K. e col., *Clin. Chem.* 1989, 35(11), 2.169-2.172).

Sabe-se também que um fXa inativo com modificações unicamente na cadeia pesada, mantendo sua cadeia leve

inalterada, poderia atuar como um inibidor de protrombinase (Hollenbach, S. e col., *Thromb. Haemost.*, 1994, 71(3), 357-62), pois ele interfere com a atividade pró-coagulante do fXa normal, como mostrado na Figura 6. Portanto, em uma

5 modalidade, o derivado de fXa possui modificações tanto na cadeia leve quanto na cadeia pesada. Foi descoberto que essas modificações reduzem ou eliminam tanto a atividade pró-coagulantes quanto a atividade anticoagulante, restando a habilidade de ligação aos inibidores do derivado de fXa.

10 Podem ser usados vários métodos para produzir derivados de fXa deficientes em domínio Gla ou outros derivados de fXa aqui descritos. Por exemplo, o domínio Gla pode ser completamente removido por meio da clivagem quimotriptica, produzindo fXa sem domínio Gla.

15 Alternativamente, um fX sem domínio Gla pode ser produzido por clivagem quimotriptica de fX nativo. O fX sem domínio Gla pode então ser convertido em fXa sem domínio Gla por um ativador de fX. fX pode ser isolado do plasma da mesma espécie ou de uma espécie diferente em relação ao indivíduo

20 a ser tratado. Foi demonstrado que fX bovino, por exemplo, era funcional em ensaios no plasma humano. Exemplos de um ativador de fX incluem, sem limitação, um veneno de cobra, por exemplo, veneno de víbora de Russel, e complexos de fVIIa/fator tecidual ou fIXa/fVIIIa. Esse meio é conhecido

25 por aqueles habilitados na técnica. Por exemplo, Rudolph A.E. e cols. relataram um fXa recombinante produzido a partir de um fator X recombinante (fX) com uma única substituição de Arg347 por Glutamina (fXR347N) (*Biochem.* 2000, 39 (11): 2.861-2.867). Em uma modalidade, os

30 derivados de fXa produzidos a partir de fontes não humanas

são não imunogênicos ou substancialmente não imunogênicos. O Exemplo 7 também fornece um método de produção de um antídoto recombinante que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 12.

5 Os derivados de fXa também podem ser purificados de plasma humano, ou podem ser produzidos pelo método de DNA recombinante em que um gene adequado para o derivado de fXa é expresso em uma organismo hospedeiro adequado. A expressão e a purificação de fXa recombinante foram
10 relatadas por vários grupos; veja, por exemplo, Larson, P.J., e col., *Biochem.*, 1998, 37: 5.029-5.038, e Camire, R.M., e col., *Biochem.*, 2000, 39, 14.322-14.329 para a produção de fX recombinante; Wolf, D.L. e col., *J. Bio. Chem.*, 1991, 266(21): 13.726-13.730 para a produção de fXa recombinante. fXa modificado pode ser preparado de acordo
15 com esses procedimentos com o uso de um cDNA genericamente modificado que possui uma sequência de nucleotídeos que codifica o mutante de fXa desejado. O Exemplo 6 dá mais detalhes para a expressão direta de um mutante de fXa sem
20 domínio Gla-S379 com atividade funcional como um antídoto.

Contempla-se que fXa com sítio ativo mutado ou modificado com domínio Gla deficiente, por exemplo, fXa subcarboxilado, pode ser útil como antídoto para o inibidor de fXa. fXa subcarboxilado pode ser preparado por meio
25 recombinante por retenção de derivados de vitamina K durante a expressão de proteína (derivados de vitamina K são necessários para a modificação pós-tradução para formar os resíduos de Gla) ou por adição de antagonistas da vitamina K como, por exemplo, warfarina, durante a cultura
30 de tecido. fXa descarboxilado pode ser preparado por

aquecimento (Bajaj P., *J. Biol. Chem.*, 1982, 257(7): 3.726-3.731) ou por digestão proteolítica por quimotripsina (Morita T., e col., *J. Biol. Chem.*, 1986, 261(9): 4.015-4.023). O antídoto também pode ser gerado em sistemas
5 procarióticos, seguido por um re-enovelamento ou constituição *in vitro* da ligação ao sítio do inibidor de fXa.

Os resíduos de Gla também podem ser modificados quimicamente para remover o grupo carboxil responsável pela
10 ligação à membrana dependente de íon cálcio. Por exemplo, os grupos carboxil nos resíduos de Gla podem ser removidos seletivamente sob condições de descarboxilação ou podem ser cobertos, por exemplo, por esterificação ou aminação. É desejável que essa esterificação ou aminação seja
15 resistente à hidrólise *in vivo* de tal forma que o fXa modificado não seja rapidamente convertido em fXa ativo, o que pode causar trombose.

Outros mutantes ou derivados de fXa também podem ser antídotos úteis desta invenção. Em uma modalidade, esta
20 invenção engloba uso de mutantes descritos em Peter J. Larson e col., *Biochem.*, 1998, 37: 5.029-5.038 como antídotos para o inibidor de fXa.

Em outra modalidade, esta invenção engloba uso de mutantes de fXa cataliticamente inativos para a preparação
25 de antídotos para o inibidor de fXa. Por exemplo, os mutantes descritos em Sinha, U., e col., *Protein Expression and Purif.*, 1992, 3: 518-524 rXai, mutantes com modificações químicas, por exemplo, desidro-alanina (fXa anidro), como descrito em Nogami, e col., *J. Biol. Chem.*
30 1999, 274(43): 31.000-7. fXa com serina do sítio ativo

(Ser379 na numeração de fX, como mostrado no ID. DE SEQ. N°: 7, e Ser195 na numeração de quimotripsina) substituída com alanina (fXa-S379A na numeração de fX, ou fXa-S195A na numeração de quimotripsina), em que a atividade pró-coagulante foi eliminada, também podem ser usados como antídotos para o inibidor de fXa. A invenção também prevê derivados de fXa com o resíduo de serina do sítio ativo acilado irreversivelmente que ainda é capaz de se ligar aos inibidores de pequena molécula. fXa com a serina do sítio ativo acilada de forma reversível foi relatado por Wolf, e col., *Blood*, 1995, 86(11): 4.153-7. Essa acilação reversível, no entanto, é capaz de produção tempo-dependente de fXa ativo e pode levar a um excesso de fXa ativo após um período de tempo. A taxa de desacilação pode ser reduzida por estratégias similares àsquelas descritas em Lin P.H. e col., *Thrombosis Res.*, 1997, 88(4), 365-372. Por exemplo, moléculas de fXa com Ser379 (Ser195 na numeração de quimotripsina) aciladas por grupos 4-metoxibenzil e 3-bromo-4-metoxibenzil recuperam menos de 50% de sua atividade original quando incubadas em um tampão que possui pH 7,5 a 37°C por 4 horas.

Uma modalidade é dirigida ao uso de derivados de fXa com mutações nos resíduos de fXa sabidamente importantes para a interação de fXa com co-fator fV/fVa. Esses resíduos incluem, sem limitação, Arg306, Glu310, Arg347, Lys351 ou Lys414 (IDS. DE SEQ. N°s: 3 e 7, esses aminoácidos correspondem à Arg125, Glu129, Arg165, Lys169, Lys230 na numeração de quimotripsina). Exemplos desses mutantes são relatados em Rudolph, A.E. e col., *J. Bio. Chem.*, 2001, 276: 5.123-5.128. Além disso, mutações nos resíduos de fXa

sabidamente importantes para a interação fVIII/fVIIIa, por exemplo, Arg424 nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 3 e 7 (Arg240 na numeração de quimotripsina), também podem ser usadas como antídotos para o inibidor de fXa. Exemplos desses mutantes
5 são descritos em Nogami, K. e col., *J. Biol. Chem.*, 2004, 279(32): 33.104-33.113.

Outra modificação de resíduos do sítio ativo de fXa ou resíduos sabidamente importantes para interações de serina-protease também pode levar a antídotos úteis desta
10 invenção; por exemplo, a substituição de Glu216, Glu218 e Arg332 nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 3 e 7 (Glu37, Glu39 e Arg150 na numeração de quimotripsina, respectivamente) com outros resíduos de aminoácido.

Em uma modalidade, a atividade pró-coagulante residual
15 de um antídoto, avaliada pelo ensaio de clivagem amidolítica de substrato, é de < 1%, preferivelmente < 0,1%, mais preferivelmente < 0,05% da do fXa humano derivado do plasma nativo. Por exemplo, não há atividade pró-coagulante mensurável para fXa recombinante-S379A
20 quando a Ser379 do sítio ativo (S195 na numeração de quimotripsina) é substituída por um resíduo de alanina, medida por ensaios de coagulação.

A invenção ainda está relacionada às seqüências de ácidos nucleicos, em particular seqüências de DNA, que
25 codificam os derivados de fXa descritos acima. Essas podem ser facilmente determinadas por retro-tradução da seqüência de polipeptídeos na seqüência de DNA correspondente de acordo com o código genético. Os códons usados preferivelmente são aqueles que levam à boa expressão no
30 organismo hospedeiro necessário. As seqüências de ácidos

nucléicos podem ser preparadas por mutagênese sítio-específica, partindo da sequência do gene de fXa natural, ou então por síntese completa de DNA.

Polipeptídeos da invenção

5 Em certos aspectos, a invenção está relacionada a um polipeptídeo isolado que compreende a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 12, 13 ou 15. Também estão englobados por esta invenção os polipeptídeos que possuem pelo menos 80% de homologia para o ID. DE SEQ. N°: 12, 13
10 ou 15.

Os polipeptídeos que compreendem as seqüências de aminoácidos da invenção podem ser preparados por expressão de polinucleotídeos que codificam as seqüências de polipeptídeos desta invenção em uma célula hospedeira
15 apropriada. Isso pode ser obtido por métodos de tecnologia de DNA recombinante conhecidos por aqueles habilitados na técnica. Conseqüentemente, esta invenção também fornece métodos para a produção recombinantemente dos polipeptídeos desta invenção em células hospedeiras eucarióticas ou
20 procarióticas. As proteínas e os polipeptídeos desta invenção também podem ser obtidos por síntese química com o uso de um sintetizador automatizado de peptídeos disponível comercialmente como, por exemplo, aqueles fabricados por Perkin Elmer/Applied Biosystems, Inc., Modelo 430A ou 431A,
25 Foster City, CA, EUA. A proteína ou o polipeptídeo sintetizado pode ser precipitado e adicionalmente purificado, por exemplo, por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Conseqüentemente, esta invenção também fornece um processo para sintetizar quimicamente as
30 proteínas desta invenção por fornecimento da seqüência da

proteína e reagentes, por exemplo, aminoácidos e enzimas, e a ligação em conjunto dos aminoácidos na orientação e sequência linear adequadas.

Aqueles habilitados na técnica sabem que podem ser
5 feitas modificações a qualquer peptídeo para que ele adquira propriedades alteradas. Os polipeptídeos da invenção podem ser modificados para incluir aminoácidos não naturais. Dessa forma, os peptídeos podem compreender D-aminoácidos, uma combinação de D- e L-aminoácidos, e vários
10 aminoácidos de "designer" (por exemplo, β -metil aminoácidos, C- α -metil aminoácidos, e N- α -metil aminoácidos etc.) para transmitir propriedades especiais aos peptídeos. Adicionalmente, distribuindo-se aminoácidos específicos em etapas de acoplamento específicas, peptídeos com α -hélices,
15 β turns, lâminas β , α turns e peptídeos cíclicos podem ser gerados. Geralmente, acredita-se que a estrutura secundária α -helicoidal ou a estrutura secundária aleatória seja preferida.

Em uma modalidade adicional, serão escolhidas
20 subunidades de polipeptídeos que conferem propriedades químicas e estruturais úteis. Por exemplo, peptídeos que compreendem D-aminoácidos podem ser resistentes às proteases específicas para L-aminoácidos *in vivo*. Os compostos modificados com D-aminoácidos podem ser
25 sintetizados com os aminoácidos alinhados em ordem reversa para produzir os peptídeos da invenção como peptídeos retro-inversos. Além disso, a presente invenção prevê as preparações de peptídeos que possuem melhores propriedades estruturais definidas, e o uso de peptidomiméticos e
30 ligações de peptidomiméticos, por exemplo, ligações éster,

para preparar peptídeos com novas propriedades. Em outra modalidade, pode ser gerado um peptídeo que incorpora uma ligação peptídica reduzida, ou seja, $R_1-CH_2NH-R_2$, em que R_1 e R_2 são resíduos ou seqüências de aminoácidos. Uma ligação

5 peptídica reduzida pode ser introduzida como uma subunidade dipeptídica. Uma molécula desse tipo seria resistente à hidrólise da ligação peptídica, por exemplo, atividade de protease. Essas moléculas forneceria ligantes com função e atividade únicas, por exemplo, meias-vidas *in vivo*

10 prolongadas em função da resistência à degradação metabólica, ou atividade de protease. Além disso, é sabido que em certos sistemas peptídeos restritos exibem atividade funcional aumentada (Hruby (1982) *Life Sciences* 31: 189-199 e Hruby e col. (1990) *Biochem. J.* 268: 249-262); a presente

15 invenção fornece um método para a produção de um peptídeo restrito que incorpora seqüências aleatórias em todas as outras posições.

Os seguintes aminoácidos não clássicos podem ser incorporados nos peptídeos da invenção a fim de introduzir

20 motivos conformacionais particulares: 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato (Kazmierski e col. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113: 2.275-2.283); (2S,3S)-metil-fenilalanina, (2S,3R)-metil-fenilalanina, (2R,3S)-metil-fenilalanina e (2R,3R)-metil-fenilalanina (Kazmierski e

25 Hruby (1991) *Tetrahedron Lett.* 32(41): 5.769-5.772); ácido 2-aminotetrahidronaftaleno-2-carboxílico (Landis (1989) Ph.D. Thesis, University of Arizona); hidróxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato (Miyake e col. (1989) *J. Takeda Res. Labs.* 43: 53-76); ácido histidina

30 isoquinolina carboxílico (Zechel e col. (1991) *Int. J. Pep.*

Protein Res. 38(2): 131-138); e HIC (histidina uréia cíclica), (Dharanipragada e col. (1993) *Int. J. Pep. Protein Res.* 42(1): 68-77) e (Dharanipragada e col. (1992) *Acta. Crystallogr. C.* 48: 1.239-1.241).

5 Os seguintes análogos de aminoácidos e peptidomiméticos podem ser incorporados em um peptídeo para induzir ou favorecer estruturas secundárias específicas: LL-Acp (ácido LL-3-amino-2-propenidona-6-carboxílico), um análogo dipeptídico indutor de β turn (Kemp e col. (1985)
 10 *J. Org. Chem.* 50: 5.834-5.838); análogos indutores de lâminas β (Kemp e col. (1988) *Tetrahedron Lett.* 29: 5.081-5.082); análogos indutores de β turn (Kemp e col. (1988) *Tetrahedron Lett.* 29: 5.057-5.060); análogos indutores de hélice α (Kemp e col. (1988) *Tetrahedron Lett.* 29: 4.935-
 15 4.938); análogos indutores de α turn (Kemp e col. (1989) *J. Org. Chem.* 54: 109:115); análogos fornecidos pelas seguintes referências: Nagai e Sato (1985) *Tetrahedron Lett.* 26: 647-650; e DiMaio e col. (1989) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* p. 1687; um análogo de turn Gly-Ala (Kahn e
 20 col. (1989) *Tetrahedron Lett.* 30: 2.317); isóstero de ligação amida (Clones e col. (1988) *Tetrahedron Lett.* 29: 3.853-3.856); tetrazol (Zabrocki e col. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110: 5.875-5.880); DTC (Samanen e col. (1990) *Int. J. Protein Pep. Res.* 35: 501-509); e análogos ensinados em
 25 Olson e col. (1990) *J. Am. Chem. Sci.* 112: 323-333 e Garvey e col. (1990) *J. Org. Chem.* 56: 436. Miméticos conformacionalmente restritos de beta turns e beta bulges, e peptídeos que os contêm, são descritos na Patente U.S. Nº 5.440.013, emitida em 8 de agosto de 1995 para Kahn.

30 Aqueles habilitados na técnica sabem que podem ser

feitas modificações em qualquer peptídeo por substituição de um ou mais aminoácidos com um ou mais aminoácidos funcionalmente equivalentes que não alteram a função biológica do peptídeo. Em um aspecto, o aminoácido que é substituído por um aminoácido que possui propriedades intrínsecas similares, incluindo, sem limitação, hidrofobicidade, tamanho ou carga. Os métodos usados para determinar o aminoácido apropriado a ser substituído e para qual aminoácido são conhecidos por aqueles habilitados na técnica. Exemplos não limitantes incluem modelos empíricos de substituição, como descrito por Dahoff e col. (1978) Em: "Atlas of Protein Sequence and Structure Vol. 5" Supl. 2 (ed. M.O. Dayhoff), pp. 345-352. "National Biomedical Research Foundation", Washington DC; matrizes de PAM, incluindo matrizes de Dayhoff (Dahoff e col. (1978), *supra*, ou matrizes de JTT, como descrito por Jones e col. (1992) *Comput. Appl. Biosci.* 8: 275-282 e Gonnet e col. (1992) *Science* 256: 1.443-1.445; o modelo empírico descrito por Adach e Hasegawa (1996) *J. Mol. Evol.* 42: 459-468; as matrizes de substituição em bloco (BLOSUM), como descrito por Henikoff e Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10.915-10.919; modelos de Poisson, como descrito por Nei (1987) "Molecular Evolutionary Genetics". Columbia University Press, Nova York; e o Método de Probabilidade Máxima (ML), como descrito por Muller e col. (2002) *Mol. Biol. Evol.* 19: 8-13.

Conjugados de polipeptídeos

Os polipeptídeos e complexos de polipeptídeos da invenção podem ser usados em diversas formulações, que podem variar, dependendo do uso desejado. Por exemplo, uma

ou mais podem ser ligadas covalentemente ou não covalentemente (em complexo) a várias outras moléculas, cuja natureza pode variar, dependendo da finalidade particular. Por exemplo, um peptídeo da invenção pode
5 formar um complexo covalentemente ou não covalentemente com um veículo macromolecular, incluindo, sem limitação, polímeros naturais e sintéticos, proteínas, polissacarídeos, polipeptídeos (aminoácidos), álcool polivinílico, polivinil pirrolidona e lipídeos. Um peptídeo
10 pode ser conjugado a um ácido graxo, para introdução em um lipossomo; veja a Patente U.S. Nº 5.837.249. Um peptídeo da invenção pode formar um complexo covalentemente ou não covalentemente com um suporte sólido, vários dos quais são conhecidos na técnica e aqui descritos. Um epitopo
15 peptídico antigênico da invenção pode estar associado a uma matriz de apresentação de antígeno como, por exemplo, um complexo de MHC, com ou sem moléculas co-estimuladoras.

Exemplos de veículos de proteína incluem, sem limitação, superantígenos, albumina sérica, toxóide
20 tetânico, ovalbumina, tireoglobulina, mioglobulina e imunoglobulina.

Polímeros de veículo de peptídeo-proteína podem ser formados com o uso de agentes de entrecruzamento convencionais como, por exemplo, carbodiimidas. Exemplos de
25 carbodiimidas são 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil) carbodiimida (CMC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e 1-etil-3-(4-azônia-44-dimetilpentil) carbodiimida.

Exemplos de outros agentes de entrecruzamento
30 adequados são brometo de cianogênio, glutaraldeído e

anidrido succínico. Em geral, qualquer um entre diversos agentes homo-bifuncionais, incluindo um aldeído homo-bifuncional, um epóxido homo-bifuncional, um imido-éster homo-bifuncional, um N-hidroxisuccinimida éster homo-bifuncional, uma maleimida homo-bifuncional, um haleto de alquila homo-bifuncional, um dissulfeto de piridil homo-bifuncional, um haleto de arila homo-bifuncional, uma hidrazida homo-bifuncional, um derivado de diazônio homo-bifuncional e um composto fotorreativo homo-bifuncional, pode ser usado. Também estão incluídos compostos hetero-bifuncionais, por exemplo, compostos que possuem um grupo amina-reativo e um grupo sulfidrila-reativo, compostos com um grupo amina-reativo e um grupo fotorreativo e compostos com um grupo carbonil-reativo e um grupo sulfidrila-reativo.

Exemplos específicos desses agentes de entrecruzamento homo-bifuncionais incluem os ésteres bifuncionais de N-hidroxisuccinimida ditio bis(succinimidilpropionato), suberato de dissuccinimidil e tartarato de dissuccinimidil; os imido-ésteres bifuncionais adipimidato de dimetila, pimelimidato de dimetila e suberimidato de dimetila; os vinculadores cruzados bifuncionais sulfidrila-reativos 1,4-di-[3'-(2'-piridilditio) propionamido]butano, bismaleimido hexano e bis-N-maleimido-1,8-octano; os haletos de arila bifuncionais 1,5-difluór-2,4-dinitrobenzeno e 4,4'-difluór-3,3'-dinitrofenilsulfona; agentes fotorreativos bifuncionais como, por exemplo, bis-[b-(4-azidosalicilamido)etil]dissulfeto; os aldeídos bifuncionais formaldeído, malondialdeído, succinaldeído, glutaraldeído e adipaldeído; um epóxido bifuncional como, por exemplo, 1,4-

butanodiol diglicidil éter; as hidrazidas bifuncionais diidrazida de ácido adípico, carboidrazida e diidrazida de ácido succínico; os diazônios bifuncionais o-tolidina, benzidina diazotizada e bis-diazotizada; os haletos de alquila bifuncionais N1N'-etileno-bis(iodoacetamida), N1N'-hexametileno-bis(iodoacetamida), N1N'-undecametileno-bis(iodoacetamida), bem como haletos de benzila e halo-mostardas, como ácido 1a'-diiodo-p-xileno sulfônico e tri(2-cloroetil)amina, respectivamente.

Exemplos de agentes de entrecruzamento hetero-bifuncionais comuns que podem ser usados para efetuar a conjugação de proteínas aos peptídeos incluem, sem limitação, SMCC (succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato), MBS (m-maleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida éster), SIAB (N-succinimidil(4-iodoacetil)aminobenzoato), SMPB (succinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato), GMBS (N-(γ-maleimidobutiriloxi)succinimida éster), MPBH (hidrazida de ácido 4-(4-N-maleimidofenil)butírico), M2C2H (4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxil-hidrazida), SMPT (succinimidiloxicarbonil-α-metil-α-(2-piridilditio)tolueno) e SPDP (N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato).

O entrecruzamento pode ser obtido por acoplamento de um grupo carbonil a um grupo amina ou a um grupo hidrazida por aminação redutiva.

Os peptídeos da invenção também podem ser formulados como adesão não covalente de monômeros por meio de interações iônicas, adsorptivas ou bioespecíficas. Complexos de peptídeos com moléculas altamente carregadas positivamente ou negativamente podem ser feitos por meio da

formação de uma ponte de sal sob ambientes de potência iônica baixa, por exemplo, em água deionizada. Grandes complexos podem ser criados com o uso de polímeros carregados como, por exemplo, poli-(ácido L-glutâmico) ou poli-(L-lisina), que contêm numerosas cargas negativas e positivas, respectivamente. A adsorção de peptídeos pode ser feita às superfícies como, por exemplo, glóbulos de micropartículas de látex ou a outros polímeros hidrofóbicos, que formam complexos de peptídeo-superantígeno associados não covalentemente eficazmente que mimetizam proteína entrecruzada ou polimerizada quimicamente. Finalmente, os peptídeos podem ser ligados não covalentemente por meio do uso de interações bioespecíficas entre outras moléculas. Por exemplo, a utilização da forte afinidade de biotina por proteínas como, por exemplo, avidina ou estreptavidina ou seus derivados, poderia ser usada para formar complexos de peptídeos. Essas proteínas de ligação de biotina contêm quatro sítios de ligação que podem interagir com biotina em solução ou serem ligadas covalentemente a outra molécula (veja Wilchek (1988) *Anal. Biochem.* 171: 1- 32). Os peptídeos podem ser modificados para que possuam grupos biotina com o uso de reagentes de biotinilação comuns como, por exemplo, o éster de N-hidroxissuccinimidil de D-biotina (NHS-biotina) que reage com grupos amina disponíveis na proteína. Os peptídeos biotinilados podem então ser incubados com avidina ou estreptavidina para criar complexos grandes. A massa molecular desses polímeros pode ser regulada por meio do controle cuidadoso da proporção molar de peptídeo biotinilado para avidina ou

estreptavidina.

Também são fornecidos por este pedido peptídeos e polipeptídeos aqui descritos conjugados a um marcador, por exemplo, um marcador fluorescente ou bioluminescente, para uso nos métodos diagnósticos. Por exemplo, peptídeos e polipeptídeos marcados de forma detectável podem ser ligados a uma coluna e usados para a detecção e purificação de anticorpos. Marcadores fluorescentes adequados incluem, sem limitação, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarinas, pireno, verde Malacita, estilbeno, Amarelo Lucifer, Cascade BlueTM e Vermelho Texas. Outros corantes ópticos adequados são descritos em Haugland, Richard P. (1996) "Molecular Probes Handbook".

