



(11) Número de Publicação: **PT 1240337 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/62 (2006.01) **A61K 47/48** (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01) **C07K 7/08** (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2000.12.22**

(30) Prioridade(s): **1999.12.24 US 173048**

(43) Data de publicação do pedido: **2002.09.18**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.08.24**
001/2007

(73) Titular(es):

GENENTECH, INC.

**1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO, CA
94080-4990**

US

(72) Inventor(es):

MARK S. DENNIS
HENRY B. LOWMAN
WARREN L. DELANO

US
US
US

(74) Mandatário:

**ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA**

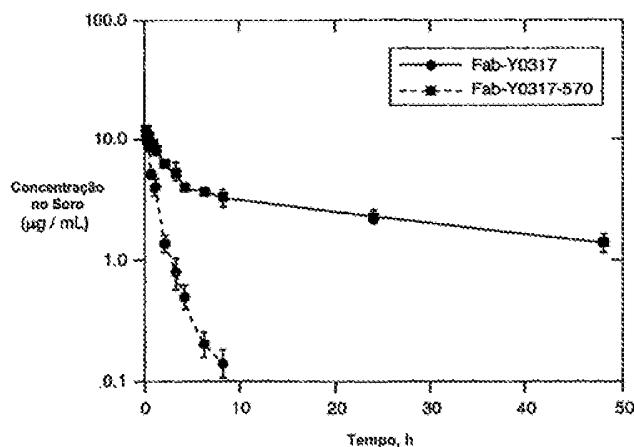
PT

(54) Epígrafe: **MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA PROLONGAR AS MEIAS-VIDAS DE
ELIMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOACTIVOS**

(57) Resumo:

RESUMO

"Métodos e composições para prolongar as meias-vidas de eliminação de compostos bioactivos"



Divulgam-se ligandos peptídicos com afinidade para IgG ou para albumina do soro. Também se divulgam moléculas híbridas que compreendem um domínio peptídico de ligação e um domínio activo. O domínio activo pode compreender qualquer molécula com utilidade como agente terapêutico ou de diagnóstico. As moléculas híbridas do invento podem ser preparadas por qualquer uma entre várias técnicas incluindo a produção em organismos recombinantes transformados ou transfetados com um ácido nucleico isolado codificante da molécula híbrida seguido de purificação, ou pela síntese química do híbrido. As moléculas híbridas têm utilidade como agentes para alterar as meias-vidas de eliminação das moléculas do domínio activo. A meia-vida de eliminação é alterada através da geração de uma molécula híbrida do presente invento onde o ligando peptídico possui afinidade de ligação pela proteína plasmática. Numa concretização preferida, uma molécula bioactiva com uma meia-vida de eliminação curta é incorporada como um domínio activo ou num domínio activo das moléculas híbridas do invento, e a afinidade de ligação do domínio peptídico de ligação prolonga a meia-vida de eliminação do híbrido relativamente à da molécula bioactiva.

DESCRIÇÃO

"Métodos e composições para prolongar as meias-vidas de eliminação de compostos bioactivos"

Campo do Invento

Este invento refere-se a compostos novos denominados ligandos peptídicos que se ligam a uma proteína plasmática. Em certos aspectos, o invento refere-se a composições que compreendem uma molécula híbrida compreendendo um domínio peptídico de ligação e um domínio activo tal como uma molécula biologicamente activa. O domínio activo pode compreender uma molécula útil para fins terapêuticos ou de diagnóstico. Em concretizações preferidas, as composições híbridas compreendem o domínio peptídico de ligação e o domínio activo com propriedades farmacocinéticas e farmacológicas melhoradas. O invento proporciona ainda a utilização terapêutica, para diagnóstico e em pesquisa do ligando peptídico e inclui composições tais como composições farmacêuticas compreendendo as moléculas do ligando peptídico.

Descrição de Divulgações Relacionadas

A apresentação em fagos proporciona um meio para gerar bibliotecas peptídicas constrangidas e não constrangidas (Devlin et al., (1990) *Science* **249**:404-406; Cwirla et al., (1990) *Proc. Natl. Acad. Sei. USA* **87**:6378-6382; Lowman (1997) *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**:401-424). Estas bibliotecas podem ser utilizadas para identificar e seleccionar ligandos peptídicos que se podem ligar a uma pré-determinada molécula alvo (Lowman (1997), *supra*); Clackson and Wells (1994) *Trends Biotechnol.* **12**:173-184; Devlin et al., (1990) *supra*). Esta técnica tem sido utilizada para identificar motivos peptídicos que se encaminham para um alvo celular (Arap et al., (1998) *Science* **279**:377-380); que se ligam ao receptor humano do tipo I da interleucina 1 (IL-1) bloqueando a ligação da IL- α (Yanofsky et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:7381-7386); que se ligam e activam o receptor da citocina eritropoietina (EPO) (Wrighton et al., (1996) *Science* **273**:458-463); que se ligam ao receptor humano da trombopoietina e competem com a ligação do ligando natural

trombopoietina (TPO) (Cwirla *et al.*, (1996) *Science* **276**:1696-1699), ou para gerar ligandos peptídicos de afinidade melhorada ou amadurecida a partir de ligandos que se ligam a proteína nativa (Lowman *et al.*, (1991) *Biochemistry* **30**:10832-10838).

Utilizando bibliotecas peptídicas estruturalmente constrangidas geradas por apresentação monovalente em fagos, isolaram-se péptidos de 14 aminoácidos que se ligam especificamente a proteínas de ligação ao factor de crescimento 1 do tipo insulina (IGFBP) (Lowman *et al.* (1998), *Biochemistry* **37**:8870-8878). Os péptidos contêm uma estrutura em hélice e ligam-se às IGFBP *in vitro* libertando actividade do factor de crescimento-a do tipo insulina (IGF-1) (Lowman *et al.*, (1998) *supra*). Utilizando selecção em fagos *in vivo*, identificaram-se péptidos capazes de mediar a localização selectiva de vários órgãos tais como o cérebro e o rim (Pasqualini and Ruoslahti (1996) *Nature* **380**:364-366) assim como péptidos que se encaminham para determinados tipos de tumores portadores das integrinas $\alpha_V\beta_3$ ou $\alpha_V\beta_5$ (Arap *et al.* (1998), *Science* **279**:377-380). A patente dos U.S. 5 627 263 descreve péptidos que são reconhecidos pela integrina $\alpha_5\beta_1$ e se ligam selectivamente a esta. Exemplos de proteínas de afinidade ou especificidade melhoradas incluem a hormona de crescimento humano, dedos de zinco, inibidores da protease, o factor natriurético atrial, e anticorpos (Wells, J. and Lowman H. (1992), *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**:597-604; Clackson, T. and Wells, J. (1994), *Trends Biotechnol.* **12**:173-184; Lowman *et al.*, (1991) *Biochemistry* **30**(10):832-838; Lowman and Wells J. (1993), *J. Mol. Biol.* **234**:564-578; Dennis M. and Lazarus R. (1994), *J. Biol. Chem.* **269**(22):137-144).

Tem sido sugerido que a farmacodinâmica da insulina é alterada quando esta se liga a albumina do soro. A acilação da insulina com ácidos gordos saturados contendo 10-16 átomos de carbono produz insulina com afinidade pela albumina (Kurtzhals, P. *et al.* (1995) *Biochem. J.* **312**:725-731). Diferenças na afinidade de ligação à albumina entre insulininas aciladas foram correlacionadas com o tempo do efeito de abaixamento da glicose no sangue das várias moléculas após injecção subcutânea em coelhos. Uma ligação mais firme a albumina foi correlacionada com um atraso no abaixamento da

glicose no sangue, possivelmente devido à insulina acilada ligar-se com albumina no tecido subcutâneo, resultando numa velocidade de absorção das insulinas aciladas inferior à da insulina não acilada.

Um conjugado de albumina do soro-CD4 no qual os domínios V1 e V2 de CD4 estavam fundidos com albumina do soro humano (HSA) foi descrito (Yeh, P. et al. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:1904-1908). A meia-vida de eliminação do conjugado era 140 vezes aquela de um CD4 solúvel (sCD4) num modelo experimental de coelho.

Meias-vidas prolongadas *in vivo* do receptor humano solúvel do complemento tipo 1 (sCR1) fundido aos domínios de ligação a albumina da proteína G de *Streptococcal* foram relatadas (Makrides, S. et al. (1996) *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* **277**:532-541). As construções continham domínios de ligação a albumina de proteína G tendo aproximadamente 80 aminoácidos (fragmento BA), e aproximadamente 155 aminoácidos (fragmento BABA).

A farmacocinética de um domínio marcado de ligação a IgG derivado do domínio Z da proteína A tendo aproximadamente 60 aminoácidos, e de um domínio de ligação a albumina do soro derivado da proteína G de *Streptococcal* (domínio B) tendo aproximadamente 200 aminoácidos, foi descrita (EP 0 486 525).

Sumário do Invento

O presente invento proporciona compostos novos que se ligam a proteínas plasmáticas. Os compostos do presente invento (referidos como ligandos peptídicos) são, por exemplo, péptidos ou derivados de péptidos tais como miméticos de péptidos e análogos de péptidos. De acordo com aspectos preferidos do invento, os compostos são sequências de aminoácidos de ocorrência não natural que se ligam a albumina do soro. Preferivelmente o ligando peptídico é uma sequência de aminoácidos de ocorrência não natural que se liga a albumina do soro. Preferivelmente o ligando peptídico é uma sequência de aminoácidos de ocorrência não natural com desde cerca de 10 até 20 resíduos de aminoácidos.

Estes compostos ligam-se preferivelmente à albumina do soro com uma afinidade caracterizada por uma constante de dissociação, K_d , inferior a cerca de 100 μM , preferivelmente inferior a cerca de 100 nM, e preferivelmente não se ligam substancialmente a outras proteínas do plasma. Exemplos específicos destes compostos incluem péptidos lineares ou cílicos, especialmente cílicos, preferivelmente com entre cerca de 10 e 20 resíduos de aminoácidos de comprimento, e suas combinações, opcionalmente modificados nos terminais N ou C ou em ambos, assim como os seus sais e derivados, análogos funcionais destes e cadeias peptídicas prolongadas albergando aminoácidos ou polipéptidos nos terminais das sequências.

Os ligandos peptídicos que se ligam a albumina do soro preferidos incluem péptidos lineares e cílicos, preferivelmente compostos peptídicos cílicos, preferivelmente compostos peptídicos cílicos que compreendem a seguinte fórmula:

(Asp-Xaa-Cys-Leu-Pro-Xaa-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp. (SEQ ID NO: 116) onde a fórmula geral compreende ainda $(\text{Xaa})_x$ no terminal N e $(\text{Xaa})_z$ no terminal C.

Os compostos peptídicos preferidos têm fórmulas gerais onde Xaa é um aminoácido e x e z são um número inteiro superior ou igual a 0 (zero), geralmente inferior a 100, preferivelmente inferior a 10 e mais preferivelmente 0, 1, 2, 3, 4 ou 5 e mais preferivelmente 4 ou 5 e Xaa₁ é seleccionado do grupo que consiste de Ile, Phe, Tyr e Val.

Em certos aspectos o invento refere-se a combinações de um ligando peptídico com um composto bioactivo para formar uma molécula híbrida que compreende um domínio peptídico de ligação e um domínio activo. Os compostos bioactivos do invento incluem qualquer composto útil como agente terapêutico ou de diagnóstico. Exemplos não limitativos de compostos bioactivos incluem polipéptidos tais como enzimas, hormonas, citocinas, anticorpos ou fragmentos de anticorpos, assim como compostos orgânicos tais como analgésicos, antipiréticos, agentes anti-inflamatórios, antibióticos, agentes antivirais, drogas antifúngicas, drogas cardiovasculares, drogas que afectam a função renal e o metabolismo electrolítico, drogas

que actuam no sistema nervoso central e drogas quimioterapêuticas, para nomear algumas.

Nas concretizações preferidas, as moléculas híbridas compreendendo um domínio peptídico de ligação e um domínio activo têm propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas melhoradas em relação à mesma molécula bioactiva compreendendo o domínio activo mas não tendo o domínio peptídico de ligação. As propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas melhoradas dos híbridos proporcionam assim formulações farmacêuticas de baixa dose e novas composições farmacêuticas. Em certos aspectos, o invento proporciona métodos de utilização de composições novas incluindo a utilização terapêutica ou para diagnóstico das moléculas híbridas.

Em determinados aspectos, o invento é dirigido a combinações de ligandos peptídicos com compostos bioactivos que possuem meias-vidas de eliminação relativamente curtas. As combinações são preparadas com vários fins em vista, incluindo a melhoria da eficácia terapêutica ou de diagnóstico do composto bioactivo em aspectos do invento que envolvem a utilização *in vivo* do composto bioactivo através de, por exemplo, o aumento da meia-vida de eliminação do composto bioactivo. A fusão ou união (isto é, "conjugação") do ligando peptídico dirigido a albumina do soro com um composto bioactivo proporciona composições com meias-vidas de eliminação aumentadas. Estas combinações ou fusões são feitas convenientemente em células hospedeiras recombinantes, ou pela utilização de agentes bifuncionais que estabelecem ligações cruzadas.

O presente invento abrange ainda aplicações terapêuticas e em diagnóstico das composições aqui descritas. Por isso, o invento inclui composições farmacêuticas compreendendo um excipiente farmaceuticamente aceitável e as moléculas híbridas do invento.

Breve Descrição dos Desenhos

Fig. 1. Ensaio ELISA competitivo para fagos mostrando a ligação a IgG de partículas de fagomídeo de Fab anti-VEGF etiquetado com ligando peptídico. Apresentam-se quatro

construções diferentes: pY0192-569 (círculos largos cheios), pY0192-570 (círculos largos abertos), PY0317-569 (círculos pequenos cheios), e pY0317-570 ("x").

Fig. 2. Análise BIACore™ da ligação de IgG ao Fab-Y0317-570 anti-VEGF etiquetado com ligando peptídico (etiquetado; gráfico superior) e ao Fab Y0317 (controlo; gráfico inferior). Uma ilustração desenhada em cima mostra um modelo para os eventos de ligação observados no teste do Fab etiquetado.

Fig. 3. Valores de concentração média no soro do grupo vs. tempo (\pm DP) estão apresentadas na figura para Fab-Y0317-570 e Fab-Y0317.

Fig. 4. As sequências peptídicas apresentadas em clones fágicos seleccionados para ligação a albumina de coelho, de rato ou humana estão apresentadas na Figura 4. A capacidade dos clones fágicos individuais para se ligarem a 3 espécies de albumina imobilizada também está indicada.

Figs. 5A a 5F. As sequências identificadas após aleatorização ligeira estão apresentadas na Figura 5 juntamente com a especificidade para as espécies como determinado por ELISA para fagos.

Fig. 6. Determinou-se por ELISA que os clones oriundos da biblioteca de aleatorização ligeira RB ligavam-se a cada uma destas espécies de albumina e que, com base na ausência de ligação a ovalbumina e caseína, eram específicos para albumina.

Fig. 7. Clones que se ligam a múltiplas espécies de albumina (ligandos multi-espécies) estão listados na Figura 7.

Figs. 8A a 8E. Nas Figuras 8A, 8B, e 8C apresentam-se sequências de bibliotecas seleccionadas relativamente a albumina de rato, coelho e humana respectivamente.

Fig. 9. Péptidos correspondentes a sequências identificadas nos fagos foram sintetizados e a sua afinidade por albumina de rato, coelho ou ratinho foi medida pelo ensaio de ligação SA08b.

Fig. 10 Um péptido correspondente à sequência SA06 identificada nos fagos foi sintetizado e a sua afinidade por albumina de rato, coelho e ratinho foi medida pelo ensaio de ligação SA08b.

Fig. 11. A sequência SA06 foi adicionada ao terminal carboxi da cadeia leve (D3H44-L) ou da cadeia pesada (D3H44-Ls) do Fab. Em adição, realizaram-se construções idênticas com o dissulfureto da intra-cadeia substituído por alaninas (D3H44-Ls e D3H44-Hs, respectivamente) como representado na Figura 11.

Fig. 12. As fusões de D3H44 purificadas retinham a sua capacidade de ligação a TF como medido por meio de um ensaio de activação de FX.

Fig. 13. As fusões de D3H44 purificadas retinham a sua capacidade de ligação a TF como medido pela análise do tempo da protrombina que mede o prolongamento da coagulação dependente do factor tecidual.

Fig. 14 Ao contrário de D3H44 sem a sequência de ligação a albumina (WT), tanto D3H44-L como D3H44-Ls são capazes de se ligar a albumina como medido no ensaio de ligação SA08b.

Fig. 15 Ambas as fusões de D3H44 de ligação a albumina são capazes de se ligar a TF e a albumina simultaneamente como concluído por uma análise de ligação de biotina-TF.

Fig. 16 A fusão do péptido de ligação a albumina com D3H44 resulta numa proteína com parâmetros farmacocinéticos melhorados.

Fig. 17. A fusão do péptido de ligação a albumina com D3H44 resulta numa proteína com parâmetros farmacocinéticos melhorados.

Descrição Detalhada das Concretizações Preferidas

I. Definições

O termo "ligando peptídico" no contexto do presente invento quer referir-se a sequências de aminoácidos de ocorrência não natural que funcionam para se ligarem a uma determinada molécula alvo. Os ligandos peptídicos no contexto do invento estão geralmente constrangidos (isto, é, têm algum elemento estrutural, tal como por exemplo, a presença de aminoácidos que iniciam uma volta β ou uma folha pregueada β , ou por exemplo, ciclizados pela presença de resíduos Cys unidos por dissulfureto) ou consistem em sequências de aminoácidos não constrangidas (lineares) com menos do que cerca de 50 resíduos de aminoácidos, e preferivelmente menos do que cerca de 40 resíduos de aminoácidos. Dos ligandos peptídicos com menos do que cerca de 40 resíduos de aminoácidos, são preferidos aqueles com cerca de 10 e cerca de 30 resíduos de aminoácidos e especialmente os ligandos peptídicos com cerca de 20 resíduos de aminoácidos. Porém, após leitura da presente divulgação, o perito na especialidade reconhecerá que não é o comprimento de um ligando peptídico em particular mas sim a sua capacidade para se ligar a uma determinada molécula alvo que distingue o ligando peptídico do presente invento. Assim, ligandos peptídicos de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 e 25 resíduos de aminoácidos, por exemplo, têm a mesma probabilidade de serem ligandos peptídicos no contexto do presente invento.

Um ligando peptídico do presente invento liga-se a uma molécula alvo com suficiente afinidade e especificidade se o ligando peptídico se "encaminhar" para, "ligar" ou "direcccionar" a uma molécula alvo tal como um determinado tipo de célula que alberga a molécula alvo *in vitro* e preferivelmente *in vivo* (refira-se, por exemplo, à utilização do termo "encaminhar para", "encaminhamento" e "direcccionamento" em Pasqualini e Ruoslahti (1996) *Nature*, **380**:364-366 e Arap *et al.*, (1998) *Science*, **279**:377-380). Em geral, o ligando peptídico ligar-se-á a uma molécula alvo com uma afinidade caracterizada por uma constante de dissociação, K_d , inferior a cerca de 1 μM , preferivelmente inferior a cerca

de 100 nM, e mais preferivelmente inferior a cerca de 10 nM. Porém, os ligandos peptídicos com uma afinidade por uma molécula alvo inferior a cerca de 1 nM e preferivelmente entre cerca de 1 pM e 1 nM têm probabilidade igual de serem ligandos peptídicos dentro do contexto do presente invento. Em geral um ligando peptídico que se liga a uma determinada molécula alvo como descrito atrás pode ser isolado e identificado por qualquer uma das várias técnicas comuns na arte como descrito aqui.

Os ligandos peptídicos são sequências de aminoácidos como descrito atrás que podem conter resíduos de aminoácidos de ocorrência natural assim como de ocorrência não natural. Por isso, os chamados "miméticos de péptidos" e "análogos de péptidos", os quais podem incluir estruturas químicas de não aminoácidos que mimetizam a estrutura de um determinado aminoácido ou péptido, podem ser ligandos peptídicos dentro do contexto do invento. De uma maneira geral, estes miméticos ou análogos são caracterizados por exibirem características físicas similares, tal como tamanho, carga ou hidrofobicidade, presentes na orientação espacial apropriada, como encontrado nos péptidos equivalentes. Um exemplo específico de um composto mimético de péptidos é um composto no qual a ligação amida entre um ou mais aminoácidos é substituída por, por exemplo, uma ligação carbono-carbono ou outra ligação, como é de conhecimento geral na arte (refira-se, por exemplo a Sawyer, em Peptide Based Drug Design pp. 378-422 (ACS, Washington DC 1995)).

Por isso, o termo "aminoácido" dentro do âmbito do presente invento é usado no seu sentido mais lato e pretende incluir L α -aminoácidos ou resíduos de ocorrência natural. Empregam-se aqui as abreviações mais vulgarmente usadas de uma e três letras para os aminoácidos de ocorrência natural (Lehninger, A.L., Biochemistry, 2^a ed., pp. 71-92, (1975), Worth Publishers, Nova Iorque). A correspondência entre os códigos padrão de uma letra e os códigos padrão de três letras é bem conhecida pelo perito na especialidade e é reproduzida aqui: A = Ala; C = Cys; D = Asp; E = Glu; F = Phe; G = Gly; H = His; I = Ile; K = Lys; L = Leu; M = Met; N = Asn; P = Pro; Q = Gln; R = Arg; S = Ser; T = Thr; V = Val; W = Trp; Y = Tyr. O termo inclui aminoácidos D assim como aminoácidos quimicamente

modificados tais como análogos de aminoácidos, aminoácidos de ocorrência natural que não são normalmente incorporados em proteínas tal como a norleucina, e compostos sintetizados quimicamente tendo propriedades que na arte se sabem serem típicas de um aminoácido. Por exemplo, análogos ou miméticos da fenilalanina ou prolina, os quais permitem a mesma restrição conformacional dos compostos peptídicos que Phe ou Pro naturais, estão incluídos na definição de aminoácido. Estes análogos e miméticos são referidos aqui como "equivalentes funcionais" de um aminoácido. Outros exemplos de aminoácidos são listados por Roberts e Vellaccio The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Gross and Meienhofer, eds., Vol.5 p.341, Academic Press, Inc., N.Y. 1983, o qual é incorporado aqui por referência.

Ligandos peptídicos sintetizados por, por exemplo, técnicas *standard* de síntese em fase sólida, não estão limitados a aminoácidos codificados por genes. Entre os aminoácidos encontrados vulgarmente que não estão codificados pelo código genético constam, por exemplo, aqueles descritos na Publicação Internacional No. WO 90/01940 tal como, por exemplo, ácido 2-aminoadípico (Aad) para Glu e Asp; ácido 2-aminopimélico (Apm) para Glu e Asp; ácido 2-aminobutírico (Abu) para Met, Leu, e outros aminoácidos alifáticos; ácido 2-amino-heptanóico (Ahe) para Met, Leu e outros aminoácidos alifáticos; ácido 2-aminoisobutírico (Aib) para Gly; ciclohexilalanina (Cha) para Val, e Leu e Ile; homoarginina (Har) para Arg e Lys; ácido 2,3-diaminopropiónico (Dpr) para Lys, Arg e His; N-etilglicina (EtGly) para Gly, Pro, e Ala; N-etilglicina (EtGly) para Gly, Pro, e Ala; N-etilasparagina (EtAsn) para Asn, e Gln; Hidroxilisina (Hyl) para Lys; alo-hidroxilisilina (AHyl) para Lys; 3-(e 4)-hidroxiprolina (3Hyp, 4Hyp) para Pro, Ser, e Thr; alo-isoleucina (Aile) para Ile, Leu, e Val; α -amidinofenilalanina para Ala; N-metilglicina (MeGly, sarcosina) para Gly, Pro, e Ala; N-metilisoleucina (Melle) para Ile; Norvalina (Nva) para Met e outros aminoácidos alifáticos; Norleucina (Nle) para Met e outros aminoácidos alifáticos; Ornitina (Orn) para Lys, Arg e His; Citrulina (Cit) e sulfóxido de metionina (MSO) para Thr, Asn e Gln; N-metilfenilalanina (MePhe), trimetilfenilalanina, halo (F, Cl, Br, e I) fenilalanina, trifluorilfenilalanina, para Phe.

Ligandos peptídicos dentro do contexto do presente invento podem ser "manipulados", i.e., são ligandos peptídicos não nativos ou de ocorrência não natural. Por "não nativos" ou "ocorrência não natural" significa que a sequência de aminoácidos do ligando peptídico em particular não se encontra na natureza. Isso quer dizer que as sequências de aminoácidos de ligandos peptídicos não nativos ou de ocorrência não natural não correspondem a uma sequência de aminoácidos de uma proteína ou polipeptídeo de ocorrência natural. Os ligandos peptídicos desta variedade podem ser produzidos ou seleccionados por uma variedade de técnicas bem conhecidas pelo perito na especialidade. Por exemplo, bibliotecas peptídicas constrangidas ou não constrangidas podem ser geradas aleatoriamente e apresentadas em fagos utilizando-se técnicas *standard* da especialidade, por exemplo, Lowman et al., (1998) *Biochemistry* **37**:8870-8878.

