

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2003.06.06	(73) Titular(es): DYAX CORP. 55 NETWORK DRIVE BURLINGTON, MA 01803 US
(30) Prioridade(s): 2002.06.07 US 387239 P 2002.08.28 US 407003 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2011.03.23	(72) Inventor(es): ROBERT CHARLES LADNER US ARTHUR C. LEY US
(45) Data e BPI da concessão: 2015.11.11 039/2016	(74) Mandatário: NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PREVENÇÃO E REDUÇÃO DA PERDA DE SANGUE E RESPOSTA INFLAMATÓRIA**

(57) Resumo:

UM POLIPEPTÍDEO COMPREENDENDO A SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS: MET HIS SER PHE CYS ALA PHE LYS ALA ASP ASP GLY PRO CYS ARG ALA ALA HIS PRO ARG TRP PHE PHE ASN ILE PHE THR ARG GLN CYS GLU GLU PHE ILE TYR GLY GLY CYS GLU GLY ASN GLN ASN ARG PHE GLU SER LEU GLU GLU CYS LYS LYS MET CYS THR ARG ASP (AMINOÁCIDOS 3-60 DA SEQ ID NO:2), EM QUE O POLIPEPTÍDEO INIBE A CALICREÍNA.

RESUMO

“PREVENÇÃO E REDUÇÃO DA PERDA DE SANGUE E RESPOSTA INFLAMATÓRIA”

Um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos:
Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg
Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe
Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
(aminoácidos 3-60 da SEQ ID NO:2), em que o polipeptídeo
inibe a calicreína.

DESCRIÇÃO

"PREVENÇÃO E REDUÇÃO DA PERDA DE SANGUE E RESPOSTA INFLAMATÓRIA"

REGISTO DE PATENTE RELACIONADO

Este registo de patente reivindica o benefício do Registo de Patente Provisório EUA N° 60/387,239, depositado em 7 de junho de 2002, e Registo de Patente Provisório EUA N° 60/407,003, depositado em 28 de agosto de 2002.

A totalidade dos conhecimentos dos registos de patentes anteriores é incorporada na presente invenção como referência.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

As protéases estão envolvidas num amplo conjunto de processos biológicos. Em particular as protéases de serina, tais como a calicreína, plasmina, elastase, ativador do plasminogénio do tipo uroquinase, trombina, inibidores de coagulação associados à lipoproteína humana, e fatores de coagulação, tais como os fatores VIIa, IXa, Xa, XIa, e XIIa, têm sido implicados em vias que afetam o fluxo sanguíneo, por exemplo, isquemia geral e focal, invasão tumoral, fibrinólise, perda de sangue perioperatória e inflamação. Consequentemente, os inibidores de protéases de serina específicos têm recebido atenção como potenciais alvos de drogas para várias doenças isquémicas.

Um exemplo de tal inibidor, a aprotinina (também chamado de inibidor de tripsina pancreática bovina ou BPTI), obtido a

partir de pulmão bovino, foi aprovado nos Estados Unidos para uso profilático na redução da perda de sangue perioperatória e quando há necessidade de transfusão em pacientes submetidos a *bypass* cardiopulmonar (CPB), por exemplo, no decorrer de um procedimento de *bypass* da artéria coronária por enxerto. A aprotinina está comercialmente disponível sob o nome comercial TRASYLOL® (Bayer Corporation Pharmaceutical Division, West Haven, Connecticut) e foi previamente aprovada para uso no tratamento da pancreatite. A eficácia da aprotinina está associada com as suas capacidades relativas não específicas para inibir uma variedade de proteases de serina, incluindo calicreína plasmática e plasmina. Estas proteases são importantes em um número de vias do sistema de ativação de contacto (CAS).

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

Apesar de ser o único composto licenciado para a prevenção da perda de sangue perioperatória em CBP para o procedimento de *bypass* da artéria coronária por enxerto (CABG, do inglês *coronary artery bypass grafting*), a aprotinina não é tão amplamente utilizada como seria de esperar. Existem sérias preocupações relativas ao uso deste polipeptídeo bovino em pacientes que necessitam de CPB, e em particular na utilização deste composto em procedimentos de CABG. A aprotinina não é específica para a calicreína, mas interage com enzimas adicionais (por exemplo, plasmina) em múltiplas vias. Assim, o mecanismo de ação da aprotinina é em grande parte especulativo e a falta de compreensão precisa do que é afetado durante o tratamento com a aprotinina produz o risco de complicações durante o tratamento. Uma complicação frequentemente citada é a trombose descontrolada devido às ações da aprotinina sobre a via fibrinolítica. Há uma preocupação não só sobre tais eventos hiperagudos como a trombose dos vasos maiores no período perioperatório, mas também sobre a permeabilidade do enxerto após o procedimento CABG. Além disso, como uma proteína natural obtida a partir de pulmão de bovino, a administração de aprotinina em seres humanos pode provocar reações graves de hipersensibilidade, anafiláticas ou anafilatóides após o primeiro e, mais frequentemente, após a administração repetida aos pacientes. Isto é particularmente preocupante no grande número de pacientes que têm procedimentos repetidos de CABG. Além disso, há uma preocupação geral crescente no que diz respeito à utilização de material derivado de fontes bovinas como um vetor potencial para a transmissão da encefalopatia espongiforme bovina aos seres humanos.

Estas preocupações deixam claro que continua a ser uma necessidade a existência de meios e métodos mais eficazes e mais específicos para prevenir ou reduzir a perda de sangue perioperatória e o início da SIR em pacientes submetidos a cirurgia, resultando na ativação do CAS, tais como procedimentos de CABG em pacientes de CPB, ou artroplastia da anca.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção é definida pelas reivindicações.

Esta invenção baseia-se na descoberta de um peptídeo que inibe as proteases de serina. As proteases de serina, tais como, por exemplo, a calicreína, estão envolvidas em, por exemplo, vias que levam à perda de sangue excessiva perioperatória e o início da resposta inflamatória sistêmica. Os inibidores peptídicos preferidos para a calicreína incluem aqueles descritos nas Patentes dos Estados Unidos N° 6,333,402 e 6,057,287 de Markland *et al.* A presente invenção é dirigida em parte ao uso dos peptídeos em métodos terapêuticos e composições adequadas para utilização na eliminação ou redução de isquemias variadas, incluindo, mas não limitado, a perda de sangue perioperatória e o início da resposta inflamatória sistêmica. A perda de sangue perioperatória resulta de procedimentos cirúrgicos invasivos que levam ao contato com a ativação de componentes do complemento e os sistemas de coagulação/fibrinólise. Mais especificamente, a presente invenção fornece os inibidores de calicreína reivindicados para utilização na redução ou prevenção da perda de sangue perioperatória e resposta inflamatória sistêmica em pacientes, por exemplo submetidos a procedimentos

cirúrgicos invasivos, especialmente cirurgias cardiotorácicas.

Numa forma de realização, a divulgação é direcionada para um método para prevenir ou reduzir a isquemia num paciente compreendendo a administração ao paciente de uma composição que compreende um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos: Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys Xaa56 Xaa57 Xaa58 (SEQ ID NO:1), em que Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa56, Xaa57 ou Xaa58 são cada um individualmente um aminoácido ou ausente; Xaa10 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Asp e Glu; Xaa11 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala e Thr; Xaa13 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys e Gln; Xaa15 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn e Gln; Xaa16 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Ala, Gly, Ser, Asp e Asn; Xaa17 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln e Thr; Xaa18 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: His, Leu, Gln e Ala; Xaa19 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Pro, Gln, Leu, Asn e Ile; Xaa21 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Trp, Phe, Tyr, His e Ile; Xaa22 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Tyr e Phe; Xaa23 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Tyr e Phe; Xaa31 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Glu, Asp,

Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile e Thr, Xaa32 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly e Val; Xaa34 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly e Leu; Xaa35 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Tyr, Trp e Phe; Xaa39 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Glu, Gly, Ala, Ser e Asp; Xaa40 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Gly e Ala; Xaa43 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Asn e Gly; Xaa45 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Phe e Tyr; e em que o polipeptídeo inibe a calicreína.

Numa forma de realização particular, a isquemia é a perda de sangue perioperatória devido a um procedimento cirúrgico realizado no paciente. O procedimento cirúrgico pode ser uma cirurgia cardiotorácica como, por exemplo, *bypass* cardiopulmonar ou cirurgia de *bypass* da artéria coronária por enxerto.

Numa forma de realização particular, as posições de aminoácidos individuais da SEQ ID NO:1 podem ser uma ou mais das seguintes: Xaa10 é Asp, Xaa11 é Asp, Xaa13 é Pro, Xaa15 é Arg, Xaa16 é Ala, Xaa17 é Ala, Xaa18 é His, Xaa19 é Pro, Xaa21 é Trp, Xaa31 é Glu, Xaa32 é Glu, Xaa34 é Ile, Xaa35 é Tyr, Xaa39 é Glu.

Numa outra forma de realização, a divulgação é direcionada para um método para prevenir ou reduzir o aparecimento da resposta inflamatória sistémica associada a um procedimento cirúrgico num paciente compreendendo a administração ao paciente de uma composição que compreende um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos: Xaa1 Xaa2 Xaa3

Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys
 Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24
 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34
 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45
 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys
 Xaa56 Xaa57 Xaa58 (SEQ ID NO:1), em que Xaa1, Xaa2, Xaa3,
 Xaa4, Xaa56, Xaa57 ou Xaa58 são cada um individualmente um
 aminoácido ou ausente; Xaa10 é um aminoácido selecionado do
 grupo que consiste em: Asp e Glu; Xaa11 é um aminoácido
 selecionado do grupo que consiste em: Asp, Gly, Ser, Val,
 Asn, Ile, Ala e Thr; Xaa13 é um aminoácido selecionado do
 grupo que consiste em: Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala,
 Gly, Lys e Gln; Xaa15 é um aminoácido selecionado do grupo
 que consiste em: Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn e Gln;
 Xaa16 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em:
 Ala, Gly, Ser, Asp e Asn; Xaa17 é um aminoácido selecionado
 do grupo que consiste em: Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln
 e Thr; Xaa18 é um aminoácido selecionado do grupo que
 consiste em: His, Leu, Gln e Ala; Xaa19 é um aminoácido
 selecionado do grupo que consiste em: Pro, Gln, Leu, Asn e
 Ile; Xaa21 é um aminoácido selecionado do grupo que
 consiste em: Trp, Phe, Tyr, His e Ile; Xaa22 é um
 aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Tyr e Phe;
 Xaa23 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em:
 Tyr e Phe; Xaa31 é um aminoácido selecionado do grupo que
 consiste em: Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile e
 Thr; Xaa32 é um aminoácido selecionado do grupo que
 consiste em: Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala,
 Gly e Val; Xaa34 é um aminoácido selecionado do grupo que
 consiste em: Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly e Leu; Xaa35
 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Tyr,
 Trp e Phe; Xaa39 é um aminoácido selecionado do grupo que
 consiste em: Glu, Gly, Ala, Ser e Asp; Xaa40 é um

aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Gly e Ala; Xaa43 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Asn e Gly; Xaa45 é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: Phe e Tyr; e em que o polipeptídeo inibe a calicreína. Numa forma de realização particular, o procedimento cirúrgico pode ser uma cirurgia cardiotorácica, como, por exemplo, *bypass* cardiopulmonar ou cirurgia de *bypass* da artéria coronária por enxerto. Numa forma de realização particular, as posições de aminoácidos individuais da SEQ ID NO:1 podem ser uma ou mais das seguintes: Xaa10 é Asp, Xaa11 é Asp, Xaa13 é Pro, Xaa15 é Arg, Xaa16 é Ala, Xaa17 é Ala, Xaa18 é His, Xaa19 é Pro, Xaa21 é Trp, Xaa31 é Glu, Xaa32 é Glu, Xaa34 é Ile, Xaa35 é Tyr, Xaa39 é Glu.

Numa forma de realização, a invenção é direcionada para prevenir a resposta inflamatória sistêmica num paciente com uma perda de sangue perioperatória e isquemia. Para um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos: Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 3-60 da SEQ ID NO:2), em que o polipeptídeo inibe a calicreína para utilização no tratamento ou prevenção.

Numa outra forma de realização na divulgação compreendendo a invenção, o polipeptídeo consiste na sequência de aminoácidos: Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr

Arg Asp (aminoácidos 3-60 da SEQ ID NO:2), em que o polipeptídeo inibe a calicreína. Num caso particular, a isquemia pode ser a perda de sangue perioperatória devido a um procedimento cirúrgico realizado no paciente. Numa forma de realização, o procedimento cirúrgico é uma cirurgia cardiotorácica, como, por exemplo, *bypass* cardiopulmonar ou cirurgia de *bypass* da artéria coronária por enxerto.

Numa outra forma de realização, a divulgação é direcionada para um método para prevenir ou reduzir o aparecimento da resposta inflamatória sistêmica associada com um procedimento cirúrgico num paciente compreendendo a administração ao paciente de uma composição que compreende um polipeptídeo que consiste na sequência de aminoácidos: Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 5-60 da SEQ ID NO:2), em que o polipeptídeo inibe a calicreína. Numa forma de realização, o procedimento cirúrgico é uma cirurgia cardiotorácica como, por exemplo, *bypass* cardiopulmonar ou cirurgia de *bypass* da artéria coronária por enxerto.

Numa outra forma de realização, a divulgação é direcionada para um método para prevenir ou reduzir a isquemia num paciente compreendendo a administração ao paciente de uma composição que compreende um polipeptídeo que consiste na sequência de aminoácidos: Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala His Ala Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Glu Glu Gln Cys Phe Ile Tyr Gly Gly Gly Asn Cys Glu Gln Asn Arg Phe Glu Glu Glu Ser Leu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 5-60 da SEQ ID NO:2), em que o

polipeptídeo inibe a calicreína. Numa forma de realização particular, a isquemia pode ser a perda de sangue perioperatória devido a um procedimento cirúrgico realizado no paciente. Numa forma de realização, o procedimento cirúrgico é uma cirurgia cardiotorácica, como, por exemplo, *bypass* cardiopulmonar ou cirurgia de *bypass* da artéria coronária por enxerto.