Os polipeptídeos desta invenção também podem ser combinados com vários veículos de fase líquida como, por exemplo, soluções estéreis ou aquosas, veículos farmacologicamente aceitáveis, suspensões e emulsões. Exemplos de solventes não aquosos incluem propil etileno glicol, polietileno glicol e óleos vegetais. Quando usados para a preparação de anticorpos, os veículos também podem incluir um adjuvante que seja útil para aumentar de forma inespecífica uma resposta imunológica específica. Aqueles habilitados na técnica poderão facilmente determinar se um adjuvante é necessário e selecionar um. No entanto, apenas para fins ilustrativos, adjuvantes adequados incluem, sem limitação, adjuvante completo de Freund, adjuvante incompleto de Freund e sais minerais.

Células hospedeiras

Também são fornecidas células hospedeiras que

compreendem um ou mais dos polipeptídeos desta invenção. Em um aspecto, os polipeptídeos são expressos e presentes na superfície celular (de forma extracelular). Células adequadas que contêm os polipeptídeos da invenção incluem

5 células procarióticas e eucarióticas, que incluem, sem limitação, células bacterianas, células de levedura, células de inseto, células animais, células de mamíferos, células muríneas, células de rato, células de carneiro, células de símios e células humanas. Exemplos de células

10 bacterianas incluem *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Streptococcus gordonii*. As células podem ser adquiridas de um vendedor comercial como, por exemplo, a "American Type Culture Collection" (ATCC, Rockville Mariland, EUA), ou cultivadas a partir de um isolado usando métodos conhecidos

15 na técnica. Exemplos de células eucarióticas adequadas incluem, sem limitação, células 293T HEK, bem como a linhagem de células de hamster CHO, BHK-21; as linhagens de célula muríneas designadas NIH3T3, NSO, C 127, as linhagens de células de símios COS, Vero; e as linhagens de células

20 humanas HeLa, PER.C6 (disponível comercialmente por Crucell) U-937 e Hep G2.

Um exemplo não limitante de células de inseto inclui *Spodoptera frugiperda*. Exemplos de leveduras úteis para expressão incluem, sem limitação, *Saccharomyces*,

25 *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Torulopsis*, *Yarrowia* ou *Pichia*. Veja, por exemplo, as Patentes U.S. N^{os}: 4.812.405, 4.818.700, 4.929.555, 5.736.383, 5.955.349, 5.888.768 e 6.258.559.

Além da especificidade de espécie, as células podem

30 ser de qualquer tipo de tecido em particular como, por

exemplo, neuronais ou, alternativamente, uma célula-tronco somática ou embrionária como, por exemplo, uma célula-tronco que pode ou não se diferenciar em uma célula neuronal, por exemplo, uma célula-tronco embrionária, uma
5 célula-tronco adiposa, uma célula-tronco neuronal e uma célula-tronco hematopoiética. A célula-tronco pode ser de origem humana ou animal, por exemplo, de mamífero.

Polinucleotídeos isolados e composições

Esta invenção também fornece os polinucleotídeos
10 complementares às seqüências identificadas acima ou seus complementos. A complementaridade pode ser determinada com o uso de hibridização tradicional sob condições de estringência moderada ou alta. Como aqui usado, o termo "polinucleotídeo" significa DNA e RNA, além de nucleotídeos
15 modificados. Por exemplo, esta invenção também fornece a fita de polinucleotídeo anti-senso, por exemplo, RNA anti-senso, a essas seqüências ou seus complementos.

Também são fornecidos polinucleotídeos que codificam polipeptídeos substancialmente homólogos e biologicamente
20 equivalentes aos polipeptídeos da invenção e complexos de polipeptídeos. Substancialmente homólogos e biologicamente equivalentes significa aqueles que possuem graus variáveis de homologia como, por exemplo, pelo menos 65% ou, alternativamente, pelo menos 70% ou, alternativamente, pelo
25 menos 75% ou, alternativamente, pelo menos 80% ou, alternativamente, pelo menos 85% ou, alternativamente, pelo menos 90% ou, alternativamente, pelo menos 95% ou, alternativamente, pelo menos 97% homólogos, como definido acima, e que codificam os polipeptídeos que possuem a
30 atividade biológica para se ligar aos inibidores do fator

Xa e não se agregam ao complexo de protrombinase, como aqui descrito. No entanto, deve-se entender que nem sempre será definido explicitamente que modalidades aos polipeptídeos e polinucleotídeos substancialmente homólogos estão englobadas em cada aspecto desta invenção, por exemplo, polipeptídeos, polinucleotídeos e anticorpos.

Os polinucleotídeos desta invenção podem ser replicados com o uso de técnicas recombinantes convencionais. Alternativamente, os polinucleotídeos podem ser replicados usando a tecnologia de PCR. A PCR é o tema individual das Patentes U.S. Nºs: 4.683.195, 4.800.159, 4.754.065 e 4.683.202, e é descrita em "PCR: The Polymerase Chain Reaction" (Mullis e col. eds, Birkhauser Press, Boston (1994)) e referências nele citadas. Além disso, aqueles habilitados na técnica poderão usar as seqüências aqui fornecidas e um sintetizador de DNA comercial para replicar o DNA. Conseqüentemente, esta invenção também fornece um processo para a obtenção dos polinucleotídeos desta invenção por fornecimento da seqüência linear do polinucleotídeo, moléculas de iniciador apropriadas, substâncias químicas, tais como enzimas e instruções para sua replicação, e replicar ou ligar quimicamente os nucleotídeos na orientação adequada para obter os polinucleotídeos. Em uma modalidade separada, esses polinucleotídeos são ainda isolados. Além disso, aqueles habilitados na técnica poderão ligar operacionalmente os polinucleotídeos às seqüências reguladoras para sua expressão em uma célula hospedeira. Os polinucleotídeos e as seqüências reguladoras são inseridos na célula hospedeira (procariótica ou eucariótica) para replicação e

amplificação. O DNA assim amplificado pode ser isolado da célula por métodos bem conhecidos por aqueles habilitados na técnica. Um processo para a obtenção dos polinucleotídeos por esse método será aqui fornecido
5 posteriormente, bem como os polinucleotídeos assim obtidos.

O RNA pode ser obtido inserindo-se primeiro um polinucleotídeo de DNA em uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica adequada. O DNA pode ser inserido por qualquer método apropriado, por exemplo, pelo
10 uso de um veículo de liberação gênica apropriado (por exemplo, lipossomo, plasmídeo ou vetor) ou por eletroporação. Quando a célula se replica e o DNA é transcrito em RNA, o RNA pode então ser isolado com o uso de métodos bem conhecidos por aqueles habilitados na
15 técnica, por exemplo, como apresentado em Sambrook e Russell (2001) *supra*. Por exemplo, o mRNA pode ser isolado com o uso de várias enzimas líticas ou soluções químicas de acordo com os procedimentos apresentados em Sambrook e Russell (2001) *supra*, ou extraído por resinas de ligação de
20 ácido nucléico seguindo as instruções fornecidas pelos fabricantes.

Em um aspecto, o RNA é RNA interferente curto, também conhecido como siRNA. Métodos para preparar e avaliar RNA interferente e selecionar quanto à habilidade para bloquear
25 a expressão de polinucleotídeo são conhecidos na técnica e exemplos não limitantes dos quais serão mostrados abaixo. Esses RNAs interferentes são fornecidos por esta invenção.

Podem ser projetadas seqüências de siRNA por obtenção da seqüência de mRNA-alvo e determinação de uma seqüência
30 de siRNA complementar apropriada. Os siRNAs da invenção são

projetados para interagir com uma sequência-alvo, o que significa que eles complementam uma sequência-alvo suficientemente para hibridizar para aquela sequência. Um siRNA pode ser 100% idêntico à sequência-alvo. No entanto, a homologia da sequência de siRNA para a sequência-alvo pode ser menor do que 100%, desde que o siRNA possa hibridizar para a sequência-alvo. Dessa forma, por exemplo, a molécula de siRNA pode ser pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica à sequência-alvo ou ao complemento da sequência-alvo. Portanto, moléculas de siRNA com inserções, eliminações ou mutações pontuais únicas em relação a um alvo também podem ser usadas. A geração de várias sequências de siRNA diferentes por mRNA-alvo é recomendada para permitir a avaliação quanto à sequência-alvo ótima. Uma pesquisa de homologia, por exemplo, uma pesquisa BLAST, deve ser realizada para assegurar que a sequência de siRNA não contém homologia para qualquer gene de mamífero conhecido.

Em geral, é preferível que a sequência-alvo esteja localizada pelo menos 100-200 nucleotídeos do códon de iniciação AUG e pelo menos 50-100 nucleotídeos afastada do códon de terminação do mRNA-alvo (Duxbury (2004) *J. Surgical Res.* 117: 339-344).

Os pesquisadores determinaram que certas características são comuns em moléculas de siRNA que silenciam eficazmente seu gene-alvo (Duxbury (2004) *J. Surgical Res.* 117: 339-344; Ui-Tei e col. (2004) *Nucl. Acids Res.* 32: 936-48). Como uma diretriz geral, siRNAs que incluem uma ou mais das seguintes condições são particularmente úteis no silenciamento gênico em células de

mamíferos: proporção GC entre 45-55%, sem execuções de mais de 9 resíduos G/C, G/C na extremidade 5' da fita senso; A/U na extremidade 5' da fita anti-senso; e pelo menos 5 resíduos A/U nas primeiras 7 bases do terminal 5' da fita anti-senso.

siRNA possuem, em geral, de cerca de 10 a cerca de 30 nucleotídeos de comprimento. Por exemplo, o siRNA pode ter um comprimento de 10-30 nucleotídeos, de 12-28 nucleotídeos, de 15-25 nucleotídeos, de 19-23 nucleotídeos ou de 21-23 nucleotídeos. Quando um siRNA contém duas fitas de comprimentos diferentes, a mais longa fitas designa o comprimento do siRNA. Nesse caso, os nucleotídeos não pareados da fita mais longa formariam uma protuberância (*overhang*).

O termo siRNA inclui RNAs *hairpin* curtos (shRNAs). shRNAs compreendem uma única fita de RNA que forma uma estrutura em *stem-loop*, em que o *stem* consiste nas fitas senso e anti-senso complementares que compreendem um siRNA de fita dupla, e a *loop* é um vinculador de tamanho variável. A estrutura *stem* de shRNAs geralmente possui comprimento de cerca de 10 a cerca de 30 nucleotídeos. Por exemplo, a *stem* pode ter comprimento de 10-30 nucleotídeos, de 12-28 nucleotídeos, de 15-25 nucleotídeos, de 19-23 nucleotídeos ou de 21-23 nucleotídeos.

Ferramentas que auxiliam no design de siRNA são facilmente disponíveis ao público. Por exemplo, uma ferramenta computacional de design de siRNA está disponível na Internet em www.dharmacon.com, acessado pela última vez em 26 de novembro de 2007.

Síntese de dsRNA e siRNA

dsRNA e siRNA podem ser sintetizados química ou enzimaticamente *in vitro*, como descrito em Micura (2002) *Agnes Chem. Int. Ed. Emgl.* 41: 2.265-2.269; Betz (2003) *Promega Notes* 85: 15-18; e Paddison e Hannon (2002) *Cancer* 5 *Cell.* 2: 17-23.

A síntese química pode ser realizada através de métodos manuais ou automatizados, ambos bem conhecidos na técnica, como descrito em Micura (2002), *supra*. O siRNA também pode ser expresso endogenamente dentro das células na forma de shRNAs, como descrito em Yu e col. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 6.047-6.052; e McManus e col. (2002) *RNA* 8: 842-850. A expressão endógena foi obtida usando sistemas de expressão baseados em plasmídeo usando pequenos promotores de RNA nuclear, por exemplo, RNA 15 polimerase III U6 ou H1, ou RNA polimerase II U1, como descrito em Brummelkamp e col. (2002) *Science* 296: 550-553 (2002); e Novarino e col. (2004) *J. Neurosci.* 24: 5.322-5.330.

A síntese enzimática de dsRNA e siRNA *in vitro* pode 20 ser realizada usando um processo mediado por RNA polimerase para produzir fitas senso e anti-senso individuais que são aneladas *in vitro* antes da liberação nas células de escolha, como descrito em Fire e col. (1998) *Nature* 391: 806-811; Donze e Picard (2002) *Nucl. Acids Res.* 30(10): 25 e46; Yu e col. (2002); e Shim e col. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 30.413-30.416. Vários manufacturers (Promega, Ambion, New England Biolabs e Stragene) produzem kits de transcrição úteis na realização da síntese *in vitro*.

A síntese de siRNA *in vitro* pode ser obtida, por 30 exemplo, com o uso de um par de oligonucleotídeos duplex,

curtos, que contêm promotores de RNA polimerase T7 acima das seqüências de RNA senso e anti-senso como o modelo de DNA. Cada oligonucleotídeo do duplex é um modelo separado para a síntese de uma fita do siRNA. As fitas de RNA curtas
5 separadas que são sintetizadas são então aneladas para formar siRNA, como descrito em "Protocols and Applications, Chapter 2: RNA interference", Promega Corporation, (2005).

A síntese de dsRNA *in vitro* pode ser obtida, por exemplo, pela utilização de um promotor de RNA polimerase
10 T7 nas extremidades 5' de ambas as fitas da seqüência de DNA-alvo. Isso é obtido pela utilização de modelos de DNA separados, cada um contendo a seqüência-alvo em uma orientação diferente em relação ao promotor T7, transcritas em duas reações separadas. Os transcritos resultantes são
15 misturados e anelados pós-transcrição. Os modelos de DNA usados nessa reação podem ser criados por PCR ou pela utilização de dois modelos de plasmídeo linearizados, cada um contendo o promotor de polimerase T7 em uma extremidade diferente da seqüência-alvo ("Protocols and Applications,
20 Chapter 2: RNA interference", Promega Corporation, (2005)).

A fim de expressar as proteínas aqui descritas, a liberação de seqüências de ácidos nucleicos que codificam o gene de interesse pode ser feita por várias técnicas. Exemplos dessas técnicas incluem tecnologias virais (por
25 exemplo, vetores retrovirais, vetores de adenovírus, vetores de vírus adeno-associado, vetores de alfavírus e semelhantes) e tecnologias não virais (por exemplo, complexos de DNA/lípssomo, micelas e complexos direcionados de proteína viral-DNA), como aqui descrito).
30 Uma vez dentro da célula de interesse, a expressão do

transgene pode ocorrer sob o controle de promotores ubíquos (por exemplo, EF-1 α) ou promotores tecido-específicos (por exemplo, promotor de quinase de calmodulina de cálcio 2 (CaMKI), promotor de NSE e promotor de Thy-1 humano).

5 Alternativamente, os níveis de expressão podem ser controlados pelo uso de um sistema de promotor indutível (por exemplo, promotor Tet on/off), como descrito em Wiznerowicz e col. (2005) *Stem Cells* 77: 8.957-8.961.

Exemplos não limitantes de promotores incluem, sem
 10 limitação, o promotor de citomegalovírus (CMV) (Kaplit e col. (1994) *Nat. Genet.* 8: 148-154), o promotor de β 3-globina CMV/humana (Mandel e col. (1998) *J. Neurosci.* 18: 4.271-4.284), o promotor de NCX1, promotor de α MHC, o promotor de MLC2v, o promotor de GFAP (Xu e col. (2001)
 15 *Gene Ther.*, 8: 1.323-1.332), o promotor de enolase neurônio-específica de 1,8 kb (NSE) (Klein e col. (1998) *Exp. Neurol.* 150: 183-194), o promotor de beta-actina de galinha (CBA) (Miyazaki (1989) *Gene* 79: 269-277) e o promotor de β -glucuronidase (GUSB) (Shipley e col. (1991)
 20 *Genetics* 10: 1.009-1.018), o promotor de albumina sérica humana, o promotor de alfa-1-antitripsina. Para aumentar a expressão, outros elementos reguladores podem adicionalmente ser ligados operacionalmente ao transgene como, por exemplo, o Elemento Pós-Regulador DO Vírus da
 25 Hepatite Woodchuck (WPRE) (Donello e col. (1998) *J. Virol.* 72: 5.085-5.092) ou o sítio de poliadenilação do hormônio do crescimento bovino (BGH).

Também é aqui fornecido uma sonda ou iniciador de polinucleotídeo que compreende pelo menos 10, ou,
 30 alternativamente, pelo menos 17 ou, alternativamente, pelo

menos 20, ou, alternativamente, pelo menos 50, ou, alternativamente, pelo menos 75 polinucleotídeos, ou, alternativamente, pelo menos 100 polinucleotídeos que codificam IDS. DE SEQ. N^{os}: 12 a 15 ou seus complementos.

5 Sondas e iniciadores adequados são descritos *supra*. Sabe-se na técnica que uma sonda "perfeitamente combinada" não é necessária para uma hibridização específica. Pequenas alterações na sequência da sonda obtidas por substituição, eliminação ou inserção de um pequeno número de bases não
10 afetam a especificidade da hibridização. Em geral, até 20% de não combinação de pareamento de bases (quando otimamente alinhadas) podem ser tolerados. Uma sonda útil para detecção do mRNA mencionado anteriormente é pelo menos cerca de 80% idêntica à região homóloga de tamanho
15 comparável contida nas sequências previamente identificadas (identificadas acima), que correspondem aos polinucleotídeos desta invenção caracterizados previamente. Alternativamente, a sonda é 85% idêntica à sequência gênica correspondente após alinhamento da região homóloga; e, além
20 disso, ela exibe 90% de identidade, ou ainda mais, é pelo menos 95% idêntica.

Essas sondas podem ser usadas em radioensaios (por exemplo, análise *Southern* e *Northern blot*) para detectar ou monitorar a expressão dos polinucleotídeos ou polipeptídeos
25 desta invenção. As sondas também podem ser anexadas a um suporte sólido ou um arranjo como, por exemplo, um chip, para uso em ensaios de triagem de alto rendimento para a detecção da expressão do gene que corresponde a um ou mais polinucleotídeos desta invenção.

30 Os polinucleotídeos e fragmentos dos polinucleotídeos

da presente invenção também podem servir como iniciadores para a detecção de genes ou transcritos gênicos que são expressos em células neuronais, por exemplo, para confirmar a transdução dos polinucleotídeos em células hospedeiras.

5 Nesse contexto, amplificação significa qualquer método que emprega uma polimerase iniciador-dependente capaz de replicar uma sequência-alvo com fidelidade razoável. A amplificação pode ser realizada por DNA-polimerases naturais ou recombinantes como, por exemplo, DNA polimerase
10 T7, fragmento de Klenow de DNA polimerase de *E. coli*, e transcriptase reversa. O comprimento do iniciador é o mesmo que aquele identificado para as sondas, acima.

A invenção ainda fornece os polinucleotídeos isolados desta invenção ligados operacionalmente a um promotor de
15 transcrição de RNA, além de outras sequências reguladoras para replicação e/ou expressão transitória ou estável do DNA ou RNA. Como aqui usado, o termo "ligado operacionalmente" significa posicionado de tal forma que o promotor irá dirigir a transcrição de RNA para fora da
20 molécula de DNA. Exemplos desses promotores são SP6, T4 e T7. Em certas modalidades, são usados promotores célula-específicos para a expressão célula-específica do polinucleotídeo inserido. Vetores que contêm um promotor ou um promotor/intensificador, com códons de terminação e
25 sequências de marcador selecionável, além de um sítio de clonagem no qual um pedaço de DNA inserido possa ser ligado operacionalmente àquele promotor, são bem conhecidos na técnica e disponíveis comercialmente. Para metodologia geral e estratégias de clonagem, veja "Gene Expression
30 Technology" (Goeddel ed., Academic Press, Inc. (1991)) e

referências nele citadas e "Vectors: Essential Data Series" (Gacesa e Ramji, eds., John Wiley & Sons, N.Y. (1994)), que contém mapas, propriedades funcionais, fornecedores comerciais e uma referência aos números de acesso no
5 GenEMBL para vários vetores adequados. De preferência, esses vetores são capazes de transcrever RNA *in vitro* ou *in vivo*.

Vetores de expressão que contêm esses ácidos nucléicos são úteis para se obter sistemas de hospedeiro de vetor
10 para a produção de proteínas e polipeptídeos. Contempla-se que esses vetores de expressão devem ser replicáveis nos organismos hospedeiros, tanto como episômos quanto como uma parte integral do DNA cromossômico. Vetores de expressão adequados incluem plasmídeos, vetores virais,
15 incluindo adenovírus, vírus adeno-associados, retrovírus, cosmídeos etc. Vetores adenovirais são particularmente úteis para a introdução de genes em tecidos *in vivo*, por causa de seus níveis elevados de expressão e transformação eficiente de células tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Quando
20 um ácido nucléico é inserido em uma célula hospedeira adequada, por exemplo, uma célula procariótica ou uma célula eucariótica, e a célula hospedeira se replica, a proteína pode ser produzida recombinantemente. Células hospedeiras adequadas dependerão do vetor, e podem incluir
25 células de mamíferos, células animais, células humanas, células de símios, células de inseto, células de levedura e células bacterianas, como descrito acima, e construídas com o uso de métodos bem conhecidos. Veja Sambrook e Russell (2001), *supra*. Além do uso de vetor viral para inserção de
30 ácido nucléico exógeno em células, o ácido nucléico pode

ser inserido na célula hospedeira por métodos bem conhecidos na técnica como, por exemplo, transformação para células bacterianas; transfecção com o uso de precipitação de fosfato de cálcio para células de mamíferos; DEAE-dextrana; eletroporação; ou microinjeção. Veja Sambrook e Russell (2001), *supra* para essa metodologia.

A presente invenção também fornece veículos de liberação adequados à liberação de um polinucleotídeo da invenção em células (seja *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro*). Um polinucleotídeo da invenção pode estar contido dentro de um veículo de liberação gênica, um vetor de clonagem ou um vetor de expressão. Esses vetores (especialmente vetores de expressão) podem, por sua vez, ser manipulados para assumir qualquer uma dentre várias formas que possam, por exemplo, facilitar a liberação e/ou entrada em uma célula.

As células hospedeiras isoladas contendo os polinucleotídeos desta invenção são úteis para a replicação recombinante dos polinucleotídeos e para a produção recombinante de peptídeos e para triagem com alto rendimento.

Os polinucleotídeos desta invenção podem ser conjugados a um marcador detectável ou combinados com um veículo como, por exemplo, um suporte sólido ou veículo farmacologicamente aceitável. Suportes sólidos adequados são descritos acima, bem como o foram marcadores adequados. Métodos para a adesão de um marcador a um polinucleotídeo são conhecidos por aqueles habilitados na técnica. Veja Sambrook e Russell (2001), *supra*.

Composições de anticorpos terapêuticos

Esta invenção também fornece um anticorpo capaz de

formar especificamente um complexo com uma proteína ou polipeptídeo desta invenção, que são úteis nos métodos terapêuticos desta invenção. O termo "anticorpo" inclui anticorpos policlonais e anticorpos monoclonais, fragmentos de anticorpo, bem como derivados destes (descritos acima). Os anticorpos incluem, sem limitação, anticorpos de camundongo, de rato e de coelho, ou humanos. Os anticorpos podem ser produzidos em cultura de células, em fago ou em vários animais, incluindo, sem limitação, vacas, coelhos, cabras, camundongos, ratos, hamsters, porquinhos-da-índia, carneiros, cães, gatos, macacos, chimpanzés, símios etc. Os anticorpos também são úteis para identificar e purificar polipeptídeos terapêuticos.

Esta invenção também fornece um complexo anticorpo-peptídeo que compreende anticorpos descritos acima e um polipeptídeo que se liga especificamente ao anticorpo. Em um aspecto, o polipeptídeo é o polipeptídeo contra o qual o anticorpo foi desenvolvido. Em um aspecto, o complexo anticorpo-peptídeo é um complexo isolado. Em um aspecto adicional, o anticorpo do complexo é, sem limitação, um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado ou um derivado de anticorpo aqui descrito. Um ou ambos do anticorpo ou do peptídeo do complexo anticorpo-peptídeo podem estar marcados de forma detectável. Em um aspecto, o complexo anticorpo-peptídeo da invenção pode ser usado como um controle ou amostra de referência em ensaios diagnósticos ou de triagem.