Os ligandos peptídicos, quando usados no contexto do presente invento, podem ser "conjugados" com uma substância terapêutica ou de diagnóstico. O termo "conjugado" é usado no seu sentido mais lato para abranger todos os métodos de fixação ou união conhecidos na arte. Por exemplo, numa concretização típica, a substância terapêutica ou de diagnóstico é uma proteína (referida aqui como uma "proteína terapêutica"), e o ligando peptídico será uma extensão de aminoácidos do terminal N Cor da proteína terapêutica. Em adição, uma sequência ligante de aminoácidos curta pode ficar entre a proteína terapêutica e o ligando peptídico. Neste cenário, o ligando peptídico, o ligante opcional e a proteína terapêutica serão codificados por um ácido nucleico compreendendo uma sequência codificante da proteína terapêutica operativamente ligada (no sentido em que as sequências de ADN são contíguas e no quadro de leitura) a uma opcional sequência ligante codificante de um polipeptídeo curto como descrito adiante, e uma sequência codificante do ligando peptídico. Neste cenário típico, o ligando peptídico é considerado como estando "conjugado" à proteína terapêutica opcionalmente através de uma sequência ligante. Numa concretização relacionada, a sequência de aminoácidos do ligando peptídico pode interromper ou substituir uma secção da sequência de aminoácidos da proteína terapêutica, desde que, claro, a inserção da sequência de aminoácidos do ligando

peptídico não interfira com a função da proteína terapêutica. Nesta concretização, o "conjugado" pode estar codificado por um ácido nucleico compreendendo uma sequência codificante da proteína terapêutica interrompida por uma sequência codificante do ligando peptídico e operativamente ligada a esta. Noutra concretização típica, o péptido estará ligado, e.g., por conjugação química à proteína terapêutica ou outro terapêutico, opcionalmente por uma sequência ligante. Tipicamente, de acordo com esta concretização, o ligando peptídico estará ligado à proteína terapêutica por uma cadeia lateral de um aminoácido algures no meio da proteína terapêutica que não interfere com a actividade terapêutica. Uma vez mais, considera-se aqui que o péptido está "conjugado" ao terapêutico.

Como usado no contexto do presente invento, o termo "molécula alvo" inclui proteínas, péptidos, glicoproteínas, glicopéptidos, glicolípidos, polissacáridos, oligossacáridos, ácidos nucleicos, e similares. Moléculas alvo incluem, por exemplo, moléculas extracelulares tais como vários factores do soro incluindo mas não limitado a proteínas do plasma tais como albumina do soro, imunoglobulinas, apolipoproteínas ou transferrina, ou proteínas encontradas na superfície de eritrócitos ou linfócitos, desde que, claro, a ligação do ligando peptídico à proteína da superfície celular não interfira substancialmente com a função normal da célula.

"Anticorpos" e "imunoglobulinas" são glicoproteínas heterotetraméricas com cerca de 150 000 Daltons, constituídas por duas cadeias leves idênticas (L) e duas cadeias pesadas idênticas (H).

A digestão dos anticorpos por papaína produz dois fragmentos idênticos de ligação a抗igénios, chamados fragmentos ou regiões "Fab", cada um com um único local de ligação ao抗igénio, e um fragmento ou região "Fc" residual. Embora os limites da região Fc de uma cadeia pesada da imunoglobulina possam variar, a região Fc da cadeia pesada do IgG humano é normalmente definida como indo desde um resíduo de aminoácido na posição Cys226, ou desde Pro230, até ao seu terminal carboxilo.

O tratamento com pepsina origina um fragmento F(ab')₂ que possui dois locais de combinação a抗igénios e ainda é capaz de estabelecer ligações cruzadas com o抗igénio. O fragmento Fab' contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada.

"Tratamento" refere-se tanto a tratamento terapêutico como a medidas profiláticas ou preventivas. Aqueles com necessidade de tratamento incluem os que já sofrem do distúrbio assim como aqueles nos quais o distúrbio é para ser prevenido.

"Mamífero" para fins de tratamento refere-se a qualquer animal classificado como um mamífero, incluindo humanos, animais domésticos e da quinta, do jardim zoológico e para desporto, ou animais de estimação, tais como cães, cavalos, gatos, vacas, etc. Preferivelmente, o mamífero é humano.

Um "distúrbio" é qualquer condição que beneficiaria de tratamento com composições compreendendo os ligandos peptídicos do invento. Isto inclui doenças ou distúrbios crónicos ou agudos incluindo aquelas condições patológicas que predispõem o mamífero ao distúrbio em questão.

"Meia-vida de eliminação" é empregue no seu sentido comum, como descrito em Goodman and Gillman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics 21-25 (Alfred Goodman Gilman, Louis S. Goodman, and Alfred Gilman, eds., 6^a ed. 1980). Resumidamente, o termo pretende abranger uma medida quantitativa do curso do tempo de eliminação de drogas. A eliminação da maioria das drogas é exponencial (*i.e.*, segue uma cinética de primeira ordem), já que as concentrações da droga normalmente não se aproximam do que é requerido para saturação do processo de eliminação. A velocidade de um processo exponencial pode ser expressa pela sua constante cinética, *k*, a qual exprime a variação fraccional por unidade de tempo, ou pela sua meia-vida, *t_½*, que é o tempo requerido para realizar 50% do processo. As unidades destas duas constantes são tempo⁻¹ e tempo, respectivamente. A constante cinética e a meia-vida de uma reacção de primeira ordem estão relacionadas simplesmente (*k* × *t_½* = 0,693) e podem ser assim permutadas. Como a cinética de eliminação de primeira ordem

dita que uma fracção constante da droga seja perdida por unidade de tempo, um gráfico do logaritmo da concentração da droga em função do tempo é sempre linear após a fase inicial de distribuição (*i.e.* após a absorção e distribuição da droga estarem completas). A meia-vida da eliminação da droga pode ser determinada exactamente a partir deste gráfico.

"Transfecção" refere-se à introdução de um vector de expressão numa célula hospedeira estejam ou não de facto expressas quaisquer sequências de codificação. Uma pessoa competente na especialidade conhece numerosos métodos de transfecção, por exemplo, precipitação por CaPO₄ e electroporação. Uma transfecção com êxito é geralmente reconhecida quando há qualquer indicação da operação deste vector na célula hospedeira.

"Transformação" significa introduzir ADN num organismo de forma a que o ADN seja replicável, ou na forma de um elemento extracromossómico ou por um integrante cromossómico. Dependendo da célula hospedeira usada, a transformação é feita por meio de técnicas standard apropriadas para estas células. O tratamento com cálcio que emprega cloreto de cálcio, como descrito na secção 1.82 de Sambrook *et al.*, Molecular Cloning (2^a ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1989), é geralmente usado para procariotas ou outras células que apresentam barreiras substanciais de paredes celulares. Utiliza-se infecção por *Agrobacterium tumefaciens* na transformação de certas células de plantas, como descrito por Shaw *et al.*, (1983) *Gene*, 23:315 e publicado em WO 89/05859 a 29 Junho de 1989. Para células de mamífero sem paredes celulares, prefere-se o método de precipitação com fosfato de cálcio descrito nas secções 16.30-16.37 de Sambrook *et al.*, *supra*. Aspectos gerais sobre as transformações do sistema hospedeiro de células de mamífero foram descritos por Axel na Patente dos U.S. No. 4 399 216 emitida em 16 de Agosto de 1983. Transformações em levedura são tipicamente levadas a cabo de acordo com o método de Van Solingen *et al.*, (1977) *J. Bact.*, 130:946 e Hsiao *et al.*, (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829. Contudo, podem também utilizar-se outros métodos para introduzir ADN em células tais como injecção nuclear, electroporação, ou fusão de protoplastos.

Como empregue aqui, o termo "administração pulmonar" refere-se à administração de uma formulação do invento por inalação através dos pulmões. Como empregue aqui, o termo "inalação" refere-se à entrada de ar até aos alvéolos. Em exemplos específicos, a entrada pode ocorrer por administração própria inalando-se uma formulação do invento, ou por administração através de um respirador, e.g., a um paciente num respirador. O termo "inalação" usado em relação a uma formulação do invento é sinónimo de "administração pulmonar".

Como empregue aqui, o termo "parentérico" refere-se à introdução no corpo de um composto do invento por outro meio para além dos intestinos, e em particular, às vias intravenosa (i.v.), intraarterial (i.a.), intraperitoneal (i.p.), intramuscular (i.m.), intraventricular, e subcutânea (s.c.).

Como empregue aqui, o termo "aerossol" refere-se a uma suspensão no ar. Em particular, aerossol refere-se à redução a partículas de uma formulação do invento e à sua suspensão no ar. De acordo com o presente invento, uma formulação para aerossol é uma formulação que comprehende um composto do presente invento que é adequado para aplicação em aerossol, i.e., redução a partículas e suspensão no ar, para inalação ou administração pulmonar.

II. Modos de Realização do Invento

A. Ligandos Peptídicos

Ligandos peptídicos no contexto do presente invento ligam-se a um alvo, albumina do soro, e podem ser identificados num ensaio de ligação directa ou pela sua capacidade para competir pela ligação ao alvo com um ligando conhecido para o alvo. Os ligandos peptídicos preferidos que se ligam a albumina do soro incluem péptidos cílicos e lineares, preferivelmente compostos peptídicos cílicos da seguinte fórmula (Asp-Xaa-Cys-Leu-Pro-Xaa-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp (SEQ ID NO: 116) onde a fórmula geral comprehende (Xaa)_x no terminal N e (Xaa)_z no terminal C. Os compostos peptídicos preferidos têm a fórmula geral precedente onde Xaa é um aminoácido e x e z são um número inteiro maior ou igual a 0 (zero), geralmente inferior a 100, preferivelmente inferior a

10 e mais preferivelmente 0, 1, 2, 3, 4 ou 5 e ainda mais preferivelmente 4 ou 5 e onde Xaa₁ é seleccionado do grupo que consiste de Ile, Phe, Tyr e Val.

De acordo com este aspecto do invento, faz-se referência às Figuras e especialmente às Figuras 5A e 5B, 8A, 8B e 8C e Figura 9 para péptidos típicos e aminoácidos apropriados para selecção de ligandos peptídicos que se ligam a albumina do soro de mamífero. Num aspecto preferido, referência é feita à Figura 9 para selecção de ligandos peptídicos que se ligam a uma variedade de espécies de albumina do soro.

Compostos preferidos de acordo com este aspecto do invento incluem:

Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp (SEQ ID NO: 120)
Met-Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp (SEQ ID NO: 121)
Gln-Arg-Leu-Met-Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp-Phe
(SEQ ID NO: 122)
Gln-Gly-Leu-Ile-Gly-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Gly-Asp-Ser-Val
(SEQ ID NO: 123)
Gln-Gly-Leu-Ile-Gly-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Gly-Asp-Ser-Val-Lys
(SEQ ID NO: 124)
Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp-Asp (SEQ ID NO: 125)
Arg-Leu-Met-Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp-Asp
(SEQ ID NO: 126)
Met-Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp-Asp (SEQ ID NO: 127)

Noutra concretização preferida, os ligandos peptídicos do presente invento ligam-se a albumina do soro humano e podem ser identificados pela sua capacidade para competir pela ligação à albumina do soro humano num ensaio *in vitro* com ligandos peptídicos da fórmula geral:

Asp-Xaa-Cys-Leu-Pro-Xaa-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp (SEQ ID NO: 116)

onde a fórmula geral compreende ainda (Xaa)_x no terminal N e (Xaa)_z no terminal C, e onde Xaa é um aminoácido, e x e z são preferivelmente 4 ou 5.

Em certas concretizações, os ligandos peptídicos que se ligam a albumina do soro humano do presente invento competirão com quaisquer ligandos peptídicos representados nas SEQ ID NO: 120-131 aqui atrás descritas e preferivelmente competirão com a SEQ ID NO: 122 pela ligação à albumina do soro humano.

Como será reconhecido do anterior, o termo "competir" e "capacidade para competir" são termos relativos. Assim, quando os termos são usados para descrever os ligandos peptídicos do presente invento, referem-se a ligandos peptídicos que resultam numa inibição de 50% da ligação, por exemplo, da SEQ ID NO: 122, quando presentes a 50 μM , preferivelmente quando presentes a 1 μM , mais preferivelmente 100 nM, e preferivelmente quando presentes a 1 nM ou menos num ensaio de competição *standard* como aqui descrito. Porém, os ligandos peptídicos com afinidade por uma proteína do soro, tal como albumina do soro, inferior a cerca de 1 nM e preferivelmente entre cerca de 1 pM e 1 nM, têm igual probabilidade de serem ligandos peptídicos dentro do contexto do presente invento.

Em sistemas de ensaio *in vitro* para determinar se um péptido ou outro composto tem "capacidade" para competir com um ligando peptídico pela ligação a uma albumina do soro como aqui referido, o perito na especialidade pode empregar qualquer um entre vários ensaios *standard* de competição. Ensaios de ligação competitiva servem-se da capacidade de um padrão marcado para competir com o analito da amostra de teste pela ligação com uma quantidade limitada de ligando. A quantidade de analito na amostra de teste é inversamente proporcional à quantidade de padrão que fica ligado ao ligando.

Assim, o perito na especialidade pode determinar se um péptido ou outro composto tem capacidade para competir com um ligando peptídico pela ligação a albumina do soro empregando procedimentos que incluem mas não estão limitados a sistemas de ensaio competitivos utilizando técnicas tais como radioimunoensaios (RIA), imunoensaios enzimáticos (EIA), preferivelmente o ensaio imunoabsorvente associado a enzimas (ELISA), imunoensaios em sanduíche, ensaios imuno-radiométricos, imunoensaios fluorescentes, e imunoelectroforese, para nomear alguns.

Com este fim, o ligando peptídico seleccionado será marcado com um fragmento detectável (o ligando peptídico detectavelmente marcado sendo daqui para a frente designado por "traçador") e usado num ensaio de competição com um potencial composto para ligação ao alvo. Podem obter-se numerosos marcadores detectáveis os quais preferivelmente podem ser agrupados nas seguintes categorias:

- (a) Radioisótopos, tais como ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , e ^{131}I . O composto peptídico pode ser marcado com o radiosótopo através de técnicas descritas em Coligen et al., eds., Current Protocols in Immunology, Volumes 1 e 2 (1991), Wiley-Interscience, Nova Iorque, N.Y., por exemplo e a radioactividade pode ser medida por contagem de cintilação.
- (b) Marcadores fluorescentes tais como quelatos de terras-raras (quelatos de európio) ou fluoresceína e seus derivados, rodamina e seus derivados, dansil, lissamina, ficoeritrina e Texas Red estão disponíveis. Os marcadores fluorescentes podem ser conjugados aos compostos peptídicos por meio das técnicas divulgadas em Current Protocols in Immunology, supra, por exemplo. A fluorescência pode ser quantificada com um fluorómetro.
- (c) Existem vários marcadores enzima-substrato disponíveis e a Patente dos U.S. No. 4 275 149 proporciona uma avaliação de alguns destes. A enzima catalisa preferivelmente uma alteração química do substrato cromogénico que pode ser medida por várias técnicas. Por exemplo, a enzima pode catalisar uma mudança de cor num substrato, a qual pode ser medida espectrofotometricamente. Alternativamente, a enzima pode alterar a fluorescência ou quimiluminiscência do substrato. Técnicas para quantificar uma variação de fluorescência foram descritas atrás. O substrato quimiluminescente torna-se electronicamente excitado por uma reacção química e pode então emitir luz que pode ser medida (usando um quimiluminómetro, por exemplo) ou fornece energia a um receptor fluorescente. Exemplos de marcadores enzimáticos incluem luciferases (e.g., luciferase do vaga-lume e luciferase bacteriana; Patente

dos U.S. No. 4 737 456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, malato-desidrogenase, urease, peroxidase tal como peroxidase de rábano silvestre (HRP), fosfatase alcalina, β -D-galactosidase, glucoamilase, lisozima, sacárido-oxidases (e.g., glicose-oxidase, galactose-oxidase, e glicose-6-fosfato-desidrogenase), oxidases heterocíclicas (tais como uricase e xantina-oxidase), lactoperoxidase, microperoxidase, e similares.

Exemplos de combinações enzima-substrato incluem, por exemplo:

(i) Peroxidase de rábano silvestre (HRP) com hidrogénio-peroxidase como substrato, onde o hidrogénio-peroxidase oxida um corante precursor (e.g. ABTS, ortofenilenodiamina (OPD) ou cloridrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB));

(ii) fosfatase alcalina (AP) com para-nitrofenilfosfato como substrato cromogénico; e

(iii) β -D-galactosidase (β -D-Gal) com um substrato cromogénico (e.g. p-nitrofenil- β -D-galactosidase) ou o substrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidase.

De acordo com um determinado ensaio, o traçador é incubado com o alvo imobilizado na presença de várias concentrações do potencial composto não marcado. Concentrações crescentes do potencial composto de sucesso competem eficazmente com a ligação do traçador ao alvo imobilizado. A concentração do potencial composto não marcado à qual 50% do traçador ligado maximizadamente é substituído, é referido como a "IC₅₀".

Assim, um potencial composto com uma IC₅₀ de 1 mM apresenta uma interacção substancialmente mais fraca com o alvo do que um potencial composto com uma IC₅₀ de 1 μ M.

Em alguns ensaios ELISA de apresentação em fagos, a afinidade de ligação de uma sequência mutada ("mut") foi comparada directamente à de um péptido de controlo ("con") por

métodos descritos em B.C. Cunningham, D.G. Lowe, B. Li, B.D. Bennett, and J.A. Wells, *EMBO J.* **13**:2508 (1994) e caracterizada pelo parâmetro EC₅₀. Os ensaios foram realizados em condições onde EC₅₀(con)/EC₅₀(mut) aproximava-se de K_d(con)/K_d(mut).

Assim, o invento proporciona compostos "tendo a capacidade para competir" pela ligação à albumina do soro humano num ensaio *in vitro* como descrito. Preferivelmente, o composto tem uma IC₅₀ para a albumina do soro humano inferior a 1 µM. Entre estes compostos, os preferidos são compostos com uma IC₅₀ inferior a cerca de 100 nM e preferivelmente inferior a cerca de 10 nM ou inferior a cerca de 1 nM. Noutras concretizações preferidas de acordo com este aspecto do invento os compostos apresentam uma IC₅₀ para a albumina do soro humano inferior a cerca de 100 pM e mais preferivelmente inferior a cerca de 10 pM.

Um ensaio preferido *in vitro* para se determinar a capacidade de um potencial composto para competir com um ligando peptídico descrito aqui é como se segue e está descrito em mais pormenor nos Exemplos. Nas concretizações preferidas o potencial composto é um péptido. A capacidade de um potencial composto para competir com um traçador de ligando peptídico marcado pela ligação a albumina do soro humano é monitorizada por ELISA. Diluições de um potencial composto em tampão são transferidas para placas de microtitulação revestidas com albumina do soro humano (como descrito na Secção dos Exemplos) juntamente com um traçador durante 1 h. A placa de microtitulação é lavada com tampão de lavagem e a quantidade de traçador ligado à albumina do soro humano é medida.

B. Combinações de Ligandos Peptídicos

De acordo com o presente invento, o ligando peptídico está opcionalmente ligado a um composto bioactivo para formar uma molécula híbrida que comprehende um domínio peptídico de ligação e um domínio activo. Os compostos bioactivos do invento incluem qualquer composto útil como agente terapêutico e de diagnóstico. Exemplos não limitativos de compostos bioactivos incluem polipeptídos tais como enzimas, hormonas,

citocinas, anticorpos ou fragmentos de anticorpos, assim como compostos orgânicos tais como analgésicos, antipiréticos, agentes anti-inflamatórios, antibióticos, agentes antivirais, drogas antifúngicas, drogas cardiovasculares, drogas que afectam a função renal e o metabolismo electrolítico, drogas que actuam no sistema nervoso central, drogas quimioterapêuticas, etc. De acordo com o presente invento, o domínio peptídico de ligação é unido ao domínio activo, opcionalmente por um domínio ligante flexível.

As moléculas híbridas do presente invento são construídas através da combinação de um domínio peptídico de ligação com um domínio activo adequado. Dependendo do tipo de união e do seu método de produção, o domínio peptídico de ligação pode ser unido pelo seu terminal N ou C ao terminal N ou C do domínio activo. Por exemplo, durante a preparação de moléculas híbridas do presente invento por técnicas recombinantes, o ácido nucleico que codifica um ligando peptídico estará operativamente ligado ao ácido nucleico que codifica a sequência do domínio activo, opcionalmente através de um domínio ligante. Tipicamente, a construção codifica uma proteína de fusão onde o terminal C do ligando peptídico está unido ao terminal N do domínio activo. Porém, especialmente quando se empregam técnicas sintéticas, também são possíveis fusões onde, por exemplo, o terminal N do ligando peptídico está unido ao terminal N ou C do domínio activo. Em certas instâncias, o domínio peptídico de ligação pode ser inserido na molécula do domínio activo em vez de se unir ao domínio activo no seu terminal N ou C. Esta configuração pode ser usada na prática desde que as funções do domínio peptídico de ligação e do domínio activo sejam conservadas. Por exemplo, um ligando peptídico pode ser inserido numa cadeia leve de não ligação CDR de uma imunoglobulina sem interferir com a capacidade da imunoglobulina para se ligar ao seu alvo. Regiões de moléculas do domínio activo que podem acomodar inserções do domínio peptídico de ligação podem ser identificadas empiricamente (*i.e.*, seleccionando um local de inserção aleatoriamente, e analisando o conjugado resultante quanto à função do domínio activo), ou por comparações de sequências numa família de moléculas relacionadas do domínio activo (*e.g.*, em relação a domínios activos que são proteínas) para localizar regiões com baixa homologia de sequências. É

mais provável que regiões com baixa homologia de sequências tolerem inserções de domínios peptídicos de ligação do que regiões que estão bem conservadas. Para as moléculas do domínio activo cujas estruturas tridimensionais são conhecidas (e.g. a partir de estudos cristalográficos com raios X ou de RMN), a estrutura tridimensional pode proporcionar orientação quanto a locais de inserção de ligandos peptídicos. Por exemplo, é mais provável que alças ou regiões de elevada mobilidade (*i.e.*, temperatura elevada ou factores "B") acomodem inserções de domínio peptídico de ligação do que regiões altamente ordenadas da estrutura, ou regiões envolvidas na ligação de ligandos ou catálise.

C. Domínios Ligantes

De acordo com o presente invento, o domínio peptídico de ligação está opcionalmente ligado ao domínio activo através de um ligante. O componente ligante da molécula híbrida do invento não participa necessariamente na função da molécula híbrida mas contribui para esta. Assim, de acordo com o presente invento, o domínio ligante é qualquer grupo de moléculas que proporciona uma ponte espacial entre o domínio activo e o domínio peptídico de ligação.

O domínio ligante pode variar em comprimento e constituição, contudo, de acordo com o presente invento, é o comprimento do domínio ligante e não a sua estrutura que é importante. O domínio ligante preferivelmente permite que o domínio peptídico de ligação da molécula híbrida se ligue à molécula alvo praticamente sem restrições estereoquímicas e/ou conformacionais. Por isso, o comprimento do domínio ligante depende das características dos dois domínios "funcionais" da molécula híbrida, *i.e.*, do domínio peptídico de ligação e do domínio activo.

O perito na especialidade reconhecerá que várias combinações de átomos proporcionam moléculas de comprimento variável com base nas distâncias conhecidas entre as várias ligações (Morrison, and Boyd, Organic Chemistry, 3^a Ed, Allyn and Bacon, Inc., Boston, MA (1977)). Por exemplo, o domínio ligante pode ser um polipéptido de comprimento variável. A composição em aminoácidos do polipéptido determina as

características e comprimento do ligante. Numa concretização preferida, a molécula ligante compreende uma cadeia polipeptídica hidrófila e flexível. Domínios ligantes típicos compreendem um ou mais resíduos Gly e/ou Ser, tais como aqueles descritos aqui na secção dos exemplos.

D. Síntese recombinante

O presente invento abrange uma composição material compreendendo um ácido nucleico isolado, preferivelmente ADN, codificante de um ligando peptídico ou de uma molécula híbrida compreendendo um domínio peptídico de ligação e um domínio activo polipeptídico como aqui descrito. O ADN codificante dos péptidos do invento pode ser preparado por uma variedade de métodos conhecidos na arte. Estes métodos incluem, mas não estão limitados a, síntese química por qualquer um dos métodos descritos em Engels *et al.* (1989), *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.* **28**:716-734, tal como os métodos de triéster, fosfito, fosforamidita e H-fosfonato. Numa concretização, os codões preferidos pela célula hospedeira de expressão são usados no desenho do ADN de codificação. Alternativamente, o ADN codificante dos péptidos do invento pode ser alterado para codificar uma ou mais variantes pela utilização de técnicas de ADN recombinante, tais como mutagénese específica para o local (Kunkel *et al.* (1991), *Methods Enzymol.*, **204**:125-139; Carter *et al.* (1986), *Nucl. Acids Res.* **13**:4331; Zoller *et al.* (1982), *Nucl. Acids Res.* **10**:6487), mutagénese por cassette (Wells *et al.* (1985), *Gene* **34**:315), mutagénese de selecção de restrição (Carter, Directed Mutagenesis: A Practical Approach (M.J. McPherson, ed.) IRL Press, Oxford, 1991), e similares.

De acordo com os aspectos preferidos descritos atrás, o ácido nucleico codifica um ligando peptídico capaz de se ligar a uma molécula alvo de albumina do soro.