DESCRIÇÃO BREVE DOS DESENHOS

FIG. 1 é um diagrama simplificado das múltiplas vias principais e eventos relacionados envolvidos no sistema de ativação de contato e resposta inflamatória sistémica (SIR) que podem surgir num paciente submetido a traumatismo de tecidos moles e ósseo, tal como o associado a um procedimento de *bypass* da artéria coronária por enxerto (CABG), especialmente quando o procedimento de CABG envolve a circulação extracorporeal do sangue, tal como o *bypass* cardiopulmonar (Dispositivo de *Bypass*). As setas indicam a ativação de um componente ou um evento para outro componente ou evento na cascata. As setas em ambas as direções indicam efeitos de ativação de componentes ou eventos em ambas as direções. Setas quebradas indicam a participação provável de um componente ou evento na ativação de outro componente ou evento. As abreviaturas são as seguintes: "tPA" = ativador do plasminogénio tecidual; "C5a" = componente de uma proteína do sistema de complemento; "fXIIa" = proteína ativadora da pré-calicreína para formar a calicreína ativa; "Extrínseco" = sistema de coagulação extrínseco; "Intrínseco" = sistema de coagulação intrínseca.

FIG. 2 mostra uma parte de um DNA e os aminoácidos correspondentes deduzidos para um polipeptídeo KI da presente invenção no plasmídeo pPIC-K503. O DNA inserido codifica o peptídeo sinal prepro mat α de *Saccharomyces cerevisiae* (sublinhado) fundido em moldura ao terminal amino do polipeptídeo PEP-1 KI tendo a sequência de aminoácidos delimitada pela área do retângulo. A sequência de aminoácidos do polipeptídeo PEP-1 KI mostrada na região do retângulo é a SEQ ID NO:2 e a correspondente sequência de nucleótidos codificante do polipeptídeo KI é a SEQ ID NO:3. As setas a tracejado indicam a localização e a direção de duas sequências de primers de PCR em regiões AOX que foram usadas para produzir moldes de sequenciação. A sequência de DNA para a sequência completa de nucleótidos da figura compreende a sequência codificante estrutural para a proteína de fusão e é designada de SEQ ID NO:27. A parte duplamente sublinhada da sequência indica uma sequência da sonda de diagnóstico. *Bst*BI e *Eco*RI indicam a localização na sequência dos seus respectivos locais de endonucleases de restrição palindrômicos, hexaméricos. Os asteriscos indicam os códons de paragem da translação.

FIGS. 3A e 3B mostram um alinhamento das sequências de aminoácidos das formas de realização preferidas da presente invenção, a sequência da LACI nativa a partir da qual estas variantes foram derivadas (SEQ ID NO:32), e outros domínios Kunitz conhecidos (SEQ ID NO:29 a 31 e 33 a 53). Os resíduos de cisteína são realçados.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção é baseada na descoberta de um grupo de polipeptídeos inibidores de calicreína (KI) que inibem a calicreína plasmática com uma especificidade que permite a sua utilização em métodos melhorados de prevenção ou redução de isquemia como, por exemplo, perda de sangue perioperatória e/ou uma resposta inflamatória sistêmica (SIR) induzida pela calicreína especialmente, por exemplo, em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos e, em particular, procedimentos cirúrgicos envolvendo cirurgia cardiotorácica, por exemplo, *bypass* cardiopulmonar (CPB), tal como um procedimento de *bypass* da artéria coronária por enxerto (CABG). Os KI podem ser usados especificamente para, por exemplo, cirurgia cardíaca pediátrica, transplante pulmonar, artroplastia total da anca e transplante de fígado, e para reduzir ou prevenir o AVC perioperatório durante o CABG, oxigenação por membrana extracorporeal (ECMO) e acidentes vasculares cerebrais (AVC) durante esses procedimentos.

A cirurgia cardiotorácica é a cirurgia da área do peito, normalmente do coração e pulmões. As doenças típicas tratadas através de cirurgia cardiotorácica incluem doença arterial coronária, tumores e cânceros do pulmão, esôfago e da parede do peito, anormalidades dos vasos e válvulas do coração, e defeitos congênitos envolvendo o peito ou o coração. Quando a cirurgia cardiotorácica é utilizada para o tratamento, incorre-se no risco de perda de sangue (por exemplo, isquemia induzida pela cirurgia) e o aparecimento de uma resposta inflamatória sistêmica (SIR). A SIR induzida por cirurgia pode resultar numa grave disfunção de órgãos (síndrome da resposta inflamatória sistêmica; SIRS).

Polipeptídeos úteis na presente invenção

Os polipeptídeos KI úteis na presente invenção compreendem polipeptídeos de domínio Kunitz. Numa forma de realização da divulgação que compreende a invenção, estes domínios Kunitz são formas variantes da estrutura em alça compreendendo o domínio Kunitz 1 da proteína inibidora de coagulação associada à lipoproteína humana (LACI). A LACI contém três estruturas internas, bem definidas, de peptídeo em alça que são paradigma dos domínios Kunitz (Girard, T. *et al.*, 1989. *Nature*, 338:518-520). Os três domínios Kunitz da LACI conferem a capacidade de ligar e inibir a calicreína, embora não com afinidade excepcional. Variantes do domínio Kunitz 1 da LACI descritas na presente invenção foram rastreadas, isoladas e ligam-se à calicreína com maior afinidade e especificidade (ver, por exemplo, Patentes EUA N° 5,795,865 e 6,057,287, aqui incorporadas por referência). Um exemplo de um polipeptídeo preferido útil na presente invenção tem a sequência de aminoácidos definida pelos aminoácidos 3-60 da SEQ ID NO:2.

Cada polipeptídeo útil na presente invenção liga a calicreína, e polipeptídeos preferidos também são inibidores da calicreína (KI), como determinado utilizando ensaios ligação e de inibição da calicreína conhecidos na técnica. A maior afinidade e especificidade para a calicreína dos polipeptídeos da variante de domínio Kunitz aqui descrita fornece a base para a sua utilização em cirurgia cardiotorácica, por exemplo, CPB e em especial em procedimentos cirúrgicos CABG, para prevenir ou reduzir a perda de sangue perioperatória e/ou o aparecimento da SIR em pacientes submetido a tais procedimentos. Os polipeptídeos KI usados na invenção têm ou compreendem a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo da variante de domínio Kunitz isolada originalmente por rastreio de

bibliotecas de exibição de fagos devido à capacidade de se ligar à calicreína.

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

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

"Xaa" refere-se a uma posição numa cadeia peptídica que pode corresponder a qualquer um de uma série de diferentes aminoácidos. Por exemplo, para os peptídeos KI aqui descritos, Xaa10 pode ser Asp ou Glu; Xaa11 pode ser Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala ou Thr; Xaa13 pode ser Pro, Arg, His, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys ou Gln; Xaa15 pode ser Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn ou Gln; Xaa16 pode ser Ala, Gly, Ser, Asp ou Asn; Xaa17 pode ser Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln ou Thr; Xaa18 pode ser His, Leu, Gln ou Ala; Xaa19 pode ser Pro, Gln, Leu, Asn ou Ile; Xaa21 pode ser Trp, Phe, Tyr, His ou Ile; Xaa31 pode ser Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile ou Thr; Xaa32 pode ser Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly ou Val; Xaa34 pode ser DE, Thr, Ser, Val, Ala, Asn, Gly ou Leu; Xaa35 pode ser Tyr, Trp ou Phe; Xaa39 pode ser Glu, Gly, Ala, Ser ou Asp. Os aminoácidos Xaa6, Xaa7, Xaa8, Xaa9, Xaa20, Xaa24, Xaa25, Xaa26, Xaa27, Xaa28, Xaa29, Xaa41, Xaa42, Xaa44, Xaa46, Xaa47, Xaa48, Xaa49, Xaa50, Xaa52, Xaa53 e Xaa54 podem ser qualquer aminoácido. Além disso,

cada um dos quatro primeiros e dos três últimos aminoácidos da SEQ ID NO:1 podem opcionalmente estar presentes ou ausentes e podem ser quaisquer aminoácidos quando presentes.

Os peptídeos definidos de acordo com a SEQ ID NO:1 formam um conjunto de polipeptídeos que se ligam à calicreína. Por exemplo, um polipeptídeo KI útil nos métodos e composições da presente divulgação tem as seguintes posições variáveis: Xaa11 pode ser Asp, Gly, Ser ou Val; Xaa13 pode ser Pro, Arg, His ou Asn; Xaa15 pode ser Arg ou Lys; Xaa16 pode ser Ala ou Gly; Xaa17 pode ser Ala, Asn, Ser ou Ile; Xaa18 pode ser His, Leu ou Gln; Xaa19 pode ser Pro, Gln ou Leu; Xaa21 pode ser Trp ou Phe; Xaa31 é Glu; Xaa32 pode ser Glu ou Gln; Xaa34 pode ser Ile, Thr ou Ser; Xaa35 é Tyr; e Xaa39 pode ser Glu, Gly ou Ala.

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

Também abrangidos dentro do âmbito da divulgação são peptídeos que compreendem partes dos polipeptídeos aqui descritos. Por exemplo, os polipeptídeos podem compreender domínios de ligação para os epítomos específicos da calicreína. Tais fragmentos dos polipeptídeos aqui descritos também serão englobados.

Os polipeptídeos KI úteis nos métodos e composições aqui descritos compreendem um domínio Kunitz. Um subconjunto das sequências abrangidas pela SEQ ID NO:1 é descrito pela seguinte sequência (onde não é indicado, "Xaa" refere-se ao mesmo conjunto de amino ácidos que são permitidos para a SEQ ID NO:1):

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16
Xaa17 Xaa18 Xaa19 Arg Xaa21 Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Xaa31
Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO:3).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

As FIGS. 3A e 3B fornecem um alinhamento de sequências de aminoácidos destas sequências, a sequência da LACI nativa a partir da qual estas variantes foram derivadas (SEQ ID NO:32), e outros domínios Kunitz conhecidos (SEQ ID NO:29-31 e 33-53).

Os polipeptídeos KI úteis nos métodos e composições aqui descritos podem ser feitos sinteticamente utilizando qualquer protocolo e equipamento convencional de síntese de polipeptídeos. Por exemplo, a síntese gradual de um polipeptídeo KI aqui descrita pode ser realizada através da remoção de um grupo protetor terminal amino (N) de um aminoácido inicial (isto é, terminal carboxílico), e o seu acoplamento com a extremidade carboxílico do aminoácido seguinte na sequência do polipeptídeo. Este aminoácido é também adequadamente protegido. O grupo carboxílico do próximo aminoácido pode ser ativado para reagir com o N-terminal do aminoácido ligado pela formação num grupo reativo, tal como a formação numa carbodiimida, um anidrido de ácido simétrico, ou um grupo "éster ativo" tal como os ésteres hidroxibenzotriazole ou pentafluorofenilo. Os métodos preferidos de síntese de peptídeos em fase sólida incluem o método BOC, que utiliza tert-butiloxicarbonilo como grupo de proteção de α -amino, e o método de FMOC, que utiliza 9-fluorenilmetiloxicarbonilo para proteger o α -amino dos resíduos de aminoácidos. Ambos os métodos são bem conhecidos dos peritos na técnica (Stewart, J. and Young, J., Solid-Phase Peptide Synthesis (W.H. Freeman Co.; São

Francisco 1989); Merrifield, J., 1963. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154; Bodanszky, M. e Bodanszky, A., The Practice of Peptide Synthesis (Springer-Verlag, Nova Iorque 1984). Se desejado, aminoácidos adicionais com terminais amino e/ou carboxílico podem ser concebidos para a sequência de aminoácidos e adicionados durante a síntese do polipeptídeo.

Como alternativa, os polipeptídeos de domínio Kunitz e polipeptídeos KI úteis nas composições e métodos da divulgação compreendendo a presente invenção podem ser produzido por métodos recombinantes utilizando um qualquer de um número de células e correspondentes vetores de expressão, incluindo mas não limitados a vetores de expressão bacterianos, vetores de expressão de levedura, vetores de expressão de baculovírus, vetores de expressão virais de mamífero, e semelhantes. Os polipeptídeos de domínio Kunitz e polipeptídeos KI úteis nas composições e métodos da divulgação compreendendo a presente invenção também podem ser produzidos transgenicamente usando moléculas de ácido nucleico compreendendo uma sequência codificante de um domínio Kunitz ou um polipeptídeo KI aqui descrito, em que a molécula de ácido nucleico pode ser integrada e expressa a partir do genoma de um animal hospedeiro utilizando métodos transgênicos disponíveis na técnica. Em alguns casos, pode ser necessário ou vantajoso fundir a sequência codificante para um polipeptídeo de domínio Kunitz ou um polipeptídeo KI compreendendo o domínio Kunitz noutra sequência codificante num vetor de expressão para formar um polipeptídeo de fusão que seja facilmente expresso numa célula hospedeira. De preferência, a célula hospedeira que expressa tal polipeptídeo de fusão também processa o polipeptídeo de fusão para produzir um

domínio Kunitz ou polipeptídeo KI útil na presente invenção, que contém apenas a sequência de aminoácidos desejada. Obviamente, se qualquer outro (ou outros) aminoácido permanece ligado ao domínio Kunitz ou KI polipeptídeo expresso, tal aminoácido (ou aminoácidos) adicional não deve diminuir a atividade de ligação da calicreína e/ou atividade inibitória da calicreína do domínio Kunitz ou polipeptídeo KI de modo a impedir a utilização do polipeptídeo nos métodos ou composições da divulgação compreendendo a presente invenção.