Os anticorpos policlonais da invenção podem ser gerados com o uso de metodologias convencionais conhecidas na técnica e que são bem descritas na literatura. Existem

várias metodologias para a produção de anticorpos policlonais. Por exemplo, anticorpos policlonais são tipicamente produzidos por imunização de um mamífero adequado como, por exemplo, sem limitação, galinhas, cabras, porquinhos-da-índia, hamsters, cavalos, camundongos, ratos e coelhos. Um antígeno é injetado no mamífero, o que induz os linfócitos B a produzirem imunoglobulinas IgG específicas para o antígeno. Essa IgG é purificada do soro dos mamíferos. Variações dessa metodologia incluem a modificação de adjuvantes, vias e locais de administração, volumes de injeção por local e o número de locais por animal para a produção ótima e tratamento humanitário do animal. Por exemplo, adjuvantes tipicamente são usados para aumentar ou intensificar uma resposta imunológica aos antígenos. A maioria dos adjuvantes permite um depósito de antígeno no local de injeção, o que permite uma liberação lenta de antígeno nos linfonodos de drenagem. Outros adjuvantes incluem tensoativos que promovem a concentração de moléculas de proteína do antígeno sobre uma grande área de superfície e moléculas imunoestimuladoras. Exemplos não limitantes de adjuvantes para a geração de anticorpo policlonal incluem adjuvantes de Freund, sistema adjuvante Ribi e Titermax. Os anticorpos policlonais podem ser gerados com o uso de métodos descritos nas Patentes U.S. N^{os}: 7.279.559, 7.119.179, 7.060.800, 6.709.659, 6.656.746, 6.322.788, 5.686.073 e 5.670.153.

Os anticorpos monoclonais da invenção podem ser gerados com o uso de metodologias convencionais de hibridoma conhecidas na técnica e bem descritas na

literatura. Por exemplo, um hibridoma é produzido por fusão de uma linhagem de célula imortal adequada (por exemplo, uma linhagem de células de mieloma como, sem limitação, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, >243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U397, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A, CHO, PerC.6, YB2/O) ou semelhantes, ou heteromielomas, produtos de fusão destas, ou qualquer célula ou célula de fusão derivada destas, ou qualquer outra linhagem de células adequadas, como conhecido na técnica (veja, por exemplo, www.atcc.org, www.lifetech.com., acessado pela última vez em 26 de novembro de 2007, e semelhantes), com células produtoras de anticorpo, como, sem limitação, células esplênicas isoladas ou clonadas, do sangue periférico, de linfonodos, da amígdala ou outras células imunes ou B que contêm, ou quaisquer outras células que expressam seqüências constantes ou variáveis ou *framework* ou de CDR da cadeia pesada ou leve, como ácido nucléico endógeno ou heterólogo, como células recombinantes ou endógenas, virais, bacterianas, de algas, procarióticas, de anfíbios, de inseto, de reptéis, de peixe, de mamíferos, de roedores, de eqüinos, de ovinos, de cabra, de carneiro, de primatas, eucarióticas, DNA genômico, cDNA, rDNA, DNA ou RNA mitocondrial, DNA ou RNA de cloroplasto, hnRNA, mRNA, tRNA, de fita simples, dupla ou tripla, hibridizadas, e semelhantes, ou qualquer combinação destas. As células produtoras de anticorpo também podem ser obtidas do sangue periférico ou, preferivelmente, do baço ou linfonodos, de seres humanos ou de outros animais adequados que foram

imunizados com o antígeno de interesse. Qualquer outra célula hospedeira adequada também pode ser usada para a expressão de ácido nucléico heterólogo ou endógeno que codifica um anticorpo, fragmento especificado ou variante
5 deste, da presente invenção. As células fundidas (hibridomas) ou células recombinantes podem ser isoladas com o uso de condições de cultura seletivas ou de outros métodos conhecidos adequados, e clonadas por diluição limitante ou separação de células, ou por outros métodos
10 conhecidos.

Em uma modalidade, os anticorpos aqui descritos podem ser gerados usando um sistema de Múltiplo Peptídeo Antigênico (MAP). O sistema MAP utiliza um núcleo de peptidil de três ou sete resíduos de lisina ramificados
15 radialmente, sobre o qual os peptídeos antigênicos de interesse podem ser construídos usando química de fase sólida padronizada. O núcleo de lisina gera o MAP que abriga cerca de 4 a 8 cópias do epitopo peptídico, dependendo do núcleo interno que geralmente é responsável
20 por menos de 10% do peso molecular total. O sistema MAP não necessita de uma proteína transportadora para a conjugação. Foi demonstrado que a proporção molar elevada e a compactação densa de múltiplas cópias do epitopo antigênico em um MAP produzem uma forte resposta imunogênica. Esse
25 método é descrito na Patente U.S. N° 5.229.490 e é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

Outros métodos adequados de produção ou isolamento de anticorpos da especificidade necessária podem ser usados, incluindo, sem limitação, métodos que selecionam anticorpo
30 recombinante de uma biblioteca de peptídeos ou proteínas

(por exemplo, sem limitação, uma biblioteca de apresentação em bacteriófago, ribossomo, oligonucleotídeo, RNA, cDNA, ou semelhantes; por exemplo, como disponível por vários vendedores comerciais como, por exemplo, Cambridge Antibody Technologies (Cambridgeshire, UK), MorphoSys (Martinsreid/Planegg, Del.), Biovation (Aberdeen, Escócia, UK) Biolnvent (Lund, Suécia), com o uso de métodos conhecidos na técnica. Veja as Patentes U.S. N^{os}: 4.704.692, 5.723.323, 5.763.192, 5.814.476, 5.817.483, 5.824.514, 5.976.862. Métodos alternativos se baseiam na imunização de animais transgênicos (por exemplo, camundongos SCID, Nguyen e col. (1977) *Microbiol. Immunol.* 41: 901-907 (1997); Sandhu e col. (1996) *Crit. Rev. Biotechnol.* 16: 95-118; Eren e col. (1998) *Immunol.* 93: 154-161 que são capazes de produzir um repertório de anticorpos humanos, como conhecido na técnica e/ou como aqui descrito. Tais técnicas, incluem, sem limitação, apresentação em ribossomo (Hanes e col. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 4.937-4.942; Hanes e col. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 14.130-14.135); tecnologias de produção de anticorpo de célula única (por exemplo, método de anticorpo por linfócitos selecionados ("SLAM") (Patente U.S. N° 5.627.052, Wen e col. (1987) *J. Immunol.* 17: 887-892; Babcook e col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1996) 93: 7.843-7.848); microgotícula de gel e citometria de fluxo (Powell e col. (1990) *Biotechnol.* 8: 333-337; One Cell Systems, (Cambridge, Mass.); Gray e col. (1995) *J. Imm. Meth.* 182: 155-163; e Kenny e col. (1995) *Bio. Technol.* 13: 787-790); seleção de célula B (Steenbakkers e col. (1994) *Molec. Biol. Reports* 19: 125-134.

Os derivados de anticorpo da presente invenção também podem ser preparados por liberação de um polinucleotídeo que codifica um anticorpo desta invenção a um hospedeiro adequado, por exemplo, animais transgênicos ou mamíferos, por exemplo, cabras, vacas, cavalos, carneiros, e semelhantes, que produzem esses anticorpos em seu leite. Esses métodos são conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. N^{os}: 5.827.690, 5.849.992, 4.873.316, 5.849.992, 5.994.616, 5.565.362 e 5.304.489.

O termo "derivado de anticorpo" inclui a modificação pós-tradução à sequência linear de polipeptídeos do anticorpo ou fragmento. Por exemplo, a Patente U.S. N^o 6.602.684 B1 descreve um método para a geração de glicol-formas modificadas de anticorpos, incluindo moléculas inteiras de anticorpos, fragmentos de anticorpo, ou proteínas de fusão que incluem uma região equivalente à região Fc de uma imunoglobulina, que possui toxicidade celular mediada por Fc aumentada, e glicoproteínas assim geradas.

Os derivados de anticorpo também podem ser preparados por liberação de um polinucleotídeo desta invenção para fornecer plantas transgênicas e células de planta cultivadas (por exemplo, sem limitação, de tabaco, milho e lemnácea) que produzem esses anticorpos, porções especificadas ou variantes nas partes da planta ou em células cultivadas a partir delas. Por exemplo, Cramer e col. (1999) *Curr. Top. Microbol. Immunol.* 240:95-118 e referências nele citadas descrevem a produção de folhas de tabaco transgênicas que expressam grandes quantidades de proteínas recombinantes, por exemplo, com o uso de um

promotor indutível. O milho transgênico foi usado para expressar proteínas de mamíferos em níveis de produção comercial, com atividades biológicas equivalentes às produzidas em outros sistemas recombinantes ou purificadas de fontes naturais. Veja, por exemplo, Hood e col. (1999) *Adv. Exp. Med. Biol.* 464: 127-147 e referências nele citadas. Derivados de anticorpo também foram produzidos em grandes quantidades a partir de sementes de plantas transgênicas, incluindo fragmentos de anticorpo, por exemplo, anticorpos de cadeia única (scFvs), incluindo sementes de tabaco e tubérculos de batata. Veja, por exemplo, Conrad e col. (1998) *Plant Mol. Biol.* 38: 101-109 e referência nele citadas. Dessa forma, os anticorpos da presente invenção também podem ser produzidos com o uso de plantas transgênicas, de acordo com métodos conhecidos.

Derivados de anticorpo também podem ser produzidos, por exemplo, por adição de seqüências exógenas para modificar a imunogenicidade ou reduzir, intensificar ou modificar a ligação, afinidade, taxa on, taxa off, avides, especificidade, meia-vida, ou qualquer outra característica. Geralmente, parte ou todas as seqüências de CDR não humanas ou humanas são mantidas, enquanto as seqüências não humanas das regiões variáveis e constantes são substituídas com aminoácidos humanos ou outros aminoácidos.

Em geral, os resíduos da CDR estão diretamente e mais substancialmente envolvidos na influência da ligação de antígeno. A humanização ou criação genética de anticorpos da presente invenção pode ser realizada com o uso de método conhecidos como, por exemplo, sem limitação, aqueles

descritos nas Patentes U.S. Nºs: 5.723.323, 5.976.862, 5.824.514, 5.817.483, 5.814.476, 5.763.192, 5.723.323, 5.766.886, 5.714.352, 6.204.023, 6.180.370, 5.693.762, 5.530.101, 5.585.089, 5.225.539 e 4.816.567.

5 As metodologias para produzir anticorpos parcial a totalmente humanos são conhecidas na técnica, e qualquer uma dessas metodologias pode ser usada. De acordo com uma modalidade, seqüências de anticorpos totalmente humanos são feitas em um camundongo transgênico que foi criado

10 geneticamente para expressar genes de anticorpos humanos de cadeia pesada e leve. Foram feitas várias cepas desses camundongos transgênicos que podem produzir classes diferentes de anticorpos. Células B de camundongos transgênicos que produzem um anticorpo desejado podem ser

15 fundidas para a produção de linhagens de células de hibridoma para produção contínua do anticorpo desejado (veja, por exemplo, Russel e col. (2000) *Infection and Immunity* Abril de 2000: 1.820-1.826; Gallo e col. (2000) *European J. of Immun.* 30: 534-540; Green (1999) *J. of Immun. Methods* 231: 11-23; Yang e col. (1999A) *J. of Leukocyte Biology* 66: 401-410; Yang (1999B) *Cancer Research* 59(6): 1.236-1.243; Jakobovits. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 31: 33-42; Green e Jakobovits (1998) *J. Exp. Med.* 188(3): 483-495; Jakobovits (1998) *Exp. Opin. Invest. Drugs* 7(4): 607 614; Tsuda e col. (1997) *Genomics* 42: 413-421; Sherman-Gold (1997) *Genetic Engineering News* 17(14); Mendez e col. (1997) *Nature Genetics* 15: 146-156; Jakobovits (1996) "Weir's Handbook of Experimental Immunology, The Integrated Immune System Vol. IV",

25 194.1194.7; Jakobovits (1995) *Current Opinion in*

Biotechnology 6: 561-566; Mendez e col. (1995) *Genomics* 26: 294-307; Jakobovits (1994) *Current Biology* 4(8): 761-763; Arbones e col. (1994) *Immunity* 1(4): 247-260; Jakobovits (1993) *Nature* 362(6417): 255-258; Jakobovits e col. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(6): 2.551-2.555; e Patente U.S. N° 6.075.181).

Os anticorpos desta invenção também podem ser modificados para criar anticorpos quiméricos. Anticorpos quiméricos são aqueles nos quais os vários domínios das cadeias pesadas e leves de anticorpos são codificados pelo DNA de mais de uma espécie. Veja, por exemplo, Patente U.S. N° 4.816.567.

Alternativamente, os anticorpos desta invenção também podem ser modificados para criar anticorpos cobertos (veneered). Anticorpos cobertos são aqueles nos quais os resíduos de aminoácido exteriores do anticorpo de uma espécie são criteriosamente substituídos ou "cobertos" com aqueles de uma segunda espécie de tal modo que anticorpos da primeira espécie não serão imunogênicos na segunda espécie, reduzindo, dessa forma, a imunogenicidade do anticorpo. Na medida em que a antigenicidade de uma proteína é primariamente dependente da natureza de sua superfície, a imunogenicidade de um anticorpo poderia ser reduzida por substituição dos resíduos expostos que diferem daqueles normalmente encontrados em anticorpos de outra espécie de mamífero. Essa substituição criteriosa de resíduos exteriores deve ter pouco ou nenhum efeito sobre os domínios interiores, ou sobre os contatos interdomínios. Dessa forma, as propriedades de ligação de ligante não devem ser afetadas em consequência de alterações que são

limitadas aos resíduos *framework* da região variável. O processo é denominado como "cobertura", na medida em que apenas a superfície externa ou "pele" do anticorpo é alterada, e os resíduos de suporte permanecem inalterados.

5 O procedimento para a "cobertura" se utiliza dos dados de seqüências disponíveis para os domínios variáveis de anticorpo humano compilados por Kabat e col. (1987) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 4ª Edição, Bethesda, Md., "National Institutes of Health",
10 atualizações dessa base de dados, e outras bases de dados acessíveis nos EUA e em outros países (tanto de ácidos nucleicos quanto de proteínas). Exemplos não limitantes dos métodos usados para a geração de anticorpos cobertos incluem EP 519596; Patente U.S. Nº 6.797.492; e descritos
15 em Padlan e col. (1991) *Mol. Immunol.* 28(4-5): 489-498.

O termo "derivado de anticorpo" também inclui "diabodies", que são pequenos fragmentos de anticorpo com dois sítios de ligação de antígeno, em que os fragmentos compreendem um domínio variável da cadeia pesada (VH)
20 conectado a um domínio variável da cadeia leve (VL) na mesma cadeia polipeptídica (veja, por exemplo, EP 404.097; WO 93/11161; e Hollinger e col., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6.444-6.448). Utilizando-se um vinculador que seja muito curto para permitir o pareamento entre os dois
25 domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a parar com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois sítios de ligação de antígeno (veja também Patente U.S. Nº 6.632.926 a Chen e col. que revela variantes de anticorpos que possuem um ou mais aminoácidos inseridos em uma região
30 hipervariável do anticorpo parente e uma afinidade de

ligação para um antígeno-alvo que é pelo menos cerca de duas vezes mais forte do que a afinidade de ligação do anticorpo parente pelo antígeno).

O termo "derivado de anticorpo" ainda inclui
5 "anticorpos lineares". O procedimento para a produção de anticorpos lineares é conhecido na técnica e descrito em Zapata e col. (1995) *Protein Eng.* 8(10): 1.057-1.062. Resumidamente, esses anticorpos compreendem um par de segmentos Fd em tandem ($V_H - C_H 1 - V_H - C_H 1$) que formam um par
10 de regiões de ligação de antígeno. Anticorpos lineares podem ser biespecíficos ou monoespecíficos.

Os anticorpos desta invenção podem ser recuperados e purificados de culturas de células recombinantes por métodos conhecidos que incluem, sem limitação, purificação
15 com proteína A, precipitação com sulfato de amônio ou etanol, extração ácida, cromatografia por troca aniônica ou catiônica, cromatografia com fosfocelulose, cromatografia por interação hidrofóbica, cromatografia por afinidade, cromatografia com hidroxilapatita e cromatografia com
20 lectina. A cromatografia líquida de alto desempenho ("HPLC") também pode ser usada para purificação.

Os anticorpos da presente invenção incluem produtos naturalmente purificados, produtos de procedimentos químicos sintéticos e produtos produzidos por técnicas
25 recombinantes por um hospedeiro eucariótico, incluindo, por exemplo, células de levedura, de planta superior, de insetos e de mamíferos ou, alternativamente, de uma célula procariótica, como descrito acima.

Caso um anticorpo monoclonal que está sendo testado se
30 ligue à proteína ou ao polipeptídeo, então o anticorpo que

está sendo testado e os anticorpos fornecidos pelos hibridomas desta invenção serão equivalentes. Também é possível determinar sem experimentação desnecessária se um anticorpo possui a mesma especificidade que o anticorpo monoclonal desta invenção determinando-se se o anticorpo que está sendo testado evita que um anticorpo monoclonal desta invenção se ligue à proteína ou ao polipeptídeo com o qual o anticorpo monoclonal é normalmente reativo. Se o anticorpo que está sendo testado compete com o anticorpo monoclonal da invenção, como mostrado por uma diminuição da ligação pelo anticorpo monoclonal desta invenção, então é provável que os dois anticorpos se liguem ao mesmo epítipo ou a um epítipo intimamente relacionado. Alternativamente, pode-se pré-incubar o anticorpo monoclonal desta invenção com uma proteína com a qual ele normalmente é reativo, e determinar se o anticorpo monoclonal que está sendo testado é inibido em sua habilidade para se ligar ao antígeno. Se o anticorpo monoclonal que está sendo testado é inibido, então, muito provavelmente, ele possui a mesma especificidade de epítipo, ou uma especificidade de epítipo intimamente relacionada que o anticorpo monoclonal desta invenção.

O termo "anticorpo" também visa incluir anticorpos de todos os isótipos. Isótipos específicos de um anticorpo monoclonal podem ser preparados diretamente por seleção a partir da fusão inicial, ou preparados secundariamente a partir de um hibridoma parental que secreta um anticorpo monoclonal de isótipo diferente por utilização da técnica de seleção sib para isolar variantes de mudança de classe com o uso do procedimento descrito em Steplewski, e col.

(1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8.653 ou Spira, e col. (1984) *J. Immunol. Methods* 74: 307.

O isolamento de outros hibridomas que secretam anticorpos monoclonais com a especificidade dos anticorpos monoclonais da invenção também pode ser obtido por aqueles habilitados na técnica por produção de anticorpos anti-idiotípicos (Herlyn, e col. (1986) *Science* 232: 100). Um anticorpo anti-idiotípico é um anticorpo que reconhece determinantes únicos presentes no anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma de interesse.

A identidade idiotípica entre anticorpos monoclonais de dois hibridomas demonstra que os dois anticorpos monoclonais são iguais com relação ao seu reconhecimento do mesmo determinante epitópico. Dessa forma, com o uso de anticorpos para os determinantes epitópicos em um anticorpo monoclonal, é possível identificar outros hibridomas que expressam anticorpos monoclonais da mesma especificidade epitópica.

É possível usar a tecnologia anti-idiótipo para produzir anticorpos monoclonais que mimetizam um epitopo. Por exemplo, um anticorpo monoclonal anti-idiotípico feito para um primeiro anticorpo monoclonal será um domínio de ligação na região hipervariável que é a imagem especular do epitopo ligado pelo primeiro anticorpo monoclonal. Dessa forma, nesse caso, o anticorpo monoclonal anti-idiotípico poderia ser usado para imunização para a produção desses anticorpos.

Em alguns aspectos desta invenção, será útil marcar de forma detectável ou terapeuticamente o anticorpo. Marcadores adequados são descritos *supra*. Métodos para a

conjugação de anticorpos a esses agentes são conhecidos na técnica. Apenas para fins ilustrativos, os anticorpos podem ser marcados com uma porção detectável, por exemplo, um átomo radioativo, um cromóforo, um fluoróforo, ou
5 semelhantes. Esses anticorpos marcados podem ser usados para técnicas diagnósticas, *in vivo*, ou em uma amostra de teste isolada.

O acoplamento de anticorpos a haptenos de baixo peso molecular pode aumentar a sensibilidade do anticorpo em um
10 ensaio. Os haptenos podem então ser detectados especificamente por meio de uma segunda reação. Por exemplo, é comum usar haptenos como, por exemplo, biotina, que reage com avidina, ou dinitrofenol, piridoxal e fluoresceína, que podem reagir com anticorpos anti-hapteno
15 específicos. Veja Harlow e Lane (1988) *supra*.

Os anticorpos podem ser marcados com uma porção detectável como, por exemplo, um átomo radioativo, um cromóforo, um fluoróforo, ou semelhantes. Esses anticorpos marcados podem ser usados para técnicas diagnósticas, *in*
20 *vivo*, ou em uma amostra de teste isolada. Os anticorpos também podem ser conjugados, por exemplo, a um agente farmacêutico, por exemplo, um fármaco quimioterápico ou uma toxina. Eles podem ser ligados a uma citocina, a um ligante, a outro anticorpo. Agentes adequados para o
25 acoplamento aos anticorpos para se obter um efeito antitumoral incluem citocinas, por exemplo, interleucina 2 (IL-2) e fator de necrose tumoral (TNF); fotossensibilizantes, para uso em terapia fotodinâmica, incluindo ftalocianina tetrassulfonato de alumínio (III),
30 hematoporfirina, e ftalocianina; radionuclídeos, por

exemplo, iodo-131 (^{131}I), ítrio-90 (^{90}Y), bismuto-212 (^{212}Bi), bismuto-213 (^{213}Bi), tecnésio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), rênio-186 (^{186}Re) e rênio-188 (^{188}Re); antibióticos, por exemplo, doxorubicina, adriamicina, daunorrubicina, metotrexato, 5 daunomicina, neocarzinostatina e carboplatina; toxinas bacterianas, de plantas e outras toxinas, por exemplo, toxina diftérica, exotoxina de *pseudomonas A*, enterotoxina estafilocócica A, toxina abrina-A, ricina A (ricina A desglicosilada e ricina A nativa), toxina TGF-alfa, 10 citotoxina de cobra da China (*naja naja atra*), e gelonina (uma toxina de planta); proteínas de inativação de ribossomo de plantas, bactérias e fungos, por exemplo, restrictocina (uma proteína de inativação ribossomo de produzida por *Aspergillus restrictus*), saporina (uma 15 proteína de inativação ribossomo de *Saponaria officinalis*), e RNase; inibidores de tirosina quinase; ly207702 (um nucleosídeo de purina difluorado); lipossomos contendo agentes anti-císticos (por exemplo, oligonucleotídeos anti-senso, plasmídeos que codificam toxinas, metotrexato etc.); 20 e outros anticorpos ou fragmentos de anticorpo, por exemplo, F(ab).

Os anticorpos da invenção também podem ser ligados a muitos veículos diferentes. Dessa forma, esta invenção também fornece composições que contêm os anticorpos e outra 25 substância, ativa ou inerte. Exemplos de veículos bem conhecidos incluem vidro, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrana, náilon, amilases, celulosas naturais e modificadas, poliacrilamidas, agaroses e magnetita. A natureza do veículo pode ser solúvel ou insolúvel para os 30 objetivos da invenção. Aqueles habilitados na técnica

conhecerão outros veículos adequados para a ligação de anticorpos monoclonais, ou serão capazes de verificar esses veículos, com o uso de experimentação de rotina.

IV. Terapias

5 A presente invenção está relacionada a um método terapêutico de prevenção ou redução de sangramento em um indivíduo submetido à terapia anticoagulante. Contempla-se que os antídotos ou derivados da presente invenção podem ser fármacos de curta duração para serem usados em
10 situações eletivas ou de emergência que podem neutralizar com segurança e especificamente as propriedades anticoagulantes de um inibidor de fXa convencional, sem causar efeitos colaterais hemodinâmicos deletérios ou exacerbação da resposta vascular proliferativa às lesões.

15 Em uma modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz de um antídoto exibe um índice terapêutico elevado. O índice terapêutico é a proporção de dose entre os efeitos tóxicos e terapêuticos, que pode ser expresso como a proporção entre LD₅₀ e ED₅₀. A LD₅₀ é a dose letal para 50%
20 da população, e a ED₅₀ é a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população. A LD₅₀ e a ED₅₀ são determinadas por procedimentos farmacêuticos padronizados em culturas de células animais ou em animais experimentais. Os antídotos ou derivados desta invenção podem ser administrados uma vez
25 ou várias vezes quando necessário para neutralizar o efeito de um inibidor de fXa presente no plasma de um indivíduo. De preferência, os antídotos desta invenção são suficientes quando administrados em uma dose única.

 Contempla-se que uma dosagem típica dos antídotos da
30 invenção dependerá do quadro clínico real e da concentração

de inibidor no plasma. Em um ensaio *in vitro*, por exemplo, de geração de trombina, em ensaios clínicos de coagulação como, por exemplo, aPTT, PT e ACT, espera-se que uma quantidade terapeuticamente eficaz de um antídoto produza
5 uma correção da atividade de coagulação *ex vivo* de 10% ou mais. Ensaio *in vitro* indicam que uma proporção de antídoto/inibidor $> 1,0$ deve exibir efeito de reversão. Espera-se que a concentração plasmática máxima para o antídoto esteja na faixa micromolar, provavelmente entre 10
10 micromolar ou menos.

