(11) Número de Publicação: **PT 1616007 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 14/81 (2013.01) ***C12N 15/62*** (2013.01)

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

(22) Data de pedido: **2004.04.05**

(30) Prioridade(s): **2003.04.04 US 460345 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2006.01.18**

(45) Data e BPI da concessão: **2013.07.24**
206/2013

(73) Titular(es):
UNIVERSITÉ DE LAUSANNE
RUE DE BUGNON 21 1005 LAUSANNE CH

(72) Inventor(es):
DAVID DEPERTHES CH
SYLVAIN CLOUTIER CH

(74) Mandatário:
ÁLVARO ALBANO DUARTE CATANA
AVENIDA MARQUÊS DE TOMAR, Nº 44, 6º 1069-229 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PROTEÍNAS INIBIDORAS DE UMA PROTEASE E USO DAS MESMAS**

(57) Resumo:
A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UMA PROTEÍNA INIBIDORA QUIMÉRICA DE UMA PROTEASE COMPREENDENDO UMA SEQUÊNCIA POLIPEPTÍDICA INIBIDORA E PELO MENOS UMA SEQUÊNCIA POLIPEPTÍDICA DE UM LOCAL DE INTERAÇÃO ENTRE ENZIMA E SUBSTRATO ESPECÍFICO PARA UMA PROTEASE. OUTROS OBJETOS DA PRESENTE INVENÇÃO SÃO O FORNECIMENTO DE UMA SEQUÊNCIA DE ADN ISOLADA E PURIFICADA QUE CODIFICA A PROTEÍNA INIBIDORA QUIMÉRICA DE UMA PROTEASE, UM VETOR DE EXPRESSÃO CARACTERIZADO POR COMPREENDER A MENCIONADA SEQUÊNCIA DE ADN ISOLADA E PURIFICADA, UMA CÉLULA HOSPEDEIRA EUCARIÓTICA OU PROCARIÓTICA TRANSFORMADA COM ESTE VETOR DE EXPRESSÃO E UM MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA INIBIDORA QUIMÉRICA.

RESUMO

"PROTEÍNAS INIBIDORAS DE UMA PROTEASE E USO DAS MESMAS"

A presente invenção refere-se a uma proteína inibidora quimérica de uma protease compreendendo uma sequência polipeptídica inibidora e pelo menos uma sequência polipeptídica de um local de interação entre enzima e substrato específico para uma protease. Outros objetos da presente invenção são o fornecimento de uma sequência de ADN isolada e purificada que codifica a proteína inibidora quimérica de uma protease, um vetor de expressão caracterizado por compreender a mencionada sequência de ADN isolada e purificada, uma célula hospedeira eucariótica ou procariótica transformada com este vetor de expressão e um método de produção de uma proteína inibidora quimérica.

DESCRIÇÃO

"PROTEÍNAS INIBIDORAS DE UMA PROTEASE E USO DAS MESMAS"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma proteína inibidora recombinante de uma protease compreendendo uma sequência polipeptídica inibidora e pelo menos uma sequência polipeptídica de um local de interação entre enzima e substrato específico para protease.

Outros objetos da presente invenção são o fornecimento de uma sequência de DNA isolada e purificada que codifica a proteína inibidora recombinante de uma protease, um vetor de expressão caracterizado por compreender a referida sequência de DNA isolada e purificada, uma célula hospedeira eucariótica ou procariótica transformada com este vetor de expressão e um método de produção de uma proteína inibidora recombinante.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Dentre todas as proteínas expressas por organismos vivos, as proteases encontram-se entre as mais críticas na mediação dos processos de vida e morte celular. De facto, as interações iniciais entre protease e substrato e subsequente divisão repousam na base de amplo espetro de eventos biológicos essenciais que incluem trombose, coagulação e apoptose.

A proteólise desregulada ou desequilíbrio entre proteases e antiproteases foi pesquisada intensamente com base na suspeita de que poderia ser fator fundamental em muitas patologias em que as proteases tenham sido envolvidas,

tais como o cancro, doenças autoimunes, inflamações e doenças infecciosas. Estudos diferentes realizados com agentes antiproteolíticos em modelos de cancro e doenças inflamatórias (tais como artrite reumatoide e enfisema) também demonstraram interessante melhoria de resultados, fortalecendo a terapia antiproteolítica e o papel de equilíbrio entre proteases e antiproteases.

No cancro da próstata, por exemplo, que é um dos cancros mais comuns diagnosticados em homens norte-americanos, acredita-se que as proteases desempenhem papel fundamental no comportamento maligno de células cancerosas, incluindo rápido crescimento de tumores, invasão e metástase.

A proteína calicreína glandular humana (hK2) é uma serino-protease similar a tripsina expressa predominantemente no epitélio da próstata. Isolada primeiramente a partir de plasma seminal humano, a hK2 recentemente surgiu como marcador de diagnóstico para cancro da próstata *(Deperthes et al*, 1995, *Isolation of Prostatic Kallikrein hK2, Also Known as hGK-1, in Human Seminal Plasma"*, Biochim. Biophys. Acta 1245, 311-6).

Além do seu papel como marcador, as suas atividades proteolíticas sugerem que a hK2 poderia contribuir para a progressão do cancro. Várias funções potenciais para esta enzima foram propostas, incluindo a ativação de ativador de plasminogénio do tipo uroquinase e desativação de inibidor 1 ativador de plasminogénio, ativação de pro-PSA, degradação de fibronectina e degradação de proteína de união de fator de crescimento similar a insulina (IGF-BP) (para análise, vide Cloutier *et al*, 2004, "Development of Recombinant Inhibitors Specific to Human Kallikrein 2

Using Phase-Display Selected Substrates", Eur. J. Biochem. 3, 607-13).

Demonstrou-se recentemente que a calicreína hK2 pode formar um complexo específico com inibidor de protease, conhecido como PI-6, em cancros e, particularmente no cancro da próstata. Com base na descoberta deste complexo específico, as Patentes US 6.284.873 e 6.472.143 fornecnum método de diagnóstico para determinar a presença ou ausência de cancro ou necrose de tecidos.

Considerando a sua expressão específica em tecido da próstata e o envolvimento de todos os seus substratos potenciais no desenvolvimento de cancro, hK2 também é considerada alvo terapêutico potencial (Darson *et al*, 1997, "Human Glandular Kallikrein 2 (hK2) Expression in Prostatic Intraepithelial Neoplasia and Adenocarcinoma: a Novel Prostate Cancer Marker", *Urology* 49, 857-62). Portanto, o desenvolvimento de inibidores de protease específicos e de longa duração, especialmente inibidores de calicreína, seria útil.

Estes possíveis inibidores de protease podem ser selecionados dentre a família serpina (inibidores de serino protease), que é uma família grande de proteínas relacionadas com a regulação de processos fisiológicos complexos. Estas proteínas de cerca de 45 kDa podem ser subdivididas em dois grupos, um que é inibidor e outro não inibidor.

As serpinas contêm um circuito de local reativo flexível exposto ou circuito de serpina reativo (RSL), que é relacionado com a interação com a suposta proteinase alvo.

Após a união à enzima e divisão da união que pode ser partida P1-P1' do RSL, é formado um complexo covalente (Huntington *et al.*, 2000, "Structure of a Serpina-Protease Complex Shows Inhibition by Deformation", Nature 407, 923-6). A formação deste complexo induz redisposição conformacional importante e, desta forma, captura irreversivelmente a protease alvo. A especificidade inibidora de serpinas é grandemente atribuída à natureza dos resíduos nas posições P1-P'1 e o comprimento do RSL. A mudança do domínio de RSL ou do local reativo de serpinas é uma abordagem para compreender o processo inibidor entre um serpina e uma enzima e desenvolver inibidores específicos (Dufour *et al.*, 2001, "The Contribution of Arginine Residues Within the P6-P1 Region of Alpha 1-Antitrypsin to its Reaction with Furin", J. Biol. Chem. 276, 38971-9 e Plotnick *et al.*, 2002, "The Effects of Reactive Site Location on the Inhibitory Properties of the Serpina Alpha (1)-Antichymotrypsin", *J. Biol. Chem.* 277, 29927-35).

Várias serpinas, tais como inibidor da proteína C, α2 antiplasmina, antitrombina-III, α1-antiquimotripsina (ACT) ou inibidor de protease 6 foram identificadas como inibidores de hK2 (Saedi *et al.*, 2001, "Human Kallikrein 2 (hK2), but not Prostate-Specific Antigen (PSA), Rapidly Complexes with Protease Inhibitor 6 (P/-6) Released from Prostate Carcinoma Cells", Int. J. Cancer 94, 558-63). A formação relativamente lenta de complexos entre hK2 e ACT é principalmente atribuída aos resíduos Leu 358 - Ser 359 nas posições P1-P'1 do RSL, união de peptídeo desfavorável para esta enzima similar a tripsina.

Até o momento, somente seleções de novos inibidores de

calicreína, que inibem especificamente a calicreína do plasma, e seu uso em métodos terapêuticos e de diagnóstico foram descritos (Patentes US 6.057.287, 6.333.402, 5.994.125 e 5.795.865). Entretanto, estas patentes descrevem a produção de inibidores que são homólogos a domínios Kunitz inibidores de tripsina pancreática bovina e especialmente proteínas que são homólogas a domínios Kunitz inibidores da coagulação associada a lipoproteína (LACI), que inibem especificamente calicreínas do plasma.

Um outro documento, designadamente o US 5.827.662, descreve um método para a produção de inibidores de protease recombinante (variantes Antiquimotripsina) capazes de modular eficazmente a atividade da protease da serina. Estes inibidores compreendem sempre uma região de charneira de um circuito de serpina reativo (RSL), que tem sequências de aminoácidos modificadas. A região de charneira é parte do RSL e estende-se a partir das posições a P14 a P9.

WO95/27053, em nome da Universidade da Pensilvânia, fornece análogos de alfa-1-antiquimotripsina com substituições de aminoácidos na posição 358 ou nas posições 356-361. Estes análogos exibem atividade inibidora da quimase e são utilizados na preparação de medicamentos para o tratamento de inflamação pulmonar, lesões de reperfusão ou a prevenção de coágulos sanguíneos. Não há indicação de que estes análogos possam ser utilizados quer para a inibição da atividade de calicreína, ou para o tratamento de cancro.

Além de serem específicos para calicreína do plasma, estes inibidores são moléculas bastante pequenas e unem-se a

calicreína do plasma de maneira reversível. Uma das principais desvantagens desta abordagem é que o uso de proteínas que inibem os seus alvos de maneira reversível corre o risco de que a descomplexação da protease restaure a sua atividade.

Portanto, uma vantagem do uso de inibidores maiores, conforme descrito no presente documento, é que ele gera a formação de complexos covalentes que inibem a protease alvo de maneira irreversível. Uma vantagem adicional da presente invenção é que grandes complexos covalentes são conhecidos por serem rapidamente eliminados de circulação.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

O objeto da presente invenção é, portanto, de fornecer uma proteína inibidora da protease com alta especificidade para a referida protease e seu uso em composição farmacêutica. Esta proteína inibidora compreende uma sequência serpina em que o Circuito de Serpina Reativo P6-P6' da referida sequência serpina compreende pelo menos um local ativo em substrato consistindo de uma sequência pentapeptídica selecionada de entre SSRTE, KTRSN, ISPRS, GVFRS, GTVRS, ETKRS, LGRSL, RGRSE, RRSID, VSRSP, PFRSS, RSGSV, ARARS, SDRTA, KLRTT, RAAMM, TRAPM, DVRAA, PGRAP, VESRA, ARASE, TLQRV, RLERV, ERVSP, SSPRV, RVGPY, PSARM, RGRMA, TVRMP, LRMPT, HRMSS, RPQEL,VRPLE, SGRLA, GTLRF, QWRNS, RNDKL, MRNRA, TRDSR, TGSRD, IMSRQ, LTTSK, PFRKI específicas para a referida Calicreína, fragmentos biologicamente ativos das mesmas, quimera molecular das mesmas, e/ou uma combinação das mesmas

Outro objeto da presente invenção é o de fornecer uma sequência de DNA isolada e purificada que codifica a

proteína inibidora recombinante de uma Calicreína, um vetor de expressão caracterizado por compreender a referida sequência de DNA isolada e purificada e uma célula hospedeira eucariótica ou procariótica transformada com este vetor de expressão.

Um objeto adicional da presente invenção é o de fornecer um método de produção da proteína inibidora recombinante de uma Calicreína. Este método compreende as etapas de:

(a) seleção de uma sequência polinucleotídica que codifica um local ativo de substrato específico para a mencionada Calicreína, a referida sequência consistindo de uma sequência pentapeptídica selecionada de entre SSRTE, KTRSN, ISPRS, GVFRS, GTVRS, ETKRS, LGRSL, RGRSE, RRSID, VLRSP, PFRSS, RSGSV, ARARS, SDRTA, KLRTT, RAAMM, TRAPM, DVRAA, PGRAP, VESRA, ARASE, TLQRV, RLERV, ERVSP, SSPRV, RVGPY, PSARM, RGRMA, TVRMP, LRMPT, HRMSS, RPQEL, VRPLE, SGRLA, GTLRF, QWRNS, RNDKL, MRNRA, TRDSR, TGSRD, IMSRQ, LTTSK, PFRKI específicas para a referida Calicreína, uma quimera molecular das mesmas, e/ou uma combinação das mesmas,

(b) introdução da mencionada sequência pentapeptídica numa sequência que codifica uma sequência de serpina, de forma a obter uma proteína inibidora recombinante da mencionada Calicreína,

(c) permitir a expressão da mencionada proteína inibidora recombinante da mencionada Calicreína num sistema de expressão celular sob condições apropriadas,

(d) e recuperação da proteína inibidora recombinante da mencionada Calicreína.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 representa análise de SDS-PAGE sob condições redutoras de ACT recombinante purificado. Variante 6.1 (linha 1) e ACT do tipo selvagem (linha 2).

A Figura 2 exibe a estequiometria de inibição (SI) de hk2 por $rACT_{WT}$ e suas variantes. A SI foi determinada utilizando análise de regressão linear para extrapolar a razão I/E (ou seja, a interceção x).

As Figuras 3A e B exibem a formação de complexo entre hK2 e inibidores recombinantes. As setas indicam hK2 (E), inibidor (I) e complexo hK2-ACT (E-I).

As Figuras 4A e B exibem a inibição de hK2 por rACTwr e suas variantes sob condições de pseudoprimeira ordem. A interação de hK2 e serpinas recombinantes foi medida sob condições de pseudoprimeira ordem utilizando o método de curva de progresso.

A Figura 5 corresponde à determinação da pureza dos inibidores por análise de SDS-PAGE sob condições redutoras de inibidores desenvolvidos nos Exemplos 1 e 2 sob condições de redução SDS-PAGE.

As Figuras 6A e B exibem análise Western Blot da reação inibidora entre ACT recombinante e as calicreínas humanas hK2 (Figura 6A) e PSA (Figura 6B).

A Figura 7A exibe as sequências de DNA e proteína de MD820.

A Figura 7B exibe as sequências de DNA e proteína de

MD62.