Um sistema de expressão recombinante preferido para a produção de polipeptídeos KI úteis nos métodos e composições aqui descritos é um vetor de expressão de levedura que permite que uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo KI ou polipeptídeo de domínio Kunitz seja ligada na mesma grelha de leitura com uma sequência de nucleótidos que codifica a sequência do peptídeo líder prepro mat α de *Saccharomyces cerevisiae*, que por sua vez está sob o controlo de um promotor de levedura operacional. O plasmídeo de expressão recombinante de levedura resultante pode então ser transformado através de métodos padrão e introduzido dentro de células hospedeiras de levedura apropriadas e compatíveis, as quais são capazes de expressar a proteína recombinante a partir do vetor de expressão recombinante de levedura. De preferência, uma célula hospedeira de levedura transformada com um tal vetor de expressão recombinante também é capaz de processar a proteína de fusão para fornecer um polipeptídeo KI ativo útil nos métodos e composições da divulgação que compreendem a presente invenção. Uma levedura hospedeira preferida para a produção recombinante de polipeptídeos de

domínio Kunitz e polipeptídeos KI compreendendo tais domínios Kunitz é a *Pichia pastoris*.

Como mencionado acima, os polipeptídeos KI que são úteis nos métodos e composições aqui descritos podem compreender um polipeptídeo de domínio Kunitz aqui descrito. Alguns polipeptídeos KI podem compreender uma sequência flanqueadora adicional, de preferência de um a seis aminoácidos de comprimento, na extremidade do terminal amino e/ou carboxílico, desde que estes aminoácidos adicionais não diminuam significativamente a afinidade de ligação da calicreína ou a atividade inibitória da calicreína, de modo a impedir qualquer utilização nos métodos e composições aqui descritos. Tais aminoácidos adicionais podem ser deliberadamente adicionados para expressar um polipeptídeo KI numa célula hospedeira recombinante em particular ou podem ser adicionados para fornecer uma função adicional, por exemplo, para fornecer um péptido que ligue o polipeptídeo KI a outra molécula ou para fornecer uma região de afinidade que facilita a purificação do polipeptídeo. De preferência, o aminoácido (ou aminoácidos) adicional não inclui a cisteína, o que poderia interferir com as pontes de dissulfeto do domínio Kunitz.

Um exemplo de um polipeptídeo de domínio Kunitz preferido útil nos métodos e nas composições da invenção tem a sequência de aminoácidos dos resíduos 3-60 da SEQ ID NO:2. Quando expressos e processados num sistema de expressão de proteína de fusão de levedura (por exemplo, com base na integração do plasmídeo de expressão pHIL-D2), tal polipeptídeo de domínio Kunitz retém um terminal amino adicional de dipeptídeo Glu-Ala resultante da fusão com a

sequência do peptídeo líder prepro mat α de *S. cerevisiae*. Quando segregado da célula hospedeira de levedura, a maior parte do peptídeo líder é processado a partir da proteína de fusão para se obter um polipeptídeo KI funcional (aqui referido como "PEP-1") possuindo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 (ver região do retângulo na FIG. 2).

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

Os polipeptídeos definidos, por exemplo, pela SEQ ID NO:1 contém posições que não podem apresentar variantes, por exemplo, as posições 5, 14, 30, 51 e 55 podem ser apenas Cys. Outras posições como, por exemplo, as posições 6, 7, 8, 9, 20, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 41, 42, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 53 e 54 podem ser qualquer aminoácido (incluindo aminoácidos de ocorrência não natural). Numa forma de realização particularmente preferida, um ou mais aminoácidos correspondem a uma sequência nativa (por

exemplo, SEQ ID NO:32, ver FIG. 3). Numa forma de realização preferida, pelo menos uma posição variável é diferente da apresentada na sequência nativa. Numa outra forma de realização preferida, os aminoácidos podem ser individualmente ou coletivamente substituídos por uma substituição conservativa ou não conservativa de aminoácidos. As substituições conservativas de aminoácidos substituem um aminoácido com outro aminoácido de estrutura química semelhante e podem não ter nenhum efeito sobre a função da proteína. As substituições não conservativas de aminoácidos substituem um aminoácido com outro aminoácido de estrutura química diferente. Exemplos de substituições conservativas de aminoácidos incluem, por exemplo, Asn->Asp, Arg->Lys e Ser->Thr. Numa forma de realização preferida, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 e/ou 21 destes aminoácidos podem ser independentemente ou coletivamente, em qualquer combinação, selecionados para corresponder à posição correspondente da SEQ ID NO:2.

Outras posições, por exemplo, as posições 10, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 31, 32, 34, 35, 39, 40, 43 e 45, podem ser qualquer um dos aminoácidos selecionados. Assim, a SEQ ID NO:1 define um conjunto de sequências possíveis. Cada membro deste conjunto contém, por exemplo, uma cisteína nas posições 5, 14, 30, 51 e 55, e qualquer um de um conjunto específico de aminoácidos nas posições 10, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 31, 32, 34, 35, 39, 40, 43 e 45. Numa forma de realização preferida, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e/ou 19 destes aminoácidos podem ser independentemente ou coletivamente, em qualquer combinação, selecionados para corresponder à posição correspondente da SEQ ID NO:2. O

peptídeo tem de preferência pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO:2.

Métodos e composições

A presente invenção é também dirigida para prevenir ou reduzir a perda de sangue perioperatória de isquemia e a resposta inflamatória. É preferido na invenção a prevenção ou redução da perda de sangue perioperatória e/ou uma resposta inflamatória sistêmica (SIR) num paciente, especialmente associados com a cirurgia cardiotorácica. Um tratamento envolve a administração de um polipeptídeo KI compreendendo um domínio Kunitz. Uma forma de realização do método envolve a utilização de um péptido contendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1 que tem uma afinidade para a calicreína que é aproximadamente 1000 vezes ou mais superior ao de uma serina protéase de largo espectro, por exemplo, a aprotinina, que é isolada do pulmão bovino e atualmente aprovada para uso em procedimentos CABG (TRASYLOL®, Bayer Corporation Pharmaceutical Division, West Haven, Connecticut).

Os pacientes submetidos a qualquer um de uma série de procedimentos cirúrgicos, especialmente os que envolvem a circulação extracorporeal, por exemplo, cirurgia cardiotorácica como, por exemplo, CPB e/ou trauma ósseo, como a separação do esterno ou artoplastia da anca, estão em risco de perda de sangue perioperatória e inflamação. O contato do sangue de um paciente com as superfícies de corte do osso ou equipamento de CPB é suficiente para ativar uma ou várias respostas indesejáveis em cascata, incluindo um sistema de ativação de contacto (CAS), que

pode conduzir a uma perda de sangue perioperatória considerável, o que requer transfusão de sangue imediata, bem como uma resposta inflamatória sistêmica (SIR), que, por sua vez, pode resultar em danos permanentes nos tecidos e órgãos. Embora não desejando ser limitado a qualquer mecanismo ou teoria particular, parece que a perda de sangue que ocorre associada com cirurgia cardiotorácica, por exemplo, CPB, como num procedimento CABG, provavelmente resulta num considerável extravasamento capilar, que pode resultar em perda significativa de sangue que deve ser substituído por transfusão de sangue imediata.

Os métodos aqui descritos são úteis para prevenir ou reduzir isquemias diversas incluindo, por exemplo, perda de sangue perioperatória e SIR num paciente submetido a um procedimento cirúrgico, e especialmente em que o procedimento cirúrgico requer a circulação extracorporeal, por exemplo, cirurgia cardiotorácica, tal como, por exemplo, o CPB. Os métodos descritos na presente invenção são particularmente úteis para a prevenção ou redução da perda de sangue perioperatória e/ou SIR num paciente submetido a um procedimento CABG que necessita de CPB, ou outras cirurgias cardíaca.

As composições preferidas para utilização médica compreendem um polipeptídeo KI descrito na presente invenção. Tais composições úteis podem ainda compreender um ou mais tampões, adjuvantes e excipientes farmacologicamente aceitáveis, que podem proporcionar uma característica desejável para a composição incluindo, mas não se limitando a, melhorar a administração da composição a um paciente, melhorar a semivida de circulação do polipeptídeo KI da composição, melhorar a compatibilidade da composição com a

química do sangue do paciente, melhorar o armazenamento da composição, e/ou melhorar a eficácia da composição após a administração a um paciente. Além de um polipeptídeo KI aqui descrito, as composições podem ainda compreender um ou mais de outros compostos farmacologicamente ativos que proporcionam um benefício profilático ou terapêutico adicional a um paciente de um procedimento cirúrgico invasivo.

As composições úteis nos métodos da presente invenção compreendem qualquer um dos polipeptídeos de domínio Kunitz ou polipeptídeos KI compreendendo tais polipeptídeos de domínio Kunitz aqui descritos. Particularmente preferidos são polipeptídeos KI compreendendo um polipeptídeo de domínio Kunitz possuindo uma sequência de 58 aminoácidos dos aminoácidos 3-60 da SEQ ID NO:2. Um exemplo de um polipeptídeo KI particularmente preferido útil nos métodos e composições aqui descritos é o polipeptídeo PEP-1 KI com a sequência de 60 aminoácidos da SEQ ID NO:2. A sequência de nucleótidos que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 é fornecida na SEQ ID NO:3 (ver, por exemplo, nucleótidos 309-488 na FIG. 2). Entende-se que com base no código genético conhecido, a presente invenção também fornece formas degeneradas da sequência de nucleótidos da SEQ ID NO:3 simplesmente substituindo um ou mais dos códons degenerados conhecidos para cada um dos aminoácidos codificada pela sequência de nucleótidos. Os nucleótidos 7-180 da SEQ ID NO:3, e formas degeneradas da mesma, codificam o polipeptídeo de domínio Kunitz que ocorre de forma não natural com a sequência de 58 aminoácidos dos aminoácidos 3-60 da SEQ ID NO:2.

Qualquer de uma variedade de moléculas de ácido nucleico pode compreender a sequência de nucleótidos 7-180 nucleótidos da SEQ ID NO:3, formas degeneradas e regiões destas, incluindo mas não limitado a, genomas recombinantes de fago, vetores virais recombinantes de mamífero, vetores virais recombinantes de inseto, mini-cromossomas de levedura e vários plasmídeos. Tais plasmídeos incluem aqueles usados para clonar e/ou expressar tais sequências codificantes de nucleótidos. Os vetores de expressão fornecem um promotor, que pode ser operacionalmente ligado a uma sequência nucleotídica em particular, e uma célula hospedeira apropriada que é capaz de transcrever a sequência codificante de nucleótidos específica num RNA mensageiro (mRNA) funcional e também traduzir o mRNA no polipeptídeo correspondente. Um polipeptídeo assim produzido pode então ser isolado a partir da célula hospedeira. As moléculas de ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um domínio Kunitz ou um polipeptídeo KI aqui descrito podem ser feitas através de métodos padrão de síntese de ácido nucleico, metodologias de DNA recombinante, métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR), e qualquer combinação dos mesmos.

Perda de sangue perioperatória e redução do fluxo sanguíneo do coração

Devido aos muitos avanços na medicina, uma série de procedimentos cirúrgicos altamente invasivos são realizados diariamente que resultam em perda de sangue, ou colocam os pacientes em alto risco de perda de sangue. Tais pacientes devem ser cuidadosamente monitorizados para restaurar e manter o fornecimento normal de sangue e a hemostasia,

podendo os pacientes precisar de transfusões de sangue. Os procedimentos cirúrgicos que envolvem a perda de sangue incluem aqueles que envolvem métodos de circulação extracorporal, como a cirurgia cardiotorácica, por exemplo, o CPB. Em tais métodos, o coração de um paciente é parado e a circulação, oxigenação, e manutenção do volume do sangue são realizadas artificialmente usando um circuito extracorporal e um oxigenador de membrana sintética. Estas técnicas são normalmente usadas durante a cirurgia cardíaca. Além disso, é evidente que a cirurgia envolvendo trauma extenso de osso, como a divisão do esterno necessária em CABG ou procedimentos de substituição da anca, também está associada com a ativação do CAS, que pode resultar numa variedade de perturbações no sangue e vasculatura.

A doença arterial coronária (DAC) aterosclerótica causa um estreitamento do lúmen de uma ou várias das artérias coronárias; isso limita o fluxo de sangue para o miocárdio (isto é, o músculo do coração) e pode causar angina, insuficiência cardíaca e enfarte do miocárdio. Na fase final da aterosclerose da artéria coronária, a circulação coronária pode ser quase completamente oclusa, causando angina ou insuficiência cardíaca com risco de vida, com uma mortalidade muito alta. Os procedimentos de CABG podem ser necessários para transpor o vaso sanguíneo ocluso e restaurar sangue para o coração; estes podem potencialmente salvar vidas. Os procedimentos CABG estão entre as cirurgias mais invasivas em que uma ou mais veias ou artérias saudáveis são implantadas para fornecer um "bypass" em torno da área obstruída do vaso doente. Os procedimentos CABG apresentam um risco perioperatório pequeno mas importante, mas são muito bem-sucedidos em

fornecer aos pacientes um alívio imediato da mortalidade e morbidade da doença cardiovascular aterosclerótica. Apesar destes resultados muito encorajadores, a repetição dos procedimentos de CABG é frequentemente necessária, como indicado por um claro aumento do número de pacientes que eventualmente são submetidos a um segundo e mesmo terceiro procedimento; a mortalidade e morbidade perioperatória observadas nos procedimentos de CABG primários aumentam nos procedimentos seguintes de repetição.