Em um quadro clínico, um dos critérios na determinação da eficácia de um antídoto é que ele produz qualquer alteração das medidas reais de sangramento. Em experimentos clínicos, as categorias de sangramentos importantes incluem
15 hemorragia fatal, sangramentos em órgãos vitais (intracraniana, intra-ocular, retro-peritoneal, espinhal, pericárdica), qualquer sangramento que exija reoperação ou um novo procedimento terapêutico (por exemplo, aspiração de um joelho operado, inserção de tubo de toracotomia para
20 hemotórax, eletrocoagulação endoscópica etc.) ou um índice de sangramento $> 2,0$, caso esteja associado a um sangramento observável. O índice de sangramento é definido como o número de unidades de células vermelhas embaladas ou de sangue total transfundido mais os valores de hemoglobina
25 antes do episódio de sangramento menos os valores de hemoglobina após o sangramento ter se estabilizado (em gramas por decilitro).

Outro critério para eficácia do antídoto em ambientes clínicos é que ele reduza sangramento não importante
30 clinicamente significativo. Essa categoria de hemorragias

inclui sangramento que não é importante, mas é mais do que o usual e exige atenção clínica, incluindo epistaxe persistente ou recorrente e em quantidade substancial ou que não pare sem intervenção; sangramento retal ou do trato urinário que não aumenta até um nível que exija um procedimento terapêutico (por exemplo, nova inserção de um cateter de Foley ou inspeção cistoscópica), hematomas substanciais em um local de injeções ou em algum outro lugar que sejam espontâneos ou que ocorram com trauma trivial; perda sangüínea substancial; sangramento que exija transfusão não planejada. Como aqui usado, o termo "perda sangüínea substancial" refere-se à quantidade de perda sangüínea que é maior do que aquela quantidade normalmente associada ao procedimento cirúrgico. A perda sangüínea substancial leva ao edema que é tratado de forma conservadora, pois não chega a necessitar de drenagem.

Em uma modalidade, os derivados desta invenção possuem meia-vida plasmática circulante suficiente para substancialmente neutralizar o inibidor de fXa presente no plasma. O fXa ativado praticamente não possui meia-vida circulante em seres humanos, na medida em que é inibido eficazmente por ATIII, TFPI e outros inibidores plasmáticos (Fuchs, H.E. e Pizzo, S.V., *J. Clin. Invest.*, 1983, 72: 2.041-2.049). Foi demonstrado que o fXa inativo possui uma meia-vida circulante de 2-3 horas em seres humanos. Em um modelo em babuíno, a meia-vida de um fXa bloqueado no sítio ativo por DEGR ([5-(dimetilamino)1-naftalenossulfonil]-glutamilglicilarginil clorometil cetona) foi de aproximadamente 10 horas ou 2 horas, como determinado por ensaios isotópicos ou ensaios imunoabsorventes ligados à

enzima, respectivamente (Taylor, F.B. e col., Blood, 1991, 78(2): 364-368).

Pode ser desejável prolongar a meia-vida de um antídoto derivado de fXa até 2.448 horas. Contempla-se que a conjugação ou adição de uma ou mais das seguintes porções aumentará a meia-vida plasmática de um antídoto:

- a) polietileno glicol;
- b) um grupo acil;
- c) lipossomos e agentes de encapsulação;
- d) proteínas transportadoras;
- e) membrana de fosfolípídeo artificial;
- f) imunoglobulina; e
- g) nanopartícula.

O local de conjugação pode não ser limitado a uma cadeia ou um resíduo em especial, desde que a conjugação não mascare o(s) sítio(s) de ligação ao inibidor do antídoto. Os antídotos aqui descritos podem ser administrados em combinação com qualquer um ou mais de um dos compostos descritos acima.

Em geral, os anticorpos administrados possuem uma meia-vida mais longa do que as proteínas da coagulação sangüínea circulantes. É possível usar um complexo que consiste em fXa deficiente em domínio Gla e um anticorpo ligado ao exosítio de fXa como um antídoto com meia-vida circulante prolongada. A formação de um complexo entre fXa e o anticorpo direcionado ao exosítio pode reduzir a interação de um fXa deficiente em domínio Gla com substratos e inibidores macromoleculares, por exemplo, protrombina e antitrombina III, deixando a fenda do sítio ativo inalterada de modo que o complexo possa atuar como um

antídoto para se ligar ao inibidor de pequena molécula dirigido ao sítio ativo. A formação de um complexo α -2-macroglobulina-fXa também pode ser útil como um antídoto para inibidores de fXa de pequena molécula.

5 A eficácia dos antídotos na reversão da atividade anticoagulante de inibidores de fXa, bem como de sua atividade pró-coagulante, pode ser determinada por ensaios *in vitro* e modelos animais por aqueles habilitados na técnica. Exemplos de ensaios *in vitro* são a geração de
10 trombina, ensaios clínicos de coagulação como, por exemplo, aPTT, PT e ACT. Contempla-se que o antídoto desta invenção seja capaz de produzir 10% ou mais de correção da atividade de coagulação *ex vivo*. Vários modelos animais *in vivo* de tempo de sangramento e/ou perda sangüínea, por exemplo, em
15 roedores, por exemplo, camundongos, cães e primatas, por exemplo, macacos, podem ser usados para medir a eficácia.

V. Composições farmacêuticas

A presente invenção ainda fornece composições que compreendem um derivado de fXa e um veículo
20 farmaceuticamente aceitável.

O termo "veículos farmaceuticamente aceitáveis" refere-se a quaisquer diluentes, excipientes ou veículos que podem ser usados nas composições da invenção. Veículos farmaceuticamente aceitáveis incluem permutadores de íons,
25 alumina, estearato de alumínio, lecitina, proteínas do soro, por exemplo, albumina sérica humana, substâncias de tamponamento, por exemplo, fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potássio, misturas parciais de glicerídeos de ácidos graxos vegetais saturados, água, sais
30 ou eletrólitos, por exemplo, sulfato de protamina,

hidrogênio fosfato dissódico, hidrogênio fosfato de potássio, cloreto de sódio, sais de zinco, sílica coloidal, trissilicato de magnésio, polivinil pirrolidona, substâncias a base de celulose, polietileno glicol, carboximetilcelulose sódica, poliacrilatos, caras, polímeros em bloco de polietileno-polioxipropileno, polietileno glicol e lanolina. Veículos farmacêuticos adequados são descritos em "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Company, um texto de referência padrão nesse campo. Eles são selecionados preferivelmente com relação à forma de administração desejada, ou seja, comprimidos orais, cápsulas, elixires, xaropes e semelhantes, e consistentes com práticas farmacêuticas convencionais.

As composições farmacêuticas da invenção podem ser fabricadas por métodos bem conhecidos na técnica como, por exemplo, processos convencionais de granulação, mistura, dissolução, encapsulação, liofilização ou emulsificação, entre outros. As composições podem ser produzidas em várias formas, incluindo grânulos, precipitados ou particulados, pós, incluindo pós liofilizados, secos por rotação ou secos por vaporização, pós amorfos, injeções, emulsões, elixires, suspensões ou soluções. As formulações podem opcionalmente conter estabilizantes, modificadores do pH, tensoativos, modificadores da biodisponibilidade e combinações destes.

Formulações farmacêuticas podem ser preparadas como suspensões ou soluções líquidas com o uso de um líquido estéril, por exemplo, óleo, água, álcool, e combinações destes. Tensoativos farmacêuticamente aceitáveis, agentes de suspensão ou agentes emulsificantes podem ser

adicionados para administração oral ou parenteral. Suspensões podem incluir óleos, por exemplo, óleo de amendoim, óleo de gergelim, óleo de semente de algodão, óleo de milho e azeite de oliva. A preparação de suspensão
5 também pode conter ésteres de ácidos graxos, por exemplo, etil oleato, miristato de isopropila, glicerídeos de ácido graxo e glicerídeos acetilados de ácido graxo. As formulações de suspensão podem incluir alcoóis, por exemplo, etanol, álcool isopropílico, álcool hexadecílico,
10 glicerol e propileno glicol. Éteres, por exemplo, poli(etilenoglicol), hidrocarbonetos de petróleo, por exemplo, óleo mineral e vaselina e água, também podem ser usados em formulações de suspensão.

As composições desta invenção são formuladas para
15 administração farmacêutica a um mamífero, preferivelmente um ser humano. Essas composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas de diversas formas, preferivelmente parenteralmente.

Contempla-se que, a fim de reverter rapidamente a
20 atividade anticoagulante de um inibidor de fXa presente no plasma de um paciente em uma situação de emergência, o antídoto desta invenção pode ser administrado à circulação sistêmica por meio de administração parental. O termo "parenteral", como aqui usado, inclui injeção subcutânea,
25 intravenosa, intramuscular, intra-articular, intra-sinovial, intra-esternal, intratecal, intra-hepática, intralesional e intracraniana ou técnicas de infusão. No entanto, nos casos em que o inibidor de fXa que está sendo neutralizado possui uma meia-vida plasmática longa, uma
30 infusão contínua ou uma formulação de liberação sustentada

pode ser necessária para se ligar ao inibidor de fXa e liberar o fXa ativo, antes da depuração do inibidor de fXa do corpo.

As formas injetáveis estéreis das composições desta
5 invenção podem ser uma suspensão aquosa ou oleaginosa. Essas suspensões podem ser formuladas de acordo com metodologias conhecidas na técnica com o uso de agentes de dispersão ou umidificação e agentes de suspensão adequados. A preparação injetável estéril também pode ser uma solução
10 ou suspensão injetável estéril em um diluente ou solvente atóxico parenteralmente aceitável, por exemplo, como uma solução em 1,3-butanodiol. Entre os veículos e solventes aceitáveis que podem ser empregados, estão água, solução de Ringer e solução isotônica de cloreto de sódio. Além disso,
15 óleos fixos estéreis são convencionalmente empregados como um solvente ou meio de suspensão. Para essa finalidade, qualquer mistura de óleos fixos pode ser empregada, incluindo mono- ou diglicerídeos sintéticos. Ácidos graxos, por exemplo, ácido oléico e seus derivados glicerídicos,
20 são úteis na preparação de injetáveis, bem como óleos naturais farmacologicamente aceitáveis, por exemplo, azeite de oliva ou óleo de rícino, especialmente em suas versões polioxietiladas. Essas soluções ou suspensões oleosas também podem conter um diluente ou dispersante de álcool de
25 cadeia longa, por exemplo, carboximetil celulose, ou agentes dispersantes similares que são comumente usados na formulação de formas de dosagem farmacologicamente aceitáveis, incluindo emulsões e suspensões. Outros tensoativos comumente usados, por exemplo, Tweens, Spans e
30 outros agentes emulsificantes ou intensificadores de

biodisponibilidade que são comumente usados na fabricação de formas de dosagem sólidas ou líquidas ou outras formas de dosagem farmacologicamente aceitáveis também podem ser usados para fins de formulação. Os compostos podem ser formulados para administração parenteral por injeção como, por exemplo, injeção em bolo ou infusão contínua. Uma forma de dosagem unitária para injeção pode estar em ampolas ou em recipientes multidoses.

Além das formas de dosagem descritas acima, excipientes e veículos farmacologicamente aceitáveis e formas de dosagem são geralmente conhecidos por aqueles habilitados na técnica e estão incluídos na invenção. Deve-se entender que uma dosagem e um regime de tratamento específicos para qualquer paciente em particular dependerão de diversos fatores, incluindo a atividade do antídoto específico empregado, a idade, o peso corporal, a saúde geral, o sexo e a dieta, a função renal e hepática do paciente, e o tempo de administração, a taxa de excreção, combinação de fármacos, avaliação do médico ou veterinário responsável pelo tratamento e gravidade da doença em particular que está sendo tratada.

VI. Kits

A invenção ainda fornece kits ou embalagens. Em algumas modalidades, o kit da presente invenção compreende:

- (a) um primeiro recipiente que contém um inibidor de fXa para administração regular para o tratamento de trombose, e
- (b) um segundo recipiente que contém um antídoto desta invenção para ser usado em casos quando há uma overdose do inibidor de fXa em (a) ou quando a hemostasia normal precisar ser restaurada para interromper ou evitar

sangramento. Em outras modalidades, o kit ainda compreende uma bula que explica quando esses dois agentes em (a) e (b) devem ser usados.

Os primeiros e segundos recipientes podem estar em uma
5 garrafa, jarro, frasco, seringa, tubo, bolsa ou qualquer
outro recipiente usado na fabricação, armazenamento ou
distribuição de um produto farmacêutico. A bula pode ser um
rótulo, etiqueta, ou semelhantes, que cita as informações
relacionadas à composição farmacêutica do kit. As
10 informações citadas normalmente serão determinadas pela
agência reguladora que atua na área na qual a composição
farmacêutica deverá ser vendida, por exemplo, o FDA
("United States Food and Drug Administration" - agência
governamental americana que regula e fiscaliza a fabricação
15 de comestíveis, drogas e cosméticos). De preferência, a
bula cita especificamente as indicações para as quais a
composição farmacêutica foi aprovada. A bula pode ser feita
de qualquer material sobre o qual uma pessoa possa ler as
informações nele contidas. De preferência, a bula é um
20 material que pode ser impresso, por exemplo, papel, papelão
com fundo adesivo, folha metálica ou plástica, e
semelhantes, sobre o qual as informações desejadas foram
impressas ou aplicadas.

EXEMPLOS

25 A invenção será mais bem compreendida por referência
aos exemplos a seguir, os quais são meramente exemplares da
invenção. A presente invenção não tem seu escopo limitado
pelas modalidades exemplificadas, que são apenas
ilustrações de aspectos únicos da invenção. Quaisquer
30 métodos que sejam funcionalmente equivalentes estão

incluídos no escopo da invenção. Várias modificações da invenção, além daquelas aqui descritas, ficarão evidentes para aqueles habilitados na técnica a partir da descrição apresentada anteriormente e das figuras que a acompanham.

5 Essas modificações estão incluídas no escopo das reivindicações em anexo.

A menos que estabelecido de forma diferente, todas as temperaturas estão em graus Celsius. Além disso, nesses exemplos e em outras seções, as abreviações possuem os
10 seguintes significados:

	as	=	aminoácido
	ab	=	anticorpo
	ACT	=	tempo de coagulação ativado
	aPTT	=	tempo de tromboplastina parcial ativada
15	célula CHO	=	célula de ovário de hamster chinês
	células CHO dhfr(-)	=	células CHO desprovidas do gene dhfr
	h	=	hora
	INR	=	proporção internacional normalizada
20	IV	=	intravenosa
	kg	=	quilograma
	M	=	molar
	mg	=	miligrama
	mg/kg	=	miligrama/quilograma
25	mg/ml	=	miligrama/mililitro
	min	=	minuto
	ml	=	mililitro
	mM	=	milimolar
	nm	=	nanômetro
30	nM	=	nanomolar

PO	=	oral
PRP	=	plasma rico em plaquetas
PT	=	tempo de protrombina
RFU	=	unidade relativa de

5 fluorescência

seg	=	segundo
TF	=	fator tecidual
U/ml	=	unidades/mililitro
µl ou ul	=	microlitro
10 µM	=	micromolar
µg	=	micrograma

Exemplo 1. Preparação de fXa anidro des-Gla por digestão por quimotripsina

fXa anidro des-Gla foi preparado de acordo com o
 15 procedimento de Morita, T. e col., *J. Bio. Chem.*, 1986,
 261(9): 4.015-4.023 por incubação de fXa anidro, em que
 desidroalanina substitui a serina do sítio ativo, com
 quimotripsina em 0,05 M de Tris-HCl, 0,1 M de NaCl, em pH
 7,5, e 22°C por 60 minutos. Em um quadro de experimento
 20 típico, 0,5 miligrama/mililitro (mg/ml) de fXa anidro foi
 incubado com 5 unidades/mililitro (U/ml) de glóbulos de α-
 quimotripsina-agarose com agitação suave. Ao final da
 reação, os glóbulos de α-quimotripsina-agarose foram
 removidos por centrifugação ou filtração. Essa foi seguida
 25 por incubação com uma quantidade em excesso de inibidores
 fluoreto de 4-amidino-fenil-metano sulfonila (APMSF),
 tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK) e tosil-L-
 fenilalanina clorometil cetona (TPCK) para extinguir a
 atividade residual de fXa ou qualquer atividade de
 30 quimotripsina possivelmente liberada pelos glóbulos. O

fragmento do domínio Gla e inibidores foram removidos do produto final, fXa anidro des-Gla, por um dispositivo de filtração Amicon Ultra Centrifugal (membrana YM10) ou por diálise convencional. A concentração ou troca de tampão, se necessário, também foi feita ao mesmo tempo. O fXa anidro contendo o domínio Gla foi preparado de acordo com o procedimento relatado por Nogami, e col., *J. Biol. Chem.* 1999, 274(43): 31.000-7. Os glóbulos de α -quimotripsina-agarose foram adquiridos de Sigma e a atividade específica (U/ml) foi baseada nos dados do fabricante para o número de lote específico usado.

A digestão por quimotripsina de fXa ativo pode ser realizada de acordo com o procedimento acima, sem a utilização de APMSF. A atividade de coagulação de fXa ativo foi determinada antes da digestão por quimotripsina, e após 15, 30 e 60 minutos de digestão por quimotripsina de acordo com o procedimento descrito no Exemplo 3 abaixo. A Figura 7 mostra a perda completa da atividade de coagulação após 30 minutos de digestão por quimotripsina. O tempo de incubação foi estendido até 60 minutos para assegurar a remoção completa do domínio Gla.

Exemplo 2. Ensaio de geração de trombina em plasma pobre em plaquetas (PPP) ou em plasma rico em plaquetas (PRP)

Nesse exemplo, amostras de plasma humano pobre em plaquetas ou rico em plaquetas foram preparadas a partir de sangue de doadores saudáveis retirados em 0,32% de citrato. PRP e PPP foram preparados por centrifugação do sangue anticoagulado a aproximadamente 100 X de gravidade ou 1000 X de gravidade por 20 minutos, respectivamente, em temperatura ambiente. 75-100 microlitros (μ l) de plasma

foram misturados com CaCl_2 e Z-Gly-Gly-Arg-aminometilcumarina (Z-GGR-AMC, um substrato fluorogênico de trombina). Fator tecidual (Innovin, Dade Behring) foi adicionado para iniciar a geração de trombina. Para um
5 experimento típico, a mistura de reação continha 15 milimolar (mM) de Ca^{2+} , 100 micromolar (μM) de Z-GGR-AMC, e 0,1 nanomolar (nM) de fator tecidual (TF) (Innovin). A formação de trombina foi monitorada continuamente a 37°C por uma leitora de placas fluorométrica (Molecular Devices)
10 que mede as unidades relativas de fluorescência (RFU). Inibidor e antídoto, quando presente, foram pré-incubados com plasma por 20 minutos em temperatura ambiente antes do início da geração de trombina.

Os resultados de vários experimentos com o uso desse
15 ensaio podem ser encontrados nas Figuras 4, 6 e 9.

Exemplo 3. Ensaio de prolongamento da coagulação

Foram usados dois formatos de ensaio de coagulação para testar os efeitos de inibidores do fator Xa e do antídoto sobre a prolongação da coagulação. No primeiro
20 formato, uma placa de 96 poços foi usada para medir múltiplas amostras ao mesmo tempo. No segundo formato de ensaio, aPTT foi medida com um instrumento de coagulação convencional (cronômetro de coagulação automático MLA Electra 800).

25 No método do formato de placa de 96 poços, plasma humano pobre em plaquetas ou rico em plaquetas foi preparado de forma similar aos procedimentos no Exemplo 2. 75-100 μl de plasma foram re-calcificados com CaCl_2 , incubados a 37°C por 3 minutos e a formação de coágulo foi
30 iniciada por adição de fator tecidual (Innovin, Dade

Behring) ou de um reagente de aPTT (Actin FS, Dade Behring). A mudança da OD₄₀₅ foi monitorada continuamente por uma leitora de placas (Molecular Devices). O tempo de coagulação foi definido como o tempo (em segundos) quando a
5 metade do valor máximo da alteração da absorbância (OD₄₀₅ nm) era alcançada. Inibidor do fator Xa e antídoto, quando presente, foram pré-incubados com plasma em temperatura ambiente por 20 minutos, antes do início da reação.

Quando um fXa ativo foi testado quanto à sua atividade
10 de coagulação, como mostrado na Figura 7, 75-100 µl de plasma deficiente em fX (George King Bio-Medical, Inc.) foram re-calcificados com CaCl₂, incubados a 37°C por 3 minutos e os produtos de fXa após digestão por quimotripsina foram adicionados ao plasma para iniciar a
15 formação de coágulo. A alteração da OD₄₀₅ foi monitorada continuamente por uma leitora de placas, como descrito anteriormente.

Na Figura 13, o efeito de 400 nM de betrixaban sobre a prolongação de aPTT de plasma humano normal e sobre a
20 reversão do efeito do inibidor betrixaban por antídoto fXa anidro des-Gla foi medido com um cronômetro de coagulação automático MLA Electra 800. Cem µl de pool de plasma humano foram misturados com 400 nM de betrixaban e concentrações diferentes de antídoto. O reagente de aPTT (Actin FS, Dade
25 Behring) e CaCl₂ foram adicionados de acordo com as instruções do fabricante para a medida dos tempos de coagulação.

Os resultados de experimentos adicionais com a utilização desse ensaio podem ser encontrados nas Figuras
30 10 e 11.

Exemplo 4. Reversão da inibição de fXa por betrixaban por fXa anidro des-Gla

Para medir a inibição da atividade de fXa por betrixaban e a reversão de seu efeito inibidor, fXa ativo purificado, diferentes concentrações de betrixaban e de antídoto fXa anidro des-Gla foram adicionadas a 20 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 5 mM Ca^{2+} e albumina sérica bovina 0,1% (BSA). Após incubação em temperatura ambiente por 20 minutos, 100 μM de Spectrozyme-fXa (um substrato cromogênico de fator Xa, Chromogenix) foram adicionados à mistura e a taxa de clivagem de substrato foi monitorada continuamente por 5 minutos a 405 nanômetros (nm) por uma leitora de placas. Na Figura 5, a atividade cromogênica foi normalizada para fXa ativo na ausência de qualquer inibidor. A velocidade inicial de formação de produto em função da concentração de inibidor e de antídoto foi analisada por regressão não linear para estimar a afinidade de betrixaban pelo antídoto (Figura 8).

O efeito do antídoto fXa anidro des-Gla sobre a atividade de trombina em direção a um substrato cromogênico S2288 (200 μM) foi medido similarmente como anteriormente, com ou sem Argatroban, um inibidor IIa de pequena molécula específico. Como esperado, o antídoto (538 nM) não afeta a atividade amidolítica de IIa (5 nM) ou sua inibição por 50 nM de Argatroban.

Exemplo 5. Preparação de fXa com resíduos descarboxilados de ácido γ -carboxiglutâmico

Um derivado de fXa com resíduos descarboxilados de ácido γ -carboxiglutâmico pode ser preparado por tratamento de proteína de fXa, por exemplo, com base no procedimento

relatado por Bajaj, e col. *J. Biol. Chem.*, 1982, 257(7): 3.726-3.731. Dois a cinco mg de fXa purificado ou recombinante em 2 ml de 0,1 molar de bicarbonato de amônio em pH 8,0 são liofilizados. O pó resultante é lacrado sob um vácuo de menos de 20 µm e aquecido a 110°C por vários períodos de tempo para obter fXa descarboxilado.

Exemplo 6. Preparação de fXa recombinante des-Gla-S379A

Os derivados de fXa podem ser produzidos pelo método de DNA recombinante com um dos seguintes procedimentos com base no cDNA de fX (ID. DE SEQ. N°: 2) para a expressão de fX (IDS. DE SEQ. N°s: 1, 3) ou derivados de fXa (IDS. DE SEQ. N°s: 4, 5, 9 e 11) em um organismo hospedeiro adequado de acordo com os procedimentos gerais de mutagênese e biologia molecular.

fX recombinante e derivados de fX podem ser expressos, por exemplo, em células embrionárias de rim humano HEK293 com base nos procedimentos descritos em Larson, P.J., e col., *Biochem.*, 1998, 37: 5.029-5.038 e Camire, R.M., e col., *Biochem.*, 2000, 39, 14.322-14.329. fX recombinante pode ser ativado em rFXa pelo ativador de fator X, veneno de víbora de Russell (RVV). rFXa pode ainda ser processado em fXa anidro des-Gla com base nos procedimentos descritos no Exemplo 1.

fX-S379A recombinante (S195A na numeração de quimotripsina) com o resíduo de serina do sítio ativo sendo substituído por alanina e, preferivelmente, o mutante de fXa ativado, rFXa-S379A, podem ser expressos, por exemplo, em células de ovário de hamster chinês (CHO) com base nos procedimentos descritos por Sinha e col., *Protein Expression and Pur* 1992, 3: 518-524; Wolf, D.L. e col., *J.*

Biol. Chem., 1991, 266(21): 13.726-13.730.

fXa-S379A des-Gla pode ser preparado por digestão por quimotripsina de fXa-S379A de acordo com procedimentos descritos no Exemplo 1.