A Figura 7C exibe as sequências de DNA e proteína de MD83.

A Figura 7D exibe as sequências de DNA e proteína de MD67.

A Figura 7E exibe as sequências de DNA e proteína de MD61.

A Figura 7F exibe as sequências de DNA e proteína de MD518.

A Figura 7G exibe as sequências de DNA e proteína de MDCI.

A Figura 8 representa uma comparação de sequências de RSL de inibidores de ACT e MD. Os resíduos em tipo normal são comuns para ACT_{WT}, resíduos sublinhados e em negrito correspondem a mutação de RSL de variantes de ACT. O suposto local de divisão em serpinas é marcado por asteriscos entre os resíduos PIP1'.

A Figura 9 representa o mapa de vetor de expressão de pQE9.

A Figura 10A exibe a inibição de crescimento de tumor por MD 62. Células cancerígenas da próstata DU-145 (3 x 10^6 células), transfectadas com calicreína humana 2, foram implantadas em ratinhos brutos e tratadas em seguida com MD 62 (5 ou 25 µg/injeção).

A Figura 10B exibe a inibição de crescimento de tumor por MD 67. Células cancerígenas da próstata DU-145 (3 x 10^6 células), transfectadas com calicreína humana 2, foram implantadas em·ratinhos brutos e tratadas em seguida com MD 67 (5 ou 25 µg /injeção).

A Figura 11 exibe a inibição do crescimento de tumor por

MD CI. Células cancerígenas da próstata DU-145 (3 x 10^6 células), transfectadas com calicreína humana 2, foram implantadas em ratinhos brutos e tratadas em seguida com MD CI (5 ou 50 µg /injeção).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma proteína inibidora recombinante de uma calicreína compreendendo uma sequência de serpina, em que o Circuito de Serpina Reativo P6-P6' da referida sequência de serpina compreende pelo menos um local ativo de substrato, que consiste de uma sequência pentapeptídica selecionada a partir de SSRTE, KTRSN, ISPRS, GVFRS, GTVRS, ETKRS, LGRSL, RGRSE, RRSID, VLRSP, PFRSS, RSGSV, ARARS, SDRTA, KLRTT, RAAMM, TRAPM, DVRAA, PGRAP, VESRA, ARASE, TLQRV, RLERV, ERVSP, SSPRV, RVGPY, PSARM, RGRMA, TVRMP, LRMPT, HRMSS, RPQEL,VRPLE, SGRLA, GTLRF, QWRNS, RNDKL, MRNRA, TRDSR, TGSRD, IMSRQ, LTTSK, PFRKI específicas para a referida Calicreína, uma quimera molecular das mesmas, e/ou uma combinação das mesmas.

"Proteína inibidora quimérica" designa uma proteína que compreende dois ou mais polipeptídeos, que são de diferentes origens, ou seja, que não ocorrem juntos na natureza.

Da forma utilizada no presente documento, os termos "proteína", "polipeptídeo", "polipeptídico", "peptídeo" e "peptídico" são utilizados de forma intercambiável no presente documento para designar uma série de resíduos de aminoácidos conectados entre si por uniões de peptídeos entre os grupos alfa-amino e carboxi de resíduos adjacentes.

A proteína da invenção é um inibidor de protease e é composta de uma sequência polipeptídica inibidora e, pelo menos, uma sequência polipeptídica de um local de interação de enzima e substrato para a referida protease. A sequência polipeptídica de um local de interação de enzima e substrato confere propriedades altamente seletivas do inibidor em direção a uma protease específica e esta sequência polipeptídica é selecionada com base na protease a ser inibida.

Tipicamente, esta sequência polipeptídica de um local de interação de enzima e substrato pode ser uma sequência de local ativo de substrato. "Sequência de local ativo de substrato" designa uma sequência encontrada sobre um substrato e que é um local de reconhecimento preferencial para uma protease. O reconhecimento da sequência de local ativo de substrato por uma protease pode gerar a ativação, desativação ou degradação do substrato e, na maior parte do tempo, esta interação de alta afinidade envolve o reconhecimento não apenas de uma sequência específica, mas também da sua conformação 3-D.

Também é englobada pela presente invenção uma quimera molecular da sequência de locais ativos do substrato. Por "quimera molecular", designa-se uma sequência de polinucleotídeos que pode incluir uma parte funcional da sequência de locais ativos do substrato e que será obtida, por exemplo, por técnicas de química de proteína conhecidas dos peritos na arte.

Combinações específicas da sequência de locais ativos de substrato também são consideradas na presente invenção.

A presente invenção também inclui variantes da sequência de locais ativos do substrato. O termo "variantes" designa polipeptídeos que contêm sequências de aminoácidos que diferem até certo ponto de um polipeptídeo de sequência nativa, ou seja, sequências de aminoácidos que variam da sequência nativa por substituições de aminoácidos conservadoras, em que um ou mais aminoácidos são substituídos por outros com as mesmas características e papéis de conformação. As variantes de sequências de aminoácidos possuem substituições, exclusões e/ou inserções em certas posições dentro da sequência de aminoácidos da sequência de aminoácidos nativa. As substituições de aminoácidos conservadoras são definidas no presente documento como trocas dentro de um dos cinco grupos a seguir:

I. Resíduos alifáticos, não polares ou levemente polares pequenos: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly
II. Resíduos polares carregados positivamente: His, Arg, Lys.
III. Resíduos polares carregados negativamente: e suas amidas: Asp, Asn, Glu, Gln.
IV. Resíduos aromáticos grandes: Phe, Tyr, Trp.
V. Resíduos não polares alifáticos grandes: Met, Leu, IIe, Val, Cys.

Preferencialmente, o substrato de acordo com a presente invenção é serpina; neste caso, a sequência de locais ativos do substrato pode ser uma sequência de Circuito de Serpina Reativo, uma das suas quimeras moleculares, uma das suas combinações e/ou suas variantes.

"Circuito de Serpina Reativo" ou "Circuito de Local Reativo", ou RSL, designa um circuito de local reativo flexível exposto encontrado em serpina e que é relacionado com a interação com a suposta protease alvo. A partir do resíduo sobre o lado de aminoácido da união que pode ser rompida e movendo-se para longe da união, os resíduos são convencionalmente denominados P1, P2, P3 etc. Os resíduos que se seguem à união que pode ser rompida são denominados P1', P2', P3' etc. Normalmente, o RSL é composto de 6 a 12 resíduos de aminoácidos.

Esta sequência de RSL pode ser selecionada a partir do grupo compreendendo SEQ ID No 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22, suas quimeras moleculares, suas combinações e/ou suas variantes.

A sequência de RSL pode também ser selecionada entre as possibilidades a seguir, exibidas na Tabela I.

TABELA I

Posição no RSL que pode ser modificada								
P5	P4	P3	P2	**P1**	P1'	P2'	P3'	P4'
		S	S	**R**	T	E		
		K	T	**R**	S	N		
	I	S	P	**R**	S			
	G	V	F	**R**	S			
	G	T	V	**R**	S			
	E	T	K	**R**	S			
		L	G	**R**	S	L		
		R	G	**R**	S	E		
			R	**R**	S	I	D	
		V	L	**R**	S	P		
		P	F	**R**	S	S		
				R	S	G	S	V
	A	R	A	**R**	S			
		S	D	**R**	T	A		
		K	L	**R**	T	T		
				R	A	A	M	M
			T	**R**	A	P	M	
		D	V	**R**	A	A		

		P	G	**R**	A	P		
	V	E	S	**R**	A			
			A	**R**	A	S	E	
	T	L	Q	**R**	V			
	R	L	E	**R**	V			
			E	**R**	V	S	P	
	S	S	P	**R**	V			
				R	V	G	P	Y
	P	S	A	**R**	M			
		R	G	**R**	M	A		
		T	V	**R**	M	P		
			L	**R**	M	P	T	
			H	**R**	M	S	S	
				R	P	Q	E	L
			V	**R**	P	L	E	
		S	G	**R**	L	A		
	G	T	L	**R**	F			
		Q	W	**R**	N	S		
				R	N	D	K	L
			M	**R**	N	R	A	
			T	**R**	D	S	R	
		T	G	**S**	R	D		
		I	M	**S**	R	Q		
L	T	T	S	**K**				
	P	F	R	**K**	I			

Sequência de aminoácidos de resíduos P4-P3' em RSL (Circuito de Serpina Reativo) correspondente a peptídeo de substrato potencial.
Os espaços em branco indicam que não é necessário modificação para obter especificidade de substrato para hK2.

Normalmente a protease é selecionada a partir do grupo compreendendo enzimas calicreína, quimotripsina (Chtr), uroquinase (uPA) e elastase de neutrófilos humanos (HNE). Preferencialmente, a protease é calicreína humana, de preferência superior, esta calicreína humana é hK2 (também conhecida como hGK-1).

A HK2 pertence à família de genes de calicreína que é composta de 15 membros, mas somente o Antígeno Específico da Próstata (PSA ou hK3) e hK2 são expressos em alto nível pela próstata. Um papel fisiológico potencial de hK2 é a degradação proteolítica do gel de captura de esperma

formado imediatamente após a ejaculação, particularmente a divisão de semenogelinas e fibronectina. Além disso, demonstrou-se em teste *in vitro* que hK2 pode aumentar a ação mitogénica do fator de crescimento similar a insulina (IGF) por meio de hidrólise de proteína de união de IGF. Estudos *in vitro* também demonstraram que hK2 ativa a prouroquinase, gera substâncias similares a bradiquinina a partir de quininogenes (potencial ativação cruzada de recetores de EGF por meio de recetores de B2 bradiquinina) e converte proPSA em forma ativa. Estas atividades de hK2 representam argumentos a favor de papel potencial de hK2 na degradação de proteínas de matriz extracelular e, consequentemente, o destacamento e migração de células cancerígenas da próstata. Além disso, hK2 poderá aumentar o desenvolvimento de cancro da próstata por meio de libertação de fator mitogénico e ativação de recetores do crescimento.

Caso a protease a ser inibida seja uma protease de cisteína, esta protease é selecionada a partir do grupo compreendendo catepsinas (subtipos K, L e S), a tiol proteinase de pró-hormona e a família de caspase (Caspases 1, 3, 4 e 8).

As proteases de cisteína, que são enzimas proteolíticas que utilizam um resíduo de cisteína para a sua atividade catalítica, podem ser agrupadas em pelo menos 30 famílias de proteínas. Cada família contém proteínas com sequências de aminoácidos similares e motivos de sequências evolucionariamente conservadas que refletem as estruturas 3D similares do membro da família.

A sequência polipeptídica inibidora da proteína inibidora

recombinante é normalmente uma protease de serina ou cisteína.

Caso a sequência polipeptídica inibidora esteja na forma de uma protease de serina, esta sequência polipeptídica inibidora é preferencialmente uma sequência de serpina, seus fragmentos, uma das suas quimeras moleculares, uma combinação destes e/ou suas variantes.

Esta sequência de serpina pode ser selecionada a partir do grupo compreendendo a α-1antiquimotripsina (ACT), inibidor de proteína C (PCI), α-1antiproteinase (AAT), precursor de proteína relativa a α-1antitripsina (ATR) humana, inibidor de α-2-plasmina (AAP), precursor anti-trombina-III humano (ATIII), inibidor 10 de protease (PI 10), precursor de proteína 2 de união de colagénio humano (CBP2), inibidor de protease 7 (PI7), leuserpina 2 inibidora de protease (HLS2), inibidor de protease C1 de plasma humano (C1 INH), inibidor de elastase de monócito/neutrófilo (M/NEI), inibidor 3 ativador de plasminogénio (PAI3), inibidor de protease 4 (PI4), inibidor de protease 5 (PI5), inibidor de protease 12 (PI12), precursor inibidor 1 ativador de plasminogénio humano endotelial (PAI-1), inibidor 2 ativador de plasminogénio humano placentário (PAI2), precursor de fator derivado de epitélio de pigmento humano (PEDF), inibidor de protease 6 (PI6), inibidor de protease 8 (PI8), inibidor de protease 9 (PI9), antígeno 1 de carcinoma de células escamosas humanas (SCCA-1), antígeno 2 de carcinoma de células escamosas humanas (SCCA-2), globulina de união de T4 (TBG), Megsin e inibidor 14 de protease (PI14), seus fragmentos, suas quimeras moleculares, combinações e/ou suas combinações.

Como a maior parte destas serpinas possui nomes diferentes, incluímos abaixo uma tabela que resume as suas especificações:

TABELA II

SERPINA	Número de acesso	Sequência de RSL
PI ou AAT, A1AT_PRECURSOR DE ALFA-1-ANTITRIPSINA HUMANA (INIBIDOR DE ALFA-1 PROTEASE) (ALFA-1-ANTIPROTEINASE)	sp|P01009|	GTEAAGAMFLEAIPMSIPPE
PIL ou ATR, A1AU_PRECURSOR DE PROTEÍNA RELATIVO A ALFA-1- ANTITRPSINA	sp|P20848|	GTEATGAPHLEEKAWSKYQT
PLI ou AAP, A2AP_PRECURSOR DE ALFA-2-ANTIPLASMINA HUMANO (INIBIDOR DE ALFA-2-PLASMINA) (ALFA-2-PI) (ALFA-2-AP)	sp|P08697|	GVEAAAATSIAMSRMSLSSF
AACT, AACT_PRECURSOR DE ALFA-1-ANTIQUIMOTRIPSINA HUMANA (ACT)	sp|P01011|	GTEASAATAVKITLLSALVE
AT3, ANT3_PRECURSOR DE ANTITROMBINA III HUMANA (ATIII)	sp|P01008|	GSEAASTAWIAGRSLNPN
PL10, BOMA_BOMAPINA humana (inibidor de protease 10)	sp|P48595|	GTEAAAGSGSEIDIRIRVPS
CBP2, CBP2_precursor de proteína 2 de ligação a colgénio humana (coligina 2)	sp|P50454|	GNPFDQDIYGREELRSPKLF
Pl7 ou PN1, GDN_PRECURSOR DE NEXINA DERIVADO DE GLIA HUMANA (GDN) (PROTEASE NEXINA I) (PN-1) (INIBIDOR DEPROTEASE 7)	sp|P07093|	GTKASAATTAILIARSSPPW
HCF2, PRECURSOR COFATOR II DE HEPARINA HUMANA (HC-II) (INIBIDOR DE PROTEASE LEUSERPINAA 2) (HLS2)	sp|P05546|	GTQATTVTTVGFMPLSTQVR
C1NH ou C1IN, IC1_PRECURSOR INIBIDOR DE PROTEASE C1 DE PLASMA HUMANO (C1 INH)	sp|P05155|	GVEAAAASAISVARTLLVFE
ELANH2 ou PL2, ILEU_INIBIDOR DE ELASTASE DE LEUCÓCITO HUMANO (LEI) (INIBIDOR DE ELASTASE DE MONÓCITO/NEUTRÓFILO) (MINEI) (EI)	sp|P30740|	GTEAAATAGIATFCMLMPE
PCI ou PLANH3 ou PROCI, IPSP_PRECURSOR INIBIDOR DE SERINO PROTEASE DE PLASMA HUMANO (PCI) (INIBIDOR DE PROTEÍNA C) (INIBIDOR 3 ATIVADOR DE PLASMINOGÉNIO) (PAI3)	sp|P05154|	GTRAAAATGTIFTFRSARLN
PL4 ou KST, KAIN_PRECURSOR DE CALISTATINA HUMANA (INIBIDOR DE CALICREÍNA) (INIBIDOR DE PROTEASE 4)	sp|P29622|	GTEAAAATTFAIKFFSAQTN
PI5, MASP_PRECURSOR DE MASPINA HUMANA (INIBIDOR DE PROTEASE 5)	sp|P36952|	GGDSIEVPGARILQHKDELN
PI12, NEUS_PRECURSOR DE NEUROSERPINA HUMANO (INIBIDOR DE PROTEASE 12)	sp|099574|	GSEAAAVSGMIAISRMAVLY
PAI1 ou PLANH1, sp|P05121|PAI1_PRECURSOR INIBIDOR-1 ATIVADOR DE PLASMINOGÉNIO	sp|P05121|	GTVASSSTAVIVSARMAPEE