De acordo com outro aspecto preferido do invento, o ácido nucleico codifica uma molécula híbrida compreendendo uma sequência de um domínio peptídico de ligação e um domínio activo. Neste aspecto do invento, o domínio activo pode compreender qualquer composto polipeptídico útil como agente terapêutico ou de diagnóstico, e.g., enzimas, hormonas, citocinas, anticorpos ou fragmentos de anticorpos. A molécula

de ácido nucleico de acordo com este aspecto do presente invento codifica uma molécula híbrida, e o ácido nucleico que codifica a sequência do domínio peptídico de ligação está operativamente ligado (no sentido em que as sequências de ADN são contíguas e no quadro de leitura) ao ácido nucleico codificante do agente biologicamente activo. Opcionalmente, estas sequências de ADN podem estar ligadas através de uma sequência de ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácidos do domínio ligante.

De acordo com este aspecto, o invento comprehende ainda uma sequência de controlo de expressão ligada operativamente à molécula de ADN codificante de um péptido do invento, um vector de expressão, tal como um plasmídeo, comprehendendo a molécula de ADN, onde a sequência de controlo é reconhecida por uma célula hospedeira transformada com o vector, e uma célula hospedeira transformada com o vector. Em geral, os vectores plasmídicos contêm sequências de controlo e de replicação que são derivadas de espécies compatíveis com a célula hospedeira. O vector normalmente alberga um local de replicação, assim como sequências que codificam proteínas capazes de proporcionar selecção fenotípica em células transformadas.

Para expressão em hospedeiros procarióticos, vectores adequados incluem pBR322 (ATCC No. 37017), phGH107 (ATCC No. 40011), pBO475, pS0132, pRIT5, qualquer vector das séries pRIT20 ou pRIT30 (Nilsson and Abrahmsen (1990), *Meth. Enzymol.* 185:144-161), pRIT2T, pKK233-2, pDR540 e pPL-lambda. Células hospedeiras procarióticas contendo os vectores de expressão do presente invento incluem a estirpe 294 de *E. coli* K12 (ATCC NO. 31446), a estirpe JM101 de *E. coli* (Messing et al. (1981), *Nucl. Acid Res.* 9:309), a estirpe B de *E. coli*, a estirpe 1776 de *E. coli* (ATCC No. 31537), *E. coli* c600, *E. coli* W3110 (F-, gama-, prototrófico; ATCC No. 27325), estirpe 27C7 de *E. coli* (W3110, *tonA*, *phoA* E15, (*argF-lac*)169, *ptr3*, *degP41*, *ompT*, *kan^r*) (Patente dos U.S. No. 5 288 931, ATCC No. 55244), espécies *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcesans*, e *Pseudomonas*.

Além de procariotas, podem utilizar-se organismos eucarióticos, tais como leveduras, ou células derivadas de

organismos multicelulares, tais como células hospedeiras. Para expressão em células hospedeiras de levedura, tais como a levedura comum de padeiro ou *Saccharomyces cerevisiae*, vectores adequados incluem vectores de replicação epissómica baseados no plasmídeo de 2 micron, vectores de integração, e vectores de cromossomas artificiais da levedura (YAC). Para expressão em células hospedeiras de insecto, tais como células SF9, vectores adequados incluem vectores baculovirais. Para expressão em células hospedeiras de plantas, particularmente células hospedeiras de plantas dicotiledóneas, tais como o tabaco, vectores de expressão adequados incluem vectores derivados do plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens*.

Exemplos de células hospedeiras úteis de mamífero, incluem a linha CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); a linha embrionária de rim humano (293 ou 293 células subclonadas para crescimento em cultura de suspensão, Graham et al. (1977), *J. Gen Virol.* **36**:59; células de rim de hamster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovário de hamster chinês /-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:4216); células Sertoli de ratinho (TM4, Mather (1980), *Biol. Reprod.* **23**:243-251); células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células de rim de macaco verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de rim canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de rato Búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamário de ratinho (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al. (1982), *Annals N.Y. Acad. Sci.* **383**:44-68); células MRC 5; células FS4; e uma linha celular de hepatoma humano (Hep G2). Para expressão em células hospedeiras de mamífero, vectores úteis incluem vectores derivados de SV40, vectores derivados do citomegalovírus tais como os vectores pRK, incluindo pRK5 e pRK7 (Suva et al. (1987)), *Science* **237**:893-896; EP 307 247 (3/15/89), EP 278 776 (8/17/88)) vectores derivados dos vírus *vaccinia* ou outros poxvírus, e vectores retrovirais tais como os vectores derivados do vírus da leucemia murina de Moloney (MoMLV).

Opcionalmente, o ADN que codifica o péptido de interesse está ligado operativamente a uma sequência de comando de

secreção resultando na secreção do produto de expressão pela célula hospedeira para o meio de cultura. Exemplos de sequências de comando de secreção incluem STII, ecotina, lamB, herpes GD, lpp, fosfatase alcalina, invertase, e factor alfa. A sequência de comando de 36 aminoácidos de proteína A também é adequada para se utilizar aqui (Abrahmsen *et al.* (1985), *EMBO J.* **4**:3901).

As células hospedeiras são transfectadas e preferivelmente transformadas com a expressão descrita atrás ou com os vectores de clonagem deste invento e crescidas em cultura em meio nutriente convencional modificado de forma apropriada para induzir promotores, seleccionar transformantes, ou amplificar os genes que codificam as sequências desejadas.

As células hospedeiras procarióticas usadas para produzir os péptidos presentes podem ser crescidas em cultura como descrito de uma maneira geral em Sambrook *et al.*, *supra*.

As células hospedeiras de mamífero usadas para produzir os péptidos do invento podem ser crescidas em cultura numa variedade de meios. Meios comercialmente disponíveis tais como F10 de Ham (Sigma), Meio Mínimo Essencial ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma), e meio de Eagle modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma) são adequados para cultura das células hospedeiras. Em adição, qualquer meio entre os descritos em Ham and Wallace (1979), *Meth. in Enz.* **58**:44, Barnes and Sato (1980), *Anal. Biochem.* **102**:255, Patentes dos U.S. Nos. 4 767 704; 4 657 866; 4 927 762; ou 4 560 655; WO 90/03430; WO 87/00195; patentes do U.S. Re. 30 985; ou U.S. 5 122 469, cujas divulgações são todas incorporadas aqui por referência, podem ser empregues como meios de cultura para as células hospedeiras. Qualquer destes meios pode ser suplementado conforme necessário com hormonas e/ou outros factores de crescimento (tais como insulina, transferrina, ou factor de crescimento epidérmico), sais (tais como cloreto de sódio, cálcio, magnésio, e fosfato), tampões (tais como HEPES), nucleósidos (tais como adenosina e timidina), antibióticos (tais como a droga Gentamycin™), elementos vestigiais (definidos como compostos inorgânicos normalmente presentes às concentrações finais da gama micromolar), e glicose ou uma

fonte equivalente de energia. Também se podem incluir em concentrações apropriadas quaisquer outros suplementos necessários conhecidos pelos peritos na especialidade. As condições de cultura, tais como temperatura, pH, e similares, serão as previamente usadas com a célula hospedeira seleccionada para expressão, e serão evidentes à pessoa competente na especialidade.

As células hospedeiras referidas nesta divulgação abrangem células em cultura *in vitro* assim como células de um animal hospedeiro.

E. Síntese Química

Outro método de produção dos compostos do invento envolve síntese química. Esta pode ser levada a cabo por metodologias bem conhecidas na arte (refira-se a Kelley, R.F. & Winkler, M.E. em Genetic Engineering Principles and Methods, Setlow, J.K, ed., Plenum Press, N.Y., Vol. 12, pp 1-19 (1990); Stewart, J.M. Young, J.D., Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984); refira-se também às Patentes dos U.S. Nos. 4 105 603; 3 972 859; 3 842 067; e 3 862 925).

Os ligandos peptídicos do invento podem ser convenientemente preparados por meio de síntese de péptidos em fase sólida. Merrifield (1964), *J. Am. Chem. Soc.* **85**:2149; Houghten (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:5132. Também se pode empregar síntese de péptidos em fase sólida para preparar as composições da molécula híbrida do invento se o domínio activo for, ou compreender, um polipeptídeo.

A síntese em fase sólida começa no terminal carboxi do péptido nascente pelo acoplamento de um aminoácido protegido a um suporte sólido inerte. O suporte sólido inerte pode ser qualquer macromolécula capaz de servir como âncora para o terminal C do aminoácido inicial. Tipicamente, o suporte macromolecular é uma resina polimérica reticulada (e.g., uma resina de poliamida ou de poliestireno) como se apresenta nas Figuras 1-1 e 1-2, nas páginas 2 e 4 de Stewart e Young, *supra*. Numa concretização, o aminoácido C-terminal é acoplado a uma resina de poliestireno para formar um éster benzílico.

Um suporte macromolecular é seleccionado de modo a que a ligação âncora do péptido seja estável nas condições usadas para desproteger o grupo amino α dos aminoácidos bloqueados na síntese peptídica. No caso de se empregar um grupo protector de α lábil a bases, então será desejável utilizar uma ligação lábil a ácidos entre o péptido e o suporte sólido. Por exemplo, uma resina de éter lábil a ácidos é eficaz para a síntese de péptidos de Fmoc-aminoácidos lábeis a bases como descrito na página 16 de Stewart e Young, *supra*. Alternativamente, pode utilizar-se uma ligação âncora do péptido e um grupo protector de α que são diferencialmente lábeis a acidólise. Por exemplo, uma resina aminometílica tal como a resina de fenilacetamidometilo (Pam) funciona bem na síntese peptídica com Boc-aminoácidos como descrito nas páginas 11-12 de Stewart e Young, *supra*.

Após acoplamento do aminoácido inicial a um suporte sólido inerte, o grupo protector de amino α do aminoácido inicial é removido com, por exemplo, ácido trifluoroacético (TFA) em cloreto de metileno e neutralizado em, por exemplo, trietilamina (TEA). A seguir à desprotecção do grupo amino α do aminoácido inicial, adiciona-se o próximo aminoácido protegido em amino α e nas cadeias laterais. Os aminoácidos residuais protegidos em amino α e, se necessário, nas cadeias laterais, são então acoplados sequencialmente na ordem desejada por condensação para se obter um composto intermediário ligado ao suporte sólido. Alternativamente, alguns aminoácidos podem ser acoplados uns aos outros para formar um fragmento do péptido desejado seguido de adição da cadeia peptídica em crescimento na fase sólida.

A reacção de condensação entre dois aminoácidos, ou um aminoácido e um péptido, ou um péptido e um péptido, pode ser levada a cabo de acordo com os métodos usuais de condensação tais como o método com axida, o método com anidridos de ácidos mistos, os métodos com DCC (*N,N'*-diciclo-hexilcarbodiimida) ou DIC (*N,N'*-diisopropilcarbodiimida), o método com éster activo, o método com éster p-nitrofenílico, o método com hexafluorofosfato de BOP (benzotriazol-1-iloxi-tris[dimetilamino]fosfónio), o método com imidoéster do ácido N-hidroxissuccínico, etc., e o método do reagente K de Woodward.

Na síntese química de péptidos é comum proteger quaisquer grupos reactivos das cadeias laterais dos aminoácidos com grupos protectores adequados. No final, estes grupos protectores são removidos depois da cadeia polipeptídica desejada ter sido arranjada sequencialmente. Também é comum proteger o grupo amino α num aminoácido ou fragmento peptídico enquanto o grupo carboxi C-terminal do aminoácido ou fragmento peptídico reage com o grupo amino N-terminal livre da cadeia polipeptídica em crescimento na fase sólida, seguido da remoção selectiva do grupo amino α de forma a permitir a adição do próximo aminoácido ou fragmento peptídico à cadeia polipeptídica da fase sólida. Assim, na síntese polipeptídica é comum produzir um composto intermediário contendo cada um dos resíduos de aminoácidos localizados na sequência desejada na cadeia peptídica com os resíduos individuais albergando ainda grupos protectores da cadeia lateral. Estes grupos protectores podem ser removidos substancialmente ao mesmo tempo para produzir o produto polipeptídico desejado, seguido de remoção da fase sólida.

As cadeias laterais amino α e ϵ podem ser protegidas com os grupos benziloxicarbonilo (abreviado para Z), isonicotiniloxicarbonilo (iNOC), o-clorobenziloxicarbonilo [Z(2Cl)], p-nitrobenziloxicarbonilo [Z(NO₂)], p-metoxibenziloxicarbonilo [Z(OMe)], t-butoxicarbonilo (Boc), t-amiloxicarbonilo (Aoc), isoborniloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, 2-(4-bifenil)-2-propiloxicarbonilo (Bpoc), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), metilsulfonietoxicarbonilo (Msc), trifluoroacetilo, ftalilo, formilo, 2-nitrofenilsulfenilo (NPS), difenilfosfinotioílo (Ppt), e dimetilfosfinotioílo (Mpt), e similares.

Os grupos protectores do grupo funcional carboxi são exemplificados por éster benzílico (OBzl), éster ciclohexílico (Chx), éster 4-nitrobenzílico (ONb), éster t-butílico (Obut), éster 4-piridilmétílico (OPic), e similares. É frequentemente desejável que específicos aminoácidos tais como arginina, cisteína, e serina, que possuem um outro grupo funcional para além de grupos amino e carboxilo, sejam protegidos por um grupo protector adequado. Por exemplo, o grupo guanidino da arginina pode ser protegido com nitro, p-toluenossulfenilo, benziloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo,

p-metoxibenzenossulfonilo, 4-metoxi-2,6-dimetilbenzenossulfonilo (Nds), 1,3,5-trimetilfenisulfonilo (Mts), e similares. O grupo tiol da cisteína pode ser protegido com p-metoxibenzilo, tritilo, e similares.

Muitos dos aminoácidos bloqueados descritos atrás podem ser obtidos de fontes comerciais tais como Novabiochem (San Diego, CA), Bachem CA (Torrence, CA) ou Peninsula Labs (Belmont, CA).

Stewart e Young, *supra*, dão informações detalhadas sobre procedimentos de preparação de péptidos. A protecção dos grupos amino α está descrita nas páginas 14-18, e o bloqueio das cadeias laterais está descrito nas páginas 18-28. Uma tabela de grupos protectores para as funções amina, hidroxilo e sulfidrilo é dada nas páginas 149-151.

Depois da sequência de aminoácidos desejada estar completa, o péptido pode ser clivado do suporte sólido, recuperado e purificado. O péptido é removido do suporte sólido com um reagente capaz de destruir a ligação péptido-fase sólida, e opcionalmente desproteger os grupos funcionais bloqueados das cadeias laterais do péptido. Numa concretização, o péptido é clivado da fase sólida por acidólise com ácido fluorídrico líquido (HF), o qual também remove quaisquer grupos protectores das cadeias laterais remanescentes. Preferivelmente, de forma a evitar a alquilação de resíduos no péptido (por exemplo, alquilação dos resíduos de metionina, cisteína, e tirosina), a mistura reacional de acidólise contém tio-cresol e cresol. A seguir à clivagem com HF, a resina é lavada com éter, e o péptido livre é extraído da fase sólida por lavagens sequenciais com soluções de ácido acético. As lavagens combinadas são liofilizadas, e o péptido é purificado.

F. Conjugação Química de Híbridos

Em certas concretizações do presente invento, as moléculas híbridas podem compreender domínios activos que são compostos orgânicos com utilidade terapêutica ou para diagnóstico, ou alternativamente, fusões entre um domínio peptídico de ligação e um domínio polipeptídico activo em

configurações que não podem ser codificadas num único ácido nucleico. Exemplos da última concretização incluem fusões entre o amino terminal de um ligando peptídico e o amino terminal do domínio activo, ou fusões entre o terminal carboxi de um ligando peptídico e o terminal carboxi do domínio activo.

Pode empregar-se conjugação química para preparar estas concretizações da molécula híbrida, utilizando uma variedade de agentes bifuncionais de acoplamento de proteínas tais como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (tais como disuccinimidilsuberato), aldeídos (tal como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis(p-azidobenzoíl)hexanodiamina), derivados de bis-diazónio (tais como bis(p-diazoniobenzoíl)etilenodiamina), diisocianatos (tais como tolueno, 2,6-diisocianato), e compostos bis-activos de flúor (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno).

G. Péptidos Ligados por Dissulfureto

Como descrito atrás, algumas concretizações do invento incluem ligandos peptídicos ciclizados. Os ligandos peptídicos podem ser ciclizados através da formação de uma ligação dissulfureto entre os resíduos de cisteína. Estes péptidos podem ser produzidos por síntese química como descrito atrás e depois ciclizados por qualquer método conveniente usado na formação de ligações dissulfureto. Por exemplo, os péptidos podem ser recuperados da síntese em fase sólida com sulfidrilos na forma reduzida, dissolvidos numa solução diluída onde a concentração de cisteína intramolecular excede a concentração de cisteína intermolecular de forma a se optimizar a formação da ligação dissulfureto intramolecular, tal como uma concentração de péptido de 25 mM a 1 µM, e preferivelmente de 500 µM a 1 µM, e mais preferivelmente de 25 µM a 1 µM, e depois oxidados por exposição dos grupos sulfidrilo livres a um agente oxidante moderado que seja capaz de gerar ligações dissulfureto intramoleculares, e.g., oxigénio molecular com ou sem catalisadores tais como catiões metálicos, ferricianeto de potássio, tetracionato de sódio,

etc. Alternativamente, os péptidos podem ser ciclizados como descrito em Pelton *et al.* (1986), *J. Med. Chem.* **29**:2370-2375.

A ciclização pode ser realizada através da formação, por exemplo, de uma ligação dissulfureto ou uma ligação lactama entre a primeira Cys e a segunda Cys. Entre os resíduos capazes de formar uma ligação dissulfureto constam, por exemplo, Cys, Pen, Mpr, e Mpp e os seus equivalentes contendo o grupo amino 2. Os resíduos capazes de formar uma ponte de lactama incluem, por exemplo, Asp, Glu, Lys, Orn, ácido $\alpha\beta$ -diaminobutírico, ácido diaminocártico, ácido aminobenzólico e ácido mercaptobenzólico. Aqui, os compostos podem ser ciclizados por exemplo via uma ligação lactama a qual pode utilizar o grupo da cadeia lateral de um resíduo não adjacente para formar uma ligação covalente com o grupo amino N-terminal de Cys ou outro aminoácido. Também se podem usar estruturas em ponte alternativas para ciclizar os compostos do invento, incluindo por exemplo, péptidos e peptidomiméticos, os quais podem ciclizar via S-S, CH₂-S, CH₂-O-CH₂, éster de lactama ou outras ligações.

H. Composições Farmacêuticas

As composições farmacêuticas que compreendem as moléculas híbridas do invento podem ser administradas por qualquer via adequada, incluindo parentérica, oral ou local (tal como aerosol ou transdérmica) ou qualquer combinação destas.

Outras composições adequadas do presente invento compreendem quaisquer entre as composições mencionadas atrás juntamente com um transportador farmaceuticamente aceitável, a natureza do transportador diferindo consoante o modo de administração, por exemplo, na administração oral, usualmente um transportador sólido e na administração i.v., um transportador líquido de solução de sal.

As composições do presente invento incluem componentes farmaceuticamente aceitáveis que são compatíveis com o objecto e a proteína do invento. Estas geralmente incluem suspensões, soluções e elixires, e mais especialmente tampões biológicos, tais como solução salina tamponada com fosfato, solução salina, meio de Dulbecco, e similares. Também se podem usar

aerossóis, ou transportadores tais como amidos, açúcares, celulose microcristalina, diluentes, agentes de granulação, lubrificantes, ligantes, agentes desintegradores, e similares (no caso de preparações sólidas orais, tais como pós, cápsulas, e comprimidos).

Como empregue aqui, o termo "farmaceuticamente aceitável" geralmente significa aprovado por uma agência reguladora do governo federal ou estatal ou listada na farmacopeia dos Estados Unidos, ou outra farmacopeia reconhecida em geral para utilização em animais, e mais particularmente em humanos.

A formulação preferida pode ser obtida com uma variedade dos tampões mencionados atrás, ou mesmo excipientes, incluindo, por exemplo, qualidades farmacêuticas de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina de sódio, celulose, carbonato de magnésio, e similares. A "PEGuilação" das composições pode ser conseguida por meio de técnicas conhecidas na arte (refira-se por exemplo à Publicação Internacional de Patente No. WO92/16555, à Patente dos U.S. No. 5 122 614 de Enzon, e à Publicação Internacional de Patente No. WO92/00748).

Uma via preferida de administração do presente invento é na forma de aerossol ou inalada. Os compostos do presente invento, combinados com um agente de dispersão, ou dispersante, podem ser administrados numa formulação de aerossol na forma de pó seco, ou numa solução ou suspensão com um diluente.

Como empregue aqui, o termo "dispersante" refere-se a um agente que assiste à formação de um aerossol do composto ou à absorção da proteína no tecido pulmonar, ou a ambas. Preferivelmente, o dispersante é farmaceuticamente aceitável. Agentes de dispersão adequados são bem conhecidos na arte, e incluem mas não estão limitados a tensioactivos e similares. Podem utilizar-se, por exemplo, tensioactivos que são geralmente usados na arte para reduzir a agregação de um composto induzida pela superfície, especialmente um composto peptídico, causada pela atomização da solução formadora do aerossol líquido. Exemplos não limitativos destes tensioactivos são tensioactivos tais como ésteres e álcoois de

ácidos gordos de polioxietileno, e ésteres de ácidos gordos de polioxietileno sorbitano. As quantidades usadas de tensioactivos variam, estando geralmente na gama de desde cerca de 0,001% até cerca de 4% em peso da formulação. Num aspecto específico, o tensioactivo é monooleato de polioxietileno sorbitano ou trioleato de sorbitano. Tensioactivos adequados são bem conhecidos na arte e podem ser seleccionados com base nas propriedades desejadas, dependendo da formulação específica, concentração do composto, diluente (numa formulação líquida) ou forma do pó (numa formulação de pó seco), etc.

Além disso, dependendo da escolha do ligando peptídico, do efeito terapêutico desejado, da qualidade do tecido do pulmão (e.g., pulmões doentes ou saudáveis), e numerosos outros factores, as formulações líquidas ou secas podem compreender componentes adicionais, como observado a seguir.

As formulações líquidas para aerossol geralmente contêm o híbrido ligando peptídico/domínio activo e um agente de dispersão num diluente fisiologicamente aceitável. As formulações em pó seco para aerossol do presente invento consistem de uma forma sólida finamente dividida do híbrido ligando peptídico/domínio activo e um agente de dispersão. Tanto no caso da formulação líquida como da formulação em pó seco para aerossol, a formulação deve ser transformada em aerossol. Isto é, deve ser reduzida a partículas de líquido ou sólido de forma a assegurar que a dose do aerossol atinja de facto os alvéolos. Em geral, o diâmetro dinâmico mediano de massa será de 5 micrón ou menos de forma a assegurar que as partículas da droga atinjam os alvéolos do pulmão (Wearley, L.L. (1991), *Crit. Rev. in Ther. Drug Carrier Systems* **8**:333). O termo "partícula de aerossol" é aqui empregue para descrever a partícula de líquido ou sólido adequada para administração pulmonar, i.e., que atingirá os alvéolos. Outras considerações tais como construção do dispositivo de entrega, componentes adicionais da formulação e características da partícula são importantes. Estes aspectos da administração pulmonar de uma droga são bem conhecidos na arte, e os meios de manipulação de formulações e formação de aerossol, assim como a construção de um dispositivo de entrega, requerem no máximo testes rotineiros por alguém competente na arte.

Em relação à construção do dispositivo de entrega, na prática do invento pode utilizar-se qualquer forma de formação de aerossol conhecida na arte, incluindo mas não estando limitado a nebulização, atomização ou formação de aerossol por bomba de uma formulação líquida, assim como formação de aerossol de uma formulação em pó seco. Prevê-se um dispositivo de entrega concebido unicamente para administração de formulações sólidas. Frequentemente, a formação de aerossol de uma formulação líquida ou em pó seco requer um propulsor. O propulsor pode ser qualquer propulsor geralmente usado na arte. Exemplos específicos não limitativos destes propulsores úteis são um clorofluorocarboneto, um hidrofluorocarboneto, um hidroclorofluorocarboneto, ou um hidrocarboneto, incluindo trifluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol, e 1,1,1,2-tetrafluroetano, ou combinações destes.

Num aspecto preferido do invento, o dispositivo para formação do aerossol é um inalador medidor de doses. Um inalador medidor de doses proporciona uma dosagem específica ao ser administrado, em vez de uma dose variável consoante a administração. Este inalador medidor de doses pode ser usado tanto com uma formulação para aerossol em pó seco como líquida. Os inaladores medidores de doses são bem conhecidos na arte.

Quando o híbrido ligando peptídico/domínio activo atinge o pulmão, vários factores dependentes da formulação afectam a absorção da droga. Será reconhecido que no tratamento de uma doença ou distúrbio que requerem níveis circulatórios do composto, factores tais como o tamanho de partícula do aerossol, a forma de partícula do aerossol, a presença ou ausência de infecção, doença dos pulmões ou êmbolos podem afectar a absorção dos compostos. Para cada uma das formulações aqui descritas, certos lubrificantes, promotores de absorção, estabilizadores de proteína ou agentes de suspensão podem ser apropriados. A escolha destes agentes adicionais dependerá do objectivo. Será reconhecido que quando se deseja ou procura a entrega local dos compostos, variáveis tais como intensificação de absorção serão menos críticas.