5 Mais preferivelmente, fXa-S379A des-Gla pode ser expresso diretamente de acordo com procedimentos prévios com eliminação do fragmento do domínio Gla por procedimentos de mutagênese. Por exemplo, a expressão recombinante de proteína pode ser usada para expressar:
 10 des-Gla(1-39)-fXaS379A, após remoção do fragmento do domínio Gla 1-39 do ID. DE SEQ. N°: 3; des-Gla(1-44)-fXa-S379A, equivalente ao ID. DE SEQ. N°: 10 com desidro-alanina sendo substituída por alanina; e des-Gla(1-45)-fXa-S379A com todo o domínio Gla sendo removido (ID. DE SEQ.
 15 N°: 11).

Truncamentos adicionais nos domínios EGF1 ou domínios EGF1 mais EGF2 (Figura 2) também podem ser feitos para expressar derivados de des(1-84)-fXa-S379A ou des(1-128)-fXa-S379A.

20 **Exemplo 7. Expressão de mutante de fXa recombinante em células CHO**

Esse exemplo descreve a expressão recombinante da construção de proteína e a linhagem de células para a expressão direta de uma variante de fXa sem domínio Gla-
 25 S379A (S195A na numeração de quimotripsina). O antídoto recombinante não necessita da ativação ou de etapas de modificação química necessárias para produzir o Antídoto-pd e possui afinidade comparável à proteína derivada do plasma nos ensaios *in vitro* aqui discutidos.

30 Nesse exemplo, um mutante de fXa (ID. DE SEQ. N°: 13,

Tabela 12a) foi expresso diretamente em células CHO (veja a Figura 14 para o vetor de expressão) e a proteína funcional foi purificada do meio condicionado, como descrito abaixo. A atividade funcional do antídoto recombinante (Antídoto-r) foi testada *in vitro* e em um modelo animal (Exemplo 8).

PCR foi usada para mutar a sequência de cDNA de fX (ID. DE SEQ. N°: 2) em três regiões. A primeira mutação foi a eliminação dos aa 6-39 no domínio Gla de FX (ID. DE SEQ. N°: 3, Figura 3). A segunda mutação foi a substituição da sequência peptídica de ativação aa 143-194 com -RKR-. Isso produziu um vinculador -RKRRKR- que conecta a cadeia leve e a cadeia pesada. Após secreção, esse vinculador é removido em CHO resultando em uma molécula de fXa de duas cadeias. A terceira mutação é a mutação do resíduo do sítio ativo S379 em um resíduo Ala.

O polipeptídeo produzido pelo cDNA (ID. DE SEQ. N°: 16) descrito anteriormente está descrito na Tabela 12 (ID. DE SEQ. N°: 12). O alinhamento do cDNA com o polipeptídeo é mostrado na Tabela 20. A molécula de fXa de duas cadeias produzida após secreção é um fragmento da cadeia leve descrito na Tabela 12b (ID. DE SEQ. N°: 14) e um fragmento da cadeia pesada descrito na Tabela 12c (ID. DE SEQ. N°: 15).

Os primeiros 1-5 aa na sequência de fX foram reservados e usados para conectar o polipeptídeo do mutante de fXa ao pré-pró-peptídeo de fX (ID. DE SEQ. N°: 1, Figura 1), assegurando o processamento adequado do pré-pró-peptídeo no mutante de fXa.

A sequência de DNA que codifica o polipeptídeo de mutante de fXa descrito acima foi seqüenciada e inserida no

vetor de expressão mostrado na Figura 14. O polinucleotídeo do vetor de expressão é mostrado no ID. DE SEQ. N°: 18. O DNA de plasmídeo foi linearizado e transfectado em células CHO dhfr(-). As células foram selecionadas usando meio 5 deficiente em tetrahidrofolato (HT) mais metotrexato (MTX). Os clones estáveis foram avaliados quanto à expressão de proteína elevada usando um kit de ELISA de fX (Enzyme Research Laboratories, Número de Catálogo FX-EIA). A proteína mutante de fXa foi expressa em meio sem soro e 10 meio condicionado foi coletado e processado para purificação.

A proteína-alvo no meio pode ser isolada por cromatografia por troca iônica e subsequente purificada por cromatografia por afinidade em etapa única 15 (por exemplo, um anticorpo anti-fXa acoplado a uma matriz) ou por uma combinação de várias etapas de cromatografia como, por exemplo, matrizes hidrofóbicas. As purificações por afinidade podem incluir material cromatográfico que se liga seletivamente à fenda do sítio ativo de fXa, por 20 exemplo, benzamidina-sefarose ou inibidor de tripsina de soja-agarose (STI-Agarose).

A Figura 15 mostra os *Western blots* do mutante de fXa purificado por afinidade (STI-Agarose, Catálogo Sigma N° T0637) usando anticorpos monoclonais (Enzyme Research 25 Laboratories, FX-EIA) que reconhecem a cadeia pesada e leve de fX, respectivamente. Mediante redução da ligação dissulfeto que conecta a cadeia leve e pesada, o Antídoto-r mostra a banda esperada da cadeia pesada similar ao derivado de fXa do plasma no *Western blot*. A eliminação de 30 6-39 como no domínio Gla do mutante de fXa resulta em uma

banda de peso molecular menor para a cadeia leve do Antídoto-r, comparado com o derivado de fXa do plasma. As marcas de peso molecular também podem ser observadas no blot.

5 Exemplo 8. Modelo in vivo em camundongo

Foi testado o perfil farmacocinético e farmacodinâmico (PK-PD) de betrixaban em machos de camundongos C57B1/6, com ou sem administração de antídoto. A administração oral única de betrixaban foi dosada em 0, 15, 25 e 75 mg/kg para grupos de controle. Quinze mg/kg foram usados para o grupo tratado com antídoto. Uma única injeção intravenosa (IV) de antídoto (300 µg/200 µl) ou veículo (solução salina normal, 200 µl) foi administrada 5 minutos antes do ponto do tempo de 1,5 hora.

15 A 1,5, 2,0, e 4,0 horas após a administração oral de betrixaban, os camundongos foram anestesiados com um coquetel de quetamina (SC) e dessangrados por meio de punção cardíaca. Foram obtidas amostras de sangue (0,5 ml) em 50 µl de citrato trissódico. A INR do sangue total foi medida usando cartuchos Hemochron Jr. (International Technidyne Corporation) de acordo com as instruções do fabricante. Plasma de camundongo pobre em plaquetas foi preparado por centrifugação para determinações da concentração plasmática de betrixaban e antídoto (ELISA).

25 Para o experimento do antídoto recombinante (Antídoto-r), os camundongos receberam administração oral de betrixaban a 0, 15, 25 e 75 mg/kg para os grupos de controle. Quinze mg/kg foram usados para o grupo tratado com antídoto (300 µg/200 µl). Foram coletadas amostras 1,5 hora após a administração oral de betrixaban (5 minutos

30

após a injeção do antídoto).

Como mostrado nas Figuras 16 e 17 e nas Tabelas 13 e 14, uma única injeção (300 µg, IV) de antídoto derivado do plasma (Antídoto-pd) ou mutante de fXa recombinante (Antídoto-r) aos camundongos após a administração de betrixaban (15 mg/kg, PO) capturou eficazmente o inibidor *in vivo*. A correlação PK-PD de INR do sangue total com concentração plasmática de antídoto (Tabelas 13-14) indicou >50% de redução de betrixaban funcional com base em medidas da INR, e justificou a neutralização eficaz dos inibidores de fXa pelo antídoto por meio de injeções múltiplas ou outros regimes. Contempla-se que esses resultados demonstram que os derivados de fXa desta invenção possuem potencial para atuar como antídotos universais para reverter o efeito anticoagulante de inibidores de fXa em pacientes com sangramento ou com outras emergências médicas.

A Figura 22 mostra um experimento em camundongo com uma única injeção IV (1 injeção) ou duas injeções (2 injeções) do Antídoto-r (n = 5 por grupo, 312 µg/200 µl de Antídoto-r) após administração oral de betrixaban (15 mg/kg). Para o grupo de injeção única, foram coletadas amostras de sangue de camundongo em 1 hora após administração oral de betrixaban. Veículo (controle 1) ou Antídoto-r (1 injeção) foi administrado 5 minutos antes do ponto do tempo de 1 hora. Para o grupo de injeção dupla, foi injetado veículo ou Antídoto-r em 55 minutos e repetido em 115 minutos após administração oral de betrixaban. Amostras de sangue de camundongo foram coletadas em 2 horas para camundongos tratados com veículo (controle 2) e com

Antídoto-r (2 injeções). A INR medida como uma função da proporção de antídoto/betrixaban no plasma de camundongo após injeções únicas ou duplas do antídoto é mostrada na Figura 22 B.

5 **Exemplo 9. Reversão *in vitro* de rivaroxaban e apixaban por antídoto**

Como esperado, os antídotos contemplados por esta invenção também foram capazes de se ligar e neutralizar outros inibidores de fXa dirigidos ao sítio ativo. As
10 Tabelas 15 e 16 mostram a correção *in vitro* da inibição por betrixaban, rivaroxaban e apixaban por Antídoto-pd e Antídoto-r. fXa purificado (3,0 nM), inibidor (7,5 nM) e diferentes concentrações de antídoto foram incubados por 10 minutos a 22°C em um tampão com 20 mM de Tris, 150 mM de
15 NaCl, BSA 0,1%, pH 7,4. A atividade de fXa foi testada de forma similar ao Exemplo 4.

Como mostrado na Tabela 15, 204 nM de Antídoto-pd produzem pelo menos 60% de correção dos efeitos inibidores dos inibidores testados, enquanto, na Tabela 16, foram
20 obtidos >95% de correção da inibição pelo Antídoto-r (186 nM) para betrixaban e rivaroxaban, e >70% de reversão de apixaban.

Exemplo 10. Reversão *in vitro* de betrixaban por antídoto-r

Na Tabela 17, o efeito de proteína do antídoto
25 recombinante sobre a reversão da anticoagulação por betrixaban foi testado em um ensaio de coagulação de plasma humano. O efeito de 300 nM e 400 nM de betrixaban sobre a prolongação por aPTT do plasma e a reversão de efeito inibidor foi medido por um cronômetro de coagulação
30 automático MLA Electra 800. Cem µl de pool de plasma humano

anticoagulado com citrato foram misturados com 300 nM ou 400 nM de betrixaban e diferentes concentrações de antídoto. O reagente de aPTT (Actin FS, Dade Behring) e CaCl_2 foram adicionados de acordo com as instruções do fabricante.

Exemplo 11. Reversão *in vitro* de heparina de baixo peso molecular ("LMWH") por Antídoto-r

Na Figura 18, o efeito de Antídoto-r para reverter o efeito inibidor de LMWH enoxaparina (Sanofi-Aventis) foi testado por alterações da turvação em plasma humano. Enoxaparina (0-1,25 U/ml) foi incubada a 22°C por 20 min, com ou sem 508 nM de Antídoto-r. As alterações da turvação foram medidas de acordo com os procedimentos descritos no Exemplo 3. Quinhentos e oito nM de Antídoto-r corrigiram substancialmente (> 75%) o efeito inibidor de 0,3125-1,25 U/ml de Enoxaparina.

Na Figura 19, o efeito de Antídoto-r sobre a reversão de anticoagulação por uma heparina de baixo peso molecular (LMWH enoxaparina, Sanofi-Aventis) foi testado em um ensaio de coagulação de plasma humano. O efeito de 1 Unidade de anti-Xa/ml de LMWH sobre a prolongação por aPTT do plasma e sobre a reversão do efeito inibidor foi medido por um cronômetro de coagulação automático MLA Electra 800. Cem µl de pool de plasma humano anticoagulado com citrato foram misturados com enoxaparina e diferentes concentrações de antídoto. Antes da medida do tempo de coagulação, reagente de aPTT (Actin FS, Dade Behring) e CaCl_2 foram adicionados de acordo com as instruções do fabricante. A adição de 1,14 µM de antídoto recombinante produziu uma correção de 52% da anticoagulação produzida por 1 Unidade/ml de enoxaparina.

Exemplo 12. Reversão in vitro de rivaroxaban por Antídoto-r

Na Figura 20, foi testado o efeito de proteína do antídoto recombinante sobre a reversão da anticoagulação por um inibidor do fator Xa de pequena molécula (rivaroxaban, Bay 59-7939) em um ensaio da coagulação de plasma humano. Como relatado por Perzborn e col., *J. Thromb. Haemost.* 3: 514-521, 2005, as medidas do tempo de protrombina são um método preciso para avaliar o efeito anticoagulante de rivaroxaban. O efeito de 1 μM de rivaroxaban sobre a prolongação do tempo de protrombina (PT) de pool de plasma humano e sobre a reversão do efeito inibidor foi medido por um cronômetro de coagulação automático MLA Electra 800. Cem μl de pool de plasma humano anticoagulado com citrato foram misturados com rivaroxaban e diferentes concentrações de antídoto. Antes da medida do tempo de coagulação, o reagente Tromboplastina C Plus de cérebro de coelho (Dade Behring) foi adicionado às amostras de plasma de acordo com as instruções do fabricante. A adição de 1,9 μM de antídoto recombinante produziu uma correção de 100% da anticoagulação produzida por 1 μM de rivaroxaban.

Exemplo 13. Reversão in vitro de Apixaban por Antídoto-r

Na Tabela 18, o efeito da proteína do antídoto recombinante sobre a reversão de anticoagulação por apixaban foi testado em um ensaio de coagulação de plasma humano. Como relatado por Pinto e col., *J. Med. Chem.* 55(22): 5.339-5.356, 2007, as medidas do tempo de protrombina (PT) são um método preciso para avaliar os efeitos anticoagulantes ex vivo de apixaban. O efeito de 1 μM e 1,5 μM de apixaban sobre a prolongação do tempo de

protrombina (PT) de pool de plasma humano e sobre a reversão do efeito inibidor foi medido por um cronômetro de coagulação automático MLA Electra 800. Cem µl de pool de plasma humano anticoagulado com citrato foram misturados com apixaban e diferentes concentrações de antídoto. Antes da medida do tempo de coagulação, reagente Tromboplastina C Plus de cérebro de coelho (Dade Behring) foi adicionado às amostras de plasma de acordo com as instruções do fabricante. A adição de 1,9 µM de antídoto recombinante produziu uma correção de 97% da anticoagulação produzida por 1,5 µM de apixaban.

Exemplo 14. Inibição in vitro de Argatroban por fXa anidro des-Gla

Para medir a inibição da atividade de trombina por argatroban e a reversão de seu efeito inibidor, trombina humana purificada (5 nM), argatroban (50 nM) e diferentes concentrações de antídoto fXa des-Gla anidro foram adicionados a um tampão contendo 20 mM de Tris, 0,15 M de NaCl, 5 mM de cloreto de cálcio, albumina sérica bovina 0,1%, pH 7,4. Após incubação em temperatura ambiente por 20 min, um substrato amidolítico S2288 (200 uM) foi adicionado à mistura e a taxa de clivagem de substrato de p-nitroanilida foi monitorada por absorbância a 405 nm. Os resultados são apresentados na Figura 12.

Deve-se entender que, embora a invenção tenha sido descrita em conjunto com as modalidades acima, a descrição e os exemplos apresentados anteriormente visam ilustrar, e não limitar, o escopo da invenção. Outros aspectos, vantagens e modificações dentro do escopo da invenção ficarão evidentes para aqueles habilitados na técnica à

qual a invenção pertence.

Tabela 13 - Correlação PK-PD em camundongos tratados com Antídoto-pd a 1,5 hora após administração oral de 15 mg/kg de Betrixaban (5 minutos após injeção do antídoto)

Animal tratado com Antídoto-pd	1	2	3	4	5	6	7	Média
Betrixaban (ng/ml)	673	793	1170	415	217	664	879	687
INR esperada	4,2	4,5	5,2	3,3	2,3	4,1	4,7	4,0
INR medida	2,3	2,3	3,3	0,8	0,8	1,5	2,0	1,9
% de correção	63,9	66,6	52,3	100	100	83,1	74,4	77,2

5 **Tabela 14 - Correlação PK-PD em camundongos tratados com Antídoto-r a 1,5 hora após administração oral de 15 mg/kg de Betrixaban (5 min após injeção do antídoto)**

Animal tratado com Antídoto-r	1	2	3	4	Média
Betrixaban (ng/ml) 434	262	335	494	381	
INR esperada	3,2	2,5	2,8	3,5	3,0
INR medida	2,0	0,9	1,2	0,9	1,3
% de correção	50,0	94,1	80,0	93,6	77,3

Tabela 15 - % de correção da inibição por inibidores de fXa

Antídoto-pd (nM)	Betrixaban	Rivaroxaban	Apixaban
0	0	0	0
10,2	13,1	10,6	6,5
20,4	34,8	37,4	11,4

40,7	47,1	46,8	15,0
61,1	68,4	55,7	40,3
101,8	67,5	69,4	52,3
162,9	80,5	74,0	56,0
203,7	82,6	72,6	60,2

Tabela 16 - % de correção da inibição por inibidores de fXa

Antídoto-r (nM)	Betrixaban	Rivaroxaban	Apixaban
0	0	0	0
9,3	21,5	23,2	13,3
18,6	52,7	54,2	33,5
37,2	75,5	72,6	49,9
55,8	86,5	79,9	59,2
93,1	94,9	89,1	64,4
148,9	99,3	96,7	74,8
186,1	99,5	94,8	72,6

Tabela 17 - Reversão por Antídoto-r da atividade anticoagulante de betrixaban

	aPTT (seg)	Nº de vezes de aumento	% de correção da anticoagulação
Plasma humano de controle	35,2	1,00	-
300 nM de Betrixaban	61,8	1,76	-
300 nM de Betrixaban + 570 nM de Antídoto-r	38,3	1,09	88
300 nM de Betrixaban + 760 nM de Antídoto-r	38,2	1,09	88
300 nM de Betrixaban +	38,1	1,08	90

1140 nM de Antídoto-r			
400 nM de Betrixaban	66,3	1,88	-
400 nM de Betrixaban + 380 nM de Antídoto-r	47,1	1,34	61
400 nM de Betrixaban + 570 nM de Antídoto-r	39,9	1,13	85
400 nM de Betrixaban + 760 nM de Antídoto-r	39,9	1,13	85
400 nM de Betrixaban + 1140 nM de Antídoto-r	37,8	1,07	92
400 nM de Betrixaban + 1520 nM de Antídoto-r	39,4	1,12	86
1140 nM de Antídoto-r	38,9	1,11	-
1520 nM de Antídoto-r	38,8	1,10	-

Tabela 18 - Reversão por Antídoto-r da atividade anticoagulante de Apixaban

	PT (seg)	Nº de vezes de aumento
Plasma humano de controle	14,1	-
1 µM de apixaban	16,4	1,16
1 µM de apixaban + 380 nM de Antídoto-r	15,3	1,09
1 µM de apixaban + 760 nM de Antídoto-r	14,9	1,06
1 µM de apixaban + 1,14 µM de Antídoto-r	14,2	1,01
1 µM de apixaban + 1,52 µM de Antídoto-r	14,2	1,01
1,5 µM de apixaban	18,4	1,31
1,5 µM de apixaban + 1,52 µM de	14,6	1,04

Antídoto-r		
1,5 µM de apixaban + 1,90 µM de Antídoto-r	14,3	1,01
1,52 µM de Antídoto-r	14	-
1,90 µM de Antídoto-r	14,2	-

TABELA 1- ID. DE SEQ. N° 1 - SEQUÊNCIA DE POLIPEPTÍDEO DE FATOR X HUMANO

1	MGRPLHLVLL	SASLAGLLLL	GESLFIRREQ	ANNILARVTR	ANSFLEEMKK	GHLERECMEE
61	TCSYEEAREV	FEDSDKTNEF	WNKYKDGDQC	ETSPCQNOGK	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN
121	CELFTRKLC	LDNGDCDQFC	HEEQNSVVC	CARGYTLADN	GKACIPTGPY	PCGKQTLERR
181	KRSVAQATSS	SGEAPDSITW	KPYDAADLDP	TENPFDLLDF	NQTQPERGDN	NLTRIVGGQE
241	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE
301	AVHEVEVVIK	HNRFTKETD	FDIAVLRKLT	PITFRMNVAP	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI
361	VSGFGRTHEK	GRQSTRKML	EVPIVDRNSC	KLSSSFIIITQ	NMFCAGYDTK	QEDACQGDG
421	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFLK	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE
481	VITSSPLK					

TABELA 2 - ID. DE SEQ. N° 2 - UMA SEQUÊNCIA DE POLINUCLEOTÍDEO CODIFICADORA DE FATOR X

1	gactttgctc	cagcagcctg	tcccagtgag	gacagggaca	cagtactcgg	ccacaccatg
61	gggcgcccac	tgcacctcgt	cctgctcagt	gcctccctgg	ctggcctcct	gctgctcggg
121	gaaagtctgt	tcacccgcag	ggagcaggcc	aacaacatcc	tggcgagggt	cacgagggcc
181	aattcctttc	ttgaagagat	gaagaaagga	cacctcgaaa	gagagtgcac	ggaagagacc
241	tgctcatacg	aagaggcccg	cgaggtcttt	gaggacagcg	acaagacgaa	tgaattctgg
301	aataaatata	aagatggcga	ccagtgtgag	accagtccct	gccagaacca	gggcaaatgt
361	aaagacggcc	tccgggaata	cacctgcacc	tgtttagaag	gattcgaagg	caaaaactgt
421	gaattattca	cacggaagct	ctgcagcctg	gacaacgggg	actgtgacca	gttctgccac
481	gaggaacaga	actctgtggt	gtgctcctgc	gcccgcgggt	acaccctggc	tgacaacggc
541	aaggcctgca	ttcccacagg	gccctacccc	tgtgggaaac	agaccctgga	acgcaggaag
601	aggtcagtg	cccaggccac	cagcagcagg	ggggaggccc	ctgacagcat	cacatggaag
661	ccatatgatg	cagccgacct	ggacccacc	gagaaccctt	tcgacctgct	tgacttcaac
721	cagacgcagc	ctgagagggg	cgacaacaac	ctcaccagga	tcgtgggagg	ccaggaatgc
781	aaggacgggg	agtgtccctg	gcaggccctg	ctcatcaatg	aggaaaacga	gggtttctgt
841	ggttgaacca	ttctgagcga	gttctacatc	ctaacggcag	cccactgtct	ctaccaagcc
901	aagagattca	aggtgagggt	aggggaccgg	aacacggagc	aggaggaggg	cgggtgaggc
961	gtgcacgagg	tggagggtgt	catcaagcac	aaccggttca	caaaggagac	ctatgacttc
1021	gacatcgccg	tgctccggct	caagaccccc	atcaccttcc	gcatgaacgt	ggcgccctgc
1081	tgccctcccc	agcgtgactg	ggccgagctc	acgctgatga	cgcagaagac	ggggattgtg
1141	agcggtcttc	ggcgacacca	cgagaagggc	cggcagtcga	ccaggctcaa	gatgctggag
1201	gtgccctacg	tggaccgcaa	cagctgcaag	ctgtccagca	gcttcatcat	caccagaac
1261	atgttctgtg	ccggtacaga	caccaagcag	gaggatgect	gccaggggga	cagcgggggc
1321	ccgcacgtca	cccgettcaa	ggacacctac	ttcgtgacag	gcacgctcag	ctggggagag
1381	ggctgtgccc	gtaaggggaa	gtacgggatc	tacaccaagg	tcaccgcctt	cctcaagtgg
1441	atcgacaggt	ccatgaaaac	caggggcttg	cccaaggcca	agagccatgc	cccggaggtc
1501	ataacgtcct	ctccattaaa	gtgagatccc	actcaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa

TABELA 3- ID. DE SEQ. N° 3- SEQUÊNCIA DE POLIPEPTÍDEO DE FATOR X HUMANO MADURO

1	ANSFLEEMKK	GHLERECMEE	TCSYEEAREV	FEDSDKTNEF	WNKYKGDQDC	ETSPCQNQGGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLCS	LDNGDCDQFC	HEEQNSVVC	CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLERR	KRSVAQATSS	SGEAPDSITW	KPYDAADLDP	TENPFDLLDF
181	NQTQPERGDN	NLTRIVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAACHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFTKETYD	FDIAVLRLKT	PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRLKML	EVPIYVDRNSC	KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG	LPAKASHAPE	VITSSPLK			