HUMANO, ENDOTELIAL (PAI-1)		
PAI2 OU PLANH2, PAI2_INIBIDOR-2 ATIVADOR DE PLASMINOGÉNIO HUMANO (PAI-2) (MONÓCITO ARG-SERPINA) (INIBIDOR DE UROQUINASE)	sp|P05120|	GTEAAAGTGGVMTGRTGHGG
PEDF, PEDF_PRECURSOR DE FATOR DERIVADO DE EPITÉLIO DE PIGMENTO HUMANO (PEDF) (EPC-1)	sp|P36955|	GAGTTPSPGLQPAHLTFPLD
PI6 ou PTI, PTI6_INIBIDOR DE TROMBINA PLACENTÁRIA HUMANA (ANTIPROTEINASE CITOPLÁSMICA) (CAP) (INIBIDOR DE PROTEASE 6)	sp|P35237|	GTEAAAATAAIMMMRCARFV
PI8, PTI8_ANTIPROTEINASE 2 CITOPLÁSMICA HUMANA (CAP2) (CAP-2) (INIBIDOR DE PROTEASE 8)	sp|P50452|	GTEAAAATAWRNSRCSRME
PI9, PTI9_ANTIPROTEINASE 3 CITOPLÁSMICA HUMANA (CAP-3) (INIBIDOR DE PROTEASE 9)	sp|P50453|	GTEAAAASSCFVVAECCMES
SCCA1, SCC1_ANTÍGENO 1 DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS HUMANAS (SCCA-1) (PROTEÍNA T4-A)	sp|P295081	GAEAAAATAVVGFGSSPAST
SCCA2, SCC2_ANTÍGENO 2 DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS HUMANAS (SCCA-2} (LEUPINA)	sp|P48594|	GVEAAAATAWWELSSPST
TBG,THBG_PRECURSOR DE GLOBULINA DE UNIÃO DE TIROXINA HUMANA (GLOBULINA DE UNIÃO DE T4)	sp|P05543|	GTEAAAVPEVELSDQPENTF
MEGSINA	gi|4505149|ref|N P 003775.1|	GTEATAATGSNIVEKQLPQS
PI14, pancpin, TSA2004	gi|374282|dbJ|BAA33766.1|	GSEAATSTGIHIPVIMSLAQ

Como exemplo de proteínas inibidoras recombinantes de uma Calicreína de acordo com a presente invenção, os Requerentes descobriram surpreendentemente 6 novas proteínas inibidoras quiméricas específicas para a protease hK2 conforme resumido abaixo na Tabela III, estes inibidores são:

TABELA III

Inibidores Recombinantes	Outro nome	SEQ ID No (proteína)
rACT$_{8.20}$	MD820	2
rACT$_{6.2}$	MD62	4
rACT$_{8.3}$	MD83	6
rACT$_{6.7}$	MD67	8
rACT$_{6.1}$	MD61	10
ACT$_{5.18}$	MD518	12

Estas proteínas inibidoras recombinantes foram obtidas por meio da modificação do RSL de α1-antiquimotripsina (rACT), que é conhecida por inibir grande variedade de enzimas humanas tais como quimotripsina, quimase de células mastro, catepsina G, calicreínas prostáticas hK2 e PSA (hK3), a fim de modificar a especificidade desta serpina. Sequências de peptídeos, selecionadas como substratos para a enzima hK2 por meio de tecnologia de exibição de fagos conforme explicado em detalhes no Exemplo 1, foram utilizadas para substituir a união que pode ser rompida e os resíduos de aminoácidos vizinhos do RSL. Inibidores recombinantes foram produzidos em bactérias e purificados por meio de cromatografia de afinidade.

Em comparação com rACT do tipo selvagem, que inibiu hK2 muito lentamente (12 a 16 horas), concluiu-se que os rACTs modificados formam um complexo covalente muito rapidamente em poucos minutos. Três das seis variantes de rACTs foram específicas para hK2 com constantes de alta associação (vide Tabelas V e VI). Em incubação com excesso de inibidores ($[I]_o/[E]_o$ de 100:1) por 30 minutos, hK2 é completamente inibido por $rACTs_{6.2}$, $rACT_{8.3}$. $rACT_{6.7}$ e $rACT_{6.1}$, enquanto $rACT_{8.20}$ e $rACT_{5.18}$ inibiram 95% e 73% da atividade enzimática, respetivamente. Sob esta condição, rACT do tipo selvagem não exibiu atividade de inibição para hK2. Dentre estas variantes, duas ($rACT_{8.3}$ e $rACT_{5.18}$) são específicas para hK2, não inibindo nenhuma outra enzima testada. Duas outras variantes, $rACT_{6.7}$ e $rACT_{6.2}$, inibiram também PK a 36% e 100%, respetivamente. Como ACT do tipo selvagem, a variante $rACT_{8.20}$ inibiu as duas proteases similares a quimotripsina Chtr e PSA, mas adicionalmente também PK e HNE. Nenhuma das serpinas

recombinantes exibiu atividade inibidora contra a calicreína hK1 e uPA.

Além disso, os requerentes também concluíram que a substituição dos resíduos P3-P3' posicionados na estrutura de RSL de $rACT_{WT}$ por meio de codificação de pentapeptídeos de substrato para o RSL de inibidor de proteína C (PCI) gera a produção de um inibidor quimérico (MDCI) que é capaz de inibir calicreínas hK2 e hK3.

Portanto, o inibidor quimérico de uma protease pode ser selecionado a partir do grupo compreendendo MD820, MD62, MD61, MD67 e MDCI. Preferencialmente, esta proteína inibidora recombinante é MD62 ou MD61.

Sabe-se que um valor de Estequiometria de Inibição (SI) superior a um é geralmente interpretado como comportamento de substrato de serpina. Neste esquema, após a formação de complexo de Michaelis inicial e divisão no RSL, a maior parte do complexo é decomposta em enzima ativa e inibidor dividido, que é definitivamente desativado. Os requerentes analisaram reações de hK2 e variantes de ACT para a divisão não formadora de complexos do inibidor, incubando as amostras em excesso de 10:1 vezes entre inibidor e protease. Estas condições, próximas ou abaixo dos valores SI calculados das variantes de ACT testadas (vide Tabela VI), normalmente favorecem a proteólise de serpinas ou complexos de serpina e protease. Surpreendentemente, os requerentes observaram discrepância para esta hipótese, pois a degradação de ACTs variantes por hK2 não foi observada, apesar dos altos valores de SI. Sem desejar restrições à teoria, possível explicação para a falta de degradação de ACT é a condição sob a qual foi realizada a

determinação de SI. Complexos de ACTs e hK2 covalentes estão a se formar *in vitro* muito lentamente. Isso ocorre de acordo com a nossa observação de que, após 30 minutos de incubação a 25 °C, nenhuma inibição de hK2 com ACT do tipo selvagem foi detetada (Tabela V) e que, mesmo após incubação prolongada a 37 °C, hK2 formou complexo apenas parcialmente com ACT do tipo selvagem (Figura 3).

Os requerentes também determinaram a especificidade destes novos inibidores para outras proteases. A avaliação foi realizada sob as mesmas condições para todas as proteases (condições pseudofisiológicas), a fim de garantir melhor tradução para aplicações *in vivo* adicionais. A permuta de local de divisão de RSL por substratos selecionados de exibição de fago de hK2 modificou ACT do tipo selvagem em inibidores altamente sensíveis a hK2. Além disso, dois destes inibidores exibiram reatividade exclusiva com hK2 e não com outras enzimas estudadas conhecidas por dirigirem substratos biológicos similares, tais como calicreína de plasma, hK1, PSA, uroquinase (uPA) e elastase de neutrófilos humanos (HNE). De conhecimento dos requerentes, este é o primeiro relatório que menciona o desenvolvimento de inibidor específico para hK2.

De forma interessante, $rACT_{8.20}$ (MD820) inibe, além de hK2, também quimotripsina e, mais fracamente, calicreína de plasma e elastase humana, o que representa ampla especificidade de inibição.

A sequência polipeptídica inibidora da proteína inibidora quimérica pode também ser selecionada a partir de uma protease de cisteína, pois existe agora uma série de casos bem documentados de inibição de proteases de cisteína por

serpinas (Gettins, P. G. W., 2002, "Serpin Structure, Mechanism and Function" em Chem. Rev., 102, 4751-4803). Estes exemplos incluem a inibição de catepsinas K, L e S pelo antígeno 1 de carcinoma de células escamosas de serpina, inibição de tiol proteinase pró-hormonal pela α-1antiquimotripsina e a inibição de membros da família de caspase, incluindo caspase 1 (enzima conversora de interleucina 1β), caspase 3 e caspase 8 pelo serpina viral crmA e caspases 1, 4 e 8 pela serpina humana P19.

Ao empregar-se técnicas recombinantes para preparar uma proteína inibidora recombinante de uma protease de acordo com a presente invenção, moléculas de ácidos nucleicos ou seus fragmentos que codificam os polipeptídeos são preferencialmente utilizadas.

Portanto, a presente invenção também se refere a uma sequência de DNA isolada e purificada que codifica a proteína inibidora recombinante de uma protease conforme descrito acima.

"Sequência de DNA isolada e purificada" designa o estado em que estará a molécula de ácido nucleico que codifica a proteína inibidora recombinante de uma protease de acordo com a presente invenção ou ácido nucleico que codifica essa proteína inibidora quimérica de uma protease, de acordo com a presente invenção. O ácido nucleico será livre ou substancialmente livre de material com o qual é naturalmente associado, tal como outros polipeptídeos ou ácidos nucleicos com os quais é encontrado no seu ambiente natural, ou no ambiente no qual é preparado (tal como cultivo celular) quando essa preparação for por meio de tecnologia de DNA recombinante praticada *in vitro* ou *in*

vivo.

O DNA que pode ser utilizado no presente documento é qualquer sequência de polidesoxinucleotídeos, que inclui, por exemplo, DNA de cadeia dupla, DNA de cadeia única, DNA de cadeia dupla em que uma ou as duas cadeias são compostas de dois ou mais fragmentos, DNA de cadeia dupla em que uma ou as duas cadeias possuem cadeia principal de fosfodiéster não interrompida, DNA que contém uma ou mais partes de cadeia única e uma ou mais partes de cadeia dupla, DNA de cadeia dupla em que as cadeias de DNA são totalmente complementares, DNA de cadeia dupla em que as cadeias de DNA são ao menos parcialmente complementares, DNA circular, DNA fechado covalentemente, DNA linear, DNA covalentemente reticulado, cDNA, DNA sintetizado quimicamente, DNA semissintético, DNA biossintético, DNA isolado naturalmente, DNA digerido por enzimas, DNA dividido, DNA marcado, tal como DNA radiomarcado e DNA marcado por fluorocromo, DNA que contém uma ou mais espécies de ácido nucleico de ocorrência não natural.

As sequências de DNA que codificam a proteína inibidora recombinante de uma protease, ou um dos seus fragmentos, podem ser sintetizadas por meio de métodos químicos padrão, tais como o método de fosfotriéster ou por meio de métodos de síntese automatizada e métodos de PCR.

A sequência de DNA isolada e purificada que codifica a proteína inibidora quimérica de acordo com a presente invenção pode também ser produzida por meio de métodos enzimáticos. Desta forma, enzimas de restrição, que dividem moléculas de ácido nucleico em sequências de reconhecimento previamente definidas, podem ser utilizadas

para isolar sequências de ácido nucleico de moléculas de ácido nucleico maiores que contêm a sequência de ácido nucleico, tais como DNA (ou RNA) que codifica a proteína inibidora quimérica ou um dos seus fragmentos.

Também é englobado pela presente invenção um ácido nucleico na forma de polirribonucleotídeo (RNA), incluindo, por exemplo, RNA de cadeia única, RNA de cadeia dupla, RNA de cadeia dupla em que uma ou as duas cadeias são compostas de dois ou mais fragmentos, RNA de cadeia dupla em que uma ou as duas cadeias possuem cadeia principal de fosfodiéster não interrompida, RNA que contém uma ou mais partes de cadeia simples e uma ou mais partes de cadeia dupla, RNA de cadeia dupla em que as cadeias de RNA são totalmente complementares, RNA de cadeia dupla em que as cadeias de RNA são apenas parcialmente complementares, RNA reticulado covalentemente, RNA digerido por enzima, RNA dividido, mRNA, RNA quimicamente sintetizado, RNA semissintético, RNA biossintético, RNA isolado naturalmente, RNA marcado, tal como RNA radiomarcado e RNA marcado com fluorocromo, RNA que contém uma ou mais espécies de ocorrência não natural de ácido nucleico.

A sequência de DNA isolada e purificada que codifica um inibidor quimérico de protease é selecionada preferencialmente a partir do grupo compreendendo SEQ ID No 1, SEQ ID No 3, SEQ ID No 5, SEQ ID No 7, SEQ ID No 9, SEQ ID No 1, e SEQ ID No 13.

A presente invenção também inclui variantes das sequências referidas acima, ou seja, sequências de nucleótidos que variam da sequência de referência por substituições de

nucleótidos conservadores, em que um ou mais nucleótidos são substituídos por outro com as mesmas características.

Ainda outra preocupação da presente invenção é o fornecimento de vetor de expressão compreendendo a sequência isolada e purificada que codifica a proteína inibidora quimérica de uma protease, conforme descrito acima. A seleção de vetor de expressão depende diretamente, como é bem conhecido na técnica, das propriedades funcionais desejadas, tais como expressão de proteína inibidora recombinante e a célula hospedeira a ser transformada ou transfectada.

Além disso, o vetor de expressão pode compreender adicionalmente um promotor ligado operativamente à sequência de DNA isolada e purificada. Isso significa que a sequência de DNA isolada e purificada ligada que codifica a proteína inibidora recombinante de uma protease de acordo com a presente invenção encontra-se sob o controle de uma sequência reguladora apropriada que permite a expressão, ou seja, a transcrição e tradução da sequência de DNA isolada e purificada inserida.