I. Formulações Líquidas de Aerossol

As formulações líquidas de aerossol do presente invento serão empregues tipicamente com um nebulizador. O nebulizador pode ser tanto propulsionado por ar comprimido como ultrassônico. Qualquer nebulizador conhecido na arte pode ser usado em conjunção com o presente invento tal como mas não limitado a: Ultravent, Mallinckrodt, Inc. (St. Louis, MO); o nebulizador Acorn II (Marquest Medical Products, Englewood CO). Outros nebulizadores úteis em conjunção com o presente invento estão descritos nas Patentes dos U.S. Nos. 4 624 251 emitida a 25 de Novembro de 1986; 3 703 173 emitida a 21 de Novembro de 1972; 3 561 444 emitida a 9 de Fevereiro de 1971 e 4 635 627 emitida a 13 de Janeiro de 1971.

A formulação pode incluir um transportador. O transportador é uma macromolécula solúvel no sistema circulatório e fisiologicamente aceitável, onde aceitação fisiológica significa que os peritos na especialidade aceitarão que um paciente seja injectado com o referido transportador como parte do sistema terapêutico. Preferivelmente, o transportador é relativamente estável no sistema circulatório tendo uma meia-vida de eliminação aceitável. Estas macromoléculas incluem mas não estão limitadas a lecitina de soja, ácido oleico e trioleato de sorbitano, sendo preferido o trioleato de sorbitano.

As formulações da concretização presente podem também incluir outros agentes úteis para estabilização de proteínas ou para regulação da pressão osmótica. Exemplos dos agentes incluem mas não estão limitados a sais, tais como cloreto de sódio, ou cloreto de potássio, e hidrocarbonetos, tais como glicose, galactose ou manose, e similares.

J. Formulações em Pó Seco de Aerossol

Também se contempla que a presente formulação farmacêutica seja usada como uma formulação em pó seco para inalador compreendendo uma forma em pó finamente dividida do ligando peptídico e um dispersante. A forma do composto será geralmente um pó liofilizado. Formas liofilizadas de compostos

do híbrido ligando peptídico/domínio activo podem ser obtidas por técnicas *standard*.

Noutra concretização, a formulação em pó seco compreenderá um pó seco finamente dividido contendo um ou mais compostos do presente invento, um agente de dispersão e também um agente de avolumamento. Agentes de avolumamento úteis em conjunção com a presente formulação incluem agentes tais como lactose, sorbitol, sacarose, ou manitol, em quantidades que facilitam a dispersão do pó do dispositivo.

K. Pesquisa, Fabrico, e Composições de Diagnóstico

Numa concretização preferida, as moléculas híbridas ou ligandos peptídicos do invento são absorvidos não covalentemente ou ligados covalentemente a uma macromolécula, tal como um suporte sólido. Será reconhecido que o invento abrange macromoléculas complexadas com os ligandos peptídicos ou moléculas híbridas.

Em geral, o suporte sólido é uma matriz inerte, tal como um gel polimérico, compreendendo uma estrutura tridimensional, reticulado ou rede de um material. Quase todas as macromoléculas sintéticas ou naturais podem formar um gel num líquido adequado quando são reticuladas adequadamente com um reagente bifuncional. Preferivelmente, a macromolécula seleccionada é conveniente para utilização em cromatografia de afinidade. A maioria das matrizes cromatográficas usadas para cromatografia de afinidade são xerogéis. Estes géis encolhem ao secarem para formarem um sólido compacto compreendendo apenas a matriz de gel. Quando o xerogel seco é ressuspenso no líquido, a matriz de gel embebe o líquido, incha e volta ao estado de gel. Xerogéis adequados para serem aqui utilizados incluem géis poliméricos, tais como celulose, dextranos reticulados (e.g. Sepharose), agarose, agarose reticulada, géis de poliacrilamida, e géis de poliacrilamida-agarose.

Alternativamente, podem usar-se aerogéis em cromatografia de afinidade. Este géis não encolhem ao secarem permitindo meramente a penetração do ar em volta. Quando o gel seco é exposto ao líquido, este substitui o ar no gel. Aerogéis

adequados para utilização aqui incluem vidro poroso e géis cerâmicos.

Aqui também são abrangidos os ligandos peptídicos ou moléculas híbridas do invento acoplados a géis derivados onde as porções derivadas facilitam o acoplamento das moléculas híbridas à matriz de gel e evitam o impedimento estereoquímico da interacção ligante peptídico-molécula alvo em cromatografia de afinidade. Alternativamente, braços intercaladores podem ser interpostos entre a matriz de gel e as moléculas híbridas para o mesmo benefício.

Uma variação do anterior contempla a utilização de fusões de genes e a utilização de ligandos peptídicos como reagentes de purificação. De acordo com este aspecto do invento, o gene codificante de um ligante peptídico está associado, num vector, com um gene codificante de outra proteína ou de um fragmento de outra proteína. Isto resulta no ligando peptídico sendo produzido pela célula hospedeira como uma fusão com outra proteína ou péptido. A "outra" proteína ou péptido é frequentemente uma proteína ou péptido que pode ser segregada pela célula, tornando possível isolar e purificar a outra proteína do meio de cultura e eliminado a necessidade de se destruir as células hospedeiras que surgem quando a outra proteína permanece dentro da célula. Alternativamente, a proteína de fusão pode ser expressa intracelularmente. É útil utilizar proteínas de fusão que são altamente expressas.

A utilização de fusões de genes é análoga à utilização de fusões de proteína A, as quais são usadas frequentemente porque a proteína A, ou mais especificamente o domínio Z da proteína A, liga-se a IgG e proporciona um "gancho de afinidade" para a purificação da proteína fundida. De acordo com um aspecto preferido do invento, ligandos peptídicos que se ligam a albumina do soro têm utilidade como "gancho de afinidade" na purificação de proteínas fundidas num suporte sólido da albumina do soro. Por exemplo, a sequência de ADN que codifica o ligando peptídico desejado pode ser fundida por mutagénese dirigida ao gene da proteína. Após expressão e secreção, a proteína de fusão pode ser purificada numa matriz da albumina do soro à qual o ligando peptídico se ligará. Após purificação, o ligando peptídico pode ser enzimática ou

quimicamente clivado para dar proteína livre ou deixado intacto de forma a prolongar a meia-vida de eliminação da proteína fundida. As proteínas de fusão podem ser clivadas com químicos, tais como brometo de cianogénio, o qual cliva uma metionina, ou hidroxilamina, a qual é clivada entre um resíduo Asn e um resíduo Gly. Utilizando metodologia standard de ADN recombinante, os pares de bases do nucleótido codificante destes aminoácidos podem ser inseridos justamente antes da extremidade 5' do gene que codifica o desejado péptido. Alternativamente, pode empregar-se clivagem proteolítica da proteína de fusão. Carter, em Protein Purification: From Molecular Mechanisms to Large-Scale Processes, Ladisch et al., eds. (American Chemical Society Symposium Series No. 427, 1990), Cap. 13, páginas 181-193.

Os seguintes exemplos são dados para ilustração e não como modo de limitação. Os ligandos peptídicos IgG-Fc não estão dentro do âmbito do presente invento. Os Exemplos 1 a 5 são incluídos para ilustrar princípios e métodos usados pelos inventores.

EXEMPLO 1 – comparativo

Ligandos Peptídicos IgG-Fc

Uma selecção *in vitro* concebida para identificar ligandos peptídicos que se ligam à superfície de IgG-Fc sem a limitação dos péptidos funcionarem *in vivo* foi realizada. A selecção foi conseguida por meio de uma combinação de apresentação polivalente e monovalente em fagos que foi recentemente usada para gerar péptidos que se ligam a uma variedade de hormonas celulares e receptores. N. C. Wrighton, et al. (1996), *Science* **273**:458, O. Livnah, et al. (1996), *Science* **273**:464. Uma única biblioteca peptídica constrangidas por dissulfureto foi construída, a qual consistia de 4×10^9 péptidos diferentes da forma Xaa_i-Cys-Xaa_j-Cys-Xaa_k onde Xaa é um aminoácido aleatório de um codão NNS, i+j+k = 18, e j = 4 até 10. Esta biblioteca foi expressa na superfície do bacteriófago M 13 como uma fusão N-terminal à proteína do gene VIII com um ligante curto consistindo dos resíduos glicina e serina. H. B. Lowman et al. (1998), *Biochemistry* **37**: 8870-8878. Mais particularmente, a construção da biblioteca continha um péptido sinal de secreção

STII, a biblioteca peptídica de vinte aminoácidos de comprimento, i.e., Xaa_i-Cys-Xaa_j-Cys-Xaa_k onde Xaa é um aminoácido aleatório de um codão NNS, i+j+k = 18, e j = 4 até 10, um ligante Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 1), e o gene VIII de M13 começando no primeiro resíduo da proteína madura.

Em princípio, poderiam ser seleccionados péptidos que se ligam potencialmente a qualquer região do IgG-Fc devido à natureza neutra desta biblioteca. Porém, após alguns ciclos de selecção, a biblioteca ficou dominada por um único péptido, Fc-I (Glu-Thr-Gln-Arg-Cys-Thr-Trp-His-Met-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Glu-Arg-Glu-His-Asn) (SEQ ID NO: 2). As selecções foram realizadas como descrito em H. B. Lowman, et al., *supra*, com as seguintes modificações: os poços de microtitulação foram revestidos com 5 µg/ml de IgG-Fc; usou-se o tampão Casein Blocker Buffer (Pierce) no lugar de BSA a 0,1% para melhor prevenção da ligação não específica; a eluição de fagos foi realizada com DTT 75 mM ou glicina 0,2 mM, pH 2,0, com resultados equivalentes. IgG-Fc foi obtido por clivagem com papaína da proteína imunoadesina CD4-IgG₁, Capon et al. (1989), *Nature*, **337**: 525. O material clivado foi purificado em proteína A-Sefarose seguido de Superdex-75 (Pharmacia) e depois quantificado por absorvância a 280 nm.

A repetição do teste de selecção deu Fc-I e também um péptido relacionado, Fc-II (Lys-Glu-Ala-Ser-Cys-Ser-Tyr-Trp-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Val-Ala-Gly-Val-Glu) (SEQ ID NO: 3). O péptido Fc-II partilhava o mesmo espaçamento da cisteína e a sequência interna Gly-Glu-Leu-Val-Trp (SEQ ID NO: 132) observada em Fc-I. Aparentemente, estes dois péptidos ligavam-se a IgG-Fc com uma afinidade suficientemente alta para serem seleccionados em relação a quaisquer outros péptidos de ligação a IgG-Fc presentes na combinação inicial. Ambos os péptidos foram sintetizados em fase sólida utilizando-se protocolos standard com 9-fluorenilmetoxicarbonilo e foram purificados por HPLC em fase reversa. As massas foram confirmadas por espectrometria de massa com electropulverização, e os péptidos purificados foram quantificados por absorvância UV a 284 nm.

Ensaios ELISA de competição foram realizados de uma maneira semelhante ao método descrito em H. B. Lowman, et al., *supra*. Resumidamente, o domínio Z da proteína A foi imobilizado em poços de microtitulação a uma concentração de 5 µg/ml, bloqueado, e lavado como descrito. Preparou-se uma matriz de misturas de IgG-Fc biotinilado a concentrações de desde 312 nM até 0,3 nM e péptido a concentrações de desde 215 µM até 0,8 nM. Estas misturas foram incubadas durante 1 h com domínio Z da proteína A imobilizado. As placas foram então lavadas e desenvolvidas como descrito usando-se conjugado de avidina/HRP. Curvas de inibição foram então computadas para cada concentração de biotina-IgG-Fc, e a seguir a curva de metade da inibição máxima, "IC₅₀", foi extrapolada para a concentração zero de biotina-IgG-Fc de modo a obter-se um K_i. Os péptidos Fc-I e Fc-II foram ambos encontrados a competir com a proteína A (domínio Z) (B. Nilsson et al. (1987), *Protein Eng.* 1:107) pela ligação a IgG-Fc com constantes de inibição (K_i) de cerca de 5 µM. Os resultados sugerem que estes péptidos se ligam a um local sobreposto em IgG-Fc que coincide com o local de ligação da proteína A.

A sequência de ADN do péptido Fc-II foi movida para um formato monovalente de apresentação em fagos por mutagénese por cassete para dar uma construção com a sequência sinal STII, o péptido Fc-II Lys-Glu-Ala-Ser-Cys-Ser-Tyr-Trp-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Val-Ala-Gly-Val-Glu (SEQ ID NO: 3), um ligante Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 4), e a proteína do gene III de M 13 começando no resíduo 253. A sequência de Fc-II foi amadurecida por afinidade por apresentação monovalente em fagos. Cinco blocos de resíduos foram mutados aleatoriamente em seis bibliotecas separadas para cobrir completamente as posições não cisteína na sequência peptídica e foram rastreados relativamente a IgG-Fc.

Um série de segunda geração de bibliotecas de apresentação monovalente em fagos foi construída com base na sequência de Fc-II Lys-Glu-Ala-Ser-Cys-Ser-Tyr-Trp-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Val-Ala-Gly-Val-Glu (SEQ ID NO: 3) na qual cinco resíduos sequenciais foram escolhidos ao acaso utilizando codões NNS em cada biblioteca começando nas posições 1, 4, 7, 10, 12, e 16, excluindo as duas cisteínas.

Cada biblioteca tinha uma diversidade de aproximadamente 1×10^8 . Estas bibliotecas foram rastreadas independentemente em seis ciclos quanto à ligação a IgG-Fc e depois sequenciadas. Os resíduos preferidos desta seleção foram então recombinados usando-se três bibliotecas adicionais que varreram a sequência peptídica inteira. As três bibliotecas adicionais foram construídas utilizando-se a degeneração do código genético para recombinar os aminoácidos preferidos de cada posição num péptido. As sequências de ADN para estas bibliotecas continham as seguintes misturas de bases (códigos IUPAC): DRG GWA GMA RRC TGC KCT TRS CAC MTG GGC GAG CTG GTC TGG TGC RVC RVM BKC GAS KDW (SEQ ID NO: 5), DRS VWG SVG RRC TGC KCC TRS YRS MTG GGC GAG CTG GTC TGG TGC RNC VVS NBS GWS KDM (SEQ ID NO: 6), e DNS NNS NNS VNS TGC BVG TDS HRS MDS GGC GAG STC KKG WRG TGC RNM NNS NNS NNS NNM (SEQ ID NO: 7). Estas bibliotecas foram também classificadas em seis ciclos relativamente a IgG-Fc e depois sequenciadas.

Depois do rastreio relativamente a IgG-Fc, os padrões consenso destas bibliotecas indicavam uma sequência central de 13 resíduos (Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr) altamente conservada (SEQ ID NO: 8). O péptido correspondente (Fc-III) foi sintetizado e determinou-se que inibia a ligação da proteína A (domínio Z) a Fc com uma IC₅₀ de 100 nM. Assim, embora Fc-III seja sete resíduos mais curto do que Fc-II, liga-se 50 vezes mais firmemente. Apesar do seu menor tamanho, a afinidade de ligação de Fc-III a Fc era só dez vezes mais fraca do que aquela dos domínios da proteína A e da proteína G, que são cada um cerca de quatro vezes maiores e ligam-se com KS a aproximadamente 10 nM. S. R. Fahnestock, et al. em Bacterial Immunoglobulin-Binding Proteins (Academic Press, Inc. 1990) Vol. 1, cap. 11. R. Karlsson, L. Jendeberg, B. Nilsson, J. Nilsson, P. Nygren (1995), *J. Immuno. Methods* **183**:43.

A Tabela 1 lista as sequências de aminoácidos e afinidades de ligação a IgG-Fc de ligandos peptídicos de IgG-Fc típicos que foram identificados pelos procedimentos descritos atrás.

Tabela I**Sequências e Afinidades dos Ligandos Peptídicos de IgG-Fc**

<u>Sequência</u>	<u>SEQ</u>	<u>ID NO</u>	<u>Afinidade de Ligação</u>
Péptidos *Todos os péptidos possuem uma amina N-terminal e uma amida C-terminal			
KEASC SYWL GELV WC VAG VE	SEQ	ID NO: 3	5000 nM (K_i)
ETQR CTWH MGEL VWC EREHN	SEQ	ID NO: 2	5000 nM (K_i)
DLADC SWHM GELV WCSR VEG	SEQ	ID NO: 15	50 nM (K_d)
WEAD CAWHL GELV WCTPM EF	SEQ	ID NO: 16	30 nM (IC_{50})
DCAWHL GELV WCT	SEQ	ID NO: 8	100 nM (IC_{50})
Clones Fágicos (Apresentação M13/gIII)			Todas as afinidades dos fagos são em EC_{50}
N/A = Não foram analisados individualmente. Como tinham sido seleccionados para ligação, EC_{50} deveria ser < 1 uM ou melhor.			
Todos os péptidos listados ligam-se a IgG-Fc.			
Bibliotecas Focadas			
KEASC SYWL GELV WCD TLTE	SEQ	ID NO: 17	N/A
KEASC SYWL GELV WC SPG VE	SEQ	ID NO: 18	734 nM
KEASC SYWL GELV WC SGS VEG	SEQ	ID NO: 19	N/A
KEASC SYWL GELV WC SAG VE	SEQ	ID NO: 20	N/A
ESEDC SYWL GELV WC VAG VE	SEQ	ID NO: 21	N/A
EKEDCSYWL GELV WC VAG VE	SEQ	ID NO: 22	N/A
EDPDCSYWL GELV WC VAG VE	SEQ	ID NO: 23	N/A
EEADC SYWL GELV WC VAG VE	SEQ	ID NO: 24	N/A
NADD CSYWL GELV WC VAG VE	SEQ	ID NO: 25	N/A
SETTCSYWL GELV WC VAG VE	SEQ	ID NO: 26	N/A
AWKTCQWL GELV WC VAG VE	SEQ	ID NO: 27	N/A
DLADC SYWL GELV WC SR VEG	SEQ	ID NO: 28	776 nM
KEADC AWHL GELV WC VAG VE	SEQ	ID NO: 29	138 nM
KEAECSYHL GELV WC VAG VE	SEQ	ID NO: 30	N/A
KEARCWYWH GELV WC SD PEE	SEQ	ID NO: 31	809 nM
KEASC SYHL GELV WC VAG VE	SEQ	ID NO: 32	416 nM
KEASC SWHL GELV WC VAG VE	SEQ	ID NO: 33	225 nM
KEASC SYWL GELV WC TEG VE	SEQ	ID NO: 34	818 nM
KEASC SYWL GELV WC DDG VE	SEQ	ID NO: 35	N/A

KEASC SYWL GELV WCSEGVE	SEQ ID NO: 36	N/A
KEASC SYWL GELV WCSPGVE	SEQ ID NO: 18	N/A
KEASC SYWL GEVWKCKSGVE	SEQ ID NO: 37	N/A
KEASC SYWL GELV WCDNGVE	SEQ ID NO: 38	N/A
KEASC SYWL GELV WCDTFDE	SEQ ID NO: 39	301 nM
KEASC SYWL GELV WCDGLDE	SEQ ID NO: 40	326 nM
KEASC SYWL GELV WCVGLDE	SEQ ID NO: 41	278 nM
KEASC SYWL GELV WCEDTLE	SEQ ID NO: 42	N/A
KEASC SYWL GELV WCEDTME	SEQ ID NO: 43	N/A
KEASC SYWL GELV WCEDMME	SEQ ID NO: 44	N/A
WVEDCSWHM GELV WCDGGEF	SEQ ID NO: 45	139 nM
KEASC SYWL GELV WCDWMNG	SEQ ID NO: 46	N/A
KEASC SYWL GELV WCDDTPV	SEQ ID NO: 47	N/A
KEASC SYWL GELV WCDDYGE	SEQ ID NO: 48	N/A
KEASC SYWL GELV WCSDLWE	SEQ ID NO: 49	N/A
WRGGCSWHM GELV WCEHDME	SEQ ID NO: 50	N/A
AVSKCSFHM GELV WCS DVMN	SEQ ID NO: 51	N/A
NQVSCSYSRGELV WCS KQSQ	SEQ ID NO: 52	N/A
GRMECAWHQ GELV WCTPTLE	SEQ ID NO: 53	N/A
GTMECSWHQ GELV WCTPTLA	SEQ ID NO: 54	N/A
EMRDCSWHL GELV WCAHMEG	SEQ ID NO: 55	N/A
GSEWCAYHL GELV WCETGSG	SEQ ID NO: 56	N/A
VAEPCAYHL GELV CEVLKG	SEQ ID NO: 57	N/A
KEAMCSYWL GELV WCESDMP	SEQ ID NO: 58	N/A

Clones desenhados

DLADC SWHL GELV WCSR VEG	SEQ ID NO: 59	9nM
DLADC SWHL GELV WC VGLDE	SEQ ID NO: 60	28 nM
WVEDCSWHL GELV WC VGLDF	SEQ ID NO: 61	31 nM

Optimização Secundária

KVADCAWHM GELV WC TVEVG	SEQ ID NO: 62	23 nM
GEEDCSYHL GELV MCT ELDD	SEQ ID NO: 63	69 nM
GVADCAWHL GELV WCT ER ED	SEQ ID NO: 64	N/A
GEEDCAWHL GELV WC SGGDF	SEQ ID NO: 65	100 nM
WEADCAWHL GELV WCT KVEE	SEQ ID NO: 66	7nM
GEADCSYHL GELV WC ND FEE	SEQ ID NO: 67	156 nM
WVD CAYHL GELV WC ST FEE	SEQ ID NO: 68	9nM
WVEDCAWHM GELV WC TKV DE	SEQ ID NO: 69	70 nM
READCAWHL GELV WC SER DL	SEQ ID NO: 70	47 nM

EEASCAYHLGELVWCDAFDV	SEQ ID NO: 71	77 nM
RVASCAWHLGELVWCDGLDG	SEQ ID NO: 72	N/A
GEADCAWHLGELVWCTKVEE	SEQ ID NO: 73	38 nM
GEASCAYHLGELVWCDEGEG	SEQ ID NO: 74	386 nM
RVEDCAYHLGELVWCTEGDE	SEQ ID NO: 75	63 nM
EEPDCSWHLGELVMCTPMEV	SEQ ID NO: 76	14 nM
KEADCAWHMGELVWCSEMEG	SEQ ID NO: 77	66 nM
EQADCAWHLGELVWCTPMVF	SEQ ID NO: 78	8 nM
EEPDCSWHLGELVWCTPIEV	SEQ ID NO: 79	15 nM
GEPDCAWHLGELVWCTPMVF	SEQ ID NO: 80	7 nM
GEQDCSYHMGELVWCTTVDG	SEQ ID NO: 81	210 nM
GVRNCAYHLGELVWCTPMEF	SEQ ID NO: 82	10 nM
RVADCAWHMGELVWCSELEV	SEQ ID NO: 83	44 nM
GEADCAWHLGELVWCTPMDL	SEQ ID NO: 84	N/A
GEQDCSWHLGELVWCTPMEV	SEQ ID NO: 85	N/A
GMRDCSYHLGELVWCSDMEL	SEQ ID NO: 86	N/A
EVADCSWHLGELVWCTEGEF	SEQ ID NO: 87	54 nM
GEEDCAWHLGELVWCTDVED	SEQ ID NO: 88	52 nM
EVEDCAYHLGELVWCSLEG	SEQ ID NO: 89	82 nM
WEEDCAWHLGELVWCAEFDE	SEQ ID NO: 90	44 nM
KEASCAWHLGELVWCSEVEE	SEQ ID NO: 91	130 nM

Varrimento de Fagos com ALA

AEADCAWHLGELVWCTKVEE	SEQ ID NO: 92	20 nM
WAADCAWHLGELVWCTKVEE	SEQ ID NO: 93	34 nM
WEPDCAWHLGELVWCTKVEE	SEQ ID NO: 94	36 nM
WEAACAWHLGELVWCTKVEE	SEQ ID NO: 95	55 nM
WEAACSWHLGELVWCTKVEE	SEQ ID NO: 96	10 nM
WEADCAAHLGELVWCTKVEE	SEQ ID NO: 97	798 nM
WEADCAWALGELVWCTKVEE	SEQ ID NO: 98	139 nM
WEADCAWHAGELVWCTKVEE	SEQ ID NO: 99	56 nM
WEADCAWHLAELVWCTKVEE	SEQ ID NO: 100	12 nM
WEADCAWHLGALVWCTKVEE	SEQ ID NO: 101	11 nM
WEADCAWHLGEAVWCTKVEE	SEQ ID NO: 102	1890 nM
WEADCAWHLGELAWCTKVEE	SEQ ID NO: 103	4670 nM
WEADCAWHLGELVACTKVEE	SEQ ID NO: 104	3380 nM
WEADCAWHLGELVWCAKVEE	SEQ ID NO: 105	101 nM
WEADCAWHLGELVWCTAVEE	SEQ ID NO: 106	10 nM
WEADCAWHLGELVWCTKAEE	SEQ ID NO: 107	8 nM
WEADCAWHLGELVWCTKVAE	SEQ ID NO: 108	4nM

EXEMPLO 2 - Comparativo**Construção de Fab Anti-VEGF Etiquetados com Ligandos Peptídicos de IgG-Fc**

Ligandos peptídicos de IgG-Fc podem ser combinados com um composto bioactivo para formar uma molécula híbrida compreendendo um domínio peptídico de ligação e um domínio activo. Neste Exemplo, os ligandos peptídicos de IgG-Fc são combinados com um fragmento Fab que reconhece o VEGF humano. Um anticorpo neutralizante do VEGF humano foi identificado previamente em hibridoma murino, humanizado, e optimizado por apresentação em fagos. Refira-se a Muller *et al.* (1998), *Structure* **6**:1153-1167; Chen *et al.* (1999), *J. Molécula. Biol.* **293**:865-881; e a Publicação Internacional de Patente No. WO 98/45331. As duas formas de Fab humanizado deste anticorpo foram escolhidas para testar se a afinidade de ligação a um IgG irrelevante poderia ser adicionada aos Fab sem destruir a sua afinidade de ligação a抗ígenios. Usou-se um ligando peptídico de IgG-Fc, DCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO: 8), identificado e optimizado pelo método de apresentação de péptidos em fagos descrito no Exemplo 1, juntamente com um ligante peptídico curto (Gly-Gly-Gly), para dar flexibilidade entre o péptido e o Fab. A cadeia leve do Fab foi escolhida para as fusões porque no caso deste anticorpo sabe-se que a cadeia leve tem uma contribuição muito pequena para a ligação ao抗ígenio (Muller *et al.*, 1998, *supra*). Em princípio, o domínio peptídico de ligação poderia funcionar para introduzir a ligação em IgG tanto no terminal N como no terminal C, ou para ser inserida na sequência original do Fab. Aqui descrevem-se fusões N-terminais DCAWHLGELVWCTGGG-(cadeia leve) (SEQ ID NO: 109) assim como fusões C-terminais (cadeia leve)-GGGWEADCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO: 110).