Têm havido melhorias nas técnicas cirúrgicas minimamente invasivas para DAC simples. No entanto, quase todos os procedimentos de CABG realizados para a doença cardíaca valvular e/ou congénita, transplante cardíaco, e grandes procedimentos aórticos, ainda são realizadas em pacientes apoiados por CPB. No CPB, cânulas grandes são inseridas nos vasos maiores de um paciente para permitir o bombeamento mecânico e oxigenação do sangue usando um oxigenador de membrana. O sangue é devolvido ao paciente sem fluir através dos pulmões, devido à hipoperfusão pulmonar durante o procedimento. O coração é parado usando uma solução cardioplégica, o paciente é arrefecido para ajudar a prevenir danos cerebrais, e o volume de circulação periférica aumentada por um circuito extracorporal, ou seja, o circuito CPB, o que requer "priming" com o sangue do dador e misturas de solução fisiológica são utilizados para preencher o circuito extracorporal. O CPB tem sido amplamente utilizado numa variedade de procedimentos realizados durante quase meio século com resultados de sucesso. A interação entre as superfícies artificiais, células sanguíneas, proteínas do sangue, endotélio vascular danificado, e tecidos extravasculares, tal como o ósseo, perturba a hemostasia e frequentemente ativa o CAS, que,

como mencionado acima, pode resultar numa variedade de perturbações no sangue e vasculatura. Essas perturbações levam ao excesso de sangramento intraoperatório, o que requer, então, transfusão de sangue imediata. Uma consequência da circulação do sangue total através de um circuito extracorporeal em CPB pode também incluir a resposta inflamatória sistêmica (SIR), que é iniciada por ativação de contacto de sistemas de coagulação e de complemento. De facto, grande parte da morbidade e mortalidade associadas a procedimentos cirúrgicos de CPB aparentemente mecanicamente bem-sucedidos é o resultado dos efeitos da ativação da coagulação, fibrinólise ou sistemas de complemento. Esta ativação pode danificar o sistema pulmonar, levando à síndrome de dificuldade respiratória no adulto (ARDS), insuficiência renal e da circulação esplâncnica e indução de uma coagulopatia geral levando à perda de sangue e à necessidade de transfusões. Além dos perigos da perda de sangue perioperatória, patologias adicionais associadas com SIR incluem défice neurocognitivos, acidente vascular cerebral, insuficiência renal, enfarte agudo do miocárdio e danos no tecido cardíaco.

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

Considerações sobre a Administração e Dosagem de polipeptídeos KI

Os polipeptídeos KI aqui descritos podem ser administrados a um paciente antes, durante e/ou após um procedimento cirúrgico numa composição farmacologicamente aceitável. O termo composição "farmacologicamente aceitável" refere-se a um adjuvante não tóxico ou um excipiente que pode ser administrado a um paciente, em conjunto com um composto da presente invenção, e em que o adjuvante ou excipiente não destrói a atividade biológica ou farmacológica da composição. Os polipeptídeos KI aqui descritos podem ser administrados localmente ou sistemicamente por qualquer meio adequado para a entrega de uma quantidade dos polipeptídeos KI inibidores de calicreína a um paciente, incluindo mas não se limitando a administrações sistêmicas, tais como, por exemplo, por via intravenosa e inalação. A administração por via parentérica é particularmente preferida.

Para administração por via parentérica, os polipeptídeos podem ser injetadas por via intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, ou subcutânea. A administração por via intravenosa é preferida. Tipicamente, as composições para administração por via intravenosa são soluções em tampão aquoso isotônico estéril. Outros adjuvantes farmacologicamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados a, água estéril, solução fisiológica, e solução salina tamponada (incluindo tampões como o fosfato ou o acetato), álcool, óleos vegetais, polietilenoglicóis, gelatina, lactose, amilose, estearato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina, etc. Se necessário, a composição também pode incluir um agente solubilizante e um anestésico

local como a lidocaína para aliviar a dor no local da injeção, conservantes, estabilizantes, molhantes, emulsionantes, sais, lubrificantes, etc., desde que estes não reagem deletariamente com os compostos ativos. De modo semelhante, a composição pode compreender excipientes convencionais, por exemplo, substâncias adjuvantes orgânicas ou inorgânicas farmacêuticamente aceitáveis adequadas para aplicação parentérica, entérica ou intranasal que não reagem deletariamente com os compostos ativos. Geralmente, os ingredientes serão fornecidos, quer separadamente, ou misturados em conjunto na forma de dose unitária, por exemplo, como um pó liofilizado seco ou um concentrado isento de água num recipiente hermeticamente selado tal como uma ampola ou saqueta com indicação da quantidade de agente ativo em unidades de atividade. Quando a composição é para ser administrada por infusão, pode ser dispensada com um frasco para infusão contendo "água para injeção" estéril de grau farmacêutico ou solução fisiológica. Quando a composição é para ser administrada por infusão, uma ampola de água estéril ou solução fisiológica para injeção pode ser fornecida de modo que os ingredientes possam ser misturados antes da administração.

De preferência, os métodos descritos na presente invenção compreendem a administração de um polipeptídeo KI a um paciente como uma perfusão intravenosa de acordo com qualquer procedimento aprovado. Assim, um polipeptídeo KI aqui descrito pode ser administrado a um paciente submetido a um procedimento CABG nos momentos semelhantes aos atualmente utilizados em protocolos aprovados para administrar aprotinina e numa quantidade necessária para fornecer um paciente com um número ou concentração necessário de unidades inibitórias de calicreína (KIU). De

acordo com a invenção, um polipeptídeo KI aqui descrito pode também ser administrado a um paciente no período pós-operatório imediato, quando anormalidades de sangramento podem ocorrer como consequência de efeitos a jusante do SIR. Por exemplo, num procedimento que envolve CPB, um polipeptídeo KI aqui descrito pode ser administrado a um paciente como uma dose de carga inicial, por exemplo, uma quantidade eficaz ao longo de um tempo conveniente, tais como 10 minutos, antes da indução da anestesia. Em seguida, no momento da indução da anestesia, uma segunda dose de polipeptídeo KI pode ser injetada no fluído "priming" CPB ("volume de bomba primário"). O paciente pode então ser colocado em uma dose de perfusão contínua e controlada por via intravenosa durante a duração do procedimento cirúrgico, e após o procedimento, se indicado.

Atualmente existem dois regimes aprovados nos Estados Unidos para administrar a aprotinina num paciente submetido a um procedimento CABG (ver rótulo do produto e literatura inclusa para o TRASYLOL®, Bayer Corporation Pharmaceutical Division, West Haven, Connecticut). Em tal regime aprovado é usada uma dose intravenosa de 2 milhões de KIU de carga, 2 milhões de KIU no volume da bomba principal, e 500.000 KIU por hora de cirurgia. Outro regime aprovado usa uma dose intravenosa de 1 milhão KIU, 1 milhão de KIU no volume da bomba principal, e 250.000 KIU por hora de cirurgia. Como estes regimes são baseados em KIU, os regimes são facilmente adaptados a qualquer polipeptídeo KI aqui descrito uma vez que a atividade específica e KIU de um polipeptídeo KI em particular foram determinados por ensaios convencionais. Devido à afinidade de ligação melhorada e atividade inibitória de polipeptídeos KI representativos aqui descrito em relação à aprotinina,

espera-se que tais composições e métodos da presente invenção sejam suscetíveis de exigir menos miligramas (mg) por paciente para fornecer a um paciente o número necessário ou concentração de KIU.

Várias considerações no que diz respeito à dosagem com um polipeptídeo KI em métodos aqui descritos podem ser ilustradas por meio de exemplo com o polipeptídeo PEP-1 KI representativo da invenção possuindo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 (peso molecular de 7.054 Daltons).

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

Tabela 1.

Substrato da Protéase	PEP-1 $K_{i, app}$ (pM)	Aprotinina $K_{i, app}$ (pM)
Calicreína plasmática humana	44	$3,0 \times 10^4$
Calicreína da urina humana	$>1 \times 10^8$	$4,0 \times 10^3$
Calicreína pancreática de suíno	$2,7 \times 10^7$	550
Clr humano, ativado	$>2,0 \times 10^8$	$>1,0 \times 10^7$
Cls humano, ativado	$>2,0 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^8$
Fator XIa do plasma humano	$1,0 \times 10^4$	ND
Fator XIIa do plasma humano	$>2,0 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^8$
Plasmina humana	$1,4 \times 10^5$	894
Tripsina pancreática humana	$>2 \times 10^7$	ND
Quimiotripsina pancreática humana	$>2,0 \times 10^7$	$7,3 \times 10^5$
Elastase de neutrófilos humanos	$>2,0 \times 10^7$	$1,7 \times 10^6$
Trombina plasmática humana	$>2,0 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^8$
ND = não determinado		

Claramente, o polipeptídeo PEP-1 KI é altamente específico para a calicreína plasmática humana. Além disso, a

afinidade ($K_{i,app}$) do PEP-1 para a calicreína é 1000 vezes maior do que a afinidade da aprotinina para a calicreína: o $K_{i,app}$ do PEP-1 para a calicreína é de cerca de 44 pM (Tabela 1), ao passo que o $K_{i,app}$ da aprotinina para calicreína é de 30.000 pM. Assim, uma dose de PEP-1 poderia ser aproximadamente 1000 vezes menor do que a utilizada para a aprotinina numa base por mole. No entanto, a consideração de vários outros fatores podem fornecer uma estimativa mais precisa da dose de PEP-1 necessária na prática. Tais fatores incluem a quantidade de calicreína ativada durante a CPB num paciente em particular, a concentração de calicreína necessária para induzir uma SIR, e a biodisponibilidade e de distribuição farmacológica do PBP-1 num paciente. No entanto, a utilização de um polipeptídeo KI em métodos de acordo com a presente invenção e fornecido em doses atualmente aprovadas para o uso da aprotinina ainda é esperado fornecer melhorias significativas quando comparado com o uso atual da aprotinina bovina que apresenta menor especificidade e menor afinidade.

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

Outro fator a considerar é a concentração limite de calicreína necessária para induzir uma SIR num paciente. Se a concentração de calicreína ativa tiver de ser mantida abaixo, por exemplo, de 1 nM, em seguida, devido à sua elevada afinidade para a calicreína, o PEP-1 oferece uma vantagem significativa sobre a aprotinina na quantidade de proteína que seria necessária para inibir a SIR. Em particular, uma concentração de PEP-1 de 1 nM inibiria 99,6% da calicreína presente a 1 nM (ou seja, apenas 0,4 pM de calicreína livre permaneceria no sangue), enquanto uma concentração de aprotinina de 1 nM só iria inibir a 24,5% da calicreína presente a 1 nM. Para a aprotinina inibir 99% da calicreína a 1 nM, é necessária pelo menos uma concentração de aprotinina no plasma de 3 μ M (isto é, uma concentração 3000 vezes mais elevada do que para o PEP-1).

Para um paciente submetido a CPB, uma dose clínica inicial de PEP-1 pode ser estimada a partir de um regime de dose recomendado para a aprotinina (1×10^6 KIU) mencionado acima. A aprotinina é descrita na literatura inclusa como tendo atividade inibitória específica de 7143 KIU/mg determinada usando um ensaio de tensão arterial num cão. Portanto, 1×10^6 KIU de aprotinina é equivalente a 140 mg de aprotinina (isto é, 1×10^6 KIU/7143 KIU/mg = 140 mg de aprotinina). Num paciente tendo um volume de plasma sanguíneo de 5 litros, 140 mg corresponde a aproximadamente 4,3 μ M de aprotinina (o peso molecular da aprotinina é de 6512 Daltons). A atividade específica da aprotinina no ensaio de inibição padrão utilizado para o PEP-1 é de 0,4 KIU/mg de polipeptídeo. Uma dose de 140 mg corresponderia a uma dose de carga de aprotinina de 56 KIU (140 mg $\times$ 0,4 KIU/mg = 56 KIU). Em contraste, uma vez que a atividade específica do polipeptídeo PEP-1 KI é de 10 KIU/mg no

ensaio de inibição padrão, uma dose de apenas 5,6 mg de PEP-1 seria necessária para fornecer o número de KIU equivalente a 140 mg de aprotinina. Num paciente com um volume de plasma de 5 litros, isto corresponde a cerca de 160 nM de PEP-1 (peso molecular do PEP-1 é 7054 Daltons), apesar de uma dose mais elevada do polipeptídeo PEP-1 KI poder ser necessária se toda a calicreína plasmática (500 nM) for ativada e/ou se este polipeptídeo KI for mal distribuído num paciente.

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

Como variantes do domínio Kunitz 1 da proteína da LACI humana, são esperados menos efeitos secundários com a administração dos polipeptídeos KI aos pacientes do que com a aprotinina, que é uma proteína bovina que está documentada como causadora de reações anafiláticas e

anafilactóides em pacientes, especialmente nas administrações repetidas, tal como nos procedimentos CABG repetidos. Além disso, a ligação altamente específica dos polipeptídeos KI aqui descritos à calicreína vai limitar ou eliminar efetivamente as tendências trombóticas observadas com aprotinina, e reduzir os problemas observados com permeabilidade do enxerto após os procedimentos CABG.

A invenção será adicionalmente descrita com referência aos seguintes exemplos não limitativos. A totalidade dos conhecimentos das patentes, pedidos de patentes e de todas as outras publicações e sítios Web aqui citadas são incorporados por referência na sua totalidade.

EXEMPLIFICAÇÃO

Exemplo 1: Um polipeptídeo KI representativo.

Um polipeptídeo KI (PEP-1) de ocorrência não natural útil nas composições e métodos da presente invenção foi identificado num fago recombinante numa biblioteca de exibição de fagos como sendo um polipeptídeo que se liga à calicreína. O PEP-1 tem a seguinte sequência de aminoácidos: Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO:2). O peso molecular do PEP-1 é 7.054 Daltons.

A sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:3) do DNA do fago recombinante que codifica a sequência de aminoácidos PEP-1 (aminoácidos 3-60 da SEQ ID NO:2) foi isolada e sequenciada

por métodos padrão determinados a partir do DNA do fago recombinante. O PEP-1 foi produzido em quantidades úteis para posterior caracterização como uma proteína recombinante em células hospedeiras de fenótipo *His4⁻* da estirpe de levedura *Pichia pastoris*.

Exemplo 2: Construção de um plasmídeo recombinante para expressar polipeptídeos KI.