Da forma utilizada no presente documento, o termo "promotor'' designa qualquer sequência reguladora adicional conhecida na técnica, tal como um promotor e/ou um amplificador, locais de poliadenilação e junções de divisão normalmente empregadas para a expressão do polipeptídeo ou pode incluir adicionalmente uma ou mais sequências de direcionamento separadas e pode codificar opcionalmente um marcador selecionável. Os promotores que podem ser utilizados, desde que esses promotores sejam compatíveis com a célula hospedeira, são, por exemplo,

promotores obtidos a partir dos genomas de vírus tais como vírus de polioma, adenovírus (tal como Adenovírus 2), vírus de papiloma (tal como vírus de papiloma bovino), vírus de sarcoma aviário, citomegalovírus (tal como promotor precoce imediato de citomegalovírus humano ou murino), retrovírus, vírus da hepatite B e Vírus 40 dos Símios (tal como promotores precoce e posterior de SV40) ou promotores obtidos a partir de promotores mamíferos heterólogos, tais como o promotor de actina ou promotor de imunoglobulina ou promotores de choque de calor.

Os amplificadores que podem ser utilizados são, por exemplo, sequências amplificadoras conhecidas a partir de genes de mamíferos (globina, elastase, albumina, a-fetoproteína e insulina) ou amplificador de um vírus de célula eucariótica, tal como o amplificador SV40, o amplificador promotor precoce de citomegalovírus, o polioma e amplificadores de adenovírus.

Uma ampla variedade de combinações de vetor hospedeiro/de expressão pode ser empregue na expressão das sequências de DNA de acordo com a presente invenção. Os vetores de expressão úteis podem consistir, por exemplo, de segmentos de sequências de DNA sintéticas, cromossómicas e não cromossómicas. Os vetores apropriados incluem derivados de SV40 e plasmídeos bacterianos conhecidos, tais como plasmídeos de *E. coli* col EI, pCR1, pBR322, pMB9 e seus derivados, plasmídeos tais como RP4; DNAs de fagos, tais como os numerosos derivados de fago X, tais como NM989, e outro DNA de fago, tal como M13 e DNA de fago de cadeia única filamentoso; plasmídeos de levedura tais como o plasmídeo 2µ ou seus derivados; vetores úteis em células eucarióticas, tais como vetores úteis em células de

insetos ou de mamíferos; vetores derivados de combinações de plasmídeos e DNAs de fagos, tais como plasmídeos que foram modificados para empregar DNA de fago ou outras sequências de controle de expressão; e similares.

De preferência superior, o vetor de expressão é pQE-9.

Outra preocupação da presente invenção é o fornecimento de uma célula hospedeira eucariótica ou procariótica transformada ou transfectada com um vetor de expressão descrito no presente documento.

A expressão "célula transfectada", "célula transformada" ou "célula transfectada/transformada" indica a célula em que o DNA extracelular foi introduzido e, desta forma, abriga o DNA extracelular. O DNA poderá ser introduzido na célula de tal forma que o ácido nucleico possa ser reproduzido na forma de integrante cromossómico ou como elemento cromossómico adicional.

A transformação ou transfecção de células hospedeiras eucarióticas ou procarióticas apropriadas com um vetor de expressão compreendendo uma sequência de DNA isolada e purificada de acordo com a presente invenção é realizada por meio de métodos bem conhecidos que dependem tipicamente do tipo de vetor utilizado. Com relação a estes métodos, vide, por exemplo, Maniatis *et al.*, 1982, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, e métodos disponíveis comercialmente.

As proteínas inibidoras recombinantes descritas no presente documento são preferencialmente produzidas, de forma recombinante, num sistema de expressão celular.

Uma ampla variedade de células hospedeiras unicelulares é útil na expressão das sequências de DNA de acordo com a presente invenção. Estes hospedeiros podem incluir hospedeiros eucarióticos e procarióticos bem conhecidos, tais como linhagens de *E. coli, Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces,* fungos tais como leveduras e células animais, tais como células CHO, YB/20, NSO, SP2/0, R1.I, B-W e L-M, células de rim de Macaco Verde Africano (tais como COS 1, COS 7, BSC1, BSC40 e BMT1O), células de insetos (tais como Sf9) e células humanas e células vegetais em cultivo de tecido. Preferencialmente, a célula hospedeira é uma célula bacteriana, de maior preferência, uma célula de *E. coli.*

A presente invenção também se refere a uma composição farmacêutica compreendendo a proteína inibidora recombinante descrita no presente documento como agente ativo, opcionalmente em combinação com um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis.

Preferencialmente, além de pelo menos uma proteína inibidora recombinante conforme aqui descrita, a composição farmacêutica pode conter um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis, tais como excipientes, veículos e/ou auxiliares que possibilitam o processamento dos compostos ativos em preparação que pode ser utilizada farmaceuticamente.

Veículos, excipientes ou estabilizantes aceitáveis são não tóxicos para os pacientes nas dosagens e concentrações empregues e incluem tampões tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes, que incluem ácido

ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzil amónio; cloreto de hexametónio; cloreto de benzalcónio; cloreto de benzetónio; álcool fenol, butil orbenzilo; alquil parabenos, tais como metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina de soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos que incluem glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes, tais como EDTA; açúcares, tais como sacarose, manitol, trehalose ou sorbitol; contra-iões formadores de sais, tais como sódio; complexos metálicos (tais como complexos de Zn e proteína); e/ou tensoativos não iónicos, tais como TWEEN®, PLURONICS® ou polietilenoglicol (PEG).

A forma de administração da composição farmacêutica pode ser sistémica ou tópica. A administração dessa composição pode ocorrer, por exemplo, por várias vias parentéricas, tais como vias subcutânea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, transdérmica, bucal ou por meio de dispositivo implantado e pode também ser fornecida por meios peristálticos.

A composição farmacêutica compreendendo uma proteína inibidora recombinante, conforme descrito no presente documento, como agente ativo pode também ser incorporada ou impregnada a uma matriz bioabsorvível, em que a matriz é administrada na forma de uma suspensão de matriz, gel ou suporte sólido. Além disso, a matriz pode ser compreendida

por um biopolímero.

Podem ser preparadas preparações de libertação prolongada. Exemplos apropriados de preparações de libertação prolongada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos que contêm o anticorpo, matrizes estas que se encontram na forma de artigos moldados, tais como filmes ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de libertação prolongada incluem poliésteres, hidrogéis (tais como metacrilato de (poli)2-hidroxietilo ou álcool (poli)vinílico), polilactídeos (Patente US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e L-glutamato de [gama]etilo, etileno-vinil acetato não degradável, copolímeros de ácido láctico e ácido glicólico degradáveis tais como LUPRON DEPOT® (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico e ácido glicólico e acetato de leuprolida) e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

As formulações a serem utilizadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isso é facilmente conseguido, por exemplo, por meio de filtragem através de membranas de filtragem estéreis.

Compreende-se que a dosagem apropriada de proteína inibidora recombinante de acordo com a presente invenção dependerá da idade, sexo, saúde e peso do paciente, tipo de tratamento concorrente, se houver, e da natureza do efeito desejado.

A forma de dosagem apropriada dependerá da doença, da proteína inibidora recombinante e do modo de administração; as possibilidades incluem pastilhas, cápsulas, pastilhas expetorantes, cremes dentais,

supositórios, inaladores, soluções, unguentos e depósitos parentéricos.

Como as modificações de aminoácidos dos aminoácidos da proteína inibidora recombinante também são englobadas na presente invenção, estas podem ser úteis para reticular a proteína inibidora recombinante numa matriz insolúvel em água ou os demais veículos macromoleculares, ou para aumentar a solubilidade, adsorção e permeabilidade ao longo da barreira do cérebro e sangue. Essas modificações são bem conhecidas na técnica e podem alternativamente eliminar ou atenuar qualquer possível efeito secundário indesejável da proteína e similares.

Embora uma composição farmacêutica preferida de acordo com a presente invenção compreenda uma proteína inibidora recombinante como agente ativo, uma composição farmacêutica alternativa pode conter uma sequência de DNA isolada e purificada que codifica a proteína inibidora quimérica de uma protease, conforme descrito no presente documento, como agente ativo. Esta composição farmacêutica pode incluir a sequência de DNA isolada e purificada única, um vetor de expressão compreendendo a referida sequência de DNA isolada e purificada, um vetor de expressão compreendendo a referida sequência de DNA isolada e purificada ou uma célula hospedeira previamente transfectada com um vetor de expressão descrito no presente documento. Neste último exemplo, a célula hospedeira será preferencialmente isolada do paciente a ser tratado, a fim de evitar qualquer problema de antigenicidade. Estas abordagens de terapia genética e celular são especialmente bem apropriadas para pacientes que necessitem da administração repetida da composição

farmacêutica, pois a referida sequência de DNA isolada e purificada, vetor de expressão ou célula hospedeira transfectada anteriormente com um vetor de expressão podem ser incorporadas à célula do paciente que produzirá em seguida a proteína de forma endógena.

O presente relatório descritivo também fornece um método de tratamento ou prevenção de disfunção associada a proteólise em mamíferos compreendendo a administração ao referido mamífero da composição farmacêutica conforme descrito no presente documento.

O presente método de tratamento ou prevenção de disfunção associada a proteólise pode ser útil caso a disfunção seja uma disfunção em que a atividade de hK2 calicreína é prejudicial, tal como um cancro, disfunção autoimune, disfunção inflamatória tal como Hipertrofia Prostática Benigna ou disfunção infecciosa.

O termo "cancro" designa ou descreve a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada pelo crescimento celular desregulado. Exemplos de cancros que podem ser tratados incluem, mas não estão limitados a cancro da próstata, cancro de mama ou cancro metastático.

Em métodos preferidos, o mamífero é um paciente humano e a proteína inibidora recombinante administrada é selecionada a partir dos exemplos de serpina recombinantes da Tabela III, que inibe especificamente a protease de hK2.

Também é englobado pelo âmbito da presente invenção o uso da composição farmacêutica descrita no presente documento para a preparação de medicamento para o tratamento ou

prevenção de uma disfunção associada a proteólise em mamíferos, caso a disfunção seja uma disfunção em que a atividade de calicreína de hK2 seja prejudicial, tal como cancro, disfunção autoimune, disfunção inflamatória tal como Hipertrofia Prostática Benigna ou disfunção infecciosa.

Exemplos de cancros incluem, mas não estão limitados a cancro da próstata, cancro de mama ou cancro metastático.

As proteínas inibidoras recombinantes de acordo com a presente invenção serão geralmente utilizadas em quantidade para atingir o propósito desejado. Para uso no tratamento ou prevenção de disfunção, as proteínas inibidoras recombinantes ou as suas composições farmacêuticas são administradas ou aplicadas em quantidade terapeuticamente eficaz. "Quantidade terapeuticamente eficaz" é a quantidade eficaz para melhorar ou evitar os sintomas, ou prolongar a sobrevivência do paciente a ser tratado. A determinação de quantidade terapeuticamente eficaz encontra-se dentro das capacidades dos técnicos no assunto, especialmente à luz do relatório descritivo detalhado fornecido no presente documento.

Para administração sistémica, quantidade ou dose terapeuticamente eficaz pode ser estimada inicialmente a partir de testes *in vitro*. Uma dose pode ser formulada, por exemplo, em modelos animais para atingir faixa de concentração circulante que inclui o IC_{50} conforme determinado em cultivo celular. Essas informações podem ser utilizadas para determinar mais precisamente doses úteis em seres humanos.

Doses iniciais podem também ser estimadas a partir de dados *in vivo*, tais como modelos animais, utilizando métodos que são bem conhecidos na técnica. Os peritos na arte poderão facilmente otimizar a administração a seres humanos com base em dados de animais e, naturalmente, dependerá do paciente a ser tratado, do peso do paciente, da severidade da disfunção, da forma de administração e da opinião do médico prescrevente.

A presente invenção também engloba um método de produção de uma proteína inibidora recombinante de uma protease, em que o referido método compreende as etapas de:

a) seleção de uma sequência polinucleotídica que codifica um local de interação entre enzima e substrato específico para protease,
   introdução da referida sequência polinucleotídica numa sequência que codifica uma proteína inibidora de uma protease de serina ou cisteína, de forma a obter uma sequência quimérica,
b) permitir a expressão da referida sequência quimérica num sistema de expressão celular sob condições apropriadas,
c) e a recuperação da proteína inibidora quimérica de uma protease.

A seleção de uma sequência polinucleotídica que codifica um local ativo de substrato específico para uma protease pode ser realizada por meio dos diferentes métodos a seguir, tais como exibição de substratos para seleção de protease, como retrovírus de leucemia murina que exibe um peptídeo diretamente a partir de células vivas, de forma a evitar a passagem em bactérias (Buchholz *et al.*, 1998) ou método similar, utilizando bibliotecas de vírus Sindbis

quiméricos que também foi empregada para a seleção *in vivo* de locais de divisão de protease utilizando células de mamíferos transfectadas com a enzima de interesse (Pacini *et al.*, 2000, "In vivo Selection of Protease Cleavage Sites by Using Chimeric Sindbis Vírus Libraries", J. Virol. 74, 22: 10563-70).

Também é idealizado um sistema de leveduras, GASP (teste genético para proteólise específica de local), que consiste na fusão de substratos aleatórios numa proteína de membrana integral, permitindo a ligação do substrato à levedura de membrana, em que fatores de transcrição citoplásmicos podem unir-se ao promotor de um gene relator (Kang *et al.*, 2001, "An Improved Strategy for a Genetic Assay for Site-Specific Proteolysis", Mol. Cell. 30; 11 (2): 263-6).

Emergiu recentemente uma série de bibliotecas químicas combinatórias para determinar a especificidade de substratos de protease. Estas incluem bibliotecas de substratos fluorogénicos combinatórios e bibliotecas combinatórias sintéticas de varrimento posicional.

Outro método, denominado biblioteca de peptídeos imobilizados, permite a determinação da especificidade de substrato relativa (kcat/km) para cada membro da biblioteca por meio da medição da intensidade de fluorescência na fase de solução e para identificar a união que pode ser rompida por meio de sequenciamento de Edman (Hu *et al.*, 2002, "Rapid Determination of Substrate Specificity of Clostridium Histolyticum Beta- Collagenase Using an Immobilized Peptide Library", J. Biol. Chem. 8, 277 (10):8366-71).

Caso a especificidade de substrato de uma protease seja determinada por meio de tecnologia de exibição de fagos, uma biblioteca de peptídeos aleatória exibida por fagos com exaustiva diversidade é gerada e selecionada com protease purificada. Esta técnica conhecida foi adaptada ao caso específico conforme descrito no presente documento, a fim de construir uma biblioteca aleatória exibida por fagos que incluísse toda a combinação de aminoácidos possíveis de comprimento definido de aminoácidos. Desta forma, são construídas bibliotecas grandes por meio da exibição de sequências aleatórias sobre a extremidade de fagos filamentosos, amplificadas e selecionadas em direção a uma protease para testar rapidamente a sua especificidade.