Um oligodesoxinucleótido, HL-569, foi desenhado e sintetizado para mutação de plasmídeos anti-VEGF de forma a criar fusões do ligando peptídico de IgG-Fc no terminal N da cadeia leve do anticorpo. A sequência de HL-569 (com a sequência peptídica adicionada realçada) é: 5'-ACA AAC GCG TAC GCT GAC TGC GCT TGG CAC CTG GGC GAG CTG GTC TGG TGC ACC GGA GGA GAT ATC CAG TTG ACC-3' (SEQ ID NO: 111). O codão GAC segue a sequência sinal de secreção STII no terminal N da

cadeia leve, e o codão GAT corresponde ao primeiro resíduo da cadeia leve madura (do tipo selvagem).

Outro oligodesoxinucleótido, HL-570, foi desenhado e sintetizado para construção de fusões de ligandos peptídicos ao terminal C da cadeia leve do anticorpo. A sequência de HL-570 (com a sequência peptídica adicionada realçada) é: 5'-AAC AGG GGA GAG TGT GGA GGA GGA TGG GAA GCA GAC TGC GCT TGG CAC CTG GGC GAG CTG GTC TGG TGC ACC TAA GCT GAT CCT CTA C-3' (SEQ ID NO: 112). O codão TGT precedendo o codão GGA realçado corresponde ao resíduo Cys-214 da cadeia leve, e o "codão de terminação" TAA assinala o fim da sequência peptídica traduzida. Os fagemídeos pY0192 e pY0317 (descritos em Muller *et al.*, 1998, *supra*; Chen *et al.*, 1999; e a Publicação Internacional de Patente No. WO 98/45331), que codificam as formas de baixa afinidade e alta afinidade de um anticorpo anti-VEGF humanizado, respectivamente, foram mutados com cada um dos oligos IgG-peptídeo para originar as construções pY0192-569, pY0192-570, pY0317-569, e pY0317-570.

EXEMPLO 3 – comparativo

Análise ELISA para Fagos das Moléculas Híbridas que Compreendem Fab Anti-VEGF Etiquetados com Ligando Peptídico.

Uma análise ELISA de ligação competitiva para fagos (Lowman (1998), *Methods Molécula. Biol.* **87**:249-264) foi conduzida para comparação das afinidades de ligação aparentes das variantes de anticorpo anti-VEGF etiquetadas com um ligando peptídico de IgG-Fc no seu terminal N ou terminal C e apresentadas monovalentemente em partículas de bacteriófagos M13 como fusões ao domínio C-terminal da proteína do gene III.

Um IgG humanizado irrelevante, 4D5-IgG, também conhecido como Herceptin®, foi revestido em placas imunossorventes Nunc Maxisorp a 2 microgramas/mL em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Partículas de fagemídeo de culturas da noite anterior de XL-1 Blue *E. coli* (Stratagene) foram diluídas em PBS contendo albumina do soro bovino a 0,5% e Tween-20 a 0,05%. As partículas de fagemídeo foram misturadas com diluições em série de Herceptin® em solução, equilibradas durante 20 min numa placa não absorvente (Nunc F96), e a

seguir foram transferidas para a placa Maxisorp revestida com Herceptin® para detecção de fagos não ligados. Após 20 minutos, a placa foi lavada com PBS/Tween e desenvolvida com um conjugado anti-fagos de anticorpo monoclonal-HRP (Pharmacia) e substrato de OPD (Sigma). Curvas de substituição (Fig. 1) mostram valores de IC₅₀ de cerca de 100–300 nM para cada uma das construções, pY0192-569, pY0192-570, pY0317-569, e pY0317-570.

EXEMPLO 4 – Comparativo

Análise BIACore™ da Ligação de IgG a Fab Anti-VEGF Etiquetado com um Ligando Peptídico de IgG-Fc

Utilizou-se um instrumento de ressonância plasmónica de superfície (BIACore, Inc., Piscataway, N.J.) para medir a ligação de um IgG irrelevante, 4D5-IgG, também conhecido como Herceptin®, a Fab ligado previamente a um chip biosensor imobilizado de VEGF.

Variantes de Fab codificadas por pY0317 e pY0317-570 (Fab de controlo anti-VEGF de alta afinidade humanizado, e Fab anti-VEGF de alta afinidade humanizado etiquetado com um domínio peptídico de ligação de IgG-Fc, respectivamente, refira-se ao Exemplo 2, *supra*, e a WO 98/45331) foram expressas em *E. coli* e purificadas por cromatografia de afinidade para a proteína G (Pharmacia). VEGF recombinante humano foi imobilizado em chips biosensores BIACore™ CM-5 (BIACore, Inc.) como descrito (Muller *et al.*, 1998, *supra*). Após a imobilização do VEGF, o chip foi bloqueado com etanolamina, e o Fab Y0317-570 etiquetado com o ligando peptídico, ou o controlo Y0317, foram injectados num tampão de PBS contendo Tween-20 a 0,05% e azida de sódio a 0,01%. A seguir à injecção de Fab, injectou-se Herceptin®, e a velocidade de dissociação (*off-rate*, k_{off}) foi monitorizada.

Os resultados (Fig. 2) mostram que a Herceptin® se ligou ao Fab etiquetado mas não ao Fab de controlo Y0317. Empregando um modelo de ligação de Langmuir 1:1 (Karlsson *et al.* (1991), *J. Immunol. Methods* **145**:229–240 (1991)), calculou-se um k_{off} de 2,8 × 10⁻³ s⁻¹, e uma correspondente meia-vida de dissociação (t_{1/2}) de 8,5 min para Y0317-570. Limitações de material

impediram determinações da velocidade de ligação (*on-rate*) fiáveis. Contudo, o observado k_{off} sugere uma afinidade de ligação em equilíbrio, K_d , de 30 nM a 300 nM (assumindo um k_{on} de 10^4 - 10^5 M $^{-1}$ s $^{-1}$), consistente com os resultados da ligação de péptidos e ELISA para fagos (atrás). Significativamente, os resultados BIACore™ (Fig. 2) também mostram que o Fab etiquetado pode ligar-se simultaneamente ao抗ígeno (VEGF imobilizado) e a um IgG irrelevante.

EXEMPLO 5 - Comparativo

Fab Anti-VEGF Etiquetados com Ligando Peptídico de IgG-Fc Possuem Meias-Vidas de Eliminação Prolongadas

As velocidades de dissipação no sangue e distribuição em tecidos do Fab anti-VEGF etiquetado com ligando peptídico de IgG-Fc (Fab Y0317-570) são comparadas com as do Fab de controlo anti-VEGF não etiquetado Y0317. As determinações da meia-vida de eliminação e do volume de distribuição foram feitas em coelhos brancos da Nova Zelândia de 2,8 a 3 kg de peso. A quantidade do objecto de teste presente nas amostras de plasma é determinada por qualquer método conhecido na arte, tal como, e.g., ELISA, ou RIA.

A análise farmacocinética é realizada utilizando as concentrações plasmáticas do objecto de teste. Valores plasmáticos da média do grupo para cada objecto de teste adaptam-se a um perfil multi-exponencial ao serem representados graficamente relativamente ao tempo pós-dosagem. Os valores são ajustados por um modelo *standard* de dois compartimentos com uma entrada do *bolus* e constantes cinéticas de primeira ordem para as fases de distribuição e eliminação. A equação geral para o melhor ajuste dos valores referentes a administração i.v. é: $c(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$, onde $c(t)$ é a concentração no plasma no tempo t , A e B são intercepções no eixo dos Y, e α e β são as constantes cinéticas de primeira ordem aparentes para as fases de distribuição e eliminação, respectivamente. A fase α é a fase inicial de dissipação e reflecte a distribuição da proteína por todo o fluido extracelular do animal, enquanto a segunda porção ou porção da fase β da curva de decaimento representa a verdadeira dissipação no plasma. Métodos para interpolar estas equações

são bem conhecidos na arte. Por exemplo, $A = D/V(\alpha-k_{21})/(\alpha-\beta)$, $B = D/V (\beta-k_{21})/(\alpha-\beta)$, e α e β (para $\alpha > \beta$) são raízes da equação quadrática: $r^2 + (k_{12} + k_{21} + k_{10})r + k_{21}k_{10} = 0$ utilizando os parâmetros estimados de V = volume de distribuição, k_{10} = velocidade de eliminação, k_{12} = velocidade de transferência do compartimento 1 para o compartimento 2 e k_{21} = velocidade de transferência do compartimento 2 para o compartimento 1, e D = dose administrada.

Na manhã do estudo seis coelhos brancos da Nova Zelândia (peso do corpo de 2,8-3,0 kg) foram colocados em dispositivos restringidores de movimentos. Cateres foram colocados na artéria da orelha para recolha de amostras de sangue e numa veia contralateral da orelha para dosagem.

Os coelhos foram divididos em dois grupos ($n = 3/\text{grupo}$). Os animais do grupo 1 receberam bolus i.v. de Fab de controlo anti-VEGF Y0317. Os coelhos do Grupo 2 receberam Fab Y0317-570. Um resumo da atribuição por grupos e informação sobre dosagens está apresentado na Tabela a seguir.

Grupo	Peso (kg)	Dose do Grupo	Dose Nominal (mg/kg)	Concent.		Vol. (mL)
				Dose Dose (mg/mL)	Dose Dose (mL)	
1	2,9	Controlo Fab Y0317	1	3	0,97	
1	3,0	Controlo Fab Y0317	1	3	1,00	
1	2,9	Controlo Fab Y0317	1	3	0,97	
2	2,8	Fab Y0317-5701		3	0,93	
2	3,0	Fab Y0317-5701		3	1,00	
2	2,9	Fab Y0317-5701		3	0,97	

Recolheu-se uma série de amostras de sangue (0,5 mL) justamente antes da dosagem e a 10, 20, 40 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24 e 48 horas após administração da dose. O sangue foi recolhido em tubos separadores de soro, deixado a coagular (~30 min) à temperatura ambiente, e centrifugado. O soro foi colhido e armazenado imediatamente a -70°C até ser analisado.

Placas de ELISA foram revestidas com 0,5 microgramas/ml de VEGF em tampão de carbonato 50 mM, pH 9,6, durante a noite a 4°C, e bloqueadas com albumina do soro bovino a 0,5%, Proclin 300 a 10 ppm (Supelco, Bellefonte, PA) em PBS (Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, KCl 2,7 mM e NaCl 137 mM, pH 7,2) à temperatura ambiente durante 1 hora. Padrões (0,41-100 ng/ml) e amostras diluídas duas vezes em série (diluição mínima 1:100) em PBS contendo albumina de soro bovino a 0,5%, polisorbato 20 a 0,05%, CHAPS a 0,25%, globulinas gama de bovino a 0,2% (Sigma, St. Louis, MO) e EDTA 5 mM foram incubados em placas durante 2 horas. O anticorpo ligado foi detectado com IgG F(ab')2 anti-humano de cabra marcado com peroxidase (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), seguido de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (Kirkegaard & Perry Laboratories) como substrato. As placas foram lavadas entre as etapas. A absorbância foi lida a 450 nm num leitor empilhador Titerek (ICN, Costa Mesa, CA). A curva padrão foi interpolada por meio de uma regressão de quatro parâmetros de um programa de interpolação de curvas (Kaleidagraph, Synergy Software, Reading, PA). Os resultados que caíam dentro da gama da curva padrão foram usados para se calcular as concentrações de Fab nas amostras.

Análise de resultados: Gráficos de perfis de concentração versus tempo foram obtidos através de KaleidaGraph (KaleidaGraph™ V. 3.09 Copyright 1986-1997. Synergy Software. Reading, PA.). Os valores mencionados como não sendo relatáveis (LTR) não foram incluídos na análise PK e não estão representados graficamente. Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados por análise compartmental usando o software WinNonlin (WinNonlin® Professional V. 3.1 WinNonlin™ Copyright 1998-1999. Pharsight Corporation. Mountain View, CA.). Os parâmetros farmacocinéticos foram computados como descrito em Ritschel WA and Kearns GL. Handbook of basic pharmacokinetics including clinical applications, 5ª edição. American Pharmaceutical Assoc., Washington, DC. Copyright 1999.

Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 3. Utilizou-se um modelo de dois compartimentos com uma entrada de bolus e uma saída de primeira ordem (WinNonlin) para ajustar os valores de concentração observados no soro versus

tempo. Os parâmetros farmacocinéticos calculados estão apresentados na tabela a seguir.

Sumário dos Parâmetros Farmacocinéticos (bolus i.v.; 1 mg/kg)

Parâmetro	Grupo 1	Grupo 2
	Controlo Fab Y0317	Fab Y0317-570
AUC (h*μg/mL)	13,6 ± 1,2	215 ± 56
Cmax (μg/mL)	15,6 ± 0,6	13 ± 0,7
CL (mL/h/kg)	74,2 ± 6,7	4,8 ± 1,1
meia-vida K10 (h)	0,6 ± 0,02	11,3 ± 3,6
meia-vida alfa (h)	0,39 ± 0,03	1,15 ± 0,31
meia-vida beta (h)	1,93 ± 0,27	37,6 ± 19
VI (mL/kg)	64,1 ± 2,37	75,2 ± 4,23
Vss (mL/kg)	112 ± 7,7	225 ± 54

O volume inicial de distribuição (VI) para ambos os agentes era aproximadamente igual ao volume de soro. O volume de distribuição em estado estacionário estimado (Vss) para Fab Y0317-570 (225 mL/kg) era aproximadamente 2 vezes superior ao estimado para o Fab de controlo (112 mL/kg) sugerindo uma ligação significativa ao IgG endógeno. O Fab de controlo Y0317 foi eliminado cerca de 15 vezes mais rapidamente do soro (dissipação = 74 mL/h/kg) do que o Fab Y0317-570 (4,8 mL/h/d). A exposição total (AUC) do Fab Y0317-570 era ~16 vezes superior à do Fab Y0317. O Fab Y0317 não era detectável no soro 24 h após dosagem mas as concentrações de Fab Y0317-570 no soro eram ainda superiores a 1 μg/mL 48 h após dosagem. Tanto a meia-vida (alfa) de distribuição (1,15 h) como a meia-vida (beta) de eliminação (37,6 h) eram significativamente maiores do que as do Fab de controlo.

Estes resultados sugerem que a adição de um aminoácido 13 que se liga a IgG endógeno a Fab Y0317 pode significativamente abrandar a dissipação de Fab, aumentar a meia-vida e promover a exposição total.

EXEMPLO 6**Ligandos Peptídicos da Albumina do Soro**

Bibliotecas de Fagos e Seleção de Condições - Bibliotecas peptídicas apresentadas em fagos foram seleccionadas relativamente a albumina de coelho, rato e humana. As bibliotecas de fagos expressando sequências peptídicas aleatórias fundidas ao gene 8 (Lowman *et al.*, Biochem. 37, 8870 (1998)) foram combinadas em 5 grupos: a Combinação A continha CX₂GPX₄C (SEQ ID NO: 133), X₄CX₂GPX₄CX₄ (SEQ ID NO: 134) e X_iCX_jCX_k SEQ ID NO: 135 onde j = 8-10; a Combinação B continha X₂₀ e X_iCX_jCX_k onde j = 4-7; a Combinação C continha X₈ e X₂CX_jCX₂ onde j = 4-6; a Combinação D continha X₂CX_jCX₂ onde j = 7-10; a Combinação E continha CX₆CX₆CCX₃CX₆C (SEQ ID NO: 135), CCX₃CX₆C (SEQ ID NO: 136), CCX₅CX₄CX₄CC (SEQ ID NO: 137), CX₃CX₇CX₃CX₆ (SEQ ID NO: 138) onde X representa qualquer um dos 20 L-aminoácidos de ocorrência natural. Em cada caso i + j + k = 18 e |i - k| < 2. Cada uma das 10 bibliotecas tinha mais de 108 clones.

As combinações de bibliotecas de fagos foram suspensas em tampão de ligação (PBS, ovalbumina a 1%, Tween 20 a 0,005%) e classificadas relativamente a albumina de coelho, rato ou humana imobilizada directamente em placas Maxisorp (10 µg/ml em PBS, durante a noite a 4°C; as placas foram bloqueadas com Blocker Casein (Pierce Chemical, Rockford, IL)). Após 2 horas, os fagos não ligados foram removidos por repetida lavagem (PBS, Tween 20 a 0,05%) e os fagos ligados foram eluídos com KCl 500 mM, HCl 10 mM, pH 2. Os fagos eluídos foram propagados em células XG1-Blue com o fago ajudante VCSM13 (Stratagene, La Jolla, CA). O enriquecimento foi monitorizado por titulação do número de fagos que se ligava a um poço revestido de albumina comparado com um poço revestido de ovalbumina ou caseína.

ELISA para Fagos - Clones fágicos (~10¹¹ fagos) foram adicionados a placas revestidas com albumina de rato, coelho ou humana. A placa de microtitulação foi lavada com tampão de lavagem e os fagos ligados foram detectados com conjugado HRP/Anti-M13. A quantidade de HRP ligado foi medida utilizando o substrato ABTS/H₂O₂ e monitorizando a variação a 405 nm.

As sequências peptídicas apresentadas pelos clones fágicos seleccionados para ligação a albumina de coelho, rato ou humana apresentam-se na Figura 4. Também se indica a capacidade dos clones fágicos individuais para se ligarem a 3 espécies de albumina imobilizada. Isto foi testado por meio de ELISA para fagos. Note-se que o clone RB, seleccionado pela sua ligação a albumina de rato, é também capaz de se ligar a albumina humana ou de rato.

Maturação de Sequências em Fagos Monovalentes - Bibliotecas ligeiramente aleatorizadas foram desenhadas com oligonucleótidos codificantes para cada um dos clones seleccionados na Figura 4, mas sintetizadas com uma mistura 70-10-10-10 de bases como descrito (Derinis et al., Nature 404, 465 (2000)). Embora a potencial diversidade destas bibliotecas seja a mesma que as bibliotecas *naïve* iniciais, cada biblioteca 'ligeiramente aleatorizada' ("soft randomized") mantém um desvio pela sequência seleccionada na Figura 4. Cada biblioteca foi seleccionada novamente para ligação a albumina de rato, coelho ou humana independentemente da sua origem. Por exemplo, a biblioteca resultante da aleatorização ligeira do clone RB foi seleccionada relativamente a albumina de rato, coelho ou humana mesmo que tivesse sido originalmente identificada para ligação a albumina de rato. As sequências identificadas após aleatorização ligeira estão apresentadas na Figura 5 juntamente com a especificidade para as suas espécies como determinado por ELISA para fagos. A maior parte dos clones parecem ser específicos para as espécies de albumina para as quais foram seleccionados, contudo, os clones da biblioteca ligeiramente aleatorizada de RB ligam-se a todas as três espécies.

Os clones fágicos foram também testados quanto à sua ligação a albumina de rhesus, macaco e bovino. Determinou-se que os clones oriundos da biblioteca ligeiramente aleatorizada de RB também se ligavam a cada uma destas espécies de albumina e que, com base na sua falta de ligação a ovalbumina e caseína, eram específicos para albumina (Figura 6). Os clones que se ligam a múltiplas espécies de albumina (ligandos multi-espécies) estão listados na Figura 7.

Aleatorização intensa ("hard randomization") - Sequências de aleatorização ligeira ("soft randomization") da sequência de RB foram amadurecidas adicionalmente utilizando-se uma estratégia de aleatorização intensa. Desenhou-se uma biblioteca nova que mantinha resíduos altamente seleccionados (realçado) constantes X₅D_XC_LP_XW_GC_LW_X₄ (SEQ ID NO: 366), ao mesmo tempo que as posições remanescentes eram aleatorizadas completamente. Construiu-se também uma segunda biblioteca com um resíduo a menos em ambos os terminais N e C. Sequências destas bibliotecas seleccionadas relativamente a albumina de rato, coelho e humana estão apresentadas nas Figuras 8A, 8B, e 8C respectivamente.

Síntese Peptídica - Sintetizaram-se péptidos por síntese em fase sólida manual ou automatizada (Milligen 9050) baseada em Fmoc numa escala de 0,25 mmol utilizando-se uma resina PEG-poliestireno (Bodanszky M., (1984) *Principles of Peptide Synthesis*, Springer, Berlin). Os grupos protectores das cadeias laterais foram removidos e os péptidos foram clivados da resina com ácido trifluoroacético a 95% (TFA) e triisopropilsilano a 5%. Uma solução saturada de iodo em ácido acético foi adicionada para oxidação das ligações dissulfureto. Os péptidos foram purificados por HPLC em fase reversa com um gradiente de água/acetonitrilo contendo TFA a 0,1%. A pureza dos péptidos era >95% como determinado por HPLC analítica e a sua identidade foi verificada por espectrometria de massa.

A lisina do terminal carboxi do péptido SA08 foi derivada com NHS-LC-biotina (Pierce Chemical, Rockford, IL) e purificada por HPLC como atrás originando SA08b (Ac-QGLIGDIDLPRWGCLWGDSVK_b (SEQ ID NO: 124)-n onde K_b se refere a lisina-biotina).

Ensaio de Ligação de SA08b - Albumina de coelho, rato ou ratinho foi imobilizada directamente em placas Maxisorp a 10 µg/ml em PBS, durante a noite a 4°C. As placas foram bloqueadas com Blocker Casein (Pierce Chemical, Rockford, IL) durante 1 h, a 25°C. Amostras diluídas em série foram suspensas em tampão de ligação (atrás) e adicionadas a uma placa seguido da adição de SA08b 10 nM durante 1 h, a 25°C. A placa de microtitulação foi lavada com PBS, Tween 20 a 0,05% e

o SA08b ligado a albumina foi detectado com Estreptavidina/HRP. A quantidade de HRP ligado foi medida usando substrato de ABTS/H₂O₂ e monitorizando a variação a 405 nm.

Sintetizaram-se péptidos que correspondiam a sequências identificadas de fagos e a sua afinidade por albumina de rato, coelho ou ratinho foi medida por uma análise de ligação a SA08b (Figuras 9 and 10).

Construção, Expressão e Purificação de Fusões de Fab de Ligação a Albumina - De forma a testar se a associação com albumina poderia aumentar a meia-vida de proteínas e péptidos *in vivo*, a sequência de SA06 foi fundida a um fragmento Fab (D3H44) dirigido ao factor tecidual de ligação (TF). A sequência de SA06 foi adicionada ao terminal carboxi da cadeia leve (D3H44-L) ou da cadeia pesada (D3H44-Ls) do Fab. Além disso, como precaução contra problemas de enrolamento, fizeram-se construções idênticas mas com o dissulfureto da intra-cadeia substituído por alaninas (D3H44-Ls e D3H44-Hs, respectivamente) como representado na Figura 11.

As fusões foram expressas sob controlo do promotor de fosfatase alcalina e segregadas de *E. coli* através de um sinal de secreção stII. As fusões de Fab foram recuperadas do teperiplasma por suspensão das células em EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8, durante 1 h a 4°C. Detritos de células foram removidos por centrifugação e o Fab anti-TF foi purificado selectivamente numa coluna de afinidade para TF Hi-Trap (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). D3H44-L ou D3H44-Ls adequadamente enroladas foram purificadas adicionalmente numa coluna de afinidade para albumina de coelho (albumina de coelho acoplada a Sepharose 4B activada por CNBr, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Ambas as colunas foram lavadas com PBS e eluídas com HCl 50 mM. As fracções eluídas foram neutralizadas com Tris 1 M, pH 8. Mais endotoxina foi removida a seguir à extracção com Triton X114 (Aida and Pabst, J. Immunol. Methods 132, 191 (1990)).

As fusões purificadas de D3H44 retinham a sua capacidade para se ligar a TF como avaliado por uma análise de activação de FX (Figura 12), e uma análise do tempo da protrombina que

mede o prolongamento da coagulação dependente do factor tecidual (Figura 13) (para os métodos refira-se a Dennis et al., Nature 404, 465 (2000)). Ao contrário de D3H44 sem a sequência de ligação a albumina (WT), tanto D3H44-L como D3H44-Ls são capazes de se ligar a albumina como avaliado na análise de ligação a SA08b (Figura 14). Além disso, ambas as fusões de ligação a albumina de D3H44 são capazes de se ligarem simultaneamente a TF e a albumina como avaliado por uma análise de ligação biotina-TF (Figura 15). Nesta análise, a ligação das fusões de D3H44 a albumina imobilizada é detectada com TF biotinilado. D3H44 (WT) do tipo selvagem não é capaz de se ligar a albumina e assim não gera um sinal após adição de TF biotinilado.