O plasmídeo inicial, pHIL-D2, é resistente à ampicilina e contém um alelo *His4* de tipo selvagem de *P. pastoris*. A sequência final de DNA compreendendo a sequência codificante para a proteína de fusão Prepro-PEP-1 matα no plasmídeo de expressão recombinante pPIC-IC503 é apresentada na FIG. 2. A sequência de DNA de pHIL-D2 foi modificada para produzir pPIC-K503, como descrito em seguida:

1. O sítio *BstBI* na região 3' de AOX1 do pHIL-D2, localizado a jusante do gene *His4*, foi removido por digestão de restrição parcial, preenchimento, e ligação, modificando a sequência de TTCGAA (SEQ ID NO:23) para TTCGCGAA (SEQ ID NO:24). Esta modificação foi feita para facilitar e direcionar a clonagem da cassete de expressão para o plasmídeo.
2. O sítio *AatII* tendo o gene *bla* localizado a jusante de *His4* foi removido por digestão de restrição, preenchimento e ligação, modificando a sequência de GACGTC (SEQ ID NO:25) para GACGTACGTC (SEQ ID NO:26). Esta modificação foi feita para facilitar a clonagem de cassetes de expressão possuindo sítios *AatII* no plasmídeo. O DNA que codifica para PEP-1 foi sintetizada com base na

sequência de nucleótidos do fago original exibindo a ligação para a calicreína e consistiu em 450 pares de bases (pb). A sequência final de DNA da inserção no plasmídeo de pHIL-D2 é flanqueada por uma sequência 5' AOX1 e uma sequência 3' AOX1 (partes das quais são mostradas na FIG. 2) e codificam uma proteína de fusão compreendendo o peptídeo sinal prepro mat α de *S. cerevisiae* fundido com a sequência codificante estrutural para o polipeptídeo PEP-1 KI. O peptídeo sinal foi adicionado para facilitar a secreção de PEP-1 a partir das células hospedeiras de levedura. Os oligonucleótidos para formar o segmento foram sintetizados e obtidos comercialmente (Genesis Labs, The Woodlands, TX), e o segmento foi gerado por reação em cadeia da polimerase (PCR). O DNA sintético ligado que codifica a proteína de fusão prepro/PEP-1 mat α foi em seguida incorporado por ligação no plasmídeo pHIL-D2 modificado entre os sítios *Bst*BI e *Eco*RI.

Os produtos de ligação foram usadas para transformar a estirpe XL1 Blue de *Escherichia coli*. Um ensaio de PCR foi utilizado para rastrear os transformantes de *E. coli* para a construção de plasmídeo desejada. O DNA dos extratos celulares foi amplificado por PCR utilizando primers contendo as sequências 5' AOX1 e 3' AOX1 (ver acima e FIG.2). Os produtos de PCR do número correto de pares de base foram sequenciados. Além disso, cerca de 20-50 pb em cada lado dos sítios de clonagem foram sequenciados, e a sequência prevista foi obtida. A sequência final de DNA do segmento no plasmídeo pHIL-D2 (para produzir o plasmídeo pPIC-K503) é mostrada na FIG. 2 juntamente com a zona das sequências flanqueadoras 5' e 3' de AOX1 e a sequência de

aminoácidos correspondente da proteína de fusão compreendendo o péptido de sinal prepro mat α de *S. cerevisiae* fundido com a sequência codificante estrutural para o polipeptídeo PEP-1 KI. Um transformante com a construção de plasmídeo de expressão desejada, o plasmídeo pPIC-K503, foi selecionado para preparar linhas de células de levedura para a produção de rotina de PEP-1.

Exemplo 3: Produção de PEP-1 a partir de linha de células de levedura recombinante.

Os esferoplastos de *P. pastoris* GS 115 com o fenótipo *His4*⁻ foram transformados com o plasmídeo de expressão pPIC-K503 (acima) seguindo-se a linearização do plasmídeo no sítio de restrição *SacI* e recombinação homóloga do DNA plasmídico na região 5' do locus *AOX1* do hospedeiro. O fenótipo da estirpe de produção é *His4*⁺. O plasmídeo completo foi inserido na região 5' *AOX1* da sequência genómica de levedura.

Os isolados da transformação foram selecionados para o crescimento na ausência de histidina exógena com metanol como única fonte de carbono. Mais do que 95% dos transformantes mantiveram a capacidade do tipo selvagem para crescer com metanol como única fonte de carbono, demonstrando assim que o plasmídeo foi inserido no genoma do hospedeiro por recombinação homóloga, em vez de substituição. Estes transformantes não requerem histidina exógena para o crescimento, demonstrando assim que o plasmídeo se tinha integrado no genoma do hospedeiro. As colónias selecionadas foram clonadas. Foram realizados estudos de expressão em pequenas culturas para identificar os clones que segregam os níveis mais altos de PEP-1 ativo

para o meio de cultura. Os níveis de secreção de PEP-1 em sobrenadantes de soluções de cultura clarificadas foram quantificados para os níveis de PEP-1 por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e avaliadas quanto à inibição da calicreína. Um clone de levedura foi selecionado para a produção de PEP-1 com base no seu elevado nível de expressão de PEP-1 entre as culturas amostradas.

Os bancos de células principais e de trabalho de *P. pastoris* que produzem PEP-1 foram preparados comercialmente (MDS Pharma Services, Bothell, Washington). A produção padrão de PEP-1 na levedura compreende três passos como se segue: (1) preparação da cultura do inóculo, (2) fermentação, e (3) recuperação da cultura.

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

As fermentações foram efetuadas num fermentador fechado Braun de 100 litros cheio com caldo estéril. Cada fermentação foi iniciada com a transferência do conteúdo dos frascos de cultura de seis inóculos para o fermentador. Após aproximadamente 24 horas, o glicerol no fermentador foi esgotado e foi necessário adicionar mais glicerol durante aproximadamente mais 8 horas.

Uma fase de alimentação mista, que durou aproximadamente 83 horas, foi iniciada em seguida pela adição de uma dosagem de glicerol e metanol. No final deste tempo, a fermentação foi terminada, e o conteúdo do fermentador foi diluído com água purificada. A purificação e processamento de PEP-1 consistiram em cinco passos da seguinte forma: (1) cromatografia de leito expandido (2), cromatografia de troca catiónica, (3) cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), (4) ultrafiltração e diafiltração, e (5) filtração final e acondicionamento.

O passo inicial de purificação consistiu na cromatografia de leito expandido. A cultura diluída do fermentador foi aplicada à coluna equilibrada e empacotada com a resina Streamline SP (coluna de cromatografia 200 Amersham Pharmacia Streamline, Amersham Pharmacia, Piscataway, New Jersey). A coluna foi então lavada (50 mM de ácido acético, pH = 3,0 - 3,5) num modo de fluxo ascendente para lavar as células de levedura do leito expandido. O adaptador superior foi levantado acima do leito expandido para melhorar a lavagem. O fluxo foi interrompido e o leito foi deixado em repouso. O adaptador foi movido para baixo de modo a ficar ligeiramente acima do leito assente. A direção do fluxo foi invertida. O efluente foi recolhido. A lavagem foi continuada num modo descendente usando 50 mM de acetato de sódio, pH 4,0. O efluente foi recolhido. O PEP-1 foi eluído da coluna utilizando acetato de sódio a 50 mM, pH 6,0. O eluato foi recolhido num recipiente de 50 litros. O eluato foi em seguida filtrado através de um filtro de 0,22 μ para um recipiente limpo localizado no sítio de purificação. Amostras adicionais foram recolhidas para a determinação da concentração de PEP-1. Um passo de cromatografia de troca catiónica foi então realizado

utilizando o eluato filtrado da coluna de leito expandido. O PEP-1 foi eluído da coluna utilizando citrato trissódico a 15 mM, pH 6,2.

Proteínas adicionais foram removidas da preparação de PEP-1 por cromatografia de interação hidrofóbica (HIC). Antes da HIC, o eluato da coluna de troca catiónica foi diluído com sulfato de amónio. O eluato foi aplicado à coluna, e o PEP-1 foi eluído com sulfato de amónio (0,572 M) em fosfato de potássio (100 mM), pH 7,0. O eluato foi recolhido em frações com base nos valores de A280. Todas as frações foram recolhidas em frascos PETG estéreis, previamente pesados.

As frações selecionadas foram reunidas dentro de um recipiente limpo. O agregado foi concentrado por ultrafiltração. A preparação de PEP-1 concentrado foi imediatamente diafiltrada contra dez volumes de PBS, pH 7,0.

Um passo final de filtração foi realizado antes da embalagem a fim de minimizar a carga microbiana no volume de PEP-1. A solução em bruto foi filtrada através de um filtro de 0,22 μ e recolhida num frasco PETG estéril, previamente pesado. Uma amostra foi retirada para testes quando da libertação dos lotes. O volume restante foi dispensado assepticamente em frascos PETG estéreis e armazenados a -20°C.

Exemplo 4: Ensaio de Inibição da Calicreína.

Um teste cinético foi utilizado para medir a atividade inibitória de polipeptídeos KI, tais como o PEP-1. O ensaio

cinético mede a fluorescência após a clivagem de um substrato mediada pela calicreína, a cumarina metil amino prolilfenilalanilarginil. Uma quantidade conhecida de calicreína foi incubada com uma diluição em série de polipeptídeo KI padrão ou com uma diluição em série com amostras de polipeptídeo KI em teste, num tampão de reação adequado numa placa de microtitulação. Cada amostra foi executada em triplicado. A solução de substrato foi adicionada e a placa lida imediatamente usando um comprimento de onda de excitação de 360 nm e um comprimento de onda de emissão de 460 nm. Pelo menos duas das curvas padrão de referência e curvas da amostra precisavam de ter um valor de R-quadrado de 0,95 para ser consideradas válidas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Dyax Corporation

<120> PREVENÇÃO E REDUÇÃO DA PERDA DE SANGUE

<130> P33517EP-D3-PCT

<140> EP10180486.2

<141> 2003-06-06

<150> EUA 60/387,239

<151> 2002-06-07

<150> EUA 60/407,003

<151> 2002-08-28

<160> 54

<170> FastSEQ para versão Windows 4.0

<210> 1

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Polipeptídeo Inibidor da Calicreína

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(4)

<223> Xaa = qualquer aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(9)

<223> Xaa = qualquer aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (20)

<223> Xaa = qualquer aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (24)..(29)

<223> Xaa = qualquer aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (41)..(42)

<223> Xaa = qualquer aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (44)

<223> Xaa = qualquer aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (46)..(50)

<223> Xaa = qualquer aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (52)..(54)

<223> Xaa = qualquer aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (56)..(58)

<223> Xaa = qualquer aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)

<223> Pode ser Glu

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)

<223> Pode ser Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala ou Thr

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)

<223> Pode ser His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys ou
Gin

<220>

<221> VARIANTE

<222> (15)

<223> Pode ser Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn ou Gin

<220>

<221> VARIANTE

<222> (16)

<223> Pode ser Gly, Ser, Asp ou Asn

<220>

<221> VARIANTE

<222> (17)

<223> Pode ser Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gin ou Thr

<220>

<221> VARIANTE

<222> (18)

<223> Pode ser Leu, Gin ou Ala

<220>

<221> VARIANTE

<222> (19)

<223> Pode ser Gin, Leu, Asn ou Ile

<220>

<221> VARIANTE

<222> (21)

<223> Pode ser Phe, Tyr, His ou Ile

<220>

<221> VARIANTE

<222> (22)

<223> Pode ser Phe

<220>

<221> VARIANTE

<222> (23)

<223> Pode ser Phe

<220>

<221> VARIANTE

<222> (31)

<223> Pode ser Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile ou Thr

<220>

<221> VARIANTE

<222> (32)

<223> Pode ser Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly ou Val

<220>

<221> VARIANTE

<222> (34)

<223> Pode ser Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly ou Leu

<220>

<221> VARIANTE

<222> (35)

<223> Pde ser Trp ou Phe

<220>

<221> VARIANTE

<222> (39)

<223> Pde ser Gly, Ala, Ser ou Asp

<220>

<221> VARIANTE

<222> (40)

<223> Pde ser Ala

<220>

<221> VARIANTE

<222> (43)

<223> Pde ser Gly

<220>

<221> VARIANTE

<222> (45)

<223> Pde ser Tyr

<400> 1

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Asp	Asp	Gly	Arg	Cys	Arg	Ala
1				5					10					15	
Ala	His	Pro	Xaa	Trp	Tyr	Tyr	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Glu	Glu
			20					25					30		
Phe	Thr	Tyr	Gly	Gly	Cys	Glu	Gly	Xaa	Xaa	Asn	Xaa	Phe	Xaa	Xaa	Xaa
		35					40					45			
Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Xaa						
		50				55									

<210> 2

<211> 60

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo de Ligação Isolado

<400> 2

```

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys
 1           5           10           15
Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
      20           25           30
Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu
      35           40           45
Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
      50           55           60

```

<210> 3

<211> 179

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência Codificante de Pep-1

<400> 3

```

gaggctatgc actctttctg tgctttcaag gctgacgacg gtcgtgcaga gctgctcacc 60
caagatggtt cttcaacatc ttcacggcgc aatgcgagga gttcatctac ggtggttggtg 120
agggtaacta aacacagattc gactctctag aggagtgtaa gaagatgtgt actagagac 179

```

<210> 4

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo de Ligação Isolado

<400> 4

```

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala
 1          5          10          15
Asn His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
      20          25          30
Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
      35          40          45
Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50          55

```

<210> 5

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo de Ligação Isolado

<400> 5

```

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1          5          10          15
Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
      20          25          30
Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
      35          40          45
Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50          55

```

<210> 6

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo de Ligação Isolado

<400> 6

```

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
1      5      10      15
Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Gln
20      25      30
Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Ala Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35      40      45
Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50      55

```

<210> 7

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo de Ligação Isolado

<400> 7

```

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
1      5      10      15

Ser Leu Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20      25      30
Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35      40      45
Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50      55