Segundo os Exemplos 1 e 2, os Requerentes construíram uma biblioteca de pentâmeros contendo $1,8 \times 10^8$ transformadores independentes que poderiam ser então considerados completos pois, teoricamente, todas as $3,2 \times 10^6$ sequências aleatórias de pentâmeros possíveis foram representadas. As sequências de fagos confirmaram adicionalmente a aleatoriedade dos insertos de pentâmero. Em seguida, os fagos que exibem os pentapeptídeos aleatórios são fundidos a um ligante (6x His) e são imobilizados sobre um suporte de afinidade, neste caso matriz Ni-NTA. Após a incubação com a protease (no caso dos Exemplos 1 e 2, a protease foi hK2), os fagos que expressam substratos sensíveis são libertados da fase sólida. Os fagos libertados são utilizados para infetar bactérias F-positivas a serem tituladas e amplificadas. Estes fagos são purificados em seguida por meio de precipitação, amplificados e imobilizados em seguida a suporte por afinidade para

proceder a uma nova rodada de seleção. Esta seleção de pentapeptídeos foi repetida 8 vezes no total, a fim de obter sequência polinucleotídica de alta especificidade. Os fagos da última rodada são clonados por meio de colocação em placas sobre placas Petri e o DNA de fagos individuais é amplificado na região que codifica um local ativo de substrato para determinar as sequências divididas pela enzima.

Sequências polinucleotídicas que codificam um local ativo de substrato são introduzidas em seguida numa sequência que codifica um inibidor de protease de serina, tal como numa sequência que codifica rACT, de forma a obter uma sequência recombinante. Dois locais de restrição silenciosos *Sac II* e *MIu I* incorporaram anteriormente 18 bp acima no fluxo e 18 bp abaixo no fluxo de códon P1 em domínio RSL de rACT permitiram a subclonagem da sequência polinucleotídica selecionada que codifica um local ativo de substrato.

Os inibidores quiméricos recombinantes são produzidos, por exemplo, em linhagens de *E. coli* TG1 em condições de cultivo apropriadas. As condições de cultivo apropriadas podem ser compreendidas de 10 a 40 °C durante 10 a 30 horas, dependendo dos inibidores recombinantes a serem expressos. Surpreendentemente, os Requerentes demonstraram que, no caso dos Exemplos 1 e 2, uma temperatura de 16 °C durante 16 horas permite a expressão e a produção de variantes totalmente intactas de rACTs.

Por fim, inibidores recombinantes podem ser recuperados do meio de cultivo, quando o inibidor recombinante é segregado, ou extraídos do sistema de expressão celular

quando o inibidor recombinante não é segregado, e purificados por meio de métodos conhecidos na técnica, tais como cromatografia de líquidos de alto desempenho, eletroforese de gel, cromatografia de afinidade, ultrafiltragem, troca de iões e similares. As condições reais utilizadas para purificar um inibidor quimérico recombinante específico dependerão, em parte, de fatores tais como carga líquida, hidrofobicidade, hidrofilicidade etc. e serão evidentes para os técnicos na arte.

Para purificação por cromatografia de afinidade, qualquer anticorpo que se una especificamente ao inibidor recombinante ou à marca His pode ser utilizado. Outras moléculas de afinidade tais como Ni^{2+} nitrilotriacético ligado a esferas de agarose e que se unem especificamente à marca His também são idealizadas na presente invenção.

As proteínas inibidoras recombinantes podem ser adicionalmente testadas para determinar a sua capacidade de inibição da atividade da protease. Isso pode ser realizado por meio de qualquer método convencional tal como o método de Scatchard (Scatchard, 1949, *Ann. NY Acad. Sci.* 51: 660-669). Este método descreve um método clássico de medição e análise da união que foi aplicada à união de proteínas e necessita de proteína relativamente pura e da capacidade de distinguir proteína unida de não unida.

Um segundo método apropriado para medir a afinidade de proteínas inibidoras recombinantes para enzimas é a medição da capacidade das proteínas inibidoras recombinantes de reduzir a velocidade da ação da enzima. Este método necessita, dependendo da velocidade em que a enzima divide os substratos e da disponibilidade de

substratos cromogénicos ou fluorogénicos, de proteínas inibidoras recombinantes relativamente puras.

Preferencialmente, as proteínas inibidoras recombinantes de acordo com a presente invenção inibem a atividade de protease com afinidade mais alta que os seus parceiros de tipo selvagem.

As proteínas inibidoras recombinantes descritas no presente documento são preferencialmente produzidas de forma recombinante num sistema de expressão celular. Este sistema pode ser uma célula hospedeira eucariótica ou procariótica.

Uma ampla variedade de células hospedeiras unicelulares é útil na expressão das proteínas inibidoras recombinantes de acordo com a presente invenção. Estes hospedeiros podem incluir hospedeiros eucarióticos e procarióticos bem conhecidos, tais como linhagens de *E. coli, Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces,* fungos tais como leveduras e células animais, tais como células CHO, YB/20, NSO, SP2/0, R1.I, B-W e L-M, células de rins de Macaco Verde Africano (tais como COS 1, COS 7, BSC1, BSC40 e BMT10), células de insetos (tais como Sf9) e células humanas e células vegetais em cultivo de tecidos. Preferencialmente, a célula hospedeira é uma célula bacteriana selecionada a partir do grupo compreendendo os géneros *Bacillus, Escherichia, Salmonella* e *Erwinia.* De maior preferência, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *E. coli.*

A transformação ou transfecção de células hospedeiras eucarióticas ou procarióticas apropriadas com um vetor de expressão compreendendo uma sequência de DNA isolada e

purificada de acordo com a presente invenção é realizada por meio de métodos bem conhecidos que dependem tipicamente do tipo de vetor utilizado. Com relação a estes métodos, ver, por exemplo, *Maniatis et al.*, 1982, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory e métodos disponíveis comercialmente.

Um objeto adicional da presente invenção é o fornecimento de um kit de diagnóstico para a deteção de uma protease, *in vivo* ou *in vitro,* numa amostra compreendendo uma sequência de DNA isolada e purificada selecionada a partir do grupo compreendendo SEQ ID N° 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, uma de suas sequências complementares, seus fragmentos e/ou suas variantes.

Alternativamente, a presente invenção também idealizou um kit de diagnóstico para deteção de uma protease numa amostra compreendendo uma proteína inibidora quimérica de uma protease de acordo com a presente invenção. A referida proteína inibidora quimérica de uma protease pode ser selecionada, por exemplo, a partir do grupo compreendendo MD820, MD 62, MD 61, MD67 e MD CI.

Da forma utilizada no presente documento, o termo "amostra" indica qualquer amostra apropriada que pode conter uma protease ou uma sequência que codifica uma protease, à qual pode-se unir a proteína inibidora quimérica ou a sequência de DNA isolada e purificada que codifica a referida proteína inibidora quimérica.

O kit de diagnóstico pode incluir um sistema que permite a deteção de uma protease, em que a deteção do sinal dependerá da quantidade de protease presente. O sinal pode

ser detetado visual ou instrumentalmente. Possíveis sinais podem incluir a fabricação de produtos coloridos, fluorescentes ou luminescentes, alteração das características de absorção ou emissão de radiação por um produto ou componente de teste e precipitação ou aglutinação de um produto componente. O referido componente pode ser uma marca, tal como radioisótopo, fluoroforo, enzima, coenzima, substrato de enzima, composto denso de eletrões ou uma partícula aglutinável e pode ser acoplado à proteína inibidora quimérica ou à sequência de DNA isolada e purificada presente neste kit de diagnóstico.

Por fim, o presente relatório descritivo também fornece um método de tratamento ou prevenção de uma disfunção associada a proteólise em mamíferos, compreendendo a administração ao referido mamífero de uma composição farmacêutica compreendendo uma serpina do tipo selvagem recombinante como agente ativo.

O método de tratamento ou prevenção de disfunção associada a proteólise referido acima pode ser útil caso a disfunção seja uma disfunção em que a atividade de calicreína de hK2 é prejudicial, tal como cancro, disfunção autoimune, disfunção inflamatória tal como Hipertrofia Prostática Benigna ou disfunção infecciosa.

A descrição acima será mais completamente compreendida com referência aos Exemplos a seguir. Estes Exemplos são, entretanto, exemplos de métodos de prática da presente invenção e não se destinam a limitar o âmbito da presente invenção.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

Desenvolvimento de Inibidores de ACT Recombinantes Específicos para hK2 Humano Utilizando Substratos Selecionados de Exibição de Fagos

MATERIAL

hK2 e hK3 (PSA) foram purificados a partir de sémen humano conforme descrito anteriormente (Frenette, G., Gervais, Y., Tremblay, R. R., Dube, J. Y., 1998, "Contamination of Purified Prostate-Specific Antigen Preparations by Kallikrein hK2", J. Urol. 159, 1375-8), anticorpos monoclonais anti-hK2 e anti-PSA foram presente do Professor R. R. Tremblay, Universidade de Laval, Canadá. Quimotripsina humana (Chtr), ativador de plasminogénio de uroquinase (uPA), calicreína humana hK1, calicreína de plasma humano (PK), elastase de neutrófilos humanos (HNE) e ACT comercial (α1-antiquimotripsina de plasma humano) foram adquiridos da Calbiochem. Z-Phe-Arg-AMC, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC, Z-Gly-Gly-Arg-AMC, MeOSuc-Ala-Ala-Pro-VaI-AMC foram adquiridos da Calbiochem. Substrato fluorescente CFP-TFRSA-YFP foi desenvolvido conforme descrito anteriormente (Mahajan, N. P. *et al.*, 1999, "Novel Mutant Green Fluorescent Protein Protease Substrates Reveal the Activation of Specific Caspases During Apoptosis", Chem. Biol. 6, 401-9). O cDNA para α1-antiquimotripsina humana (ACT) foi presente generoso do Dr. Harvey Rubin (Universidade da Pensilvânia).

MUTAGÉNESE DIRIGIDA A LOCAL

Após a subclonagem de cDNA de ACT em vetor de expressão

pQE-9 (Qiagen, Alemanha, Figura 9) e a introdução de uma marca His_6 no terminal N de $rACT_{WT}$, dois locais de restrição, *Sac II* e *Mlul,* foram incorporados a 18 bp a montante e 18 bp a montante de códon P1 no domínio RSL, respetivamente. Estes locais foram criados por meio de mutação silenciosa utilizando os oligonucleotídeos 5'-GTGATTTTGACCGCGGTGGCAGCAG-3' para *Sac II* e 5'-GCACAATGGTACGCGTC TCCACTAATG-3' para local *Mlu I* e seguindo o protocolo de mutagénese de rápida mudança fornecido pela Stratagene.

CONSTRUCÃO DA BIBLIOTECA DE EXIBIÇÃO DE FAGOS DE SUBSTRATO

As bibliotecas de fago de substrato foram geradas utilizando um fagomídeo pH0508b modificado (Lowman *et al.*, 1991, "*Selecting High-Affinity Binding Proteins by Monovalent Phage Display*", *Biochemistry* 12, 10832-8). A construção consiste de uma marca His_6 em qualquer extremidade de uma região rica em repetições Gly-Gly-Gly-Ser que precede o domínio carboxil-terminal (códons 249 a 406) do gene M13 111. Os pentâmeros aleatórios foram gerados por meio de extensão de PCR dos oligonucleotídeos modelo com locais de restrição apropriados posicionados nos dois lados dos codões degenerados: 5' TGAGCTAGTCTAGATAGGTGGCGGTNNSNNSNNSNNSNNSGGGTCGACGTCGGT CATAGCAGTCGCTGCA -3' (em que N é qualquer nucleotídeo e S é G ou C), utilizando iniciadores 5' biotinilados correspondentes às regiões ladeadoras: 5'TGAGCTAGTCTAGATAGGTG-3' e 5'-TGCAGCGACTGCTATGA-3'. Modelos de PCR são digeridos e purificados conforme descrito anteriormente (Smith, G. P., Scott, J. K., 1993, "*Libraries of Peptides and Proteins Displayed on Filamentous Phage*", *Methods Enzymol.* 217, 228-57), inseridos em vetor pH0508b digerido por XbaI/SalI e

eletroporados em XL1-Azul (F^-). A extensão da biblioteca foi estimada a partir da eficiência de transformação determinada pela colocação em placas de pequena parcela das células transformadas sobre placas Luria-Bertani contendo ampicilina e tetraciclina (100 e 15 $\mu g \cdot mL^{-1}$, respetivamente). O restante das células transformadas foi utilizado para preparar uma biblioteca de fagos por meio de incubação por uma noite por adição de um fago auxiliar M13K07 sob concentração que gera multiplicidade de infeções de cem 100 formadoras de placas (pfu) por mililitro. Fagos foram recolhidos do sobrenadante e purificados por meio de precipitação em poli(etileno glicol). Destes, 200 clones foram selecionados arbitrariamente para sequenciamento, para verificar a aleatorização da biblioteca.

DESPISTAGEM DE BIBLIOTECAS DE PENTAPEPTÍDEOS EXIBIDAS POR FAGOS

Esta nova biblioteca de pentapeptídeos foi submetida a oito rodadas de despistagem com hK2. Cem microlitros de Ni^{2+}-ácido nitrilotriacético acoplado a esferas de sefarose (resina de Ni^{2+}-ácido nitrilotriacético) foram lavados com 10 mL de $NaCl/P_i$ contend 1 mg•mL 1 BSA. Partículas de fagos (10^{11}) foram adicionadas à resina equilibrada de Ni^{2+}-ácido nitrilotriacético e mantidas em união com suave agitação por 3 horas a 4 °C. A resina foi lavada em seguida ($NaCl/P_i$/BSA 1 $mg \cdot mL^{-1}$ mM de imidazol, 0,1% Tween 20) para remover fagos não unidos e equilibrada em seguida em $NaCl/P_i$. O fago de substrato foi exposto a 27 nM (concentração final) de hK2 por 45 minutos a 37 °C. Também foi realizada uma seleção de controlo sem protease. Os fagos divididos libertados no sobrenadante foram

amplificados utilizando XL1-Azul de *Escherichia coli* e utilizados em seguida para rodadas subsequentes de seleção. Após oito rodadas de extração, cerca de 15 clones individuais foram tomados da quinta, sexta e oitava rodada de seleção e DNA de plasmídeo foi isolado e sequenciado na região que codifica o substrato.