Farmacocinética das fusões de ligação a albumina de D3H44 - Variantes de D3H44 foram dadas a coelhos na forma de um bolus de 0,5 mg/kg. Cada grupo consistia de 3 coelhos (5 no grupo F(ab')²). Amostras de soro tiradas nas alturas indicadas foram diluídas em série e a concentração de D3H44 foi determinada por ELISA de ligação a TF.

A análise farmacocinética foi realizada através do teste de concentrações plasmáticas do objecto. Valores plasmáticos da média do grupo para cada objecto de teste adaptam-se a um perfil multi-exponential quando são representados graficamente relativamente ao tempo pós-dosagem. Os valores são ajustados por um modelo *standard* de dois compartimentos com uma entrada de bolus e constantes cinéticas de primeira ordem para as fases de distribuição e eliminação. A equação geral para o melhor ajuste dos valores da administração i.v. é: $c(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$, onde $c(t)$ é a concentração plasmática na altura t , A e B são as intersecções no eixo Y, e α e β são constantes cinéticas aparentes de primeira ordem para as fases de distribuição e eliminação, respectivamente. A fase α é a fase inicial de dissipação e reflecte a distribuição da proteína por todo o fluido extracelular do animal, enquanto a segunda porção ou porção da fase β da curva de decaimento representa a verdadeira dissipação no plasma. Métodos de interpolação destas equações são bem conhecidos na arte. Por exemplo, $A = D/V(\alpha-k21)/(\alpha-\beta)$, $B = D/V (\beta-k21)/(\alpha-\beta)$, e α e β (para $\alpha > \beta$) são raízes da equação quadrática: $r^2 + (k12 + k21 + k10)r + k21k10 = 0$ usando os parâmetros estimados de V = volume de

distribuição, k_{10} = velocidade de eliminação, k_{12} = velocidade de transferência do compartimento 1 para o compartimento 2 e k_{21} = velocidade de transferência do compartimento 2 para o compartimento 1, e D = dose administrada.

Análise dos resultados: Gráficos de perfis de concentração versus tempo foram feitos utilizando KaleidaGraph (KaleidaGraph™ V. 3.09 Copyright 1986-1997. Software Synergy. Reading, PA.). Os valores descritos como não sendo relatáveis (LTR) não foram incluídos na análise PK e não estão representados graficamente. Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados por análise compartmental usando software WinNonlin (WinNonlin® Professional v. 3.1 WinNonlin™ Copyright 1998-1999. Pharsight Corporation. Mountain View, CA.). Os parâmetros farmacocinéticos foram computados como descrito em Ritschel WA and Kearns GL. Handbook of basic pharmacokinetics including clinical applications, 5th edition. American Pharmaceutical Assoc., Washington, DC. Copyright 1999.

A fusão do péptido de ligação a albumina com D3H44 resulta numa proteína tendo parâmetros farmacocinéticos melhorados (Figura 16 e 17). D3H44-L tem um aumento de 70 vezes na meia-vida ($K_{10}-HL$) relativamente ao Fab do tipo selvagem e uma meia-vida comparável aos Fab de D3H44 derivados com polietilenoglicol 20K ou 40K (PEG).

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Ligando peptídico que compreende uma sequência de aminoácidos Asp-Xaa-Cys-Leu-Pro-Xaa-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp (SEQ ID NO:116) que se liga a albumina do soro, onde Xaa é qualquer aminoácido.

2. Ligando peptídico de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de aminoácidos é Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp (SEQ ID NO: 120).

3. Ligando peptídico de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de aminoácidos é Met-Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp (SEQ ID NO: 121).

4. Ligando peptídico de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de aminoácidos é Gln-Arg-Leu-Met-Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp-Asp-Phe (SEQ ID NO: 122).

5. Ligando peptídico de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de aminoácidos é Gln-Gly-Leu-Ile-Gly-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Gly-Asp-Ser-Val (SEQ ID NO: 123).

6. Ligando peptídico de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de aminoácidos é Gln-Gly-Leu-Ile-Gly-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Gly-Asp-Ser-Val-Lys (SEQ ID NO: 124).

7. Ligando peptídico de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de aminoácidos é Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp-Asp (SEQ ID NO: 125).

8. Ligando peptídico de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de aminoácidos é Arg-Leu-Met-Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp-Asp (SEQ ID NO: 126).

9. Ligando peptídico de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de aminoácidos é Met-Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp-Asp (SEQ ID NO: 127).

10. Ligando peptídico de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de aminoácidos é qualquer sequência seleccionada do grupo que consiste de:

SEQ ID No:	SEQ (X é um aminoácido)
207	NRQMEDI CLPQWGCLWGDDF
208	QRHPEDICLPRWGCLWGDDD
209	DFDLCLPDWGCLWDD
210	DICLERWGCLW
211	DICLPAWGCLW
212	DICL PDWGCLW
213	DICLPEWGCLW
214	DICLPVGCLW
215	DLCLPEWGCLW
216	DLCLPKWGCLW
217	DLCLPVWGCLW
223	EEDLCLPVWGCLWGA
224	EEDVCLPVWGCLWEG
225	EFDLCLPTWGCLWED
226	ERQMEDFCLPQWGCLWGDGV
227	ERQMVD FCLPKWGCLWGDGF
228	EWDVCFPAWGCLWDQ
229	EWDVCLPHWGCLWDG
230	FEDFCLPNWGCLWGS
231	FEDLCVVWRWGCLWGD
232	GRQVVDFCLPKWGCLWEEGL
233	KMGRVDFCLPKWGCLWGDEL
234	KSRMGDFCLPEWGCLWGDEL
235	LRIFEDICLPKWGCLWGE GF
237	MDDLCLPNWGCLWGD
238	MF DLCLPKWGCLWGN
242	QGDFWDICLPRWGCLS GEGY

SEQ ID No:	SEQ (X é um aminoácido)
243	QGGMGDFCLPQWGCLWGEDL
244	QGYMVDFCLPRWGCLWGDAN
245	QMHHMDICLPKGCLWGDT S
246	QMQLMSDFCLPQWGCLWGDGY
247	QRHMMDFCLPKWGCLWGDGY
249	QRPIMDFCLPKWGCLWEDGF
250	QRQIMDFCLPHWGCLWGDGF
251	QRQVVDFCLPQWGCLWGDGS
252	QSQLEDFCLPKWGCLWGDGF
253	QSYMEDICLPRWGCLSDDAS
254	RWQTEDVCLPKWGCLFGDGV
255	SEDFCLPVWGCLWED
256	VWDLCLPQWGCLWDE
263	LWAMEDICLPKWGCLWEDDF
264	QRDMGDI CLPRWGCLWEDGV
265	QRLMEDICLPRWGCLWGDRF
266	QWHMEDICL P QWGCLWGDVL
268	QWQVMDICLPRWGCLWADEY
269	DICLPRWGCLW
270	AAQVGDI CLPRWGCLWSEYA
271	AGWAADVCLPRWGCLWEEDV
272	ALFEDVCLPVWGCLWGGE
273	AQAMGDI CLPRWGCLWEAEI
274	ASDPGDVCLPRWGCLWGESF
275	ASDRGDLCLPYWGCLWGPDG
276	ASEWDVCLPTWGCLWMEG
277	ASNWEDVCLPRWGCLWGERN
278	ASTPRDICI CLPRWGCLWSEDA
279	ASVVDDICL PVWGCLWGEDI
280	ATMEDDICLPRWGCLWGAE E

SEQ ID No:	SEQ (X é um aminoácido)
281	AYSADICLPRWGCLWMSE
282	DEDFEDYCLPPWGCLWGSSM
283	DGEEGDLCLPRWGCLWALEH
284	EDWEDICLQPWGCLWEGM
285	EDWTDLCLPAWGCLWDTE
286	EEDSDICLPRWGCLWNTS
287	EGEEVDICLQPWGCLWGYPV
288	EGTWDDFCLPRWGCLWLGER
289	EGYWDLCLPRWGCLWELE
290	ELGEDLCLPRWGCLWGSE
291	ERWEGDVCLPRWGCLWGESG
292	ETWSDVCLPRWGCLWGAS
293	EVGDLDLCLPRWGCLWGNDK
294	FRDGEDFCLQPWGCLWADTS
295	GDMVNDFCLPRWGCLWGSEN
296	GDWMHDICLPKWGCLWDEKA
297	GDYVDLCLPGWGCLWEDG
298	GIEWGDTCLPKWGCLWRVEG
299	GQQGEDVCLPVWGCLWDTSS
300	GRMGTDLCLPRWGCLWGEVE
301	GRYPMDLCLPRWGCLWEDSA
302	GSAGDDLCLPRWGCLWERGA
303	GVLDIDICLPRWGCLWGPK
304	HASDWDVCLPGWGCLWEEDD
305	HEWERDICLPRWGCLWRDGD
306	HMMDDVCLPGWGCLWASE
307	IDYTDLCLPAWGCLWELE
308	IEHEDLCLPRWGCLWAVID
309	ISEWDLCLPRWGCLWDRS
310	ISWADVCLPKWGCLWGKD

SEQ ID No:	SEQ (X é um aminoácido)
311	ISWGDLCLPRWGCLWEGS
312	KKVSGDICLPIWGCLWDNDY
313	KLWDDICLPRWGCLWSPL
314	LAWPDVCLPRWGCLWGGM
315	LGVTHDTCLPRWGCLWDEVG
316	LLESDDICLPRWGCLWHEDG
317	LNESDICLPTWGCLWGVD
318	LPEQDVCLPVWGCLWDAN
319	LVWEEDFCLPKWGCLWGAED
320	MAWGDVCLPRWGCLWAGG
321	MQAESDFCLPHWGCLWDEGT
322	MQGPLDICLPRWGCLWGGVD
323	NEEWDVCLPRWGCLWGGV
324	NVGWNDICLPRWGCLWAQES
325	QELQDFCLPRWGCLWGVG
326	QGVEWDVCLPQWGCLWTREV
327	QMPLEDICLPRWGCLWEGRE
328	QREWVDVCLPQWGCLWSDV
329	QRFWDTCLPRWGCLWGGD
330	REEWGDLCPTWGCLWETKK
331	RLDAWDICLPPQWGCLWEEPS
332	RVFTDVCLPRWGCLWDLG
333	RVWTEDVCLPRWGCLWSEGN
334	SEAPGDYCLPRWGCLWAQEK
335	SGWDDVCLPVWGCLWGPS
336	SIREYDVCLPKWGCLWEPSA
337	SPTEWDMCLPKWGCLWGDAL
338	SSASDYCLPRWGCLWGDL
339	SSGLEDICLPNWGCLWADGS
340	SVGWGDICLPPVWGCLWGEKG

SEQ ID No:	SEQ (X é um aminoácido)
341	SWQGDICLPRWGCLWGVD
342	SYETDVCLPYWGCLWEDA
343	SYWGDVCLPRWGCLWSEA
344	TAMDEDVCLPRWGCLWGSGS
345	TEENWDLCLPRWGCLWGDDW
346	TEIGQDFCLPRWGCLWVPGT
347	TLEWDMCLPRWGCLWTEQ
348	TLGWPDFCLPKWGCLWRESD
349	TLSNQDICLPGWGCLWGGIN
350	TSGSDDICLPVGCLWGEDS
351	TSTGGDLCLPRWGCLWDSSE
352	TWP-GDLCLPRWGCLWEAES
353	VGEFDICLPRWGCLWDAE
354	VSEMDDICLPLWGCLWADAP
355	VSEWEDICLPSWGCLWETQD
356	VTSWDVCLPRWGCLWEED
357	VVGDGDFCLPKWGCLWDQAR
358	VVWDDDVLPRWGCLWEEYG
359	WDHELDFCLPVWGCLWAEDV
360	WLWEDLCLPKWGCLWEED
361	WSDSDDVCLPRWGCLWGNVA
362	WTESEDICLPGWGCLWGPEV
363	WVEEGDICLPRWGCLWESVE
364	WVPFEDVCLPRWGCLWSSYQ
365	ÇÕESDXCLPXWGCLWÇÃO
366	ÇÕESDXCLPXWGCLWÇÕES
367	AFWSDICLPRWGCLWEED
368	AGLDEDICLPRWGCLWGKEA
369	AGMMGDICLPRWGCLWQGEP
370	APGDWDFCLPKWGCLWDDDA

SEQ ID No:	SEQ (X é um aminoácido)
371	AQLFDDICLPRWGCLWSDGY
372	ARTMGDICLPRWGCLWGASD
373	AVSWADICLPRWGCLWERAD
374	AWLDEDICLPKGCLWNTGV
375	AWQDFDVCLPRWGCLWEPEs
376	DTTWGDICLPRWGCLWSEEA
377	DWGRDICLPRWGCLWDEE
378	EAWGDICLPRWGCLWELE
379	EGFLGDICLPRWGCLWGHQA
380	EQWLHDICLPKGCLWDDTD
381	ETGWPDICLPRWGCLWEEGE
382	FELGEDICLPRWGCLWEEHN
383	FITQDICLPRWGCLWGEN
384	FLWRDICLPRWGCLWSEG
385	FSLDEDICLPKGCLWGAEK
386	FVHEDICLPRWGCLWGEg
387	GASLGDICLPRWGCLWGPED
388	GDLGDDICLPRWGCLWDEYP
389	GEGWSDICLPRWGCLWAEDe
390	GEWWEDICLPRWGCLWGSSS
391	GLGDDICLPRWGCLWGRD
392	GLMGEDICLPRWGCLWKDI
393	GMFDDICLPKGCLWGLG
394	GPGWDICLPRWGCLWGEE
395	GPWYDICLPRWGCLWDGV
396	GSLESDICLPRWGCLWGIDE
397	GWDDDICLPRWGCLWGDG
398	GWHDRDICLPRWGCLWEQND
399	GWLEEDICLPKGCLWGADN
400	HEQWDDICLPRWGCLWGGSY

SEQ ID No:	SEQ (X é um aminoácido)
401	LEYEDICLPKGCLWGGE
402	LILSDICLPRWGCLWDDT
403	LKLEDICLPRWGCLWGES
404	LLDEDICLPRWGCLWGVR
405	LLGGHDICLPRWGCLWGGDV
406	LLTRDICLPRKGCLWGSD
407	LMSPDICLPRKGCLWEGD
408	LRWSDICLPRWGCLWEET
409	LVLGDIICLPRWGCLWESD
410	LYLRDICLPRKGCLWEAD
411	MLSRDICLPRWGCLWEEE
412	MPWTDICLPRWGCLWSES
413	MRWSSDICLPRKGCLWGDEE
414	NWYDDICLPRWGCLWDVE
415	QDWEDICLPRWGCLWGD
416	QFEWDDICLPRWGCLWEVEV
417	QGWWHDICLPRWGCLWEEGE
418	QRVDDDICLPRWGCLWGENS
419	QSWPDICLPRKGCLWGEG
420	REGWPDICLPRWGCLWSETG
421	RELWDICLPRWGCLWEHAT
422	RLELMDICLPRWGCLWDPQD
423	RLGSDICLPRWGCLWDYQ
424	RLGSDICLPRWGCLWGAG
425	SGVLGDIICLPRWGCLWEEAG
426	SLGLTDLICLPRWGCLWEEEQ
427	SPWMMDICLPRWGCLWESG
428	SSLEQDICLPRWGCLWGQDA
429	STFTDICLPRWGCLWELE
430	SVGWGDICLPRKGCLWAESD

SEQ ID No:	SEQ (X é um aminoácido)
431	SVLSDDICLPRWGCLWWDFS
432	SVLSDICLPRWGCLWEES
433	TLLQDICLPRWGCLWESD
434	TLMSNDICLPRWGCLWDEPK
435	TLVLDDICLPRWGCLWDMDTD
436	TSLADDICLPRWGCLWSEDG
437	TSLLDDICLPRWGCLWYEEG
438	TWFSDICLPRWGCLWEPG
439	TWQGEDICLPRWGCLWDTEV
440	VEMWHDICLPRWGCLWDSNA
441	VGVFDDICLPRWGCLWEQPV
442	VHQADICLPRWGCLWGDT
443	VLLGDICLPLWGCLWGED
444	VNWGDICLPRWGCLWGES
445	VPAMGDICLPRWGCLWEARN
446	VRLMDICLPRWGCLWGEE
447	VRWEDICLPRWGCLWGEE
448	VSLGDDICLPKGCLWEPEA
449	VVWSDICLPRWGCLWDKE
450	VWIDRDICLPRWGCLWDTEN
451	VWYKDICLPRWGCLWEAE
452	WDLASDICLPRWGCLWEAAA
453	WDVADICLPRWGCLWAED
454	WDYGDICLPRWGCLWEEG
455	WEVQDICLPRWGCLWGDD
456	WHMGDICLPRWGCLWSEV
457	WKDFDICLPRWGCLWDDH
458	WLSDDICLPRWGCLWDDL
459	WLSEDICLPQWGCLWEES
460	WLSEDICLPRWGCLWAAD

SEQ ID No:	SEQ (X é um aminoácido)
461	WRWNEDICLPRWGCLWEEEAA
462	YIWRDIDCLPRWGCLWEGE
463	YRDYDIDCLPRWGCLWDER
464	AGEWDIDCLPRWGCLWDVE
465	EIRWDFCLPRWGCLWDDED
466	ESLGDIICLPRWGCLWGSG
467	EVREWDIDCLPRWGCLWENWR
468	EYWGDIDCLPRWGCLWDWQ
469	FGQEWDIDCLPRWGCLWGNEQ
470	IWQLEDIDCLPRWGCLWEDGL
471	KMWSDIDCLPRWGCLWEEE
472	MGTKDIDCLPRWGCLWAEA
473	MHEWDIDCLPRWGCLWESS
474	NTPTYDIDCLPRWGCLWGDVP
475	NWAENDIDCLPRWGCLWGDEN
476	QPVWSDIDCLPRWGCLWGEDH
477	RGLHDACLPWWGCLWAGS
478	RLFGDIDCLPRWGCLWQGE
479	SAREWDIDCLPTWGCLWEKDI
480	SGEWWDIDCLPRWGCLWGEG
481	SMFFDHCLPMWGCLWAEQ
483	TLFQDIDCLPRWGCLWEES
484	VGEWDIDCLPNWGCLWERE
485	WFPKDRCLPVWGCLWERH
486	WGMARDWCLPMWGCLWRGGG
487	WHLTDDIDCLPRWGCLWGDEQ
488	WWMADRCLPLWGCLWRGD
489	WWVRDLCLPTWGCLWSGK
490	YFDGDIDCLPRWGCLWGSD
491	EDICLPRWGCLWEDD
492	SWYGGDIDCLP-WGCLWSEES

11. Ligando peptídico de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de aminoácidos é ciclizada pela presença de resíduos Cys unidos por dissulfureto.

12. Ligando peptídico de acordo com a reivindicação 1, onde o ligando peptídico consiste em menos de 50 resíduos de aminoácidos.

13. Ligando peptídico de acordo com a reivindicação 1, onde o ligando peptídico consiste em menos de 40 resíduos de aminoácidos.

14. Ligando peptídico de acordo com a reivindicação 1, onde o ligando peptídico consiste de 10 a 30 resíduos de aminoácidos.

15. Ligando peptídico de acordo com a reivindicação 1, onde o ligando peptídico tem uma afinidade por albumina do soro inferior a 1 nM.

16. Ligando peptídico de acordo com a reivindicação 1, onde o ligando peptídico está adsorvido não covalentemente ou ligado covalentemente a uma macromolécula.

17. Ligando peptídico de acordo com a reivindicação 16, onde a macromolécula é um suporte sólido.

18. Ligando peptídico de acordo com a reivindicação 1, onde o ligando peptídico é marcado com um fragmento detectável.

19. Molécula híbrida compreendendo

(a) o ligando peptídico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-15; e

(b) um composto bioativo.

20. Molécula híbrida de acordo com a reivindicação 19, onde o composto bioativo é um agente terapêutico ou de diagnóstico.

21. Molécula híbrida de acordo com a reivindicação 20, onde o agente terapêutico é qualquer agente seleccionado do grupo que consiste de uma enzima, uma hormona, uma citocina, um anticorpo, um fragmento de anticorpo, um analgésico, um antipirético, um agente anti-inflamatório, um antibiótico, um agente antiviral, uma droga anti-fúngica, uma droga cardiovascular, uma droga que actua no sistema nervoso central, uma droga que afecta a função renal e o metabolismo electrolítico e um agente quimioterapêutico.

22. Molécula híbrida de acordo com a reivindicação 19 onde o ligando peptídico é Gln-Arg-Leu-Met-Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp-Asp-Phe (SEQ ID NO: 122) e o agente terapêutico é um Fab anti-factor tecidual ou fragmento de anticorpo F(ab')₂.

23. Composição compreendendo a molécula híbrida de acordo com qualquer uma das reivindicações 19-22 e um transportador farmaceuticamente aceitável.

24. Molécula híbrida de acordo com qualquer uma das reivindicações 19-22, para utilização num método de terapia.

25. Molécula híbrida de acordo com qualquer uma das reivindicações 19-22, para utilização num método de diagnóstico.

26. Utilização de uma molécula híbrida de acordo com qualquer uma das reivindicações 19-22 no fabrico de um medicamento.

27. Utilização de uma molécula híbrida de acordo com qualquer uma das reivindicações 19-22 no fabrico de um agente de diagnóstico.

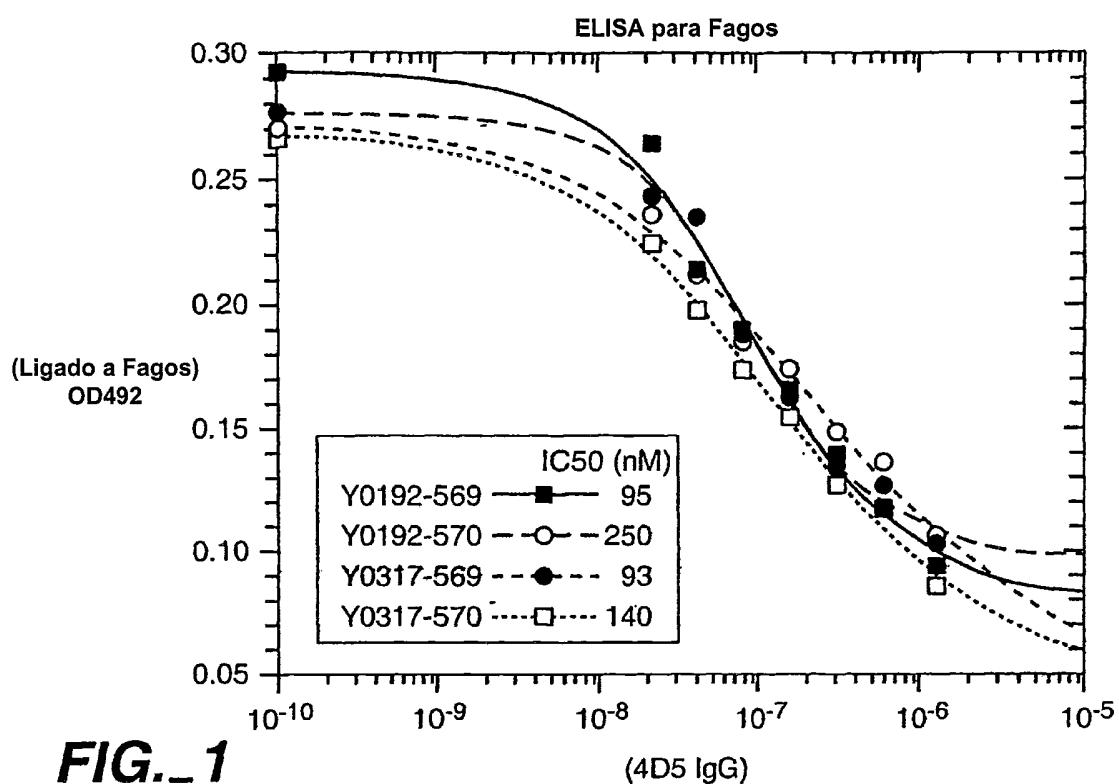
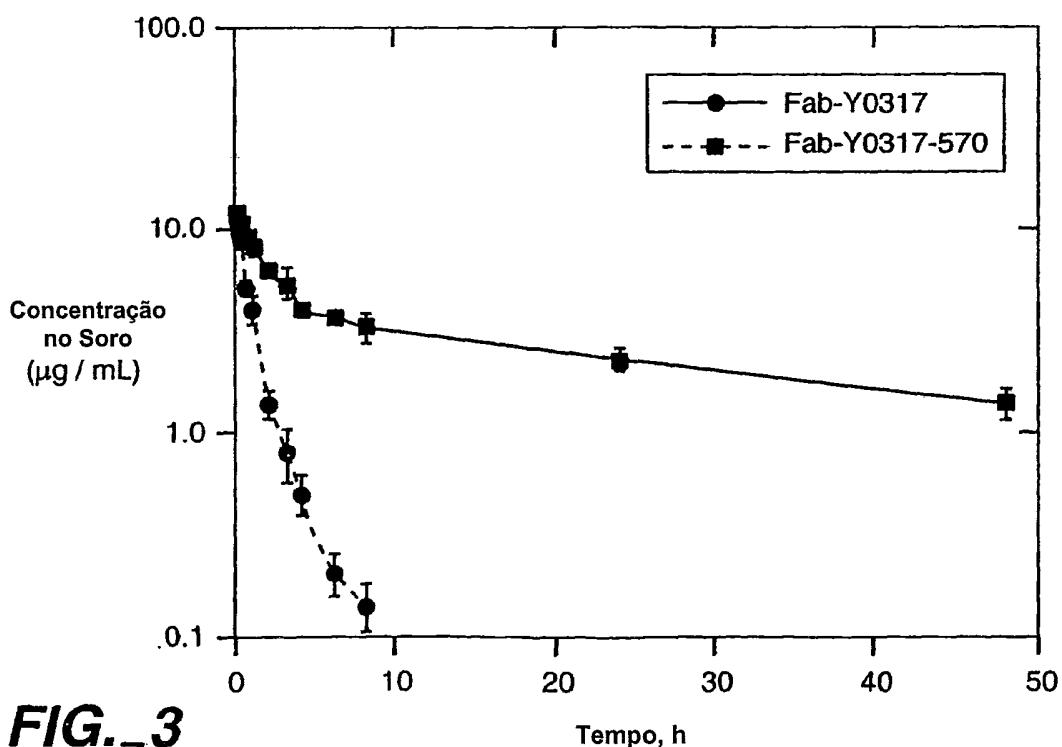
28. Ácido nucleico que codifica um ligando peptídico de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 15.