TABELA 4- ID. DE SEQ. N° 4- SEQUÊNCIA DE POLIPEPTÍDEO DE FATOR Xa SEM DOMÍNIO GLA DESPROVIDO DE 1 A 44 RESÍDUOS DE AMINOÁCIDO

Cadeia Leve	
1	KDGDQC ETSPCQNQGGK
61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVC
121	GKACIPTGPY PCGKQTLER
Cadeia Pesada	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAACHCLYQ
241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDIAVLRLKT PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EVPIYVDRNSC KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK QEDACQGDG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG LPAKASHAPE VITSSPLK

TABELA 5- ID. DE SEQ. N° 5- SEQUÊNCIA DE POLIPEPTÍDEO DE FATOR Xa SEM DOMÍNIO GLA DESPROVIDO DE 1 A 45 RESÍDUOS DE AMINOÁCIDO

Cadeia Leve	
1	DGDQC ETSPCQNQGGK
61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVC
121	GKACIPTGPY PCGKQTLER
Cadeia Pesada	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAACHCLYQ
241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDIAVLRLKT PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EVPIYVDRNSC KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK QEDACQGDG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG LPAKASHAPE VITSSPLK

TABELA 6- ID. DE SEQ. N° 6- SEQUÊNCIA DE POLIPEPTÍDEO DE FATOR Xa HUMANO ATIVADO ANTES DA PÓS-TRADUÇÃO DE ÁCIDO GLUTÂMICO PARA ÁCIDO γ -CARBOXIGLUTÂMICO

Cadeia Leve	
1	ANSFLEEMKK GHLERECMEE TCSYEEAREV FEDSDKTNEF WNKYKDGQDC ETSPCQNOGK
61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVCSC ARGYTLADN
121	GKACIPTGPY PCGKQTLER
Cadeia Pesada	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETVD FDIAPVRLKT PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRKML EYPYVDRNSC KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK QEDACQGDSC GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG LPAKSHAPE VITSSPLK

TABELA 7- ID. DE SEQ. N° 7- SEQUÊNCIA DE POLIPEPTÍDEO DE FATOR Xa HUMANO ATIVADO COM A PÓS-TRADUÇÃO DE ÁCIDO GLUTÂMICO PARA ÁCIDO γ -CARBOXIGLUTÂMICO (γ REPRESENTA RESÍDUO DE ÁCIDO γ -CARBOXIGLUTÂMICO)

Cadeia Leve	
1	ANSFLEEMKK GHLERECMEE TCSYEEAREV FEDSDKTNEF WNKYKDGQDC ETSPCQNOGK
61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVCSC ARGYTLADN
121	GKACIPTGPY PCGKQTLER
Cadeia Pesada	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETVD FDIAPVRLKT PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRKML EYPYVDRNSC KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK QEDACQGDSC GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG LPAKSHAPE VITSSPLK

TABELA 8- ID. DE SEQ. N° 8- SEQUÊNCIA DE POLIPEPTÍDEO DE CADEIA LEVE DE FATOR Xa HUMANO ATIVADO COM A PÓS-TRADUÇÃO DE ÁCIDO GLUTÂMICO PARA ÁCIDO γ -CARBOXIGLUTÂMICO

Cadeia Leve	
1	ANSFLYMKK GHLRYCMY TCSYYYARV FYDSKTYNF WNKYKDGQDC ETSPCQNOGK
61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVCSC ARGYTLADN
121	GKACIPTGPY PCGKQTLER

TABELA 9- ID. DE SEQ. N° 9 - SEQUÊNCIA DE POLIPEPTÍDEO DE CADEIA PESADA DE FATOR Xa HUMANO ATIVADO

181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETVD FDIAPVRLKT PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRKML EYPYVDRNSC KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK QEDACQGDSC GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG LPAKSHAPE VITSSPLK

TABELA 10- ID. DE SEQ. N° 10 - SEQUÊNCIA DE POLIPEPTÍDEO DE FATOR Xa ANIDRO DES-GLA (Ã REPRESENTA DESIDROALANINA)

5	Cadeia Leve	
	1	KDGDQC
	ETSPCQNQGK	
	61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVCS
	CARGYTLADN	
	121	GKACIPTGPY PCGKQTLER
	Cadeia Pesada	
	181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY
	ILTAAHCLYQ	
	241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETD FDI AVLRLKT
	PITFRMNVAP	
	301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EPPYVDRNSC
	KLSSSFIITQ	
	361	NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG
	IYTKVTAFLK	
	421	WIDRSMKTRG LPAKSHAPE VITSSPLK

TABELA 11- ID. DE SEQ. N° 11 - SEQUÊNCIA DE POLIPEPTÍDEO DE

10 FATOR Xa-S379A DES-GLA

15	Cadeia Leve	
	1	DGDQC
	ETSPCQNQGK	
	61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVCS
	CARGYTLADN	
	121	GKACIPTGPY PCGKQTLER
	Cadeia Pesada	
	181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY
	ILTAAHCLYQ	
	241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETD FDI AVLRLKT
	PITFRMNVAP	
	301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EPPYVDRNSC
	KLSSSFIITQ	
	361	NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG
	IYTKVTAFLK	
	421	WIDRSMKTRG LPAKSHAPE VITSSPLK

20 TABELA 12- ID. DE SEQ. N° 12 - SEQUÊNCIA DE POLIPEPTÍDEO DE
FATOR Xa HUMANO TRIPLO MUTANTE ANTES DA REMOÇÃO DO LIGANTE
-RKRRKR-

25	Cadeia Leve	
	1	ANSFL F WNKYKDGDQC ETSPCQNQGK
	61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVCS CARGYTLADN
	121	GKACIPTGPY PCGKQTLER
	Linker	
	RKRRKR	
	Cadeia Pesada	
	181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
	241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP
	301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EPPYVDRNSC KLSSSFIITQ
	361	NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
	421	WIDRSMKTRG LPAKSHAPE VITSSPLK

30 TABELA 12a- ID. DE SEQ. N° 13 - SEQUÊNCIA DE POLIPEPTÍDEO

DE FATOR Xa HUMANO TRIPLO MUTANTE APÓS A REMOÇÃO DO LIGANTE
-RKRRKR-

5

Cadeia Leve	
1 ANSFL	F WNKYKDGQDC ETSPCQNGK
61 CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVC	CARGYTLADN
121 GKACIPTGPY PCGKQTLER	
Cadeia Pesada	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241 AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETD FDI AVLRLKT	PITFRMNVAP
301 ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRKLML	EVPIVDRNSC KLSSSFIITQ
361 NMFCAGYDTK QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
421 WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPLK	

TABELA 12b- ID. DE SEQ. N° 14 - SEQUÊNCIA DE POLIPEPTÍDEO
DE FRAGMENTO DA CADEIA LEVE DO FATOR Xa HUMANO TRIPLO
MUTANTE APÓS A SECREÇÃO

1 ANSFL	F WNKYKDGQDC ETSPCQNGK
61 CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVC	CARGYTLADN
121 GKACIPTGPY PCGKQTLER	

TABELA 12c- ID. DE SEQ. N° 15 - SEQUÊNCIA DE POLIPEPTÍDEO
DE FRAGMENTO DA CADEIA PESADA DO FATOR Xa HUMANO TRIPLO
MUTANTE APÓS A SECREÇÃO

20

Cadeia Leve	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241 AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETD FDI AVLRLKT	PITFRMNVAP
301 ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRKLML	EVPIVDRNSC KLSSSFIITQ
361 NMFCAGYDTK QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
421 WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPLK	

TABELA 19- ID. DE SEQ. N° 16 - SEQUÊNCIA DE POLIPEPTÍDEO DE
CODIFICADORA DE r-ANTÍDOTO (UM FATOR X TRIPLO MUTANTE)

1	ATGGGGCGCC	CACATGCACCT	CGTCCTGATC	AGTGCCTCCC	TGGCTGGCCT	CCTGCTGCTC	GGGGAAAGTC	TGTTATATCC	CAGGAGCAG	GCCAAACAACA
101	TCCTGGCGAG	GGTCACGAGG	GCCAAATTCCT	TTCTTTTCTG	GAATAAATAC	AAAGATGGCG	ACCAATGTGA	GACCAATCCT	TGCCAGAACC	AGGCAAAATG
201	TAAAGACGGC	CTCGGGGAAT	ACACCTGCAC	CTGTTTAGAA	GGATTGGAAG	GCAAAACTG	TGAATTATTC	ACAAGGAAGC	TCTGCAGCCT	GGACAACGGG
301	GACTGTGACC	AGTTCTGCCA	CGAGGGAACAG	AACCTCTGCG	TGTGCTCCTG	CGCCCGCGGG	TACACCTTGG	CTGACAACGG	CAAGGCCCTGC	ATTCCACACAG
401	GGCCCTACCC	CTGTGGGAAA	CAGACCCCTGG	AACGCAGGAA	GAGGAGGAAG	AGGATCGTGG	GAGGCCAGGA	ATGCAAGGAC	GGGAGTGTTC	CCTGGCAGGC
501	CCTGCTCATC	AATGAGGAAA	ACGAGGGTTT	CTGTGGTGGG	ACCAATCTGA	GGAGTTCTTA	CATCCTAACG	GCAGCCCACT	GTCTCTACCA	AGCCAAGAGA
601	TTCAAGGTGA	GGGTAGGGGA	CCGGAACAAG	GAGCAGGAGG	AGGGUGGTGA	GGCGGTGCAC	GAGGTGGAGG	TGCTCATCAA	GCACAACCCG	TTACACAAGG
701	AGACCTATGA	CTTGGACATC	GCCGTCCTCC	GGCTCAAGAC	CCCCATCACC	TTCCGCATGA	ACGTGGCGCC	TGCTTGCCCTC	CCCGAGCGTG	ACTGGGCCGA
801	GTCCACGCTG	ATGACGCGGA	AGACGGGGAT	TGTGAGCGGC	TTCCGGCGCA	CCCACGAGPA	GGGCCGGCAG	TCCACCAGGC	TCAAGATGCT	GGAGGTGCCC
901	TACGTGGACC	GCAACAGCTG	CAAGCTGTCC	AGCAGCTTCA	TCATCACCCA	GAACATGTTT	TGTGCCGGCT	ACGACACCAA	GCAGGAGGAT	GCTTGCCAGG
1001	GGGACGCAAG	GGGCCCGCAC	GTACCCCGCT	TCAGGACAC	CTACTTCGTG	ACAGGATCG	TCAGCTGGGG	AGAGGGCTGT	GGCCGTAAAG	GGAAGTACGG
1101	GATCTACACC	AAGGTCACCG	CCTTCCCTCAA	GTGGATCGAC	AGGTCCATGA	AAACCAGGGG	CTTGCCCCAAG	GCCAAGAGCC	ATGCCCCCGA	GGTCATAACG
1201	TCCTCTCCAT	TAAAGTGA								

TABELA 20- ID. DE SEQ. N° 18 - SEQUÊNCIA DE POLIPEPTÍDEO DO
VETOR DE EXPRESSÃO DO r-ANTÍDOTO

ω	25	20	15	10	5					
1	TCATGACACA	GTAATCGGCC	ACACCATGGG	GGCCCCACTG	CACCTCGTCC	TGCTCAGTGC	CTCCCTGGCT	GGCTCTGTC	TGCTCTGGGA	AAGTCTGTTC
101	ATCCGCAGGG	AGCAGGCCAA	CAACATCCTG	GGAGGGGTCA	CGAGGGCCAA	TTCTTTCTTT	TTCTTGAATA	AATACAAAGA	TGGCACCAG	TGTGAGACCA
201	GTCTTTGCCA	GAACATGGGC	AAATGTAAAG	ACGGCTCTGG	GGAAATACACC	TGCACCTGTT	TAGAAGGATT	CGAAGGCCAA	AACGTGCAAT	TATTCACACG
301	GAAGCTCTGC	AGCTTGACA	ACGGGACATG	TGACCATCTC	TGCCACGAGG	AACAGAACTC	TGTGGTGTGC	TCCTGGGCC	CGGGGTACAC	CCTGGCTGAC
401	AACGGCAAG	CCTGCATTCC	CACAGGGGCC	TACCCCTGTG	GGAAACAGAC	CCTTGAACGC	AGGAAGAGGA	GGAAGAGGAT	CGTGGGAGC	CAGGAATGCA
501	AGGACGGGGA	GTGTCTCTGG	CAGGCCCTGC	TCAATCAATGA	GGAAACAGAG	GGTTTCTGTG	GTGGAACCAT	TTCTAGCCAG	TTCTACATTC	TAACGGCAGC
601	CACTGTCTC	TACCAAGCCA	AGAGATTCAA	GGTGAAGGTA	GGGACCCGGA	ACACGGAGCA	GTGAGAGGCG	GTGAGAGGCG	TGCACAGAGT	GGAGGTGCTC
701	ATCAAGCACA	ACCGGTTTCA	AAAGGAGACC	TATGACTTCC	GCATCGCCGT	GCTCGGGCTC	AAGACCCCCA	TCACTTCCG	CATGAAGCTG	GCCTCTGCC
801	GCCTCCCGA	GCCTGACTGG	GCCGAGTCCA	CGCTGATGAC	GCAGAAGACG	GGGATGTGTA	GGGGCTTCCG	GGCACCACC	GAGAAGGGCC	GGCAGTCCAC
901	CAGGCTCAAG	ATGCTGGAGG	TGCCCTAAGT	GGACCGCAAC	AGCTGCAAGC	TGTCCAGCAG	CTTCAATCATC	ACCCAGACA	TGTTCTGTGC	CGGCTACGAC
1001	ACCAAGCAGG	AGGATGCCCTG	CCAGGGGGAC	GCAGGGGCC	CGCAGTCTAC	CCGCTTCAAG	GACACCTACT	TCGTGACAGG	CATCTCAGC	TGGGAGAGG
1101	GTGTGCCCC	TAGGGGGAAG	TACGGGATCT	ACACCAAGGT	CACCGCTTTC	CTCAAGTGA	TGCACAGGTC	CATGAACACC	AGGGCTTGC	CCAAGGCCAA
1201	GAGCCATGCC	CCGGAGGTCA	TAAAGTCTCT	TCCATTAAAG	TGAGATCCCA	CTCGGATCCC	TATTCATATAG	TGTCACCTAA	ATGCTAGAGC	TCGCTGATCA
1301	GCCTCGACTG	TGCTTCTAG	TTGCCAGCCA	TCTGTGTGTT	GCCCTTCCCG	CGTGCCTTCC	TTGACCCCTGG	AAGGTGCCAC	TCCCACTGTC	CTTTCCTAAT
1401	AAATGAGGA	AATGCTATCG	CATTGTCTGA	GTAGGTGACA	TTCTATTCTG	GGGGTGGGG	TGGGGCAGGA	CAGCAAGGGG	GAGGATTTGG	AAGACAATAG
1501	CAGGCATGCT	GGGATGCGG	TGGGCTCTAT	GGCTTCTGAG	GCAGTGGGA	CCAGCTGGGG	CTCGAGCGGC	CGCCCTTCT	GAGCGGAAA	GAACCACTG
1601	TGGAATGTGT	GTCAGTTAGG	GTGTGGAAG	TCCCCAGGCT	CCCCAGCAGG	CAGAAGTATG	CAAGCATGTC	ATCTCAATTA	GTCGCAAC	AGGTGTGAA
1701	AGTCCCCAGG	CTCCCCAGCA	GGCAGAACTA	TGCAAGCAT	GCATCTCAAT	TAGTCAGCAA	CCATAGTCCC	GCCCTTAAC	CGCCCATCC	CGCCCTAAC
1801	TCCGCCCAT	TCCGCCCAT	CTCCGCCCAT	TGGCTGACTA	ATTTTCTTAA	TTTATGAGA	GGCCGAGGCC	GCCTCGGCT	CTGAGCTATT	CCAGAAGTAG
1901	TGAGGAGGCT	TTTTTGGAGG	CCTRAGGCTTT	TGCNAAAAG	CTAGCTTCC	TGCTGCCATCA	TGGTTCCAGC	ATTGAAGTGC	ATGCTCGCG	TGTCCCAAAA
2001	TATGGGGATT	GGCAAGAACG	GAGACCTACC	CTGGCCCTCG	CTCAGGAAAG	AGTTCAAGTA	CTTCCNAAA	ATTGACCAAA	CTCTTTCAGT	GGAAGGTAAA
2101	CAGATCTGG	TGATATATGG	TAGGAARACC	TGGTCTCTCA	TTCTTGAGAA	GAATCGACCT	TTAAAGGACA	GAATTAATAT	AGTTCTCAGT	AGAGAATCA
2201	AAGAACCACC	ACGAGGAGCT	CATTCTCTTG	CCAAAAGTTT	GGATGATGCC	TTAAGACTTA	TTGACAAACC	GGAAATGGCA	AGTAAAGTAG	ACATGGTTTG
2301	GATAGTCCGA	GGCAGTCTTG	TTTACCAGGA	AGCCATGAAT	CAACCAGGCC	ACCTTAGACT	CTTTGAGACA	AGGATCATGC	AGGAATTTGA	AAGTGACACG
2401	TTTTTCCAG	AAATTGATTT	GGGAAATAT	AACTTCTTCC	CAGAATACCC	AGCGTCTCTC	TCTGAGGTCC	AGGAGGAAA	AGGCATCAAG	TATAAGTTTG
2501	AGTCTACGA	GAAGAAGAC	TAACAGGAAG	ATGCTTTTCA	GTCTCTGCT	CCCTCTCTAA	AGCTATGCTAT	TTTTATAGA	CCATGGGACT	TTTGCTGGCT
2601	TTAGATCCCG	CGGAGATCCA	GACATGATA	GATACATGTA	TGAGTTTGG	CAACACCAA	CTAGAATGCA	GTGAAAAAA	TGCTTTATTT	GTGAATTTG
2701	TGATGCTATT	GCTTTATTTG	TAACTATTA	AAAGTGCAT	AAACAAAGTA	ACAACACAA	TTGCTATCAT	TTTATGTCTC	AGGTTACAGG	GGAGGTGTGG
2801	GAGGTTTTTT	AAAGCAAGTA	AAACTCTAC	AAATGTGTA	TGGCTGATTA	TGAGTCTCAG	CTTTTGTTC	CTTTAGTAG	GGTAAATTC	GGCTTTGGCG
2901	TAATCATNGT	CATAGCTGTT	TCCTGTGTGA	AATTGTTATC	CGCTCACAT	TCCACAGAAC	ATACGAGCG	GAAGCATAAA	GTGTAAGCC	TGGGGTGCCT
3001	AATGAGTGAG	CTAATCTACA	TTAATTGCGT	TGCGTCTACT	GCCCGCTTTC	CAGTCGGAA	ACCTGTCTG	CCAGCTGCAT	TAATGAATCG	GCCAACGGCG
3101	GGGGAGAGGC	GGTTTGGCGTA	TTGGGCGCTC	TTCCGCTTCC	TGCTCTACTG	ACTCGCTGCG	CTCGGTGCTT	CGGCTCGGC	GAGCGGTATC	AGCTCACTCA
3201	AAAGCGGTAA	TACGGTTATC	CACAGAATCA	GGGATTAACG	CAGGAAGAA	CATGTGAGCA	AAAGGCCAGC	AAAGGCCAG	GAACCGTAAA	AAGGCCGCGT
3301	TGCTGGCGTT	TTTCCATAGG	CTCCGCCCCC	CTGACGAGCA	TCACAAAAT	CGACGCTCAA	GTACAGAGTG	GCAGAACCCG	ACAGGACTAT	AAAGATACCA
3401	GGCGTTTCCC	CCTTGGAGCT	CCCTCGTGGG	CTCTCTGTGT	CCGACCTTGC	CGCTTACCGG	ATACTGTTC	GCCTTCTTCC	CTTCGGGAAG	CGTGGCGCTT
3501	TCTCATAGCT	GATATCTAG	GTATCTCACT	TGGGTGATAG	TGCTTCTGCTC	CAAGCTGGG	TGTGTGACG	AACCCCGCT	TCAGCCGAC	CGCTGCGCT
3601	TATCCGGTAA	CTATCTGCTT	GAGTCCAAAC	CGGTAAAGCA	CGACTTATCG	CCACTTGGCAG	CAGCCACTGG	TAAACAGATT	AGCAGAGCGA	GGTATGTAGG
3701	CGGTGCTACA	GAGTCTTGA	AGTGGTGGCC	TAACTACGGC	TACACTAGAA	GGACAGTAT	TGGTATCTGC	GCCTGTGTA	AGCCAGTTAC	CTTCGAAAA
3801	AGAGTTGGTA	GCTCTTGATC	CGGCAACCAA	ACCACCGCTG	GTAGCGGTGG	TTTTTTTGTG	TGCAAGCAGC	AGATTACCG	CAGAAAAAAA	GGATCTCARG

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um derivado da proteína do fator Xa que se liga ao inibidor do fator Xa e não se agrega em um complexo de protrombinase caracterizado pelo fato de que é no
5 preparo de um medicamento para a prevenção ou redução de sangramento em um indivíduo submetido à terapia anticoagulante com um inibidor do fator Xa.

2. Uso de um derivado da proteína Xa que se liga ao inibidor do fator Xa e não se agrega em um complexo de
10 protrombinase caracterizado pelo fato de que é no preparo de um medicamento para ligar e inibir seletivamente um inibidor do fator Xa administrado exogenamente em um indivíduo.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2,
15 caracterizado pelo fato de que o derivado da proteína do fator Xa se liga ao inibidor do fator Xa direta ou indiretamente.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o derivado possui atividade pró-coagulante
20 reduzida ou ausente.

5. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, caracterizado pelo fato de que o derivado é um derivado da proteína do fator Xa deficiente em Gla ou uma proteína des-Gla do fator Xa.

25 6. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que o derivado possui um sítio ativo modificado.

7. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que o
30 derivado compreende pelo menos os resíduos de aminoácido de

46 a 448 do ID. DE SEQ. N° 3 ou um equivalente destes.

8. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7, caracterizado pelo fato de que o derivado compreende pelo menos os resíduos de aminoácido de 5 46 a 139 e de 195 a 448 do ID. DE SEQ. N° 3 ou um equivalente destes.

9. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que o derivado é desprovido de uma cadeia leve de fXa e contém um 10 domínio catalítico de serina-protease presente na cadeia pesada.

10. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9, caracterizado pelo fato de que o derivado é um polipeptídeo que compreende a sequência de 15 aminoácidos do ID. DE SEQ. N° 5.

11. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10, caracterizado pelo fato de que o derivado inclui um domínio catalítico opcionalmente modificado química ou recombinantemente para perder a 20 atividade proteolítica, mas manter características estruturais necessárias à ligação, o referido domínio derivado de:

- a. Proteases de mamíferos selecionadas do grupo que consiste em calicreína, trombina e tripsina plasmáticas; ou
- 25 b. Protease bacteriana subtilisina.

12. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que o derivado compreende uma sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N° 7 com uma cadeia leve 30 modificada ou um equivalente desta.

13. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12, caracterizado pelo fato de que o derivado compreende uma cadeia leve modificada para reduzir a ligação da membrana de fosfolipídeo.

14. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou 13, caracterizado pelo fato de que a cadeia leve modificada compreende pelo menos uma substituição, adição ou eliminação de aminoácido no domínio Gla, quando comparada com o domínio Gla de uma proteína do fator Xa humano do tipo selvagem.

15. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que o derivado é selecionado do grupo que consiste em uma proteína não carboxilada, subcarboxilada e descarboxilada do fator Xa.

16. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que o derivado compreende a cadeia pesada do ID. DE SEQ. N° 7 que é modificada, ou um equivalente desta.

17. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16, caracterizado pelo fato de que o derivado é modificado por pelo menos uma substituição de aminoácido de um aminoácido selecionado do grupo que consiste em Glu216, Glu218, Arg332, Arg347, Lys351 e Ser379.

18. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ou 17, caracterizado pelo fato de que Ser379 é modificada para

desidro-alanina ou alanina.

19. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que o derivado é des-Gla anidro-fXa que possui uma sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N° 10 ou um equivalente desta.

20. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ou 19, caracterizado pelo fato de que o derivado é des-Gla fXa-S379A que possui uma sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N° 11 ou um equivalente desta.

21. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20, caracterizado pelo fato de que o derivado possui interação reduzida com ATIII, co-fatores fV/fVa e/ou fVIII/fVIIIa, e compreende uma sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N° 7 ou um equivalente desta.

22. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou 21, caracterizado pelo fato de que o derivado compreende a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N° 12 ou 13 ou 15 ou um polipeptídeo que possui pelo menos 80% de homologia para o ID. DE SEQ. N° 12 ou 13 ou 15.

23. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22, caracterizado pelo fato de que o derivado possui pelo menos uma substituição de aminoácido na posição de aminoácido Arg306, Glu310, Arg347, Lys351, Lys414 ou Arg424.

24. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 ou 23, caracterizado pelo fato de que o derivado possui uma modificação no domínio EGF, a referida modificação sendo selecionada do grupo que consiste na
5 eliminação do domínio EGF1, eliminação do domínio EGF2 e eliminação tanto do domínio EGF1 quanto do domínio EGF2.

25. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ou 24, caracterizado pelo fato de
10 que o derivado é conjugado a uma porção capaz de prolongar a meia-vida circulante do derivado.

26. Uso, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a porção é selecionada do grupo que consiste em polietileno glicol, um grupo acil, um
15 lipossomo, um agente de encapsulação, uma proteína transportadora, uma membrana de fosfolípídeo artificial, uma nanopartícula, fragmento de peptídeo Fc, uma proteína quimérica que compreende um domínio do transportador de Fc e derivado de fXa e combinações destes.

20 27. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ou 26, caracterizado pelo fato de que o método ainda compreende a administração de uma quantidade eficaz de um agente que prolonga a meia-vida
25 circulante do derivado.

28. Uso, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o agente é um anticorpo anti-fXa que reconhece e se liga especificamente ao
exosítio de fXa ou a um derivado de fXa ligado à alfa-2-
30 macroglobulina.

29. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28, caracterizado pelo fato de que o inibidor do fator Xa é selecionado do grupo que consiste em fondaparinux, idraparinux, idraparinux biotinilado, enoxaparina, fragmina, NAP-5, rNAPc2, inibidor da via do fator tecidual, DX-9065a, YM-60828, YM-150, apixaban, rivaroxaban, PD-348292, otamixaban, DU-176b, LY517717, GSK913893, razaxaban, heparina de baixo peso molecular, betrixaban ou um sal farmacologicamente aceitável destes, e combinações destes.

30. Uso, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o inibidor do fator Xa é selecionado de betrixaban, rivaroxaban, apixaban, heparina de baixo peso molecular, e combinações destes.

31. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30, caracterizado pelo fato de que o indivíduo apresenta um quadro clínico de sangramento importante selecionado do grupo que consiste em hemorragia, sangramento em órgãos vitais, sangramento que necessite de reoperação ou de um novo procedimento terapêutico e um índice de sangramento igual ou maior do que 2,0 com um sangramento visível associado.

32. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou 31, caracterizado pelo fato de que o indivíduo apresenta um quadro de sangramento selecionado do grupo que consiste em

epistaxe persistente ou recorrente, sangramento retal ou do trato urinário sem a necessidade de um procedimento terapêutico, hematomas substanciais no local de injeções, hematomas espontâneos em fora do local de injeções, 5 hematomas que ocorrem com trauma trivial, perda sangüínea substancial e sangramento que exija transfusão não planejada.

33. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 10 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 ou 32, caracterizado pelo fato de que o derivado é administrado antes de uma cirurgia.

34. Composição farmacêutica, caracterizada por compreender uma proteína de derivado de fator Xa que se 15 liga a um inibidor do fator Xa e não se agrega em um complexo de protrombinase e um veículo farmacêuticamente aceitável.

35. Polipeptídeo isolado, caracterizado por compreender a seqüência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N° 12 20 ou um polipeptídeo que possui pelo menos 80% de homologia para o ID. DE SEQ. N° 12.

36. Polipeptídeo isolado, caracterizado por compreender a seqüência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N° 12.

25 37. Polipeptídeo de duas cadeias isolado, caracterizado por compreender a seqüência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N° 13 ou um polipeptídeo que possui pelo menos 80% de homologia para o ID. DE SEQ. N° 13.

38. Polipeptídeo isolado, caracterizado por 30 compreender a seqüência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N° 15

ou um polipeptídeo que possui pelo menos 80% de homologia para o ID. DE SEQ. N° 15.

39. Conjugado peptídico, caracterizado por compreender um veículo ligado covalente ou não covalentemente a um polipeptídeo de qualquer uma das reivindicações 35, 36, 37 ou 38.

40. Conjugado peptídico, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o veículo é um lipossomo, uma micela, um polímero farmacêuticamente aceitável, ou um veículo farmacêuticamente aceitável.

41. Composição farmacêutica, caracterizada por compreender um veículo e um polipeptídeo de qualquer uma das reivindicações 35, 36, 37 ou 38.

42. Polinucleotídeo, caracterizado por codificar um polipeptídeo de qualquer uma das reivindicações 35, 36, 37 ou 38.

43. Anticorpo, caracterizado por se ligar a um polipeptídeo de qualquer uma das reivindicações 35, 36, 37 ou 38.

44. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo quimérico ou um anticorpo humanizado.

45. Fragmento biologicamente ativo caracterizado pelo fato de ser do Anticorpo, de acordo com a reivindicação 43.

46. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é marcado de forma detectável.

47. Composição caracterizada por compreender o Anticorpo da reivindicação 43 e um veículo.

48. Composição caracterizada por compreender o anticorpo fragmento da reivindicação 45.

49. Complexo anticorpo-peptídeo, caracterizado por compreender o Anticorpo da reivindicação 46 e um
5 polipeptídeo que se liga especificamente ao anticorpo.

50. Complexo, de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é o polipeptídeo contra o qual o anticorpo é desenvolvido.

51. Complexo, de acordo com a reivindicação 49,
10 caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo quimérico ou um anticorpo humanizado.

52. Método para a preparação de um polipeptídeo de qualquer uma das reivindicações 35, 36, 37 ou 38,
15 caracterizado por compreender a expressão de um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de qualquer uma das reivindicações 35, 36, 37 ou 38 em uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica.

53. Método, de acordo com a reivindicação 52,
20 caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo compreende a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N° 12 e o polinucleotídeo compreende a sequência de nucleotídeos do ID. DE SEQ. N° 16.

54. Método, de acordo com a reivindicação 52,
25 caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é uma célula de ovário de hamster chinês.

55. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 52, 53 ou 54, caracterizado ainda por compreender o isolamento do polipeptídeo.

30 56. Célula hospedeira procariótica ou eucariótica

isolada, caracterizada por compreender um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de qualquer uma das reivindicações 35, 36, 37 ou 38.

57. Composição caracterizada por compreender um
5 veículo e uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica da reivindicação 56.

58. Uso de uma composição da reivindicação 41
caracterizado pelo fato de ser no preparo de um medicamento para a prevenção ou redução de sangramento em um indivíduo
10 submetido à terapia anticoagulante com um inibidor do fator Xá.

59. Método de se ligar e inibir seletivamente um inibidor do fator Xa administrado exogenamente em um indivíduo submetido à terapia anticoagulante com um
15 inibidor do fator Xa, caracterizado por compreender a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de uma composição da reivindicação 41.

60. Método, de acordo com a reivindicação 58 ou 59, caracterizado pelo fato de que o inibidor do fator Xa é
20 selecionado do grupo que consiste em fondaparinux, idraparinux, idraparinux biotinilado, enoxaparina, fragmina, NAP-5, rNAPc2, inibidor da via do fator tecidual, DX-9065a, YM-60828, YM-150, apixaban, rivaroxaban, PD-348292, otamixaban, DU-176b, LY517717, GSK913893,
25 razaxaban, heparina de baixo peso molecular, betrixaban ou um sal farmacologicamente aceitável destes, e combinações destes.

61. Método, de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que o inibidor do fator Xa é
30 selecionado de betrixaban, rivaroxaban, apixaban, heparina

de baixo peso molecular, e combinações destes.

62. Método, de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que o derivado é administrado antes de uma cirurgia.

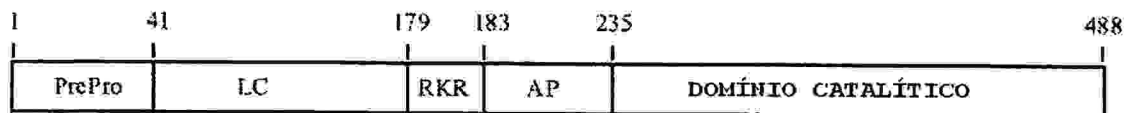


FIG. 1

Cadeia leve

	10	20	30	40	50	60
1	<u>ANSFLEEMKK GHLERECMEE TCSYBEAREV FEDSDKTNEF WNKYKGDQDC ETSPCONQGGK</u>					
	GLA DOMAIN (1-45)					
61	<u>GKPGIGGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCG LUNGDCDQFC HEEQNSVVCSS CARGYTLADN</u>					
	EGF1 (46-84)			EGF2 (85-128)		
121	<u>GKACIPTQPY PCGKQTLER</u>					

Cadeia pesada

	SVAQATSS SGEAPDSITW KPYDAADLDF TENPFDLLDF					
	(RKR) ACTIVATION PEPTIDE					
181	<u>NQTQBERGDN NLTRIVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ</u>					
	HIS236 (H57)					
241	<u>AKREFKVRVGD RNTQESEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETVD FDIIVLRKLT PITFRMNVAP</u>					
	ASP282 (D102)					
301	<u>ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRITHEK GRQSTRKML EVPYVDRNSC KLSSSEFIITQ</u>					
361	<u>NMECAGYDIK QEDACQGDSC GPHVTRFKDT YFVTGIVSEG EGCAREGKYG IYTKVTAEFK</u>					
	SER379 (S195)					
421	<u>WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPLK</u>					