CONSTRUÇÃO E EXPRESSÃO DE ACT DE TIPO SELVAGEM RECOMBINANTE E SUAS VARIANTES

Seis variantes, que correspondem a uma mudança do circuito de local reativo em posições entre P3 e P3′ (vide Tabela IV abaixo), foram geradas por extensão de PCR dos oligonucleotídeos modelo:

$rACT_{8.20}$: 5′-TACCGCGGTCAAAATCACCCTCCGTTCTCGAGCAGTGGA GACGCGTGA-3′;

$rACT_{6.3}$: 5′- TACCGCGGTCAAAATCACCAGGAGGTCTATCGATGT GGAGACGCGTGA-3′;

$rACT_{8.3}$: 5′- TACCGCGGTCAAAATCAGGGGGAGATCTGAGTTAGTG GAGACGCGTGA-3′;

$rACT_{6.7}$: 5′- TACCGCGGTCAAAATCAAGCTTAGAACAACATTAG TGGAGACCGCTGA-3′;

$rACT_{6.1}$ 5′-TACCGCGGTCAAAATCATGACAAGATCTAACTTAGT GGAGACGCGTGA-3′;

$rACT_{5.18}$: 5′- TACCGCGGTCAAAATCACCGAGCGTGTCTCGCCCGTG GAGACGCGTGA-3′

(em que as sequências sublinhadas codificam novos locais de divisão no circuito de local reativo), utilizando os iniciadores correspondentes às regiões ladeadoras: 5′-TACCGCGGTCAAAATC -3′ e 5′- TCACGCGTGTCCAC-3′. Produtos de PCR foram digeridos com enzimas de restrição *Sac II* e *Mlu I* e subclonados em seguida em construção de $rACT_{WT}$ digerida. Serpinas recombinantes foram produzidos em

linhagem de *E. coli* TG1. Células foram cultivadas a 37 °C em meios 2 x TY (16 g de triptona, 10 g de extrato de levedura, 5 g de NaCI por L) contendo 100 µg/mL de ampicilina até A_{600} = 0,5. Isopropiltio-B-galactosida (IPTG) foi adicionada em seguida até concentração final de 0,5 mM, permitindo a expressão de serpinas recombinantes por 16 horas a 16 °C. As células de 100 mL de cultivo foram colhidas por centrifugação, novamente suspensas em PBS frio e passadas em seguida através de prensa francesa para recuperar as proteínas citoplásmicas solúveis totais. Fragmentos celulares foram removidos por centrifugação e esferas de agarose com afinidade de Ni^{2+}·nitrilotriacético foram adicionadas ao sobrenadante por 90 minutos a 4 °C para unir serpinas recombinantes. A resina foi lavada em seguida com 50 mM de Tris pH 8,0, 500 mM de NaCl, 25 mM de imidazol e as proteínas unidas foram eluídas por 10 minutos com 50 mM de Tris pH 8,0, 500 mM de NaCl e 150 mM de imidazol. Após completar-se a purificação, rACT foi dialisado contra 50 mM de Tris pH 8,0, 500 mM de NaCl, 0,05% Triton X-100 por 16 horas a 4 °C. A concentração de proteínas foi determinada para cada purificação por teste de Bradford e normalizada por densitometria de géis SDS-PAGE manchados com Azul de Coomassie (Laemmli, U. K., 1970, "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", Nature 227, 680-5).

TABELA IV

ALINHAMENTO DE RSL (CIRCUITO DE SERPINA REATIVO) DE α1-ANTIQUIMOTRIPSINA (ACT) DE SERPINA RECOMBINANTE E SUAS VARIANTES													
Serpina	Peptídeo de substrato selecionado[a]	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P'1	P'2	P'3	P'4	P'5	P'6
$rACT_{wT}$		V	K	I	T	L	R*	S	A	L	V	E	T
$rACT_{8.20}$	LR↓SRA	V	K	I	T	L	R*	S	R	A	V	E	T

$rACT_{6.2}$	RR↓SID	V	K	I	T	R	R*	S	I	D	V	E	T
$rACT_{8.3}$	RGR↓SE	V	K	I	R	G	R*	S	E	L	V	E	T
$rACT_{6.7}$	KLR↓TT	V	K	I	K	L	R*	T	T	L	V	E	T
$rACT_{6.1}$	MTR↓SN	V	K	I	M	T	R*	S	N	A	V	E	T
$ACT_{5.18}$	ER↓VSP	V	K	I	T	E	R*	V	S	P	V	E	T

[a] Peptídeos de substratos selecionados por calicreína hK2 utilizando uma biblioteca de pentapeptídeos aleatórios exibida por fago. Os resíduos do tipo plano são comuns para $rACT_{WT}$, os resíduos em negrito e sublinhados correspondem a peptídeos de substratos reposicionados em RSL de variantes de ACT. A união que pode ser unida por hK2 em peptídeos de substrato é designada por ↓, e o suposto local de divisão em serpinaas é marcado por asteriscos entre os resíduos P1–P1'.

TESTES DE INIBIÇÃO E ESTEQUIOMETRIA DE INIBIÇÃO (SI)

Os valores de estequiometria de inibição (SI) foram determinados para inibição de $rACT_{WT}$ e suas variantes com hK2 e outras enzimas diferentes. Foi realizado um teste inicial com excesso molar de rACT (100 vezes) sobre enzimas hK2, PSA, hK1, quimotripsina (Chtr), calicreína de plasma (PK), uroquinase (uPA) e elastase de neutrófilos humanos (HNE). A reação foi conduzida por 30 minutos a 25 °C (90 minutos a 37 °C para PSA) em tampão de reação (50 mM de Tris pH 7,5, 150 mM de NaCl, 0,05% Triton X-100, 0,01% BSA) e a atividade de enzima residual foi medida por meio da adição de substratos fluorescentes (Z-Phe-Arg-AMC para hK1, hK2 e PK, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC para Chtr,·Z-Gly-Gly-Arg-AMC para uPA, MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC para HNE e CFP-TFRSA-YFP para PSA). A atividade de enzima na presença de inibidores foi comparada com reação não inibida. Para reações em que se observou inibição, SI foi determinado por meio da incubação de diferentes concentrações de serpinas recombinantes. Utilizando

análise de regressão linear da atividade fracional (velocidade de reação de enzima inibida/velocidade de reação de enzima não inibida) contra a razão molar entre o inibidor e a enzima ($[I_0]/[E_0]$), foi obtida a estequiometria de inibição, correspondente à interceção das abcissas.

CINÉTICA

As constantes de velocidade de associação para interações de hK2, quimotripsina, PK e HNE com diferentes rACTs foram determinadas sob condições de pseudoprimeira ordem, utilizando o método de curva de andamento (Morrison, J. F., Walsh, C. T., 1988, "The Behavior and Significance of Slow-Binding Enzyme Inhibitors", Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 61, 201-301). Sob estas condições, quantidade fixa de enzima (2 nM) foi misturada com diferentes concentrações de inibidor (0 a 800 nM) e excesso de substrato (10 µM). Cada reação foi elaborada em tampão de reação (50 mM de Tris pH 7,5, 150 mM de NaCl, 0,05% Triton X-100, 0,01% BSA) a 25 °C por 45 minutos e a velocidade de formação de produto foi medida utilizando um leitor de microplacas de 96 poços de fluorescência Flx800 (Biotek, Estados Unidos). Neste·modelo, a inibição é considerada irreversível ao longo do curso da reação e o progresso da atividade enzimática é expresso pela formação de produto (P), começando em velocidade (v_z) e é inibida ao longo do tempo (t) em velocidade de primeira ordem (k_{obs}), constante de velocidade que depende somente da concentração de inibidor.

$$p = (v_z/k_{obs})X(1-e^{(kobst)}) \qquad \text{Eq 1}$$

Para cada inibidor, foi calculado um k_{obs} para quatro concentrações diferentes de inibidores, por meio de regressão não linear dos dados utilizando a Equação 1. Por meio de plotagem do k_{obs} contra a concentração de inibidor [I], constante de velocidade de segunda ordem, k', igual à inclinação da curva ($k' = \triangle k_{obs}/\triangle[I]$), foi determinada. Devido à competição entre inibidor e o substrato, a Equação 2 abaixo é utilizada para corrigir a constante de velocidade de segunda ordem k' levando-se em conta a concentração de substrato [S] e o K_m da enzima para o seu substrato, gerando k_a.

$$k_a = (1+[S]/K_m) x k' \qquad \text{Eq. 2}$$

O K_m de hK2 para Z-FR-AMC, quimotripsina para Suc-AAPF-AMC, PK para Z-FR-AMC e HNE para MeOSuc-AAPV-AMC foram de 67 µM, 145 µM, 170 µM e 130 µM, respetivamente.

Análise de Manchas Western de Formação de Complexos e Degradação de Inibidor

Calicreína hK2 foi incubada por três horas a 37 °C com ACTs recombinantes diferentes em razão $[I]_0:[E]_0$ de 100:1 em 50 mM de Tris, 200 mM de NaCl, 0,05% Triton X-100. Amostras de proteína foram aquecidas a 95 °C por 5 minutos, separadas por SDS-PAGE (12% acrilamida razão 19:1 T:C) e eletromanchadas em seguida sobre nitrocelulose Hybond-ECL (Amersham Pharmacia). Os complexos livre-hK2 e hK2-ACT foram detetados utilizando um anticorpo monoclonal anti-hK2 de ratinho e um anticorpo secundário anti-ratinho de cabra conjugado com fosfatase alcalina. Western Blot foi visualizado utilizando o kit de deteção ECL (Amersham Pharmacia Biotech). hK2 também foi incubado com $ACT_{8.3}$ ou

$ACT_{6.7}$ por 30 minutos a 25 °C (condições cinéticas) em razão $[I]_0$:$[E]_0$ de 10:1 em 50 mM de Tris, 200 mM de NaCl, 0,05% Triton X-100. As proteínas foram detetadas por meio de Western Blot, utilizando um anticorpo monoclonal anti-His_6 seguido por deteção com o anticorpo secundário e protocolo descritos acima.

PRODUÇÃO DE ACTS VARIANTES E DE TIPO SELVAGEM RECOMBINANTE SOLÚVEIS

α1-antiquimotripsina de serpina de tipo selvagem foi utilizada para desenvolver inibidores específicos da calicreína hK2. Os resíduos P3-P3' localizados na estrutura de SRL de $rACT_{WT}$ foram substituídos por pentapeptídeos de substrato, previamente selecionados por tecnologia de exibição de fagos conforme descrito acima. Seis variantes de rACT exibidas na Tabela I foram projetadas e construídas. A união que pode ser rompida em peptídeos de substrato foi alinhada de acordo com Leu-358-Ser-359 em RSL da serpina. $rACT_{WT}$ e suas variantes foram expressos em TG1 de *E. coli* como proteínas de fusão contendo uma marca His em posição N-terminal. Cada um deles foi produzido em baixa temperatura, permitindo a acumulação de proteína principalmente em forma solúvel ativa. Purificado sob condições nativas, o nível de produção variou de 1,0 a 2,5 mg/L. A pureza de serpinas purificadas, tais como a Variante 6.1 (linha 1) e ACT do tipo selvagem (linha 2), conforme estimado por análise de SDS-PAGE é de mais de 98% (Figura 1).

Variantes De Ract São Principalmente Específicas Para Calicreína hK2

Um quadro de enzimas que inclui elastase de neutrófilos humanos, proteinases similares a quimotripsina (Chtr, PSA ou hK3) e similares a tripsina (hK2, hK1, PK, uPA) foram selecionadas para determinar a especificidade inibidora de variantes de rACT (Tabela V).

TABELA V

PERFIL INIBIDOR DE $RACT_{WT}$ E SUAS VARIANTES

Protease	$ACT_{8.20}$ (LR↓. SRA)[a]	$ACT_{6.2}$ (RR↓SID)[a]	$ACT_{8.3}$ (RGR↓SE)[a]	$ACT_{6.7}$ (KLR↓TT)[a]	$ACT_{6.1}$ (MTR↓SN)[a]	$ACT_{5.18}$ (ER↓VSP)[a]	ACT_{wT} (LL↓AS)[a]
	MD820	MD62	MD83	MD67	MD61	MD518	
	Inibição %[b]						
hK2	95	100	100	100	100	73	0
Chtr	66	0	0	0	0	0	100
PK	54	100	0	36	100	0	0
HNE	30	0	0	0	60	0	15
PSA (hK3)	45	0	0	0	0	0	80
hK1	0	0	0	0	0	0	0
Uroquinase	0	0	0	0	0	0	0

[a] Sequência de aminoácidos dividida em RSL (Circuito de Serpina Reativo) de ACTs recombinantes correspondente a peptídeo de substrato selecionado por hK2.
[b] Protease e serpinas foram incubados por 30 minutos a 25 °C (90 minutos a 37 °C para PSA) em razão $[I]_0/[E]_0$ de 100:1. O percentual de inibição corresponde a 100 x (1-(velocidade na presença de inibidor/velocidade de controlo não inibido)).

Incubação com excesso de inibidores ($[I]_0/[E]_0$ de 100:1) por 30 minutos, hK2 é completamente inibido por $rACT_{6.2}$, $rACT_{8.3}$, $rACT_{6.7}$ e $rACT_{6.1}$, enquanto $rACT_{8.20}$ e $rACT_{5.18}$ inibiu 95% e 73% da atividade enzimática, respetivamente. Sob esta condição, rACT do tipo selvagem não exibiu atividade inibidora para hK2. Dentre estas variantes, duas ($rACT_{8.3}$ e $rACT_{5.18}$) são específicas para hK2, não inibindo nenhuma outra enzima testada. Duas outras variantes, $rACT_{6.7}$ e

$rACT_{6.2}$, inibiram PK a 36% e 100%, respetivamente. Como ACT do tipo selvagem, a variante $rACT_{8.20}$ inibiu as duas proteases similares a quimotripsina Chtr e PSA, mas adicionalmente também PK e HNE. Nenhuma das serpinas recombinantes exibiu atividade inibidora contra a calicreína hK1 e uPA.

ESTEQUIOMETRIAS DE INIBIÇÃO DE ACTS VARIANTES PARA HK2 SÃO DRASTICAMENTE APRIMORADAS EM COMPARAÇÃO COM ACT DO TIPO SELVAGEM

A determinação da estequiometria de inibição foi realizada sob condições fisiológicas de pH e resistência iónica para todas as enzimas, para garantir a comparação mais valiosa. ACT do tipo selvagem recombinante gerou valor SI de 2 (Tabela VI) com quimotripsina que é idêntico ao valor obtido com ACT comercial sob condições similares (dados não exibidos).

TABELA VI

Comparação de Estequiometria de Valores de Inibição e Constantes de Velocidade de Segunda Ordem (K_a) para Reação de $Ract_{wt}$ e suas Variantes com Hk2 e outras Proteinases

	$ACT_{8.20}$ (LR↓SRA)[c] MD820		**$ACT_{6.2}$ (RR↓SID) MD62**		**$ACT_{8.3}$ (RGR↓SE) MD83**		**$ACT_{6.7}$ (KLR↓TT) MD67**		**$ACT_{6.1}$ (MTR↓SN) MD61**		**$ACT_{5.18}$ (ER↓VSP) MD518**		**ACT_{WT} (LL↓SA)[c]**	
	SI	$(k_a)^b$ $M^{-1}S^{-1}$	*SI*	k_a^b $M^{-1}S^{-1}$	*SI*	k_a^b $M^{-1}S^{-1}$	*SI*	k_a^b $M^{-1}S^{-1}$	*SI*	k_a^b $M^{-1}S^{-1}$	*SI*	k_a^b $M^{-1}S^{-1}$	*SI*	k_a^b $M^{-1}S^{-1}$
Protease														
HK2	**105**	**1779**	**25**	**6261**	**34**	**2439**	**9**	**8991**	**19**	**3442**	**139**	**595**	**-**	**-**
Chtr	134	905	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	61295
PK	150	424	18	6217	-	-	277	201	16	8024	-	-	-	-
HNE	334	158	-	-	-	-	-	-	159	1192	-	-	-	-

[a] Os valores SI relatados foram determinados utilizando análise de regressão linear para extrapolar a razão I/E (vide Figura 1).