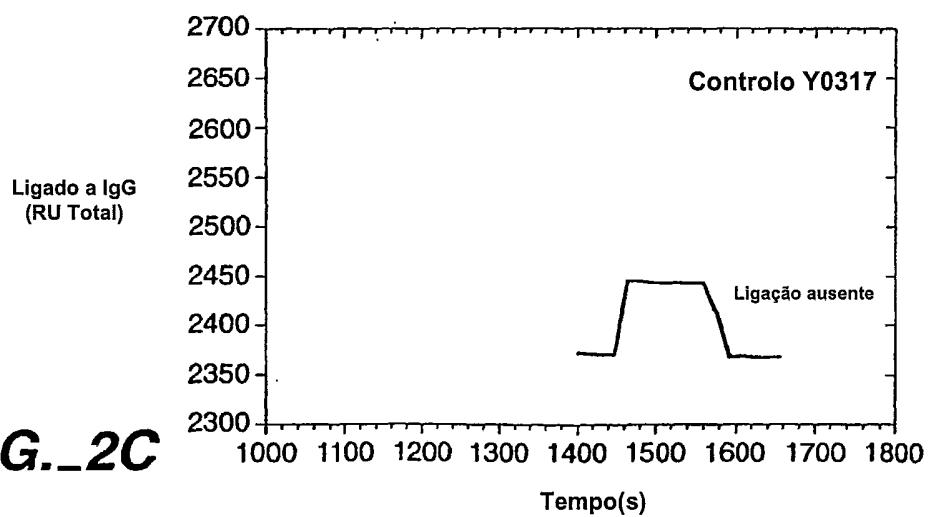
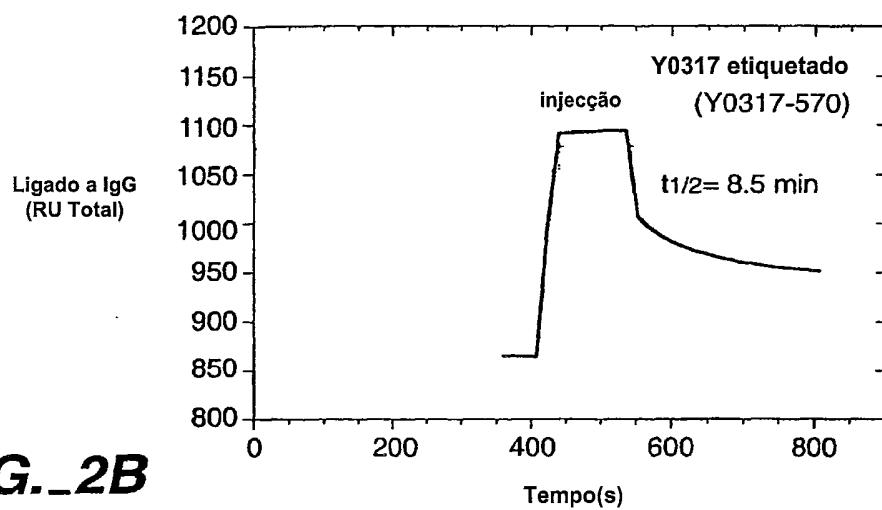
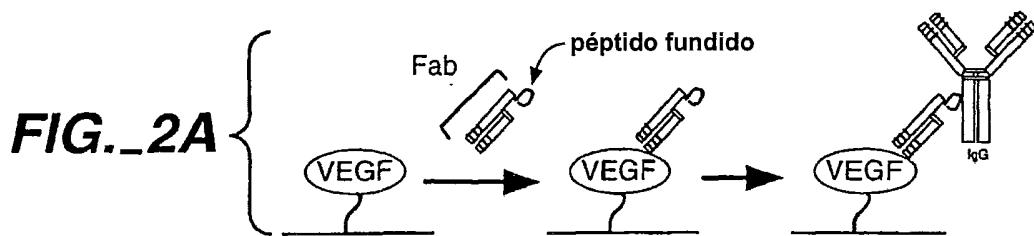
29. Ácido nucleico que codifica uma molécula híbrida de acordo com qualquer uma das reivindicações de 19 a 22.

30. Método de purificação de uma proteína, compreendendo a cultura de uma célula hospedeira contendo um vector que compreende uma fusão de genes, a fusão de genes compreendendo um gene codificante da proteína e um gene codificante de um ligando peptídico de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 15, resultando na produção de uma proteína de fusão compreendendo a proteína e o ligando peptídico; e

purificação da proteína de fusão num suporte sólido da albumina do soro utilizando o ligando peptídico como um gancho de afinidade.

Lisboa,

**FIG._1****FIG._3**

**FIG._2C**

Especificidade para Espécies dos Péptidos de Fagos de Ligação a Albumina

Biblioteca	<u>Ligação a Fagos</u>		
	Coelho	Humana	Rato
Seleccionado em SA de Coelho			
BA	G E N W C D S T L M A Y D L C G Q V N M	+++	-
BB	M D E L A F Y C G I W E C L M H Q E Q K	+++	-
BC	D L C D V D F C W F	+++	-
BD	K S C S E L H W L L V E E C L F	+++	-
Seleccionado em SA Humana			
HA	E V R S F F C T D W P A E K S C K P L R G	-	+++
HB	R A P E S F V C Y W E T I C F E R S E Q	-	++
HC	E M C Y F P G I C W M	-	++
HE	C E V A L D A C R G G E S G C C R H I C E L I R Q L C	-	(+)
Seleccionado em SA de Rato			
RA	R N E D P C V V L L E M G L E C W E G V	-	+++
RD	D T C V D L V R L G L E C W G	-	+++
RB	Q R Q M V D F C L P Q W G C L W G D G F	++	+++
RC	D L C L R D W G C L W	-	+++
RE	C G C V D V S D W D C W S E C L W S H G A	-	+++

FIG.-4

	Sequências Seleccionadas em Albumina de Coelho										Ligaçāo										
	Coelho					Humana					Rato										
Biblioteca BA	G	E	N	W	C	D	S	T	L	M	A	Y	D	L	C	G	Q	V	N	M	
BA-B44	G	E	D	W	C	D	S	T	L	L	A	F	D	L	C	G	E	G	A	R	
BA-B37	G	E	N	W	C	D	W	V	L	L	A	Y	D	L	C	G	E	D	N	T	
BA-B39	M	E	L	W	C	D	S	T	L	M	A	Y	D	L	C	G	D	F	N	M	
Sequências Seleccionadas em Albumina Humana																					
Biblioteca HA	E	V	R	S	F	C	T	D	W	P	A	E	K	S	C	K	P	L	R	G	
HA-H74	E	V	R	S	F	C	T	D	W	P	A	H	Y	S	C	T	S	L	Q	G	
HA-H83	G	-	R	S	F	C	M	D	W	P	A	H	K	S	C	T	P	L	M	L	
HA-H73	G	V	R	T	F	C	Q	D	W	P	A	H	N	S	C	K	L	L	R	G	
HA-H76	Q	T	R	S	F	C	A	D	W	P	R	H	E	S	C	K	P	L	R	G	
HA-H84	R	-	R	T	-	C	-	D	W	P	-	H	N	S	C	K	-	L	R	G	
Biblioteca HB	R	A	P	E	S	F	V	C	Y	W	E	T	I	C	F	E	R	S	E	Q	
HB-H2	R	A	A	E	S	S	V	C	Y	W	P	G	I	C	F	D	R	T	E	Q	
HB-H8	M	E	P	S	R	S	V	C	Y	A	E	G	I	C	F	D	R	G	E	Q	
HB-H3	R	E	P	A	S	L	V	C	Y	F	E	D	I	C	F	V	R	A	E	A	
HB-H6	R	G	P	D	-	V	-	C	Y	W	P	S	I	C	F	E	R	S	M	P	
HB-H4	L	V	P	E	R	-	V	C	Y	F	E	S	I	C	Y	E	R	S	E	L	
HB-H16	R	M	P	A	S	L	P	C	Y	W	E	T	I	C	Y	E	S	S	E	R	
HB-H18	R	R	T	A	E	S	L	V	C	Y	W	P	G	I	C	F	D	R	Y	E	Q
HB-H1	R	A	P	E	R	W	V	C	Y	W	E	G	I	C	F	D	R	Y	E	(+)	

FIG.-5A

.....

Biblioteca HC

FIG. - 5B

Biblioteca HBC

Q R Q M V D F C L P Q W G C L W Q D G F	++	+++	+++
Q R H P E D I C L P R W G C L W G D D D	++	+++	+++
N R Q M E D I C L P Q W G C L W G D D F	++	+++	+++

Biblioteca RB

RB-H6

FIG.-5C

RB-B2 RB-B5 RB-B6 RB-B4 RB-B7 RB-B8 RB-B11 RB-B12 RB-B16 RB-B9 RB-B14 RB-B3 RB-B10 RB-B1 RB-R8 RB-R16 HC-R10 RB-R4 RB-R7 RB-R11 RB-R12 RB-R13 RB-R15 RB-R17 RB-R5 RB-R10 RB-R2

FIG.-5D

FIG.-5E

RB-R3	RC-R6	Biblioteca RC	RBC-R16
RB-R9	RC-R8		RBC-R7
RB-R1	RC-R15		RBC-R1
RB-R14	RC-R1		RBC-R2
	RC-R2		RBC-R4
	RC-R3		
	RC-R10		
	RC-R12		
	RC-R18		
	RC-R9		
	RC-R4		
	RC-R5		
	RC-R20		
	RC-R17		
	RC-R13		
	RC-R16		

RBC-R6	+++
RBC-R5	+++
RBC-R9	+++
RBC-R10	+++
RBC-R8	+++
RBC-R14	+++
RBC-R20	+++
RBC-R12	+++
RBC-R13	+++
RBC-R15	+++
RBC-R18	+++
RBC-R11	+++
 ----- -----	
Biblioteca RD	+++
RD-R2	D T C V D L V R L G L E C W G
RD-R7	D T C A D L V R L G L E C W A
RD-R11	N T C A D L V R L G L E C W A
RD-R5	D T C D D L V Q L G L E C W A
RD-R6	D T C E D L V R L G L E C W A
RD-R1	D S C G D L V G L G L E C W A
 ----- -----	

FIG.-5F

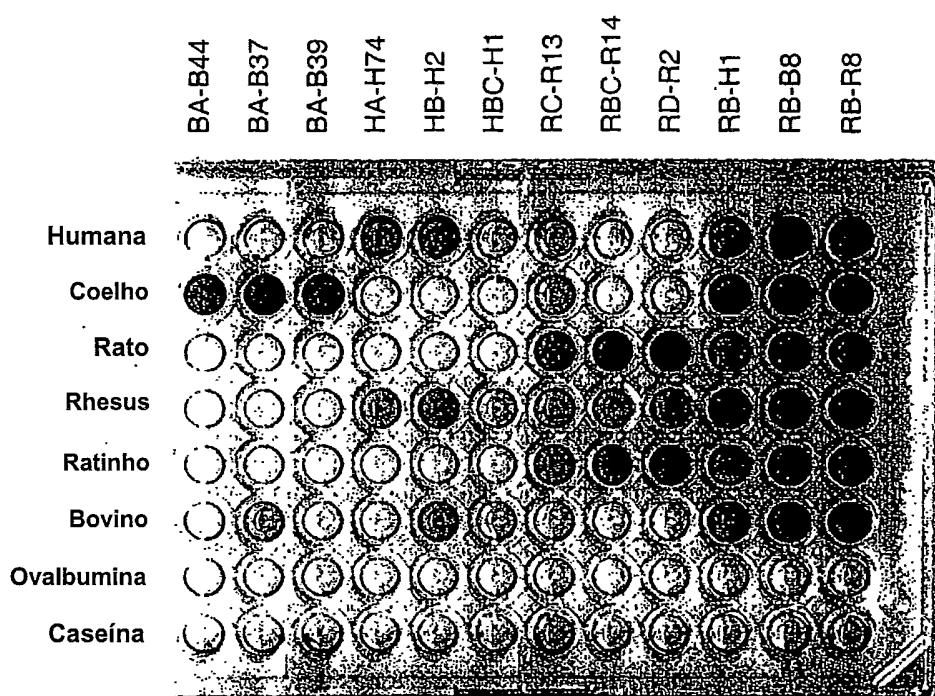


FIG._6

FAGOS	RB	Ligaçāo										Rato												
		Humana					Coelho																	
	RB-H1	Q	R	H	P	E	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	D	G	F	+	++	++
	RB-H6	N	R	Q	M	E	D	I	C	L	P	Q	W	G	C	L	W	G	D	D	F	++	++	++
RB-B12	Q	G	L	I	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	D	S	V	++	++	++	
RB-B8	H	S	Q	M	E	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	D	E	L	++	++	++	
RB-B7	L	R	L	M	D	N	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	D	G	F	++	++	++	
RB-B5	Q	W	H	M	E	D	I	C	L	P	Q	W	G	C	L	W	G	D	V	L	++	++	++	
RB-B6	Q	W	Q	M	E	N	V	C	L	P	K	W	G	C	L	W	E	E	L	D	++	++	++	
RB-B4	L	W	W	A	M	E	D	I	C	L	P	K	W	G	C	L	W	E	D	F	++	++	++	
RB-B11	Q	W	Q	V	M	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	A	D	E	Y	++	++	++	
RB-B16	H	R	R	L	V	E	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	N	D	F	++	++	++
RB-B2	Q	R	L	M	E	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	D	R	F	++	++	++	
RB-R8	Q	G	L	I	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	D	S	V	++	++	++	
RB-R16	L	I	F	M	E	D	V	C	L	P	Q	W	G	C	L	W	E	D	G	V	++	++	++	
HC-R10	Q	R	D	M	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	D	G	V	++	++	++	

FIG. 7

Sequências selecionadas em albumina de rato

Biblioteca de Aleatorização Intensa

	X	X	X	X	X	D	X	C	L	P	X	W	G	C	L	W	X	X	X	X
35	A	A	Q	V	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	S	E	Y	A
33	A	G	W	A	A	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	E	D	V
60	A	S	V	V	D	D	I	C	L	P	V	W	G	C	L	W	G	E	D	I
84	A	T	M	E	D	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	A	E	E
10	D	E	D	F	E	D	Y	C	L	P	P	W	G	C	L	W	G	S	S	M
34	E	G	T	W	D	D	F	C	L	P	R	W	G	C	L	W	L	G	E	R
93	E	R	W	E	G	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	E	S	G
23	G	D	W	M	H	D	I	C	L	P	K	W	G	C	L	W	D	E	K	A
71	G	I	E	W	G	D	T	C	L	P	K	W	G	C	L	W	R	V	E	G
36	G	Q	Q	G	E	D	V	C	L	P	V	W	G	C	L	W	D	T	S	S
48	G	R	Y	P	M	D	L	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	D	S	A
24	G	S	A	G	D	D	L	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	R	G	A
9	H	A	S	D	W	D	V	C	L	P	G	W	G	C	L	W	E	E	D	D
47	L	G	V	T	H	D	T	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	E	V	G
72	L	V	W	E	E	D	F	C	L	P	K	W	G	C	L	W	G	A	E	D
11	N	V	G	W	N	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	A	Q	E	S
83	Q	G	V	E	W	D	V	C	L	P	Q	W	G	C	L	W	T	R	E	V
58	R	L	D	A	W	D	I	C	L	P	Q	W	G	C	L	W	E	E	P	S
96	S	E	A	P	G	D	Y	C	L	P	R	W	G	C	L	W	A	Q	E	K
94	T	A	M	D	E	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	S	G	S
81	T	E	I	G	Q	D	F	C	L	P	R	W	G	C	L	W	V	P	G	T
57	T	L	G	W	P	D	F	C	L	P	K	W	G	C	L	W	R	E	S	D
12	T	L	S	N	Q	D	I	C	L	P	G	W	G	C	L	W	G	G	I	N
46	T	S	T	G	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	S	S	E
22	V	S	E	M	D	D	I	C	L	P	L	W	G	C	L	W	A	D	A	P
59	V	S	E	W	E	D	I	C	L	P	S	W	G	C	L	W	E	T	Q	D
45	V	V	G	D	G	D	F	C	L	P	K	W	G	C	L	W	D	Q	A	R
21	V	V	W	D	D	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	E	Y	G
69	W	S	D	S	D	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	N	V	A
95	W	V	E	E	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	S	V	E
33	A	Q	A	M	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	A	E	I
10	A	S	D	R	G	D	L	C	L	P	Y	W	G	C	L	W	G	P	D	G
93	A	S	D	P	G	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	E	S	F
71	A	A	S	N	W	E	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	E	R
22	A	S	T	P	R	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	S	E	D	A
23	D	G	E	E	G	D	L	C	L	P	R	W	G	C	L	W	A	L	E	H
24	E	G	E	E	V	D	I	C	L	P	Q	W	G	C	L	W	G	Y	P	V
82	E	V	G	D	L	D	L	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	N	D	K
81	F	R	D	G	E	D	F	C	L	P	Q	W	G	C	L	W	A	D	T	S
46	G	D	M	V	N	D	F	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	S	E	N
83	G	R	M	G	T	D	L	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	E	V	E
94	H	E	W	E	R	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	W	R	D	G
35	K	K	V	S	G	D	I	C	L	P	I	W	G	C	L	W	D	N	D	Y

FIG.-8A

96	L L E S D	D I C L P	R W G C L W H E D G
21	M Q A E S	D F C L P	H W G C L W D E G T
36	M Q G P L	D I C L P	R W G C L W G G V D
48	Q M P L E	D I C L P	R W G C L W E G R E
95	R E E W G	D L C L P	T W G C L W E T K K
47	R V W T E	D V C L P	R W G C L W S E G N
11	S I R E Y	D V C L P	K W G C L W E P S A
34	S P T E W	D M C L P	K W G C L W G D A L S
69	S S G L E	D I C L P	N W G C L W A D G S
9	S V G W G	D I C L P	V W G C L W G E G G
57	T E E N W	D L C L P	R W G C L W G D D W
84	T S G S D	D I C L P	V W G C L W G E D S
58	T W P - G	D L C L P	R W G C L W E A E S
72	W D H E L	D F C L P	V W G C L W A E D V
60	W T E S E	D I C L P	G W G C L W G P E V
59	W V P F E	D V C L P	R W G C L W S S Y Q

Biblioteca de Aleatorização Intensa

	X X X X D X C L P X W G C L W X X X
93	E E D S D I C L P R W G C L W N T S
81	E G Y W D I L C L P R W G C L W E L E
10	E L G E D I L C L P R W G C L W G S E
24	E T W S D V C L P R W G C L W G A S
83	G D Y V D I L C L P P G W G C L W E D G
23	G V L D D I C L P R W G C L W G P K
94	H M M D D I V C L P P G W G C L W A S E
59	I D Y T D I L C L P A W G C L W E L E
36	I E H E D I L C L P R W G C L W A V D
11	I S E W D I L C L P R W G C L W D R S
12	I S W A D V C L P K W G C L W G K D
47	I S W G D I L C L P R W G C L W E G S
22	K L W D D I C L P R W G C L W S P L
84	L A W P D I V C L P R W G C L W G G M
71	L N E S D I C L P T W G C L W G V D
46	L P E Q D I V C L P V W G C L W D A N
35	M A W G D I V C L P R W G C L W A G G
48	N E E W D I V C L P R W G C L W G G V
60	Q E L Q D F C L P R W G C L W G V G
21	Q R E W D V C L P R W G C L W S D V
9	Q R F W D T C L P R W G C L W G G D
57	R V F T D V C L P R W G C L W D L G
58	S G W D D V C L P V W G C L W G P S
96	S S A S D Y C L P R W G C L W G D L
72	S W Q G D I C L P R W G C L W G V D
69	S Y E T D V C L P Y W G C L W E D A
34	S Y W G D V C L P R W G C L W S E A
45	T L E W D M C L P R W G C L W T E Q

FIG._8B

95	V G E F D	I C L P R	W G C L W D A E
33	V T S W D	I V C L P R	W G C L W E E D
82	W L W E D	I L C L P K	W G C L W E E D
82	A L F E D	I V C L P V	W G C L W G G E
45	A S E W D	I V C L P T	W G C L W M E G E
34	A Y S A D	I C L P R	W G C L W M S E
35	E D W E D	I C L P Q	W G C L W E G M
83	E D W T D	I C L P A	W G C L W D T E

Sequências seleccionadas em albumina de coelho

Biblioteca de Aleatorização Intensa

	X X X X X D X C L P X W G C L W X X X X
75	A G L D E D I C L P R W G C L W G K E A
39	A G M M M G D I C L P R W G C L W Q G E P
76	A P G D W D F C L P K W G C L W D D D A
74	A Q L F D D I C L P R W G C L W S D G Y
86	A R T M G D I C L P R W G C L W W G A S D
63	A W Q D F D V C L P R W G C L W E P E S
26	D T T W G D I C L P R W G C L W S E E A
4	E G F L G D I C L P R W G C L W G H Q A
2	E Q W L H D I C L P K W G C L W D D T D
61	E T G W P D D I C L P R W G C L W E E G E
52	F E L G E D I C L P R W G C L W E E H N
38	G A S L G D I C L P R W G C L W G P E D
88	G E W W E D I C L P R W G C L W G S S S
1	G S L E S D I C L P R W G C L W G I D E
13	G W L E E D I C L P K W G C L W G A D N Y
64	H E Q W D D I C L P R W G C L W G G S Y
49	Q R V D D D I C L P R W G C L W G E N S
50	S V G W G D I C L P K W G C L W A E S D
40	T L M S N D I C L P R W G C L W D E P K
28	T L V L D D I C L P R W G C L W D M T D
14	T W Q G E D I C L P R W G C L W D T E V
73	V G V F D D I C L P R W G C L W E Q P V
25	V P A M G D I C L P R W G C L W E A R N
16	V S L G D D I C L P K W G C L W E P E A
15	V W I D R D I C L P R W G C L W D T E N
51	W R W N E D I C L P R W G C L W E E E A
73	A V S W A D I C L P R W G C L W E R A D
37	A W L D E D I C L P K W G C L W N T G V
16	F S L D E D I C L P K W G C L W G A E K
3	G D L G D D I C L P R W G C L W D E Y P
87	G E G W S D I C L P R W G C L W A E D E
38	G L M G E D I C L P R W G C L W K G D I
75	G W H D R D I C L P R W G C L W E Q N D
63	L L G G H D I C L P R W G C L W G G D V

FIG._8C

64	M R W S S	D I C L P K W G C L W G D E E
13	Q F E W D	D I C L P R W G C L W E V E V
49	Q G W W H	D I C L P R W G C L W E E G E
51	R E G W P	D I C L P R W G C L W S E T G
40	R E L W G	D I C L P R W G C L W E H A T
76	R L E L M	D I C L P R W G C L W D P Q D
2	S G V L G	D I C L P R W G C L W E E A G
14	S L G L T	D I C L P R W G C L W E E E Q
27	S S L E Q	D I C L P R W G C L W G Q D A
74	S V L S D	D I C L P R W G C L W W D F S
15	T S L L D	D I C L P R W G C L W Y E E G
50	T S L A D	D I C L P R W G C L W S E D G
25	V E M W H	D I C L P R W G C L W D S N A
4	W D L A S	D I C L P R W G C L W E E E A

Biblioteca de Aleatorização Intensa

	X X X X D X C L P X W G C L W X X X
40	F I T Q D I C L P R W G C L W G E N
13	F L W R D I C L P R W G C L W S E G
50	F V H E D I C L P R W G C L W G E G
26	G L G D D I C L P R W G C L W G R D
63	G M F D D I C L P K W G C L W G L G
37	G P G W D I C L P R W G C L W G E E
87	G P W Y D I C L P R W G C L W D G V
4	G W D D D I C L P R W G C L W G D G
39	L E Y E D I C L P K W G C L W G G E
14	L L D E D I C L P R W G C L W G V R
28	L M S P D I C L P K W G C L W E G D
52	L V L G D I C L P R W G C L W E S D
75	M L S R D I C L P R W G C L W E E E
61	M P W T D I C L P R W G C L W S E S
25	R L G S D I C L P R W G C L W G A G
51	R L G S D I C L P R W G C L W D Y Q
49	S P W M D I C L P R W G C L W E S G
38	S T F T D I C L P R W G C L W E L E
74	S V L S D I C L P R W G C L W E E S
86	T W F S D I C L P R W G C L W E P G
88	V H Q A D I C L P R W G C L W G D T
1	V L L G D I C L P L W G C L W G E D
15	V N W G D I C L P R W G C L W G E S
76	V V W S D I C L P R W G C L W D K E
73	V W Y K D I C L P R W G C L W E A E
85	W D Y G D I C L P R W G C L W E E G
2	W E V Q D I C L P R W G C L W G D D
27	Y I W R D I C L P R W G C L W E G E
3	Y R D Y D I C L P R W G C L W D E R