```

<210> 8

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo de Ligação Isolado

<400> 8

Met	His	Ser	Phe	Cys	Ala	Phe	Lys	Ala	Asp	Asp	Gly	His	Cys	Lys	Ala
1				5					10					15	
Asn	His	Gln	Arg	Phe	Phe	Phe	Asn	Ile	Phe	Thr	Arg	Gln	Cys	Glu	Glu
			20				25						30		
Phe	Ser	Tyr	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Asn	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Leu
		35				40						45			
Glu	Glu	Cys	Lys	Lys	Met	Cys	Thr	Arg	Asp						
	50					55									

<210> 9

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo de Ligação Isolado

<400> 9

Met	His	Ser	Phe	Cys	Ala	Phe	Lys	Ala	Asp	Asp	Gly	His	Cys	Lys	Gly
1				5					10					15	
Ala	His	Leu	Arg	Phe	Phe	Phe	Asn	Ile	Phe	Thr	Arg	Gln	Cys	Glu	Glu
			20				25						30		
Phe	Ile	Tyr	Gly	Gly	Cys	Glu	Gly	Asn	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Leu
		35				40						45			
Glu	Glu	Cys	Lys	Lys	Met	Cys	Thr	Arg	Asp						
	50					55									

<210> 10

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo de Ligação Isolado

<400> 10

Met	His	Ser	Phe	Cys	Ala	Phe	Lys	Ala	Asp	Asp	Gly	Arg	Cys	Lys	Gly
1				5					10					15	
Ala	His	Leu	Arg	Phe	Phe	Phe	Asn	Ile	Phe	Thr	Arg	Gln	Cys	Glu	Glu
			20					25					30		
Phe	Ile	Tyr	Gly	Gly	Cys	Glu	Gly	Asn	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Leu
		35					40					45			
Glu	Glu	Cys	Lys	Lys	Met	Cys	Thr	Arg	Asp						
		50				55									

<210> 11

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo de Ligação Isolado

<400> 11

Met	His	Ser	Phe	Cys	Ala	Phe	Lys	Ala	Asp	Gly	Gly	Arg	Cys	Arg	Gly
1				5					10					15	
Ala	His	Pro	Arg	Trp	Phe	Phe	Asn	Ile	Phe	Thr	Arg	Gln	Cys	Glu	Glu
			20					25					30		
Phe	Ser	Tyr	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Asn	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Leu
		35					40					45			
Glu	Glu	Cys	Lys	Lys	Met	Cys	Thr	Arg	Asp						
		50				55									

<210> 12

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo de Ligação Isolado

<400> 12

Met	His	Ser	Phe	Cys	Ala	Phe	Lys	Ala	Asp	Asp	Gly	Pro	Cys	Arg	Ala
1				5					10					15	
Ala	His	Pro	Arg	Trp	Phe	Phe	Asn	Ile	Phe	Thr	Arg	Gln	Cys	Glu	Glu
			20				25						30		
Phe	Ser	Tyr	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Asn	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Leu
		35				40						45			
Glu	Glu	Cys	Lys	Lys	Met	Cys	Thr	Arg	Asp						
	50					55									

<210> 13

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo de Ligação Isolado

<400> 13

Met	His	Ser	Phe	Cys	Ala	Phe	Lys	Ala	Asp	Val	Gly	Arg	Cys	Arg	Gly
1				5					10					15	
Ala	His	Pro	Arg	Trp	Phe	Phe	Asn	Ile	Phe	Thr	Arg	Gln	Cys	Glu	Glu
			20				25						30		
Phe	Ser	Tyr	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Asn	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Leu
		35				40						45			
Glu	Glu	Cys	Lys	Lys	Met	Cys	Thr	Arg	Asp						
	50					55									

<210> 14

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo de Ligação Isolado

<400> 14

Met	His	Ser	Phe	Cys	Ala	Phe	Lys	Ala	Asp	Val	Gly	Arg	Cys	Arg	Gly
1				5					10					15	
Ala	Gln	Pro	Arg	Phe	Phe	Phe	Asn	Ile	Phe	Thr	Arg	Gln	Cys	Glu	Glu
			20				25						30		
Phe	Ser	Tyr	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Asn	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Leu
		35				40						45			
Glu	Glu	Cys	Lys	Lys	Met	Cys	Thr	Arg	Asp						
	50					55									

<210> 15

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo de Ligação Isolado

<400> 15

Met	His	Ser	Phe	Cys	Ala	Phe	Lys	Ala	Asp	Asp	Gly	Ser	Cys	Arg	Ala
1				5					10					15	
Ala	His	Leu	Arg	Trp	Phe	Phe	Asn	Ile	Phe	Thr	Arg	Gln	Cys	Glu	Glu
			20				25						30		
Phe	Ser	Tyr	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Asn	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Leu
		35				40						45			
Glu	Glu	Cys	Lys	Lys	Met	Cys	Thr	Arg	Asp						
	50					55									

<210> 16

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo de Ligação Isolado

<400> 16

Met	His	Ser	Phe	Cys	Ala	Phe	Lys	Ala	Glu	Gly	Gly	Ser	Cys	Arg	Ala
1				5					10					15	
Ala	His	Gln	Arg	Trp	Phe	Phe	Asn	Ile	Phe	Thr	Arg	Gln	Cys	Glu	Glu
			20					25					30		
Phe	Ser	Tyr	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Asn	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Leu
		35					40					45			
Glu	Glu	Cys	Lys	Lys	Met	Cys	Thr	Arg	Asp						
		50					55								

<210> 17

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo de Ligação Isolado

<400> 17

Met	His	Ser	Phe	Cys	Ala	Phe	Lys	Ala	Asp	Asp	Gly	Pro	Cys	Arg	Gly
1				5					10					15	
Ala	His	Leu	Arg	Phe	Phe	Phe	Asn	Ile	Phe	Thr	Arg	Gln	Cys	Glu	Glu
			20					25					30		
Phe	Ser	Tyr	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Asn	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Leu
		35					40					45			
Glu	Glu	Cys	Lys	Lys	Met	Cys	Thr	Arg	Asp						
		50					55								

<210> 18

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo de Ligação Isolado

<400> 18

```

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Arg Gly
 1          5          10          15
Ala Leu Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
          20          25          30
Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
          35          40          45
Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
          50          55

```

<210> 19

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo de Ligação Isolado

<400> 19

```

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Ser Gly Asn Cys Arg Gly
 1          5          10          15
Asn Leu Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
          20          25          30
Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
          35          40          45
Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
          50          55

```

<210> 20

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo de Ligação Isolado

<400> 20

Met	His	Ser	Phe	Cys	Ala	Phe	Lys	Ala	Asp	Ser	Gly	Arg	Cys	Arg	Gly
1				5				10					15		
Asn	His	Gln	Arg	Phe	Phe	Phe	Asn	Ile	Phe	Thr	Arg	Gln	Cys	Glu	Glu
		20					25					30			
Phe	Ser	Tyr	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Asn	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Leu
		35				40					45				
Glu	Glu	Cys	Lys	Lys	Met	Cys	Thr	Arg	Asp						
50						55									

<210> 21

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo de Ligação Isolado

<400> 21

Met	His	Ser	Phe	Cys	Ala	Phe	Lys	Ala	Asp	Gly	Gly	Arg	Cys	Arg	Ala
1				5				10					15		
Ile	Gln	Pro	Arg	Trp	Phe	Phe	Asn	Ile	Phe	Thr	Arg	Gln	Cys	Glu	Glu
		20					25					30			
Phe	Ser	Tyr	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Asn	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Leu
		35				40					45				
Glu	Glu	Cys	Lys	Lys	Met	Cys	Thr	Arg	Asp						
50						55									

<210> 22

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo de Ligação Isolado

<400> 22

Met	His	Ser	Phe	Cys	Ala	Phe	Lys	Ala	Asp	Asp	Gly	Arg	Cys	Arg	Gly
1				5					10					15	
Ala	His	Pro	Arg	Trp	Phe	Phe	Asn	Ile	Phe	Thr	Arg	Gln	Cys	Glu	Glu
			20					25					30		
Phe	Ser	Tyr	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Asn	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Leu
		35					40					45			
Glu	Glu	Cys	Lys	Lys	Met	Cys	Thr	Arg	Asp						
	50					55									

<210> 23

<211> 6

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sítio de Clonagem Modificado

<400> 23 ttcgaa 6

<210> 24

<211> 8

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sítio de Clonagem Modificado

<400> 24 ttcgcgaa 8

<210> 25

<211> 6

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sítio de Clonagem Modificado

<400> 25 gacgtc 6

<210> 26

<211> 10

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sítio de Clonagem Modificado

<400> 26 gacgtacgtc 10

<210> 27

<211> 548

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência de Nucleótidos da Proteína de Fusão

<400> 27

```

cgacttttaa cgacaacttg agsagatcaa aaasacaacta attattcgaa acgatgagat 60
tcccatctat cttaactgct gttttgttcg ctgcttcctc tgccttggtc gctccagtta 120
acaccactac tgaagacgag actgctcaaa ttccctgctga ggctgtcctc ggttactctg 180
acttggaagg tgacttcgac gtgcgtgttt tgccattctc taactctact aacaacggtt 240
tgttgttcct caccactacc atcgcttcta tcgctgctaa ggaggaaggt gtttcctctg 300
agaagagaga ggctatgcac tctttctgtg cttscaaggc tgacgacggt ccgtgcagag 360
ctgctcaccg aagatggctc ttcaacacct tcacgcgtca atgcgaggag ttcatctacg 420
gtggttggtg gggtaaccaa aacagattcg agtctctaga ggagtgtaaq aagatgtgta 480
ctagagacta gtaagaattc gccttagaca tgactgttcc tcagttcaag ttgggcactt 540
acgagaag 548

```

<210> 28

<211> 145

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Proteína de Fusão

<400> 28

```

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1      5      10      15
Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
      20      25      30
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
      35      40      45
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
      50      55      60
Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
      65      70      75      80
Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala
      85      90      95
Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile
      100      105      110
Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn
      115      120      125
Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
      130      135      140
Asp
145

```

<210> 29

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência BPTI

<400> 29

Arg	Pro	Asp	Phe	Cys	Leu	Glu	Pro	Pro	Tyr	Thr	Gly	Pro	Cys	Lys	Ala
1				5					10					15	
Arg	Ile	Ile	Arg	Tyr	Phe	Tyr	Asn	Ala	Lys	Ala	Gly	Leu	Cys	Gln	Thr
			20				25						30		
Phe	Val	Tyr	Gly	Gly	Cys	Arg	Ala	Lys	Arg	Asn	Asn	Phe	Lys	Ser	Ala
		35					40					45			
Glu	Asp	Cys	Met	Arg	Thr	Cys	Gly	Gly	Ala						
	50					55									

<210> 30

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência ITI-D1

<400> 30

Lys	Glu	Asp	Ser	Cys	Gln	Leu	Gly	Tyr	Ser	Ala	Gly	Pro	Cys	Met	Gly
1				5					10					15	
Met	Thr	Ser	Arg	Tyr	Phe	Tyr	Asn	Gly	Thr	Ser	Met	Ala	Cys	Glu	Thr
			20				25						30		
Phe	Gln	Tyr	Gly	Gly	Cys	Met	Gly	Asn	Gly	Asn	Asn	Phe	Val	Thr	Glu
		35					40					45			
Lys	Glu	Cys	Leu	Gln	Thr	Cys	Arg	Thr	Val						
	50					55									

<210> 31

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência ITI-D2

<400> 31

Thr	Val	Ala	Ala	Cys	Asn	Leu	Pro	Ile	Val	Arg	Gly	Pro	Cys	Arg	Ala
1				5					10					15	
Phe	Ile	Gln	Leu	Trp	Ala	Phe	Asp	Ala	Val	Lys	Gly	Lys	Cys	Val	Leu
		20					25					30			
Phe	Pro	Tyr	Gly	Gly	Cys	Gln	Gly	Asn	Gly	Asn	Lys	Phe	Tyr	Ser	Glu
		35				40					45				
Lys	Glu	Cys	Arg	Glu	Tyr	Cys	Gly	Val	Pro						
	50					55									

<210> 32

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência LACI-D1

<400> 32

Met	His	Ser	Phe	Cys	Ala	Phe	Lys	Ala	Asp	Asp	Gly	Pro	Cys	Lys	Ala
1				5					10					15	
Ile	Met	Lys	Arg	Phe	Phe	Phe	Asn	Ile	Phe	Thr	Arg	Gln	Cys	Glu	Glu
		20					25					30			
Phe	Ile	Tyr	Gly	Gly	Cys	Glu	Gly	Asn	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Leu
		35				40					45				
Glu	Glu	Cys	Lys	Lys	Met	Cys	Thr	Arg	Asp						
	50					55									

<210> 33

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência LACI-D2

<400> 33

```

Lys Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly
 1           5           10           15
Tyr Ile Thr Arg Tyr Phe Tyr Asn Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg
      20           25           30
Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu
      35           40           45
Glu Glu Cys Lys Asn Ile Cys Glu Asp Gly
      50           55

```

<210> 34

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência LACI-D3

<400> 34

```

Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro Ala Asp Arg Gly Leu Cys Arg Ala
 1           5           10           15
Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn Ser Val Ile Gly Lys Cys Arg Pro
      20           25           30
Phe Lys Tyr Ser Gly Cys Gly Gly Asn Glu Asn Asn Phe Thr Ser Lys
      35           40           45
Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys Lys Gly
      50           55

```

<210> 35

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência HKI B9

<400> 35

```

Leu Pro Asn Val Cys Ala Phe Pro Met Glu Lys Gly Pro Cys Gln Thr
 1      5      10      15
Tyr Met Thr Arg Trp Phe Phe Asn Phe Glu Thr Gly Glu Cys Glu Leu
      20      25      30
Phe Ala Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Ser Asn Asn Phe Leu Arg Lys
      35      40      45
Glu Lys Cys Glu Lys Phe Cys Lys Phe Thr
      50      55