[b] Constantes de velocidade de segunda ordem para reações de serpina e proteinase foram medidas sob condições de pseudoprimeira ou segunda ordem, conforme descrito em "Procedimento Experimental".

[c] Sequência de aminoácidos de resíduos P3-P3′ em RSL (Circuito de Serpina Reativo) de ACT recombinante correspondente a peptídeo de substrato selecionado por hK2.

-, Nenhuma atividade inibidora detetável.

A fim de determinar os valores SI de todas as variantes recombinantes, os Requerentes incubaram hK2 (5 nM) com concentrações diferentes (6,25-500 nM) de $rACT_{8.20}$ (x), $rACT_{6.2}$ (□), $rACT_{8.3}$ (△), $rACT^{6.7}$ (0), $rACT_{6.1}$ (✱), $rACT_{5.18}$ (O), $rACT_{WT}$ (+), a 25 °C por 30 minutos em tampão de reação. As atividades residuais (velocidade) para hK2 foram testadas por meio de adição do substrato fluorescente (10 µM) Z-FR-AMC. A velocidade fracional corresponde à razão entre a velocidade de enzima inibida (v_i) e a velocidade do controlo não inibido (v_0). O SI foi determinado utilizando análise de regressão linear para extrapolar a razão I/E (ou seja, a interceção x).

Conforme exibido na Figura 2, todas as variantes recém-construídas de ACT exibiram valores SI mais baixos com hK2 que ACT do tipo selvagem. Dentre essas variantes $rACT_{6.7}$, $rACT_{6.1}$ e $rACT_{6.2}$ apresentaram os valores mais baixos de estequiometria de inibição para hK2 (9, 19 e 25, respetivamente). Embora $rACT_{6.2}$ e $rACT_{6.1}$ também apresentassem os valores SI mais baixos (18 e 16) para PK, o SI para $rACT_{6.7}$ foi muito mais alto (277). Os dois ACTs recombinantes específicos para hK2, $rACT_{8.3}$ e $rACT_{5.18}$ apresentaram razão SI mais alta de 34 e 139, respetivamente. O valor SI de inibidor $rACT_{8.20}$ foi de mais de 100 para todas as proteases testadas, incluindo hK2.

ACTs Variantes Formam Complexos Estáveis com Hk2 sem Degradação de Inibidores

hK2 foi incubado por 3 horas a 37 °C com $rACT_{8.20}$, $rACT_{6.2}$, $rACT_{8.3}$, $rACT_{6.7}$, $rACT_{6.1}$, $rACT_{5.18}$, e rACT do tipo selvagem, sob razão I:E de 100:1. Análise Western Blot dos produtos

de reação de rACTs com hK2 ($rACT_{8.20}$ (linha 1), $rACT_{6.2}$ (linha 2), $rACT_{8.3}$ (linha 3), $rACT_{6.7}$ (linha 4), $rACT_{6.1}$ (linha 5), $rACT_{5.18}$ (linha 6) e rACT do tipo selvagem (linha 7)) foi realizada sob condições redutoras utilizando um anticorpo anti-hK2 de ratinho para determinar o destino dos inibidores após a interação com a enzima. A Figura 3A demonstra que, ao incubar-se hK2 com variantes de ACT, hK2 livre (E) desapareceu completamente para formar um complexo covalente (EI). Este complexo covalente demonstrou alta estabilidade, pois não se rompeu ao longo de um período de incubação de 16 horas (dados não exibidos). ACT do tipo selvagem inibiu hK2 mais lentamente, que principalmente não teve complexo formado após 3 horas de incubação. Valores de SI elevados medidos com hK2 não se deveram à degradação não formadora de complexo de inibidores variantes de ACT.

Posteriormente, ACT8.3 (linha 1) ou ACT6.7 (linha 3) foram incubadas com hK2 (linha 2 e 4, respetivamente, sobre o Western Blot) sob condições cinéticas (30 minutos a 25 °C) em razão I:E de 10:1. A formação de complexos foi analisada por Western Blot sob condições redutoras utilizando uma marca anti-his monoclonal de ratinho (Figura 3B). Todas as proteínas inibidoras tiveram complexo formado com hK2 ou presentes em forma não dividida, o que indica que o possível processo de substrato para a interação entre serpina e enzima é marginal.

ACTs Variantes Exibiram Constantes de Associação mais Altas com HK2

A velocidade de reação inibidora com ACTs variantes foi determinada para cada protease exibindo reatividade com esses inibidores. Com este propósito, a interação de hK2 e serpinas recombinantes foi medida sob condições de pseudoprimeira ordem utilizando o método de curva de progresso. hK2 (2 nM) e o substrato Z-FR-AMC (10 µM) foram adicionados a quantidades variáveis (20 n a 800 nM) de inibidores $rACT_{8.20}$ (◇), $rACT_{5.18}$ (+) (Figura 4A) e inibidores $rACT_{6.2}$ (O), $rACT_{8.3}$ (□), $rACT_{6.7}$ (△), $rACT_{6.1}$ (x) (Figura 4B). Curvas de progresso representativas foram submetidas a análise de regressão não linear utilizando a eq 1 e a velocidade (k_{obs}) foi plotada contra as concentrações de serpina. Após a determinação de *kobs*, constantes de associação (k_a) foram calculadas utilizando K_m das proteases para os seus substratos correspondentes (Tabela VI). O valor *ka* de ACT do tipo selvagem com quimotripsina foi idêntico ao de dados publicados (Cooley *et al.*, 2001, "The Serpin MNEI inhibits Elastase-Like and Chymotrypsin-Like Serine Proteases Through Efficient Reactions at Two Active Sites", Biochemistry 40, 15762-70). O $rACT_{6.7}$ recombinante exibiu *ka* mais alto (8991 $M^{-1}s^{-1}$) com hK2, enquanto o obtido com PK foi 45 vezes menor. Por outro lado, $rACT_{6.2}$ recombinante gerou *ka* equivalente com hK2 e PK, demonstrando falta de discriminação entre as duas proteases. Os valores *ka* de inibidores recombinantes específicos de hK2 $rACT_{8.3}$ e $rACT_{5.18}$ foram mais baixos, 2439 e 595 $M^{-1}s^{-1}$, respetivamente, enquanto $ACT_{8.20}$ não específico exibiu *ka* de 1779 $M^{-1}s^{-1}$, para hK2, superior em comparação com Chtr, PK e HNE. Uma das serpinas recombinantes, $rACT_{6.1}$ estava em reação em velocidade mais alta com PK do que com

hK2.

EXEMPLO 2

Desenvolvimento de Inibidores de ACT Recombinantes Específicos Para Proteases hK2 e hK3 Humanas

Os resíduos P3-P3' localizados na estrutura de RSL de $rACT_{WT}$ foram substituídos por codificação de pentapeptídeos de substrato para o RSL de inibidor de Proteína C (PCI) (Tabela VII), conforme descrito no Exemplo 1.

TABELA VII

ALINHAMENTO DE RSL (CIRCUITO DE SERPINA REATIVO) DE SERPINAS RECOMBINANTES ACT. PCI E ACT^{PCI}

Sequências de RSL													
Serpina		P6	P5	P4	P3	P2	P1	P'1	P'2	P'3	P'4	P'5	P'6
$rACT_{WT}$	Aminoácido	V	K	I	T	L	L	S	A	L	V	E	T
	Sequência de aminoácidos												
	Sequência de DNA (codões)	GTC	AAA	ATC	ACC	CTC	CTT	TCT	GCA	TTA	GTG	GAG	GTC
$rPCi_{WT}$	Sequência de aminoácidos	T	I	F	T	F	R	S	A	R	L	N	S
$rACT_{PCI}$ (MD CI)	Sequência de aminoácidos	V	K	I	T	**F**	**R**	**S**	**A**	**L**	V	E	T
	DNA (codão)	GTC	AAA	ATC	ACC	TTT	*AGA*	TCT	GCA	TTA	GTG	GAG	GTC

Os resíduos de tipo plano são comuns para $rACT_{WT}$, resíduos em negrito e sublinhados correspondem a peptídeos de substrato reposicionados em RSL de variantes de ACT. A união que pode ser rompida em peptídeos de substrato é designada por ↓ e suposto local de divisão em serpinas é marcado por asteriscos entre os resíduos P1-P1'.

Resumidamente, para produzir a proteína recombinante ACT_{PCI} (MDCI), células TG1 foram transformadas com as construções correspondentes seguidas por crescimento em meios de cultivo apropriados. As células foram induzidas em seguida até densidade ideal para expressar inibidores recombinantes por 16 horas a 16 °C. O inibidor recombinante ACT_{PCI} foi extraído de bactérias de citoplasma

e separado por cromatografia de afinidade utilizando coluna Ni-NTA conforme descrito para o exemplo anterior.

Análise de Expressão de ACT Recombinante Por SDS-PAGE

A pureza dos diferentes inibidores desenvolvidos nos Exemplos 1 e 2 foi testada por análise de SDS-PAGE sob condições redutoras, conforme exibido na Figura 5.

Avaliação dos Inibidores

Estes inibidores foram adicionalmente analisados para determinar a sua especificidade e afinidade de inibição das calicreínas humanas hK2 e hK3 (Figuras 6) e calicreína de plasma, tripsina, uroquinase, elastase, trombina, hK14 e calicreína humana 8 (Tabela VIII). Estas duas enzimas possuem diferentes especificidades enzimáticas (hK2: similar a tripsina, hK3: similar a quimotripsina), mas são naturalmente inibidas por ACT. Embora ACT seja considerado o inibidor de hK3 natural na circulação sanguínea, a sua inibição de hK2 é mais fraca.

Análise da reação inibidora entre rACTs e as calicreínas humanas foi realizada por Western Blot conforme exibido nas Figuras 6. Para cada variante de ACT, 1 µg de inibidor foi incubado com 100 ng de hK2 ou hK3 durante uma hora a 37 °C sob condições fisiológicas.

Os resultados da deteção utilizando o anticorpo monoclonal anti-hK2 9D5 são exibidos na Figura 6A.

Linha 1: somente hK2, 2: ACT comercial + hK2, 3: ACT de tipo selvagem + hK2, 4: MD820 + hK2, 5: MDCI + hK2, 6: MD62 + hK2, 7: MD61 + hK2.

A Figura 68 exibe a deteção de complexo de hK3-ACT utilizando anticorpo anti-His (marca presente sobre proteínas ACT recombinantes).

Linha 1: PSA, 2: PSA + ACT, 3: ACT do tipo selvagem + PSA, 4: MD820 + PSA, 5: MDCI + PSA, 6: MD62 + PSA, 7: MD61 + PSA.

As mudanças de aminoácidos dentro do circuito reativo utilizando sequências de substratos selecionados pela especificidade de hK2 transformaram ACT num inibidor altamente específico para hK2 (MD820, MD61, MD62) sem inibir hK3. Estes resultados confirmam os exibidos anteriormente na Tabela IV. Somente MDCI, com base no circuito reativo do inibidor da Proteína C (PCI), é capaz de inibir

Protease	**% Inibição b**	**SI**	k_a M^{-1} s^{-1}
Quimotripsina	98	1	86216
Calicreína de plasma	100	4,6	25900
Tripsina	100	1	1126025
Uroquinase	0	–	–
Elastase	0	–	–
Trombina	0	–	–
hK14	100	3,2	287000
Calicreína 8 humana	~25	~180	
Ambas as calicreínas testadas (hK2 e hK3)			

MD61 e MD62 são inibidores com afinidade muito alta para hK2, inibindo toda a proteína hK2 em menos de 3 minutos (sob as mesmas condições) em comparação com α1-antiquimotripsina comercial ou de tipo selvagem, que necessita de mais de 12 horas de incubação para inibir a mesma quantidade de hK2 (dados não exibidos). **Tabela VIII Perfil Inibidor de MDCI. EXEMPLO 3**

INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE TUMORES POR INIBIDORES DE MD

3.1 INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE TUMORES POR INIBIDORES por MD62 E MD67

A linhagem de células de adenocarcinoma da próstata humana independente de andrógenos DU-145 foi obtida através da Coleção Norte-Americana de Cultivos de Tipos. Tecnologia retroviral foi utilizada para obter célula DU145 transfectada com gene hK2 (DU 145/hK2).

Células DU145/hK2 em crescimento exponencial foram recolhidas e novamente suspensas sob concentração de 7,5 x 10^7 células/mL em DMEM (Invitrogen) contendo 1 ou 10 µg de inibidores. Esta suspensão celular foi misturada com matrigel (BD Biosciences) em razão 1:2 e injetada por via subcutânea (3 x 10^6 células/40 µL) no flanco direito e esquerdo de ratinhos brutos suíços atímicos machos com 8 semanas de idade (dois ratinhos/grupo). Cada ratinho foi inoculado em dois lugares.

Nos dias 6, 12 e 18 após a inoculação do tumor, 50 ou 10 µg de MD62, MD67 ou 100 µg ou 10 µg de ACT-WT foram injetados por via subcutânea. Nos dias 24, 30, 33, 36, 39 e 41 após a inoculação do tumor, 25 ou 5 µg de inibidores (MD62 e MD67) ou 50 µg ou 5 µg de ACT-WT foram injetados por via subcutânea.

A Figura 10A exibe a inibição do crescimento de tumores por MD 62. As células cancerígenas da próstata DU-145 (3 x 10^6 células), transfectadas com calicreína humana 2, foram implantadas em ratinhos brutos e tratadas em seguida com MD 62 (5 ou 25 µg por injeção).

A Figura 10B exibe a inibição do crescimento de tumores por MD 67. As células cancerígenas da próstata DU-145 (3 x 10^6 células), transfectadas com calicreína humana 2, foram implantadas em ratinhos brutos e tratadas em seguida com MD 67 (5 ou 25 µg por injeção).

3.2 Inibição do Crescimento de Tumores por Inibidor DE MDCI

A linhagem de células de adenocarcinoma da próstata humana independente de andrógenos DU-145 foi obtida através da Coleção Norte-Americana de Cultivos de Tipos. Tecnologia retroviral foi utilizada para obter célula DU145 transfectada com gene hK2 (DU145/hK2).

Células DU145/hK2 em crescimento exponencial foram recolhidas e novamente suspensas sob concentração de 7,5 x 10^7 células/mL em DMEM (Invitrogen) contendo 1 ou 10 µg de inibidores. Esta suspensão celular foi misturada com matrigel (BD Biosciences) a uma razão 1:2 e injetada por via subcutânea (3 x 10^6 células/40 µL) no flanco direito e esquerdo de ratinhos brutos suíços atímicos machos com 8 semanas de idade (dois ratinhos/grupo). Cada ratinho foi inoculado em dois lugares.

Nos dias 6, 12 e 18 após a inoculação do tumor, 100 µ*g* ou 10 µ*g* de MDCI ou ACT-WT foram injetados por via subcutânea. Nos dias 24, 30, 33, 36, 39 e 41 após a inoculação do tumor, 50 µ*g* ou 5 *µg* de MDCI ou ACT-WT foram injetados por via subcutânea.