FIG. 2

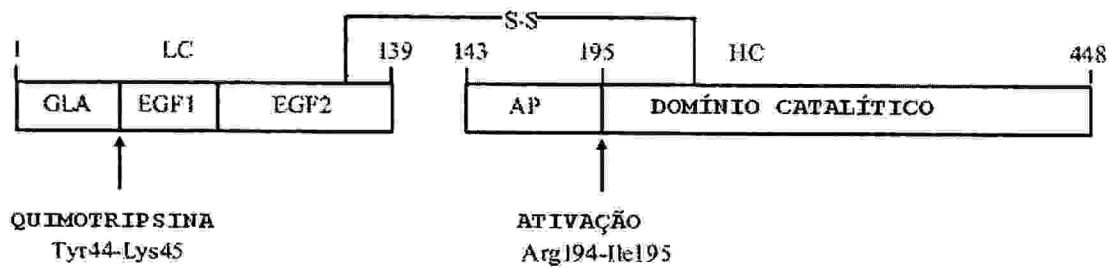


FIG. 3

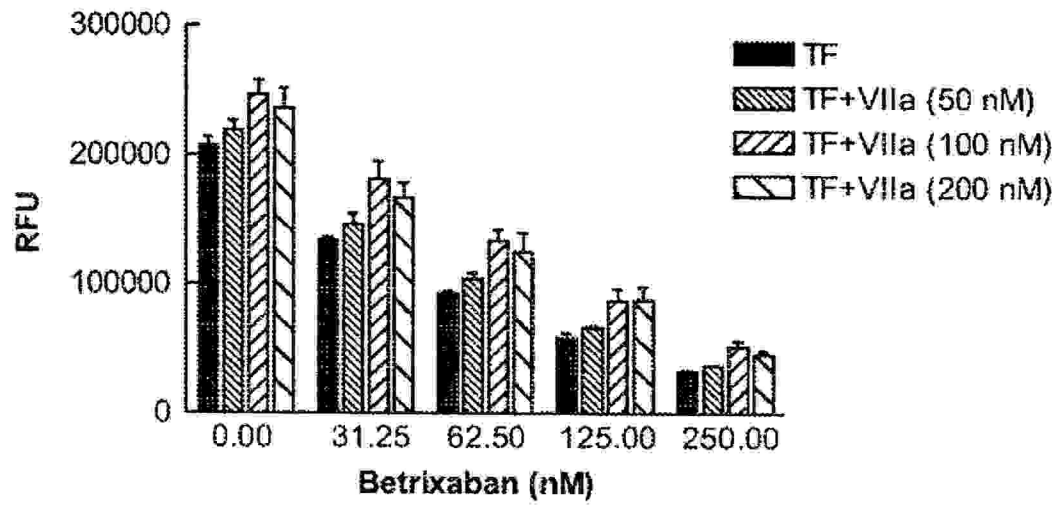


FIG. 4

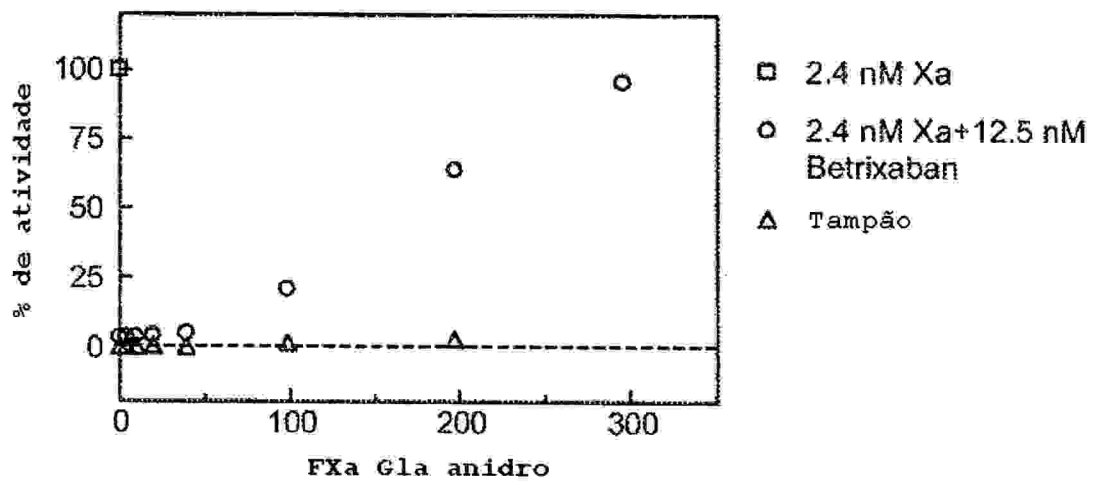


FIG. 5

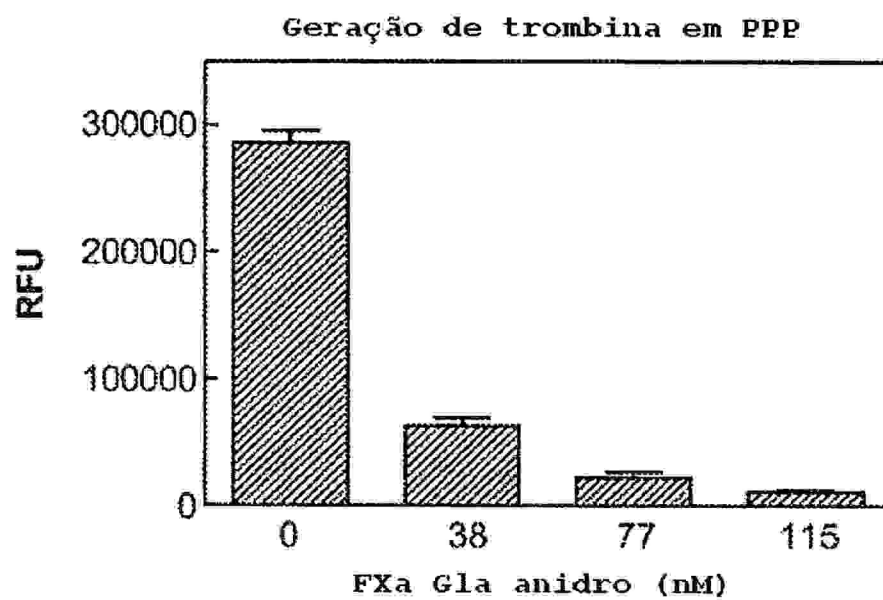


FIG. 6

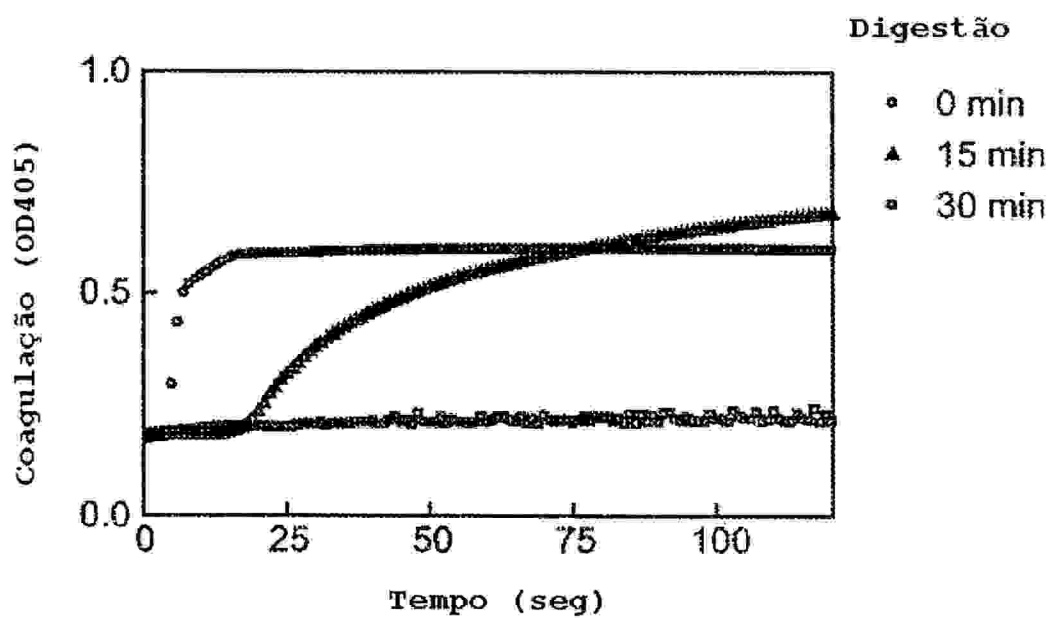


FIG. 7

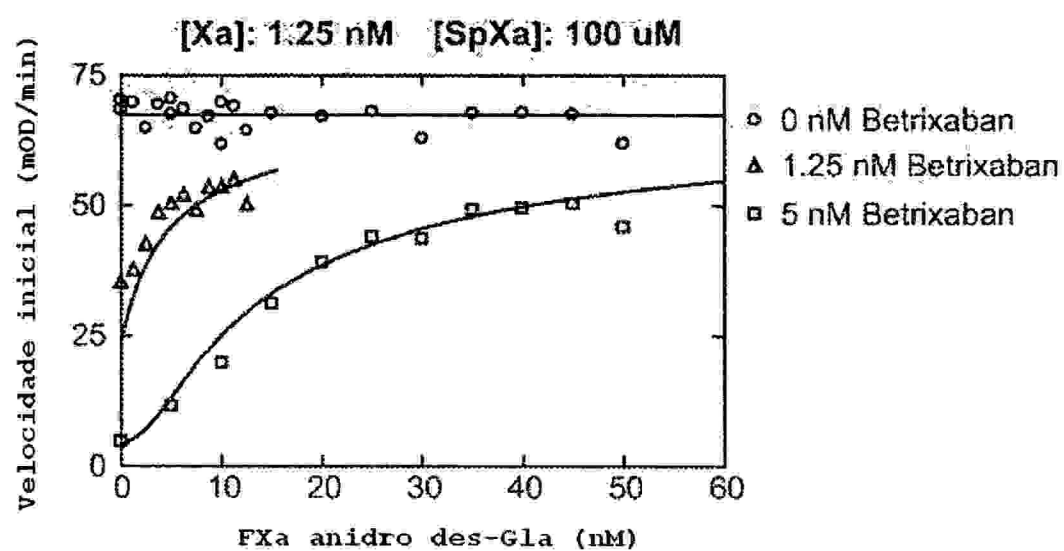


FIG. 8

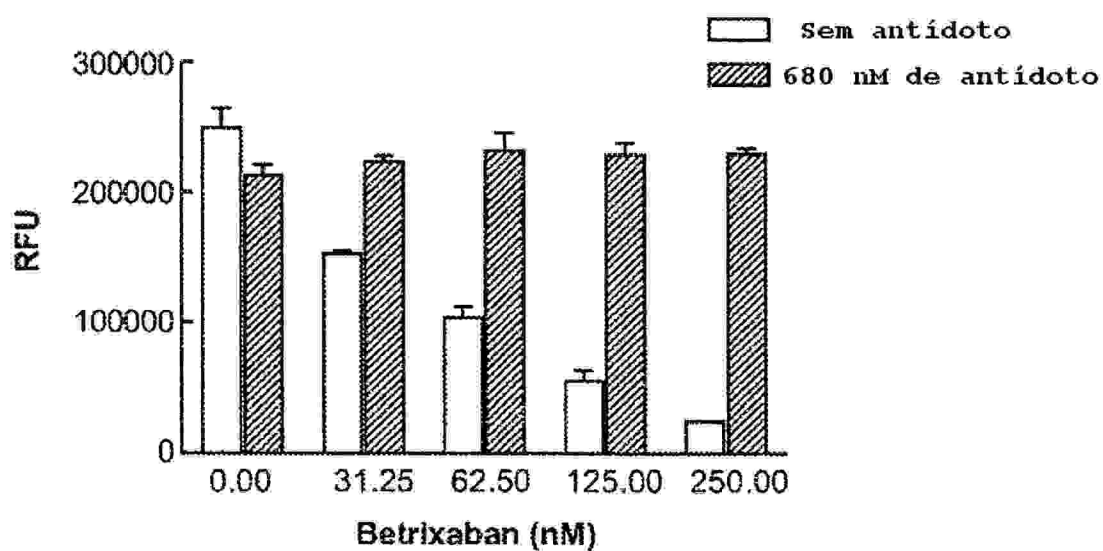


FIG. 9

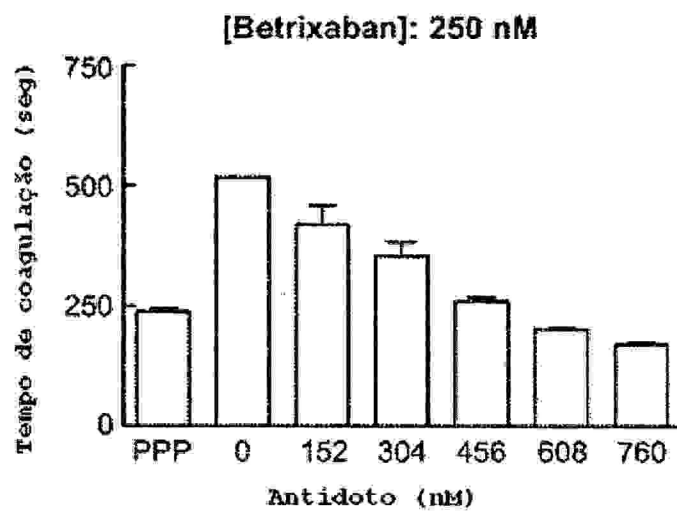


FIG. 10

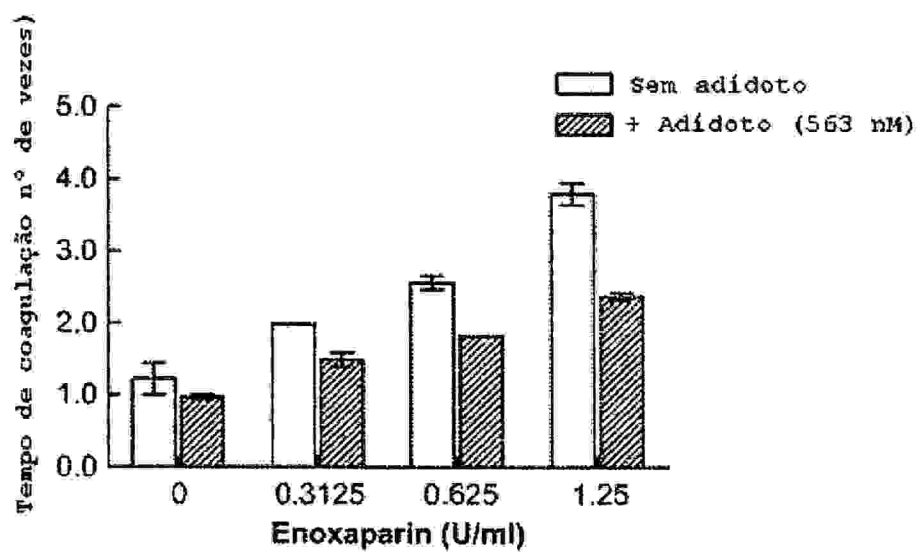


FIG. 11

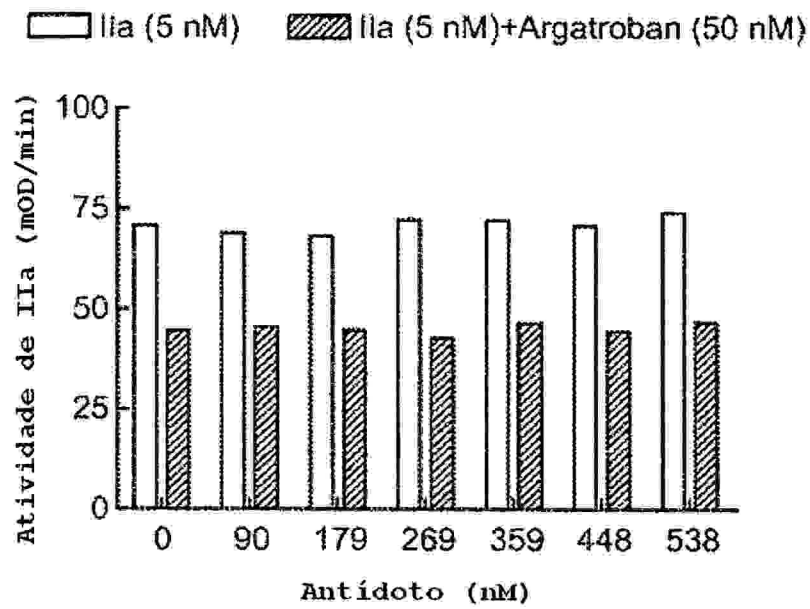


FIG. 12

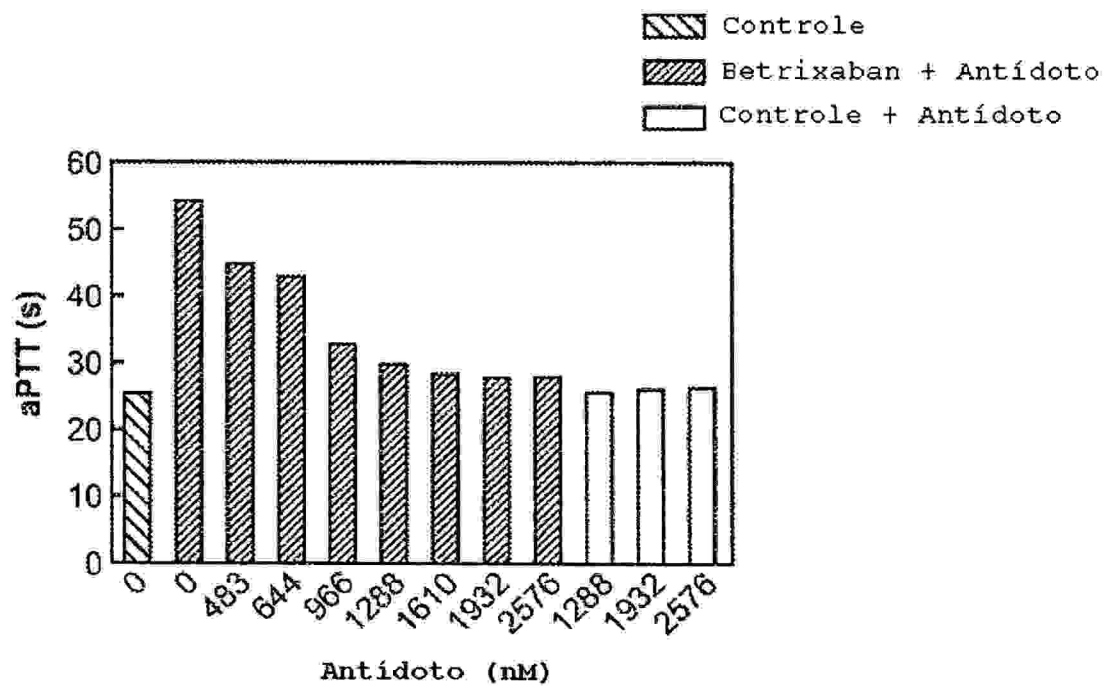


FIG. 13

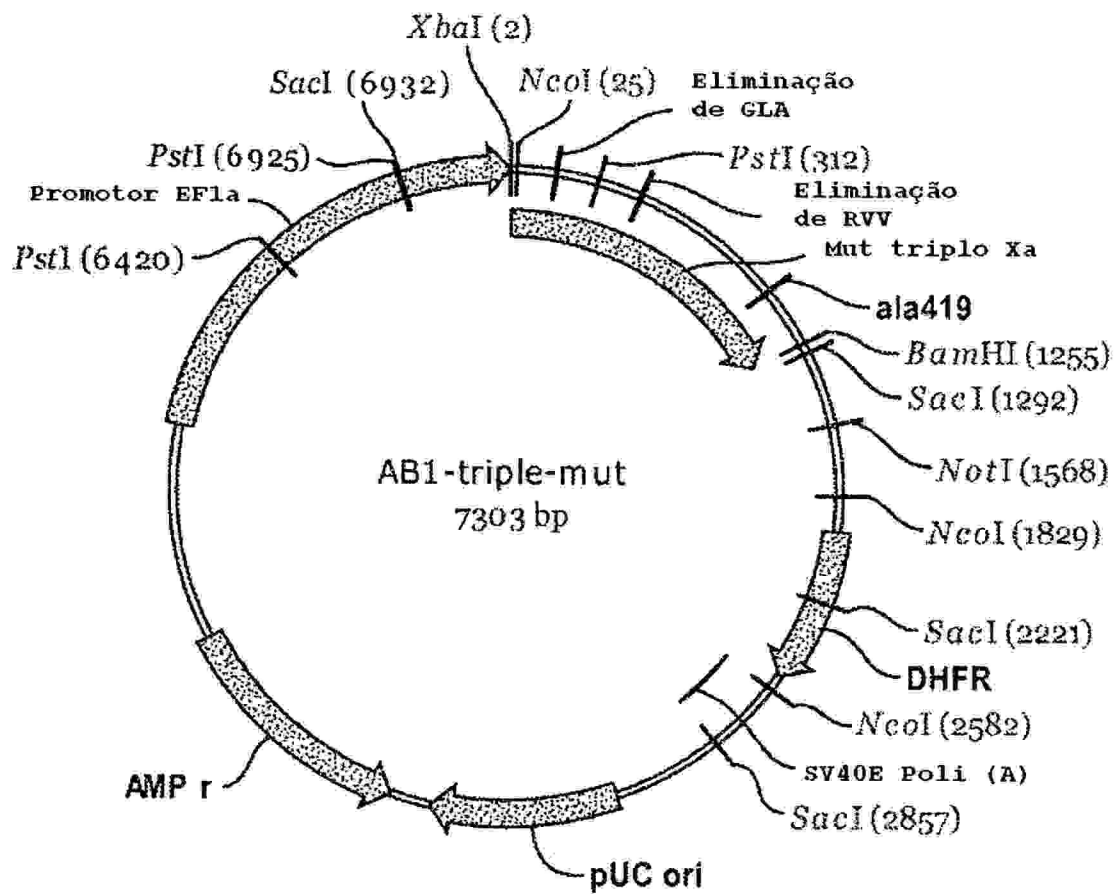


FIG. 14

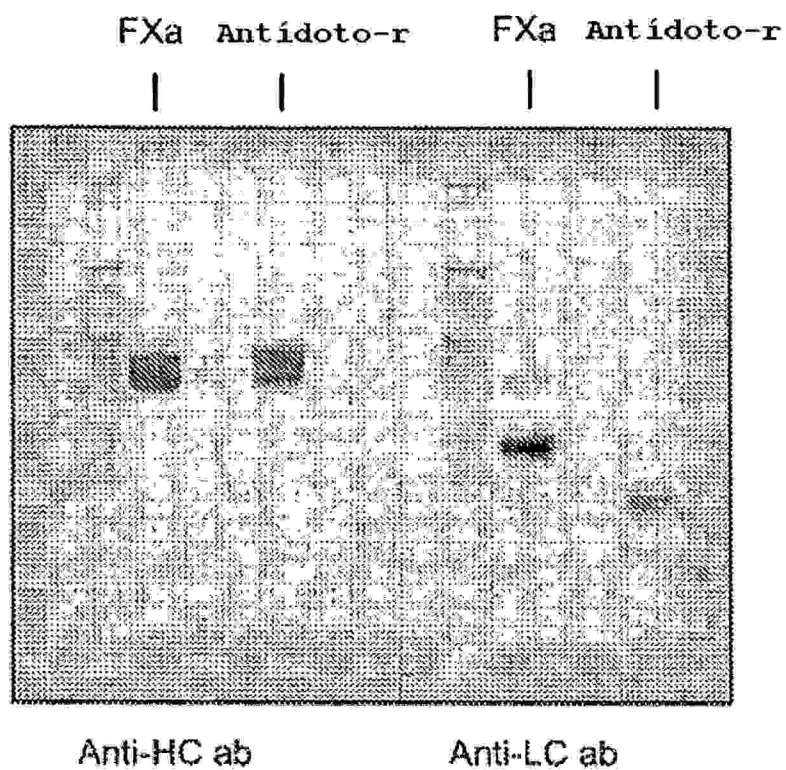


FIG. 15

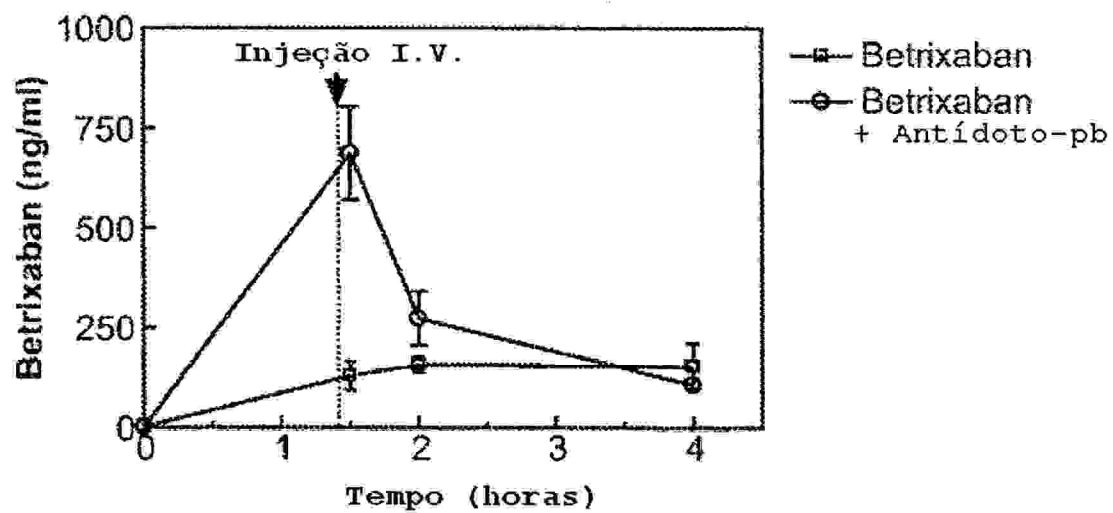


FIG. 16

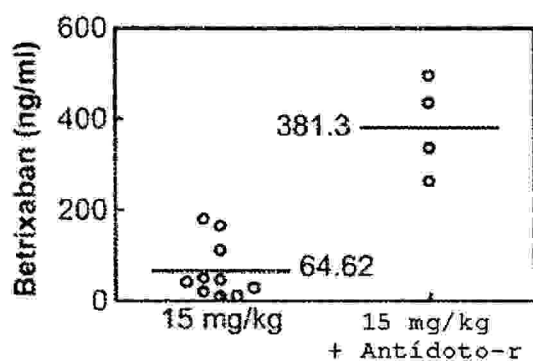


FIG. 17A

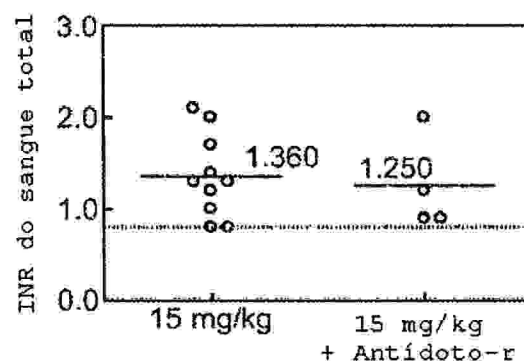


FIG. 17B

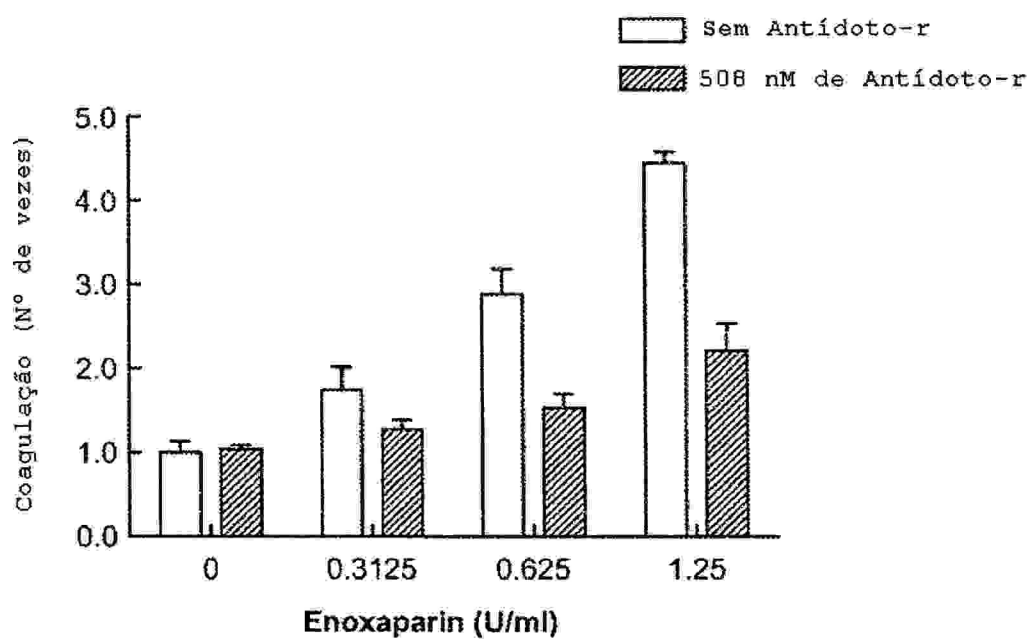


FIG. 18

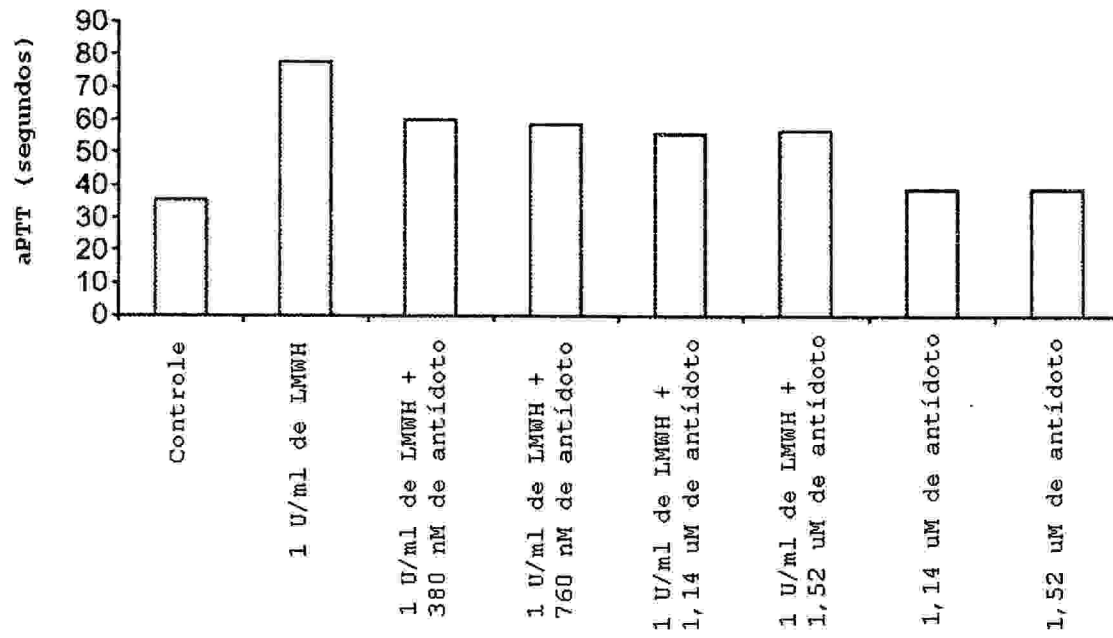


FIG. 19

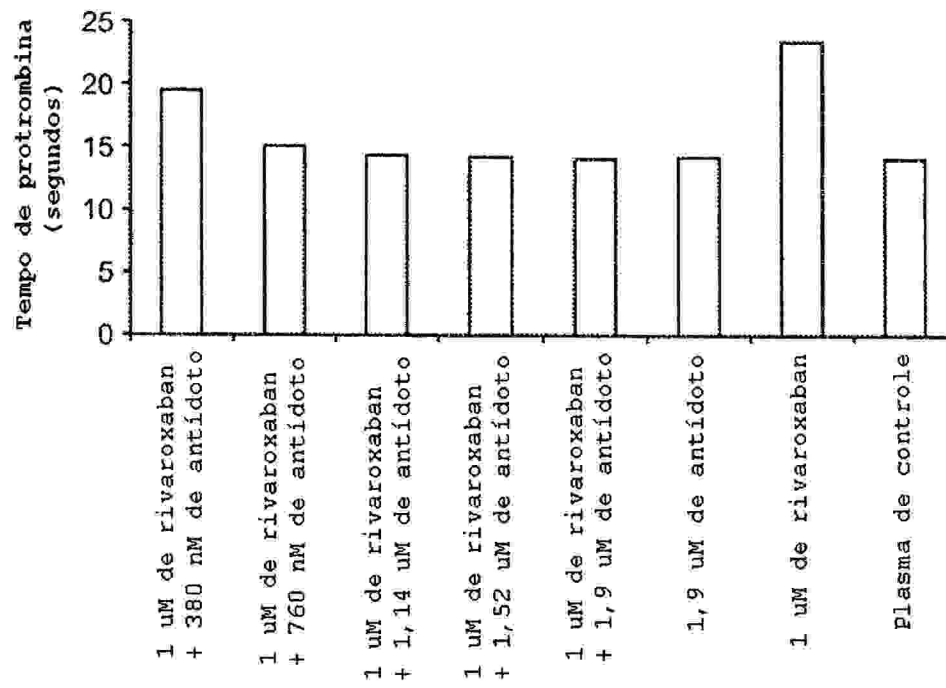


FIG. 20

atggggggcccaactgcacctcgtctctgctcagtgccctccctggctgggctccctgctgctc
 M G R P L H L V L L S A S L A G L L L L
 ggggaaagtctgttccatccgcagggagcaggcccaacaacatccctggcgaggggtcagcagg
 G E S L F I R R E Q A N N I L A R V T R
 gccaatccctttcttttctggaataaatacaaaagatggcgaccagtgtgagaccagtcct
 A N S F L F W N K Y K D G D Q C E T S P
 tggcagaaccaggggcaaatgtaaagacggcctcgggggaatacacctgcacctgtttagaa
 C Q N Q G K C K D G L G E Y T C T C L E
 ggattogaaggcaaaaactgtgaattattcacacgggaagctctgcagccctggacaacggg
 G F E G K N C E L F T R K L C S L D N G
 gactgtgaccagttcttgcacagaggaacagaactctgttggtgtgctcctgcgccccgggg
 D C D Q F C H E E Q N S V V C S C A R G
 tacaccttggctgacaaacggcaaggcctgcattcccacaggggccctacctctgtgggaaa
 Y T L A D N G K A C I P T G P Y P C G K
 cagaccttggaaacgcagggaagaggaggaagaggatcgtgggaggccagggaatgcaggac
 Q T L E R R K R R K R I V G G Q E C K D
 ggggagtgctccctggcaggccctgctcatcaatgaggaaaaacgagggtttctgtggtgga
 G E C P W Q A L L I N E E N E G F C G G
 accattctgagcaggttctacatcctaacggcagccactgtctctaccaagccaagaga
 T I L S E F Y I L T A A H C L Y Q A K R
 ttcaagggtgagggttagggggacccgggaacacggagcaggaggaggggcggtgaggcggtgcac
 F K V R V G D R N T E Q E E G G E A V H
 gaggtggagggtggctcatcaagcacaaacgggttcacaaaggagacctatgacttgcacatc
 E V E V V I K H N R F T K E T Y D F D I
 gccgtgctccgggtccagacccccatcaccttcgcgatgaacgtggcgccctgcctgcctc
 A V L R L K T P I T F R M N V A P A C L
 cccgagcgtgactgggcccaggtccacgctgatgaacgagaagacggggattgtgagcggc
 P E R D W A E S T L M T Q K T G I V S G
 ttccgggcgcacccacagagaaggggccggcagtcacaccaggctcaagatgctggagggtgccc
 F G R T H E K G R Q S T R L K M L E V P
 tacgtggaccgcacacagctgcaagctgtccagcagcttcacatcacccagaaacatgttc
 Y V D R N S C K L S S S F I I T Q N M F
 tgtgcgggctacgacaccacagcaggaggatgcctgccagggggaacgaggggggcccgccac
 C A G Y D T K Q E D A C Q G D A G G P H
 gtcacccgcttcaaggacacctacttcgtgacaggcatcgtcagctggggagagggtgt
 V T R F K D T Y F V T G I V S W G E G C
 gcccgtaagggggaagtaagggtatctacaccaagggtcaccgccttcctcaagtggatcgac
 A R K G K Y G I Y T K V T A F L K W I D
 aggtccatgaaaaccaggggcttgcctcaaggccaaagagccatgccccggagggtcataacg
 R S M K T R G L P K A K S H A P E V I T
 tctctccattaaagtga
 S S P L K -

FIG. 21

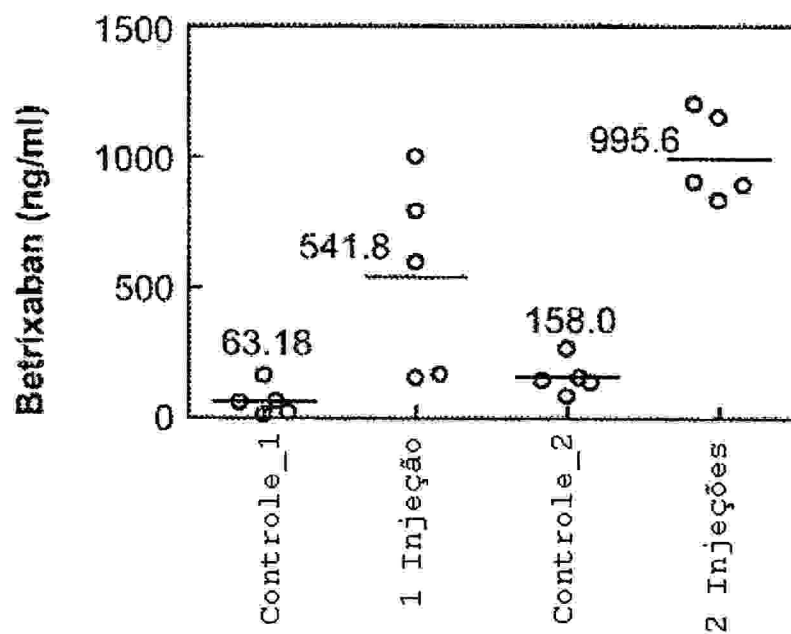


FIG. 22A

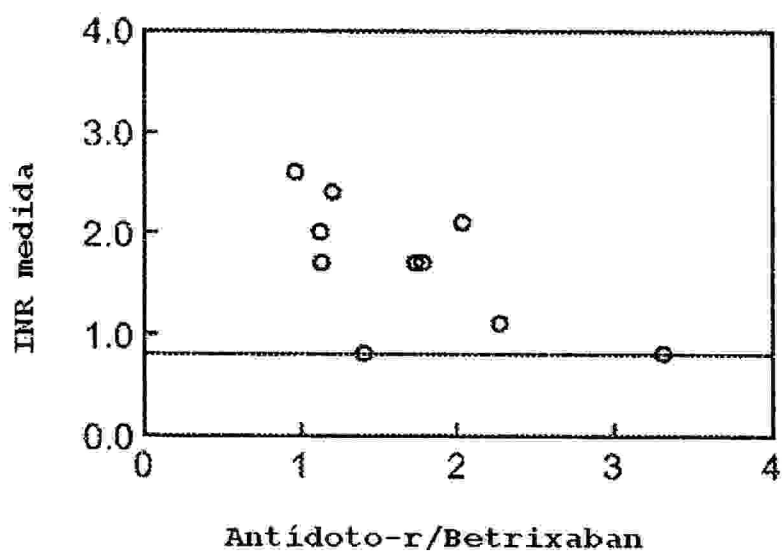


FIG. 22B

RESUMO**ANTÍDOTOS PARA INIBIDORES DO FATOR Xa E MÉTODOS PARA SUA
UTILIZAÇÃO**

A presente invenção está relacionada aos antídotos
5 para anticoagulantes que visam o fator Xa. Os antídotos são
derivados da proteína do fator Xa que se ligam aos
inibidores do fator Xa e, dessa forma, os neutralizam
substancialmente, mas não se agregam ao complexo de
protrombinase. Os derivados aqui descritos são desprovidos
10 ou possuem atividade coagulante intrínseca reduzida. São
aqui revelados métodos de interrupção ou prevenção de
sangramento em um paciente está sendo submetido à terapia
anticoagulante com um inibidor do fator Xa.