```

<210> 36

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência C alfa 3

<400> 36

```

Glu Thr Asp Ile Cys Lys Leu Pro Lys Asp Glu Gly Thr Cys Arg Asp
 1      5      10      15
Phe Ile Leu Lys Trp Tyr Tyr Asp Pro Asn Thr Lys Ser Cys Ala Arg
      20      25      30
Phe Trp Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Glu Asn Lys Phe Gly Ser Gln
      35      40      45
Lys Glu Cys Glu Lys Val Cys Ala Pro Val
      50      55

```

<210> 37

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência TFPI-2 D1

<400> 37

```

Asn Ala Glu Ile Cys Leu Leu Pro Leu Asp Tyr Gly Pro Cys Arg Ala
1      5      10      15
Leu Leu Leu Arg Tyr Tyr Tyr Asp Arg Tyr Thr Gln Ser Cys Arg Gln
20      25      30
Phe Leu Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Ala Asn Asn Phe Tyr Thr Trp
35      40      45
Glu Ala Cys Asp Asp Ala Cys Trp Arg Ile
50      55

```

<210> 38

<211> 61

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência TFPI-2 D2

<400> 38

```

Val Pro Lys Val Cys Arg Leu Gln Val Ser Val Asp Asp Gln Cys Glu
1      5      10      15
Gly Ser Thr Glu Lys Tyr Phe Phe Asn Leu Ser Ser Met Thr Cys Glu
20      25      30
Lys Phe Phe Ser Gly Gly Cys His Arg Asn Arg Ile Glu Asn Arg Phe
35      40      45
Pro Asp Glu Ala Thr Cys Met Gly Phe Cys Ala Pro Lys
50      55      60

```

<210> 39

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência TFPI-2 D3

<400> 39

```

Ile Pro Ser Phe Cys Tyr Ser Pro Lys Asp Glu Gly Leu Cys Ser Ala
1      5      10      15
Asn Val Thr Arg Tyr Tyr Phe Asn Pro Arg Tyr Arg Thr Cys Asp Ala
20      25      30
Phe Thr Tyr Thr Gly Cys Gly Gly Asn Asp Asn Asn Phe Val Ser Arg
35      40      45
Glu Asp Cys Lys Arg Ala Cys Ala Lys Ala
50      55

```

<210> 40

<211> 59

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência APP-I

<400> 40

```

Arg Asn Arg Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg
1      5      10      15
Ala Met Ile Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala
20      25      30
Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr
35      40      45
Glu Glu Tyr Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala
50      55

```

<210> 41

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência EpiNE7

<400> 41

```

Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Val Ala
 1      5      10      15
Met Phe Pro Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln Thr
      20      25      30
Phe Val Tyr Gly Gly Cys Met Gly Asn Gly Asn Asn Phe Lys Ser Ala
      35      40      45
Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala
      50      55

```

<210> 42

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência BITI-E7-141

<400> 42

```

Arg Pro Asp Phe Cys Gln Leu Gly Tyr Ser Ala Gly Pro Cys Val Ala
 1      5      10      15
Met Phe Pro Arg Tyr Phe Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Cys Gln Thr
      20      25      30
Phe Val Tyr Gly Gly Cys Met Gly Asn Gly Asn Asn Phe Val Thr Glu
      35      40      45
Lys Asp Cys Leu Gln Thr Cys Arg Gly Ala
      50      55

```

<210> 43

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência MUTT26A

<400> 43

```

Arg Pro Asp Phe Cys Gln Leu Gly Tyr Ser Ala Gly Pro Cys Val Ala
1      5      10      15
Met Phe Pro Arg Tyr Phe Tyr Asn Gly Ala Ser Met Ala Cys Gln Thr
20
Phe Val Tyr Gly Gly Cys Met Gly Asn Gly Asn Asn Phe Val Thr Glu
35      40      45
Lys Asp Cys Leu Gln Thr Cys Arg Gly Ala
50      55

```

<210> 44

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência MUTQE

<400> 44

```

Arg Pro Asp Phe Cys Gln Leu Gly Tyr Ser Ala Gly Pro Cys Val Ala
1      5      10      15
Met Phe Pro Arg Tyr Phe Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Cys Glu Thr
20
Phe Val Tyr Gly Gly Cys Met Gly Asn Gly Asn Asn Phe Val Thr Glu
35      40      45
Lys Asp Cys Leu Gln Thr Cys Arg Gly Ala
50      55

```

<210> 45

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência MUT1619

<400> 45

```

Arg Pro Asp Phe Cys Gln Leu Gly Tyr Ser Ala Gly Pro Cys Val Gly
1      5      10      15
Met Phe Ser Arg Tyr Phe Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Cys Gln Thr
20      25      30
Phe Val Tyr Gly Gly Cys Met Gly Asn Gly Asn Asn Phe Val Thr Glu
35      40      45
Lys Asp Cys Leu Gln Thr Cys Arg Gly Ala
50      55

```

<210> 46

<211> 62

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência EPI-HNE-1

```

Glu Ala Glu Ala Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly
1      5      10      15
Pro Cys Ile Ala Phe Phe Pro Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly
20      25      30
Leu Cys Gln Thr Phe Val Tyr Gly Gly Cys Met Gly Asn Gly Asn Asn
35      40      45
Phe Lys Ser Ala Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala
50      55      60

```

<400> 46

<210> 47

<211> 56

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência EPI-HNE-2

<400> 47

```

Ala Ala Cys Asn Leu Pro Ile Val Arg Gly Pro Cys Ile Ala Phe Phe
 1      5      10      15
Pro Arg Trp Ala Phe Asp Ala Val Lys Gly Lys Cys Val Leu Phe Pro
      20      25      30
Tyr Gly Gly Cys Gln Gly Asn Gly Asn Lys Phe Tyr Ser Glu Lys Glu
      35      40      45
Cys Arg Glu Tyr Cys Gly Val Pro
      50      55

```

<210> 48

<211> 56

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> EPI-HNE-3 Sequência

<400> 48

```

Ala Ala Cys Asn Leu Pro Ile Val Arg Gly Pro Cys Ile Ala Phe Phe
 1      5      10      15
Pro Arg Trp Ala Phe Asp Ala Val Lys Gly Lys Cys Val Leu Phe Pro
      20      25      30
Tyr Gly Gly Cys Gln Gly Asn Gly Asn Lys Phe Tyr Ser Glu Lys Glu
      35      40      45
Cys Arg Glu Tyr Cys Gly Val Pro
      50      55

```

<210> 49

<211> 56

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência EPI-HNE-4

<400> 49

```

Glu Ala Cys Asn Leu Pro Ile Val Arg Gly Pro Cys Ile Ala Phe Phe
 1           5           10           15
Pro Arg Trp Ala Phe Asp Ala Val Lys Gly Lys Cys Val Leu Phe Pro
          20           25           30
Tyr Gly Gly Cys Gln Gly Asn Gly Asn Lys Phe Tyr Ser Glu Lys Glu
          35           40           45
Cys Arg Glu Tyr Cys Gly Val Pro
 50           55

```

<210> 50

<211> 60

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência DPI14 KR

<400> 50

```

Glu Ala Val Arg Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys
 1           5           10           15
Ile Ala Phe Phe Pro Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys
          20           25           30
Ala Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp
          35           40           45
Thr Glu Glu Tyr Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala
 50           55           60

```

<210> 51

<211> 60

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência DPI24 KR

<400> 51

```

Glu Ala Asn Ala Glu Ile Cys Leu Leu Pro Leu Asp Tyr Gly Pro Cys
 1      5      10      15
Ile Ala Phe Phe Pro Arg Tyr Tyr Tyr Asp Arg Tyr Thr Gln Ser Cys
      20      25      30
Arg Gln Phe Leu Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Ala Asn Asn Phe Tyr
      35      40      45
Thr Trp Glu Ala Cys Asp Asp Ala Cys Trp Arg Ile
      50      55      60

```

<210> 52

<211> 60

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> DPI68 KR Sequência

<400> 52

```

Glu Ala Lys Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Ile Cys
 1      5      10      15
Ile Gly Phe Phe Pro Arg Tyr Phe Tyr Asn Asn Gln Ala Lys Gln Cys
      20      25      30
Glu Arg Phe Val Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu
      35      40      45
Thr Leu Glu Glu Cys Lys Asn Ile Cys Glu Asp Gly
      50      55      60

```

<210> 53

<211> 60

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência DPI84 KR

<400> 53

Glu	Ala	Glu	Thr	Asp	Ile	Cys	Lys	Leu	Pro	Lys	Asp	Glu	Gly	Thr	Cys
1				5					10					15	
Ile	Ala	Phe	Phe	Pro	Arg	Trp	Tyr	Tyr	Asp	Pro	Asn	Thr	Lys	Ser	Cys
		20					25						30		
Ala	Arg	Phe	Val	Tyr	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Asn	Glu	Asn	Lys	Phe	Gly
		35					40					45			
Ser	Gln	Lys	Glu	Cys	Glu	Lys	Val	Cys	Ala	Pro	Val				
	50					55					60				

<210> 54

<211> 58

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)

<223> Pode ser Glu

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)

<223> Pode ser Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala ou Thr

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)

<223> Pode ser His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys ou
Gin

<220>

<221> VARIANTE

<222> (15)

<223> Pode ser Ala, Ser, Gly, Met, Asn ou Gin

<220>

<221> VARIANTE

<222> (16)

<223> Pode ser Gly, Ser, Asp ou Asn

<220>

<221> VARIANTE

<222> (17)

<223> Pode ser Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gin ou Thr

<220>

<221> VARIANTE

<222> (18)

<223> Pode ser Leu, Gin ou Ala

<220>

<221> VARIANTE

<222> (19)

<223> Pode ser Gin, Leu, Asn ou Ile

<220>

<221> VARIANTE

<222> (21)

<223> Pode ser Phe, Tyr, His ou Ile

<220>

<221> VARIANTE

<222> (31)

<223> Pode ser Asp, Gin, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile ou Thr

<220>

<221> VARIANTE

<222> (32)

<223> Pode ser Gin, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly ou Val

<220>

<221> VARIANTE

<222> (34)

<223> Pode ser Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly ou Leu

<220>

<221> VARIANTE

<222> (35)

<223> Pode ser Trp ou Phe

<220>

<221> VARIANTE

<222> (39)

<223> Pode ser Gly, Ala, Ser ou Asp

<400> 54

Met	His	Ser	Phe	Cys	Ala	Phe	Lys	Ala	Asp	Asp	Gly	Arg	Cys	Arg	Ala
1				5					10					15	
Ala	His	Pro	Arg	Trp	Phe	Phe	Asn	Ile	Phe	Thr	Arg	Gln	Cys	Glu	Glu
			20					25					30		
Phe	Thr	Tyr	Gly	Gly	Cys	Glu	Gly	Asn	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Leu
		35					40					45			
Glu	Glu	Cys	Lys	Lys	Met	Cys	Thr	Arg	Asp						
	50					55									

Lisboa, 20 de janeiro de 2016

REIVINDICAÇÕES

1. Um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos:

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro
Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe
Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu
Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys
Lys Met Cys Thr Arg Asp (resíduos de aminoácidos 3-
60 da SEQ ID NO:2), em que o referido polipeptídeo
inibe a calicreína, para utilização no tratamento
ou prevenção de uma resposta inflamatória sistêmica
num indivíduo.

2. O polipeptídeo para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o indivíduo tem um considerável extravasamento capilar, traumatismo do tecido mole ou traumatismo do tecido ósseo.
3. O polipeptídeo para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a utilização trata ou evita danos no sistema pulmonar do indivíduo.
4. O polipeptídeo para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o uso trata ou impede no indivíduo a síndrome de dificuldade respiratória no adulto (ARDS).
5. O polipeptídeo para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o uso trata ou previne no

indivíduo a insuficiência renal ou circulação esplâncnica.

6. O polipeptídeo para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o uso trata ou previne no indivíduo uma coagulopatia.
7. O polipeptídeo para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o uso trata ou previne no indivíduo um déficit neurocognitivo.
8. O polipeptídeo para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o uso trata ou previne no indivíduo um acidente vascular cerebral.
9. O polipeptídeo para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o uso trata ou previne no indivíduo a insuficiência renal.
10. O polipeptídeo para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o uso trata ou previne no indivíduo um enfarte agudo do miocárdio ou danos no tecido cardíaco.
11. Um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos:
Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro
Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe
Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu
Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys
Lys Met Cys Thr Arg Asp (resíduos de aminoácidos 3-
60 da SEQ ID NO:2), em que o referido polipeptídeo

inibe a calicreína, para utilização no tratamento ou prevenção da perda de sangue perioperatória.

12. O polipeptídeo para utilização de acordo com a reivindicação 2 ou a reivindicação 11, em que o indivíduo foi submetido a uma cirurgia cardiotorácica.
13. O polipeptídeo para utilização de acordo com a reivindicação 2 ou a reivindicação 11, em que o indivíduo foi submetido a um procedimento de *bypass* da artéria coronária por enxerto.
14. O polipeptídeo para utilização de acordo com a reivindicação 2 ou a reivindicação 11, em que o indivíduo foi submetido a um *bypass* cardiopulmonar.
15. O polipeptídeo para utilização de acordo com a reivindicação 2 ou a reivindicação 11, em que o indivíduo foi submetido a artoplastia da anca ou à separação do esterno.
16. O polipeptídeo para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações de 12 a 15, para utilização em combinação com uma transfusão de sangue.
17. Um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos:

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro
Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe
Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu
Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys
Lys Met Cys Thr Arg Asp (resíduos de aminoácidos 3-
60 da SEQ ID NO:2), em que o referido polipeptídeo

inibe a calicreína, para utilização no tratamento ou prevenção de isquemia.

18. O polipeptídeo para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 17, em que o polipeptídeo consiste na sequência de aminoácidos:

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro
Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe
Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu
Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys
Lys Met Cys Thr Arg Asp (resíduos de aminoácidos 3-
60 da SEQ ID NO:2).

19. O polipeptídeo para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 17, em que o polipeptídeo consiste na sequência de aminoácidos:

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp
Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn
Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly
Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu
Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO:2).