FIG._8D

64	A F W S	D I C L P R	W G C L W E E D
49	D W G R	D I C L P R	W G C L W D E E
28	E A W G	D I C L P R	W G C L W E L E
61	L I L S	D I C L P R	W G C L W D D T
25	L K L E	D I C L P R	W G C L W G E S
52	L L T R	D I C L P K	W G C L W G S D
4	L R W S	D I C L P R	W G C L W E E T
87	L Y L R	D I C L P K	W G C L W E A D
76	N W Y D	D I C L P R	W G C L W D V E
1	Q D W E	D I C L P R	W G C L W G D -
38	Q S W P	D I C L P K	W G C L W G E G
88	T L L Q	D I C L P R	W G C L W E S D
74	V R L M	D I C L P R	W G C L W G E E
26	V R W E	D I C L P R	W G C L W G E E
40	W D V A	D I C L P R	W G C L W A E D
15	W H M G	D I C L P R	W G C L W S E V
14	W K D F	D I C L P R	W G C L W D D H
3	W L S E	D I C L P Q	W G C L W E E S
27	W L S E	D I C L P R	W G C L W A A D
37	W L S D	D I C L P R	W G C L W D D L

Sequências seleccionadas em albumina humana

Biblioteca de Aleatorização Intensa

X X X X X D X C L P X W G C L W X X X X

68	E V R E W	D I C L P R	W G C L W E N W R
6	F G Q E W	D I C L P R	W G C L W G N E Q
17	I W Q L E	D I C L P R	W G C L W E D G L
53	N T P T Y	D I C L P R	W G C L W G D V P
5	Q P V W S	D I C L P R	W G C L W G E D H
18	S W Y G G	D I C L P -	W G C L W S E E S
80	W G M A R	D W C L P M	W G C L W R G G G
7	W H L T D	D I C L P R	W G C L W G D E Q
54			
67	N W A E N	D I C L P R	W G C L W G D E N
68	S A R E W	D I C L P T	W G C L W E K D I

FIG._8E

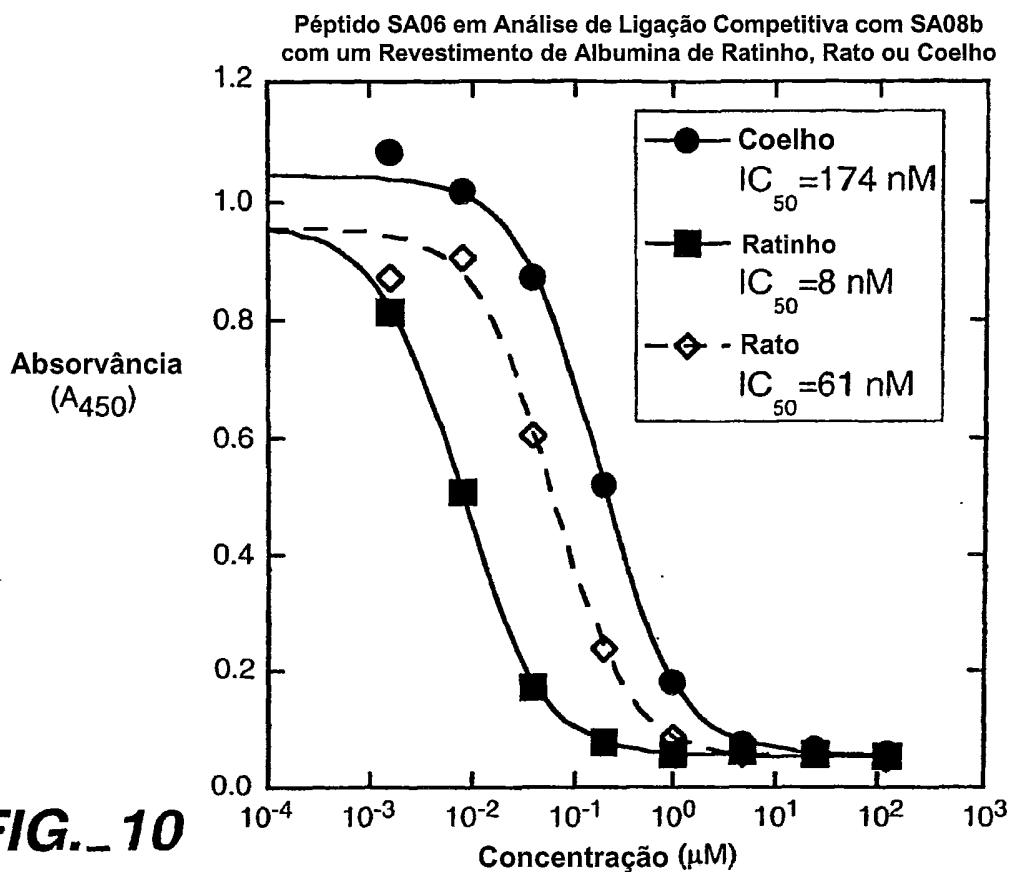
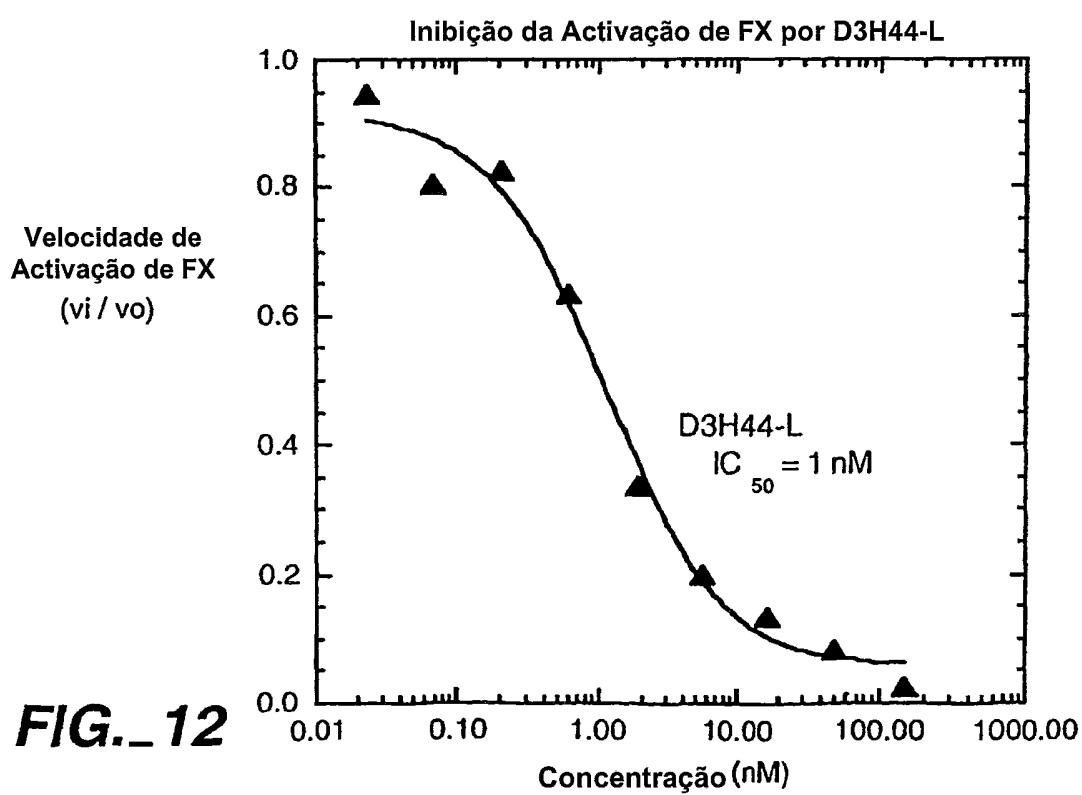
Biblioteca de Aleatorização Intensa

	X	X	X	X	D	X	C	L	P	X	W	G	C	L	W	X	X	X
42	A	G	E	W	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	V	E
56	E	I	R	W	D	F	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	E	D
8	E	S	L	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	S	G
30	E	Y	W	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	W	Q
80	K	M	W	S	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	E	E
90	M	G	T	K	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	A	E	A
7	M	H	E	W	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	S	S
78	R	G	L	H	D	A	C	L	P	W	W	G	C	L	W	A	G	S
19	R	L	F	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	Q	G	E
5	S	G	E	W	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	E	G
6	S	M	F	F	D	H	C	L	P	M	W	G	C	L	W	A	E	Q
44	V	G	E	W	D	I	C	L	P	N	W	G	C	L	W	E	R	E
32	W	W	M	A	D	R	C	L	P	L	W	G	C	L	W	R	G	D
29	W	W	V	R	D	L	C	L	P	T	W	G	C	L	W	S	G	K
54	Y	F	D	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	S	D
32	T	L	F	Q	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	E	S
68	W	F	P	K	D	R	C	L	P	V	W	G	C	L	W	E	R	H

FIG._8F

PÉPTIDO	Seqüência										SA de Coelho IC ₅₀ (nM)	SA de Rato IC ₅₀ (nM)	SA de Ratinho IC ₅₀ (nM)	
	D	L	C	L	R	D	W	G	C	L	W	-n		
SA02	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	-n	8543	787
SA04	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	-n	804	161
SA05	M	E	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	128	68
SA06	Q	R	L	M	E	D	I	G	D	I	C	L	30	35
SA07	Q	G	L	I	G	D	I	C	L	P	R	W	K	6
SA08	Ac-	Q	G	L	I	G	D	I	C	L	P	R	-n	10
SA09	Ac-	R	L	M	E	D	I	C	L	P	R	W	68	10
SA10	Ac-	R	L	M	E	D	I	C	L	P	R	W	1687	258
SA11	Ac-	M	E	D	I	C	L	P	R	W	G	C	86	6
SA12	Ac-	M.	E	D	I	C	L	P	R	W	G	C	77	4
SA13	Ac-	R	L	M	E	D	I	C	L	A	R	W	1213	292
D3H44-L	Q	R	L	M	E	D	I	C	L	P	R	W	1765	205
D3H44-Ls	Q	R	L	M	E	D	I	C	L	P	R	W	3200	13
													2480	188
													75	

FIG. 9

**FIG._ 10****FIG._ 12**

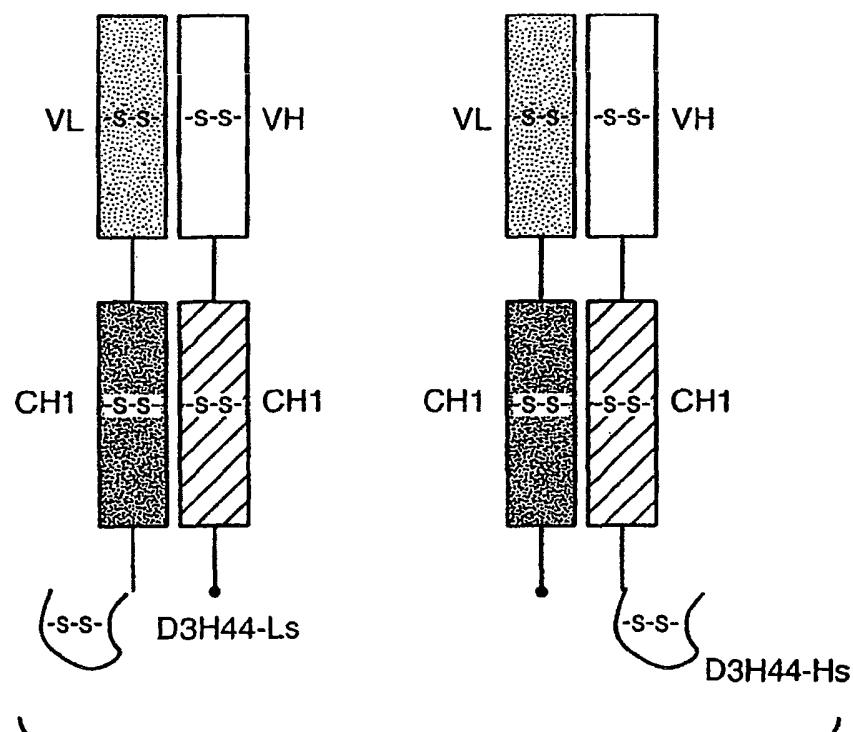
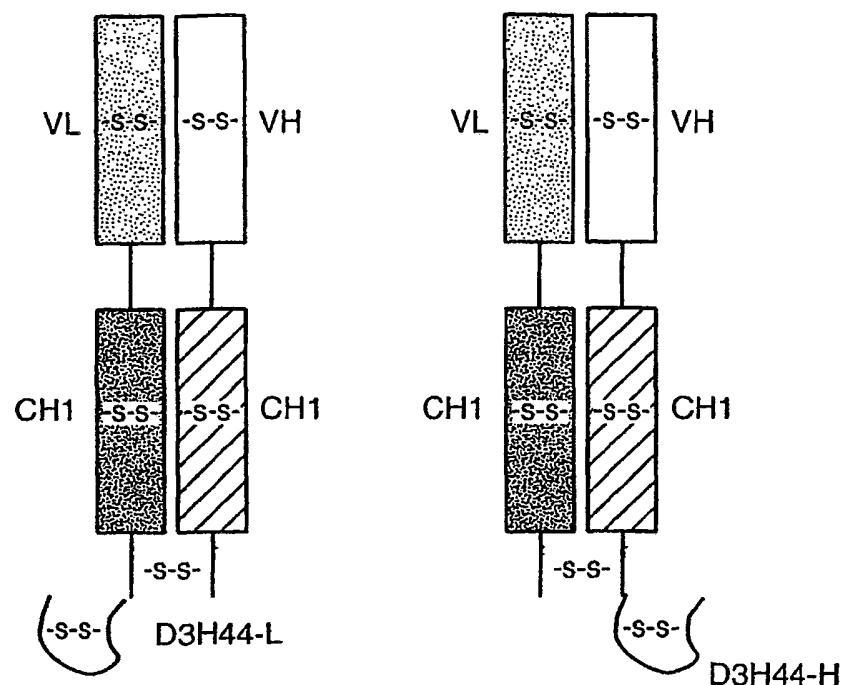
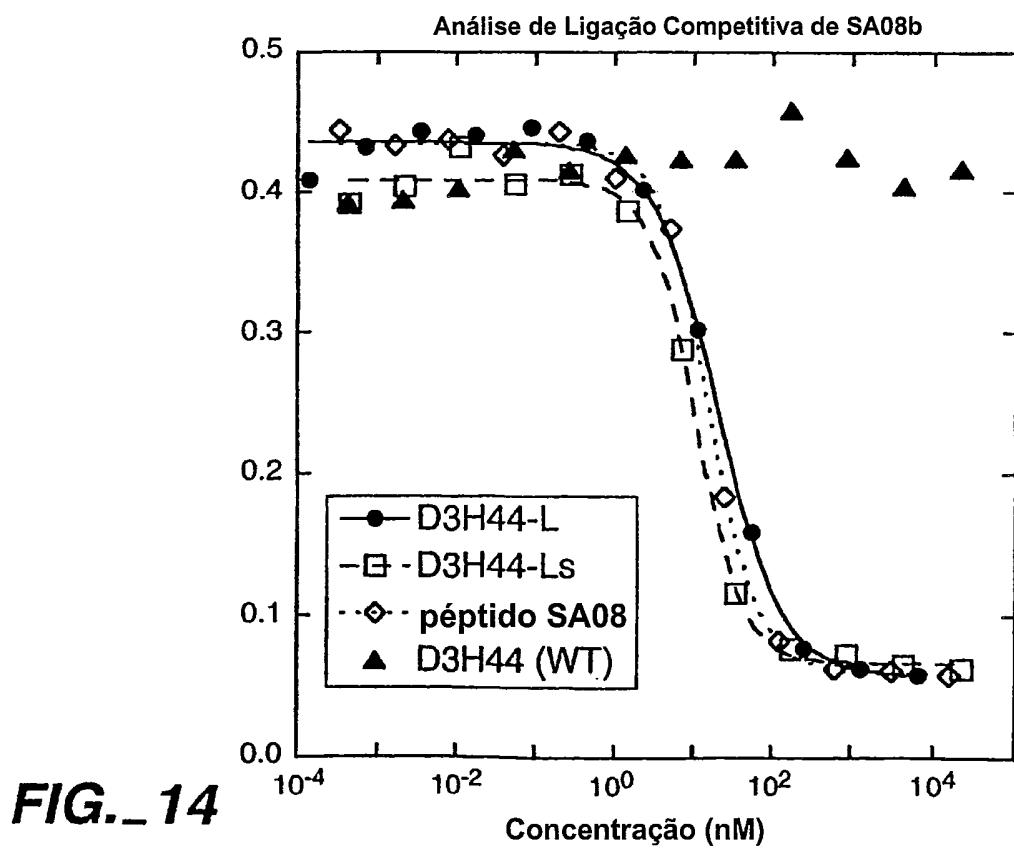
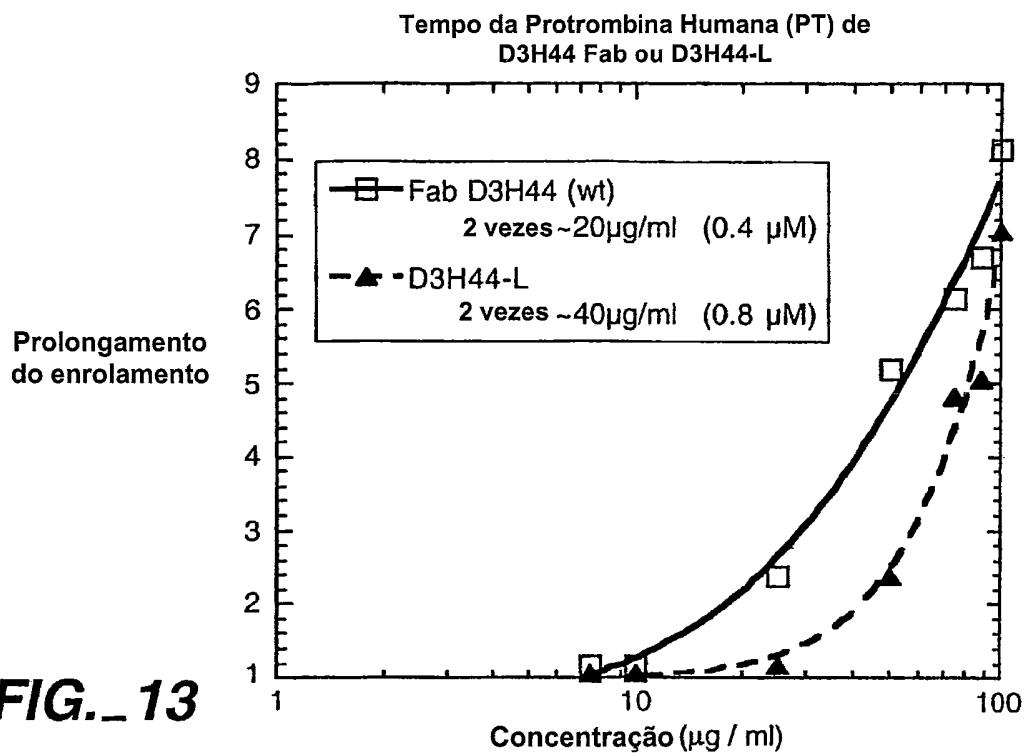
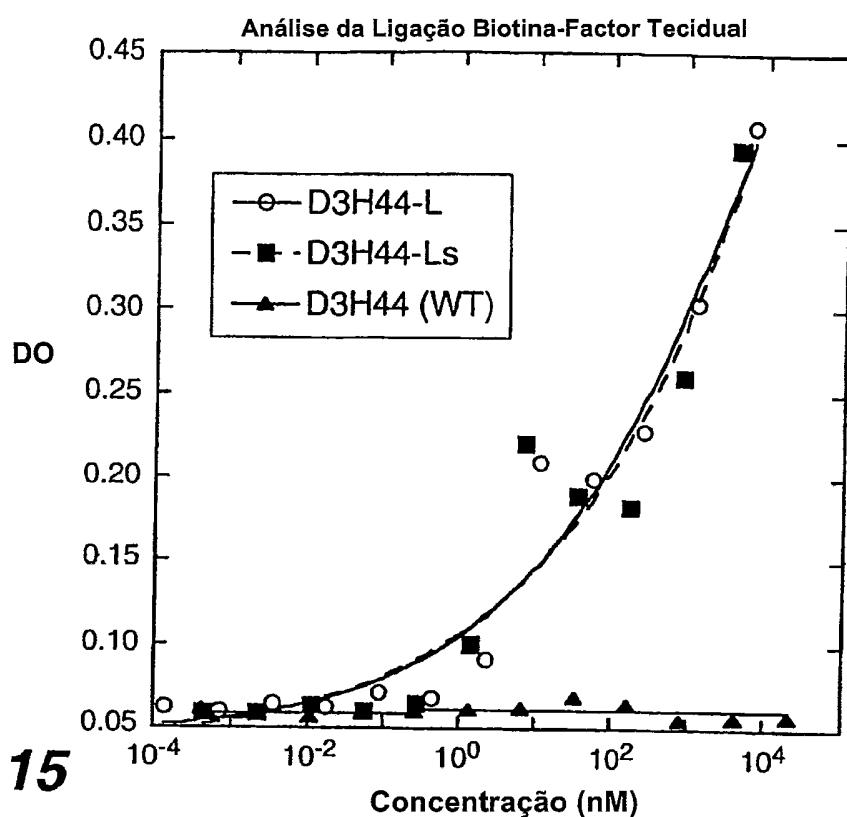
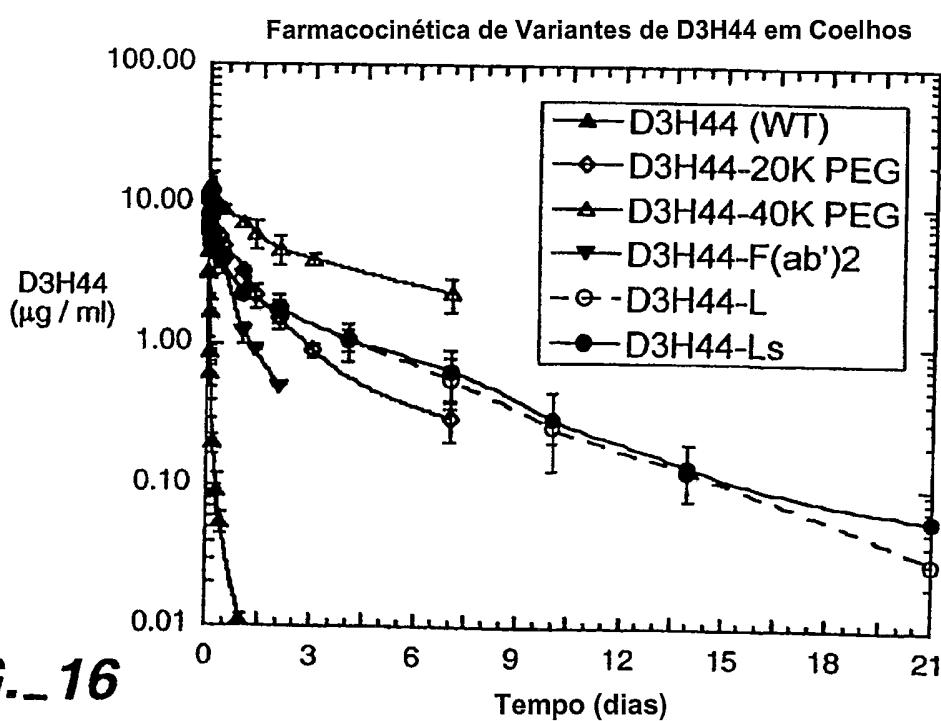


FIG._ 11



**FIG. 15****FIG. 16**

00-331 Sumário dos Valores de PK

Parâmetro	Unidades	D3H44-Fab		D3H44-LS	
		Média	DesPad	Média	DesPad
Dose	ug/kg	396	416	524	524
AUC	hr*ug/mL	5.86	1.23	349	33
AUC/Dose	(hr*ug/mL)/(mg/kg)	14.8	3.1	840	78
CL	mL/hr/kg	69.9	16.2	1.20	0.11
Cmax	ug/mL	5.00	2.30	7.55	1.23
K10-HL	hr	0.876	0.213	32.4	3.2
MRT	hr	3.07	0.62	95.0	13.1
V1	mL/kg	90.6	38.4	56.2	10.1
Vss	mL/kg	221	95	113	7

11 p < 0.05 RC20L vs RC20LS
11 p < 0.05 RC20L vs RC20LS

99-133 Sumário dos valores de PK (histórica)

Parâmetro	Unidades	D3H44-20K PEG	D3H44-40K PEG	D3H44-Fab	D3H44-Fab'2
		Média	DesPad	Média	DesPad
AUC	hr*ug/mL	271	33	1255	383
CL	mL/hr/kg	1.87	0.23	0.422	0.119
K10-HL	hr	18.0	4.2	68.9	28.5
V1	ug/mL	47.4	5.4	39.2	7.4
Vss	mL/kg	109	14	78.8	13.7
Dose	ug/kg	509	493	127	500
AUC/Dose	(hr*ug/mL)/(mg/kg)	532	65	2546	777

AUC = Área sob a curva
CL = dissipação
K10-HL = meia-vida do compartimento

MRT = tempo de retenção médio
V1 = volume de distribuição inicial
Vss = volume de distribuição em estado estacionário

F/G._ 17