20. Uma composição farmacêutica compreendendo o polipeptídeo para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 19, e um ou mais tampões, adjuvantes e excipientes farmacêuticamente aceitáveis, em que a composição farmacêutica é para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 17.

21. A composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 20, em que a composição é um pó seco, liofilizado.

22. A composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 20, em que a composição compreende uma solução fisiológica tamponada.
23. A composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 22, em que a composição compreende uma solução fisiológica tamponada com fosfato.
24. A composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações de 20 a 23, em que a referida composição farmacêutica compreende um ou mais compostos adicionais farmaceuticamente ativos.
25. Um recipiente que compreende a composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações de 20 a 24, em que a composição farmacêutica é para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 17.

Lisboa, 20 de janeiro de 2016

Figura 1

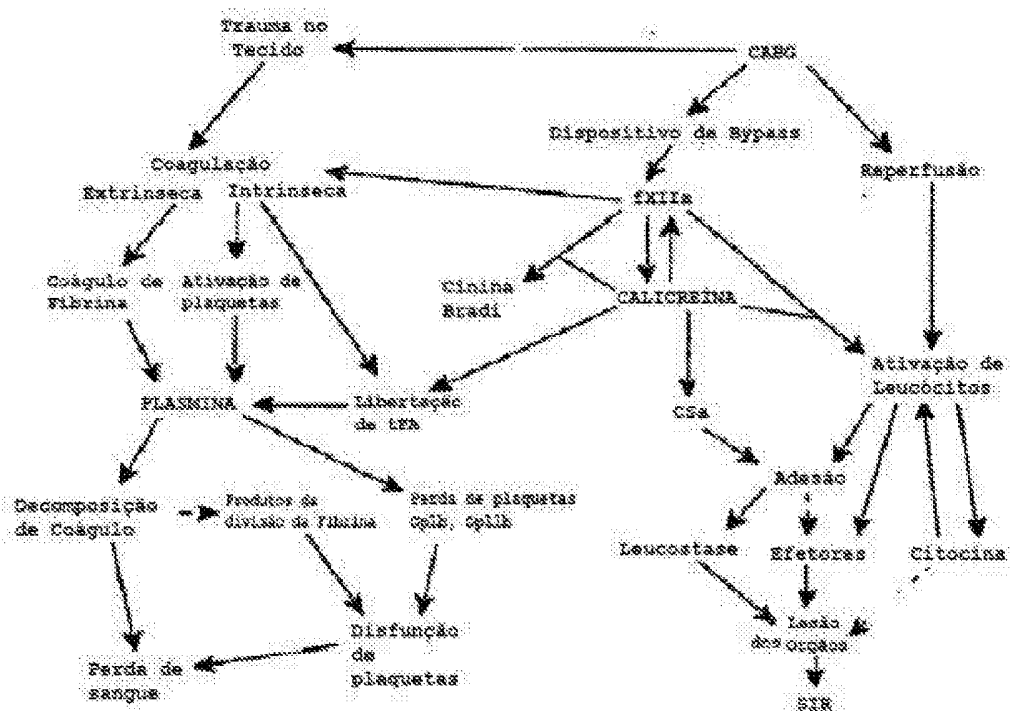


Figura 2

5'AOXI

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

ACG ATG AGA TTC CCA TCT ATC TTC ACT GCT GTT TTG TTC GCT GCT
M R F P S I F T A V L F A A

TCC TCT GCT TTG GCT GCT CCA GTT AAC ACC ACT ACT GAA GAC GAG ACT
S S A L A A P V N T T T E D E T

GCT CAA ATT CCT GCT GAG GCT GTC ATC GGT TAC TCT GAC TTG GAA GGT
A Q I P A E A V I G Y S D L E G

GAC TTC GAC GTC GCT GTT TTG CCA TTC TCT AAC TCT ACT AAC AAC GGT
D F D V A V L P E S N S T N N G

TTG TTG TTC ATC AAC ACT ACC ATC GCT TCT ATC GCT GCT AGG GAG GAA
L L F I N T T I A S I A A K E E

GGT GTT TCC CTC GAG AAG AGA GAG GCT ATG CAC TCT TTC TGT GCT TTC
G V S L E K R E A M H S F C A F

AAQ GCT GAC GAC GGT CCG TGC AGA GCT GCT CAG CCA AGA TGG TTC TTC
K A D D G P C R A A H P R W F F

AAC ATC TTC ACG CGT CAA TGC GAG GAG TTC ATC TAC GGT GGT TGT GAG
N I F T R Q C E E F I Y G G C E

GGT AAC CAA AAC AGA TTC GAG TCT CTA GAG GAG TGT AAG AAG ATG TGT
G N Q N R F E S L E E C K K M C

EcoR I

ACT AGA GAC TAG TAA GAA TTC GCC TTA GAC ATG ACT GTT CCT CAG TTC
T R D * *

← 3'AOXI

AAG TTG GGC ACT TAC GAG AAG
3'AOXI

Figura 3A

```

SEQ ID 2:  (aminoácidos 3-60)  ----MHSFCAFKK-DDGPCRAAHPRWFFNIPTQCEEFYGG
SEQ ID 4:  ----MHSFCAFKK-DDGPKCAHHLRFFFNIPTRQCEEFYGG
SEQ ID 5:  ----MHSFCAFKK-DDGHCKANHQRFFFNIPTRQCEEFYGG
SEQ ID 6:  ----MHSFCAFKK-DDGHCKANHQRFFFNIPTRQCEQFTYGG
SEQ ID 7:  ----MHSFCAFKK-DDGHCKASLPRFFFNIPTRQCEEFYGG
SEQ ID 8:  ----MHSFCAFKK-DDGHCKANHQRFFFNIPTRQCEEFYGG
SEQ ID 9:  ----MHSFCAFKK-DDGHCKGAHLRFFFNIPTRQCEEFYGG
SEQ ID 10: ----MHSFCAFKK-DDGRCKGAHLRFFFNIPTRQCEEFYGG
SEQ ID 11: ----MHSFCAFKK-DGGRCRGAHPRWFFNIPTRQCEEFYGG
SEQ ID 12: ----MHSFCAFKK-DDGPCRAAHPRWFFNIPTRQCEEFYGG
SEQ ID 13: ----MHSFCAFKK-DVGRCRGAHPRWFFNIPTRQCEEFYGG
SEQ ID 14: ----MHSFCAFKK-DVGRCRGAQPRFFFNIPTRQCEEFYGG
SEQ ID 15: ----MHSFCAFKK-DDGSCRAAHLRWFNIPTRQCEEFYGG
SEQ ID 16: ----MHSFCAFKK-BGGSCRAAHQRWFFNIPTRQCEEFYGG
SEQ ID 17: ----MHSFCAFKK-DDGPCGAHLRFFFNIPTRQCEEFYGG
SEQ ID 18: ----MHSFCAFKK-DDGHCRGALPRWFFNIPTRQCEEFYGG
SEQ ID 19: ----MHSFCAFKK-DSGNCRGNLPRFFFNIPTRQCEEFYGG
SEQ ID 20: ----MHSFCAFKK-DSGRCRGNHQRFFFNIPTRQCEEFYGG
SEQ ID 21: ----MHSFCAFKK-DGGRCAIQPRWFFNIPTRQCEEFYGG
SEQ ID 22: ----MHSFCAFKK-DDGRCRGAHPRWFFNIPTRQCEEFYGG
BPTI (SEQ ID 29): ----RPDFCLEPP-YTGPCAKRIIRYFYNAKAGLCQTFVYGG
ITI-D1 (SEQ ID 30): ----KEDSCQLGY-SAGPCMGMTSRYFYNGTSMACQTFYGG
ITI-D2 (SEQ ID 31): ----TVACNLPI-VRGPCAFIQLWAFDAVGKCVLFYGG
LACI-D1 (SEQ ID 32): ----MHSFCAFKK-DDGPCAKINRFFFNIPTRQCEEFYGG
LACI-D2 (SEQ ID 33): ----KPDFCFLEE-DPGICRGYITRYFYNAKQCFERFYGG
LACI-D3 (SEQ ID 34): ----GPSWCLTPA-DRGLCRANENRFFYNBVGKCRPFYGG
HKI B9 (SEQ ID 35): ----LPNVCAFFM-EKGPCQTYNTRWFFNPFTEGCELFAYGG
C-3 (SEQ ID 36): ----ETDICKLPK-DEGTCDPILKWYDENTKSCARFVYGG
TFPI-2 D1 (SEQ ID 37): ----NAEICLLPL-DYGPCRALLLRYFYDRYTQSCROFLYGG
TFPI-2 D2 (SEQ ID 38): ----VPKVCRLOQSVDDQCEGSTEKYFFNLSSMTCEKFFSGG
TFPI-2 D3 (SEQ ID 39): ----IPSPCYSPK-DEGLCSANVTRYFYHPRYRTCDAPTYG
APP-1 (SEQ ID 40): ----RNREVCSEA-ETGPCRAMISRWFYDVTGKCAPFFYGG
EPIH7 (SEQ ID 41): ----RPDFCLEPP-YTGPCVAMFPRIYFYNAKAGLCQTFVYGG
BITI-E7-141 (SEQ ID 42): ----RPDFCQLGY-SAGPCVAMFPRIYFYNGTSMACQTFVYGG
MUT26A (SEQ ID 43): ----RPDFCQLGY-SAGPCVAMFPRIYFYNGTSMACQTFVYGG
MUTQE (SEQ ID 44): ----RPDFCQLGY-SAGPCVAMFPRIYFYNGTSMACQTFVYGG
MUT1619 (SEQ ID 45): ----RPDFCQLGY-SAGPCVGMFSRYFYNGTSMACQTFVYGG
EPI-HNE-1 (SEQ ID 46): ----EAEARPDFCLEPP-YTGPCIAFFPRIYFYNAKAGLCQTFVYGG
EPI-HNE-2 (SEQ ID 47): -----AACNLPI-VRGPCIAFFPRWAFDAVGKCVLFYGG
EPI-HNE-3 (SEQ ID 48): -----AACNLPI-VRGPCIAFFPRWAFDAVGKCVLFYGG
EPI-HNE-4 (SEQ ID 49): -----EACNLPI-VRGPCIAFFPRWAFDAVGKCVLFYGG
DPI14 KR (SEQ ID 50): ----EAVREVCSEA-ETGPCIAFFPRWFYDVTGKCAPFFYGG
DPI24 KR (SEQ ID 51): ----EANABICLLPL-DYGPCIAFFPRIYFYDRYTQSCROFLYGG
DPI68 KR (SEQ ID 52): ----EAKPDFCFLEE-DPGICIGFFPRIYFYNNQAKQCFERFYGG
DPI84 KR (SEQ ID 53): ----EAEIDICKLPK-DEGTCDIAFFPRWFYDENTKSCARFVYGG

```

Figura 3B

SEQ ID 2:	(cont.)	CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 4:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 5:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 6:	(cont.)	CAGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 7:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 8:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 9:	(cont.)	CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 10:	(cont.)	CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 11:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 12:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 13:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 14:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 15:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 16:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 17:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 18:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 19:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 20:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 21:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 22:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
BPTI (SEQ ID 29):	(cont.)	CRAGR--NNPKSAEDCMRTCGGA
ITI-D1 (SEQ ID 30):	(cont.)	CMGNG--NNFVTEKDCLOTCTRV
ITI-D2 (SEQ ID 31):	(cont.)	CGGNG--NKFYSEKREYCGVP
LACI-D1 (SEQ ID 32):	(cont.)	CEGNA--NRFESLEECKKMCTRD
LACI-D2 (SEQ ID 33):	(cont.)	CLGNM--NNFETLEECKNICEG
LACI-D3 (SEQ ID 34):	(cont.)	CGGNE--NNFTSKQECIRACKKG
HKI B9 (SEQ ID 35):	(cont.)	CGGNS--NNFLAKEKCEKFCFT
C-3 (SEQ ID 36):	(cont.)	CGGNE--NKGSGQKECEKVCAPV
TPPI-2 D1 (SEQ ID 37):	(cont.)	CEGNA--NNFYTWACDDACWRI
TPPI-2 D2 (SEQ ID 38):	(cont.)	CHRNRIENRPPDEATCMGFCAPK
TPPI-2 D3 (SEQ ID 39):	(cont.)	CGGND--NNFVSREDCKIRACAKA
APP-I (SEQ ID 40):	(cont.)	CGGNR--NNPDTEEYCMVCGSA
EpiNE7 (SEQ ID 41):	(cont.)	CMGNG--NNPKSAEDCMRTCGGA
BITI-E7-141 (SEQ ID 42):	(cont.)	CMGNG--NNFVTEKDCLOTCTRGA
MUTT26A (SEQ ID 43):	(cont.)	CMGNG--NNFVTEKDCLOTCTRGA
MUTQE (SEQ ID 44):	(cont.)	CMGNG--NNFVTEKDCLOTCTRGA
MUT1619 (SEQ ID 45):	(cont.)	CMGNG--NNFVTEKDCLOTCTRGA
EPI-HNE-1 (SEQ ID 46):	(cont.)	CMGNG--NNPKSAEDCMRTCGGA
EPI-HNE-2 (SEQ ID 47):	(cont.)	CGGNG--NKFYSEKREYCGVP
EPI-HNE-3 (SEQ ID 48):	(cont.)	CGGNG--NKFYSEKREYCGVP
EPI-HNE-4 (SEQ ID 49):	(cont.)	CGGNG--NKFYSEKREYCGVP
DPI14 KR (SEQ ID 50):	(cont.)	CGGNR--NNPDTEEYCMVCGSA
DPI24 KR (SEQ ID 51):	(cont.)	CEGNA--NNFYTWACDDACWRI
DPI68 KR (SEQ ID 52):	(cont.)	CLGNM--NNFETLEECKNICEG
DPI84 KR (SEQ ID 53):	(cont.)	CGGNE--NKGSGQKECEKVCAPV