A Figura 11 exibe a inibição de crescimento de tumores por MD CI. As células cancerígenas da próstata DU-145 (3 x 10^6

células), transfectadas com calicreína humana 2, foram implantadas em ratinhos brutos e tratadas em seguida com MD Cl (5 ou 50 µg por injeção).

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Uma proteína inibidora recombinante de Calicreína, compreendendo uma sequência de serpina, em que o Circuito de Serpina Reativo P6-P6' da referida sequência de serpina compreende pelo menos um local ativo de substrato, que consiste de uma sequência pentapeptídica selecionada a partir de SSRTE, KTRSN, ISPRS, GVFRS, GTVRS, ETKRS, LGRSL, RGRSE, RRSID, VLRSP, PFRSS, RSGSV, ARARS, SDRTA, KLRTT, RAAMM, TRAPM, DVRAA, PGRAP, VESRA, ARASE, TLQRV, RLERV, ERVSP, SSPRV, RVGPY, PSARM, RGRMA, TVRMP, LRMPT, HRMSS, RPQEL,VRPLE, SGRLA, GTLRF, QWRNS, RNDKL, MRNRA, TRDSR, TGSRD, IMSRQ, LTTSK, PFRKI específicas para a referida Calicreína, uma quimera molecular das mesmas, e/ou uma combinação das mesmas.

2. A proteína inibidora recombinante de uma Calicreína, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** a Calicreína ser uma proteína de Calicreína hK2.

3. A proteína inibidora recombinante de uma Calicreína, de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2, **caracterizada por** a sequência de serpina ser selecionada a partir do grupo que consiste de α-1antiquimotripsina (ACT), inibidor de proteína C (PCI), α-1antiproteinase (AAT), precursor de proteína relativa a α-1antitripsina (ATR) humana, inibidor de α-2-plasmina (AAP), precursor anti-trombina-III humano (ATIII), inibidor 10 de protease (PI 10), precursor de proteína 2 de união de colagénio humano (CBP2), inibidor de protease 7 (PI7), leuserpina 2 inibidora de protease (HLS2), inibidor de protease C1

de plasma humano (C1 INH), inibidor de elastase de monócito/neutrófilo (M/NEI), inibidor 3 ativador de plasminogénio (PAI3), inibidor de protease 4 (PI4), inibidor de protease 5 (PI5), inibidor de protease 12 (PI12), precursor inibidor 1 ativador de plasminogénio humano endotelial (PAI-1), inibidor 2 ativador de plasminogénio humano placentário (PAI2), precursor de fator derivado de epitélio de pigmento humano (PEDF), inibidor de protease 6 (PI6), inibidor de protease 8 (PI8), inibidor de protease 9 (PI9), antígeno 1 de carcinoma de células escamosas humanas (SCCA-1), antígeno 2 de carcinoma de células escamosas humanas (SCCA-2), globulina de união de T4 (TBG), Megsin e inibidor 14 de protease (PI14), seus fragmentos biologicamente ativos, suas quimeras moleculares, e/ou suas combinações.

4. A proteína inibidora recombinante de uma Calicreína, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizada por** a referida proteína inibidora recombinante de uma Calicreína ser selecionada a partir do grupo que compreende a SEQ. ID. No. 2, 4, 8, 10 e 14.

5. A proteína inibidora recombinante de uma Calicreína, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada por** a referida proteína inibidora recombinante de uma Calicreína ser da SEQ. ID. No. 4, ou 8.

6. A proteína inibidora recombinante de uma Calicreína, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizada por** a pelo menos uma sequência de local ativo de substrato específica para a mencionada

Calicreína ser um peptídeo de substrato selecionado por Calicreína utilizando uma biblioteca de pentapeptídeos aleatória exibida por fago.

7. Uma sequência de DNA isolada e purificada, que codifica a proteína inibidora recombinante de uma Calicreína de acordo com qualquer das reivindicações anteriores.

8. A sequência de DNA isolada e purificada, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada por** a mencionada sequência ser selecionada a partir do grupo compreendendo a SEQ ID No 1, SEQ ID No 3, SEQ ID No 5, SEQ ID No 7, SEQ ID No 9, SEQ ID No 11 e SEQ ID No 13.

9. Um vetor de expressão, **caracterizado por** compreender a sequência de DNA isolada e purificada de acordo com as reivindicações 7 ou 8.

10. O vetor de expressão, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado por** compreender ainda um promotor ligado operativamente à sequência de DNA isolada e purificada.

11. Célula hospedeira, eucariótica ou procariótica, transfectada com o vetor de expressão, de acordo com as reivindicações 9 ou 10.

12. Uma composição farmacêutica, **caracterizada por** compreender a proteína inibidora recombinante de Calicreína de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 como agente ativo e opcionalmente em combinação com um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis.

13. Uso da composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 12, na preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de disfunção associada a proteólise em mamíferos.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado por** a disfunção ser uma disfunção na qual a atividade de Calicreína hK2 é prejudicial.

15. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13, ou 14, **caracterizado por** a disfunção ser cancro, disfunção autoimune, disfunção inflamatória ou disfunção infecciosa.

16. Uso, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado por** o cancro ser cancro da próstata, cancro da mama ou cancro metastático.

17. Uso, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado por** a disfunção inflamatória ser Hipertrofia Prostática Benigna.

18. Método de produção, de proteína inibidora recombinante de Calicreína, de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 6, compreendendo as etapas de:

a. seleção de uma sequência polinucleotídica que codifica um local ativo de substrato específico para a mencionada Calicreína, a referida sequência consistindo de uma sequência pentapeptídica selecionada de entre SSRTE, KTRSN, ISPRS, GVFRS, GTVRS, ETKRS, LGRSL, RGRSE, RRSID, VLRSP, PFRSS, RSGSV, ARARS, SDRTA, KLRTT, RAAMM, TRAPM, DVRAA, PGRAP, VESRA, ARASE, TLQRV, RLERV, ERVSP, SSPRV,

RVGPY, PSARM, RGRMA, TVRMP, LRMPT, HRMSS, RPQEL, VRPLE, SGRLA, GTLRF, QWRNS, RNDKL, MRNRA, TRDSR, TGSRD, IMSRQ, LTTSK, PFRKI específicas para a referida Calicreína, fragmentos biologicamente ativos das mesmas, uma quimera molecular das mesmas, e/ou uma combinação das mesmas,

b. introdução da mencionada sequência pentapeptídica numa sequência que codifica uma sequência de serpina, de forma a obter uma proteína inibidora recombinante da mencionada Calicreína,

c. permitir a expressão da mencionada proteína inibidora recombinante da mencionada Calicreína num sistema de expressão celular sob condições apropriadas,

d. recuperação da proteína inibidora recombinante da mencionada Calicreína.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizado por** as condições apropriadas consistirem no cultivo do sistema de expressão celular sob temperatura de 10-40 °C durante 10-30 horas.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizado por** as condições apropriadas consistirem numa temperatura de 16 °C durante 16 horas.

21. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 20, **caracterizado por** a etapa (d) ser realizada por meio de separação após extração da proteína inibidora recombinante da mencionada Calicreína a partir do sistema de expressão celular.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado**

por a separação da proteína inibidora recombinante da mencionada Calicreína ser realizada por cromatografia de afinidade.

23. Método, de acordo com qualquer das reivindicações 18 a 22, **caracterizado por** a proteína inibidora recombinante da mencionada Calicreína ser adicionalmente testada para determinar a sua capacidade de inibição da atividade da mencionada Calicreína.

24. Método, de acordo com qualquer das reivindicações 18 a 22, **caracterizado por** o sistema de expressão celular ser uma célula bacteriana.

25. Um kit de diagnóstico para deteção de uma Calicreína numa amostra, **caracterizado por** compreendendo qualquer sequência de DNA isolada e purificada apropriada selecionada a partir do grupo SEQ ID No 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, e/ou uma sequência complementar às mesmas.

26. Kit de diagnóstico para deteção de uma Calicreína numa amostra, **caracterizado por** compreender a proteína inibidora recombinante de Calicreína de acordo com uma das reivindicações 1 a 6.

Lisboa,

FIG.1

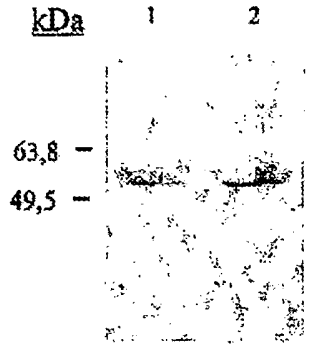

kDa
1
2
63,8
49,5

FIG.2

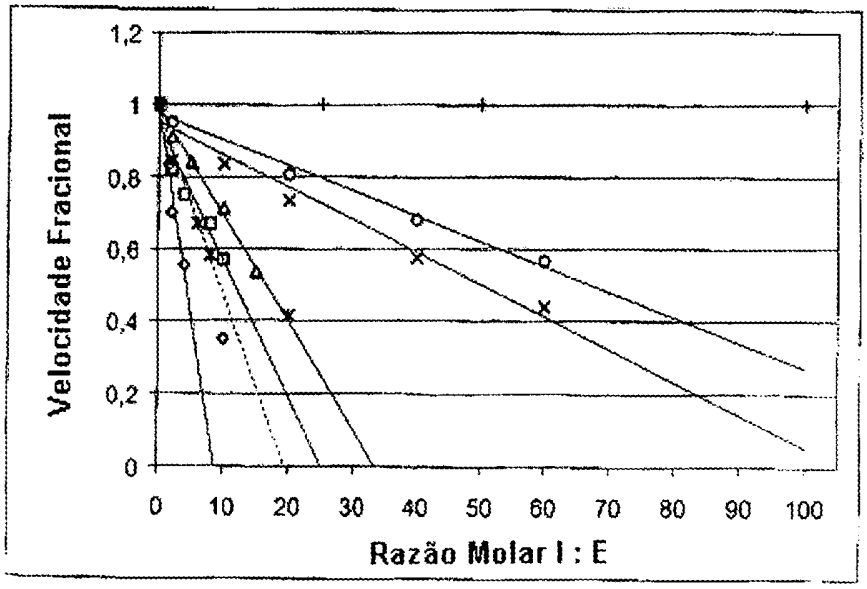

Velocidade Fracional
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Razão Molar I : E

FIG. 3

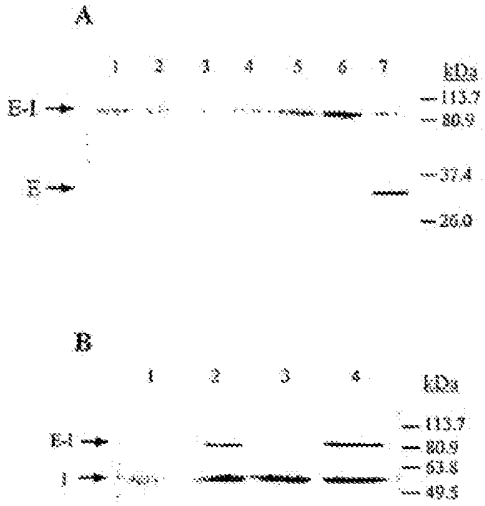

A
1 2 3 4 5 6 7
kDa
E-I
E
113.7
80.9
37.4
26.0
B
1 2 3 4
kDa
E-I
I
113.7
80.9
63.8
49.5

FIG. 4

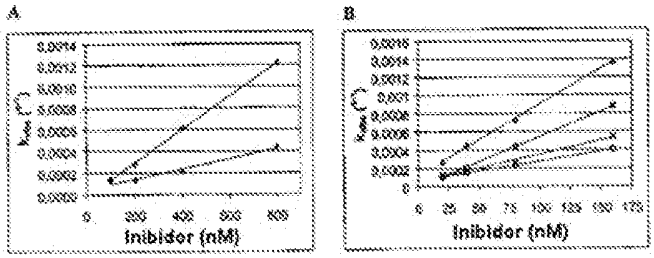

A
B
Inibidor (nM)
Inibidor (nM)

FIG. 5

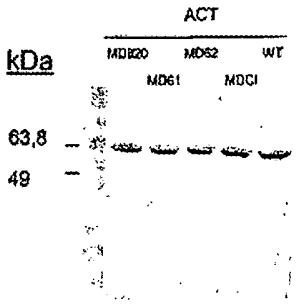

ACT
kDa
MDB20
MD52
WT
MD61
MDCI
63,8
49

FIG. 6

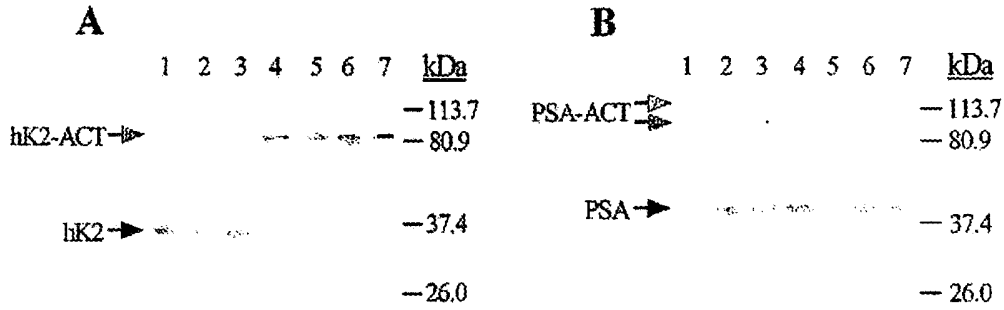

A
1 2 3 4 5 6 7 kDa
hK2-ACT
hK2
113.7
80.9
37.4
26.0
B
1 2 3 4 5 6 7 kDa
PSA-ACT
PSA
113.7
80.9
37.4
26.0

FIG. 7A

Itálico: Codão inicial ATG
Negrito: His-tag
Sublinhado: Sequência de DNA diferente da sequência ACTwt
Sublinhado e cinza: Sequência de DNA que codifica mutação em RSL

Sequência de DNA de Variantes de ACT: MD 820

SEQ ID N°1

ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCCACTTGACGAGGAGA
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCCTGTCTCTGGGGGCCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTCACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAACTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTCATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAAG
CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAAATCACCCTCCGTTCTCGAGCAGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

Sequência de Proteína de Variantes de ACT: MD 820

SEQ ID N°2

MRGSHHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
SPLSISTALAFLSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFQHLLRTLNQSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNGTRGKITDLIKDLDSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPQDTHQSRFYLSKKKWVMVPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVELK
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDYNLNDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVEITLRSRAVETRTIVRF
NRPFLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

FIG. 7B

Itálico: Codão inicial ATG
Negrito: His-tag
Sublinhado: Sequência de DNA diferente da sequência ACTwt
Sublinhado e cinza: Sequência de DNA que codifica mutação em RSL

Sequência de DNA de Variantes de ACT: MD 62

SEQ ID N°3

ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCCACTTGACGAGGAGA
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCCTGTCTCTGGGGGCCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTCACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAACTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGTTCTACTTGAGCAAGAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAAG
CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAAATCACCAGGAGGTCTATCGATGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

Sequência de Proteína de Variantes de ACT: MD 62

SEQ ID N°4

MRGSHHHHHHSRHPNSPLDRENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
SPLSISTALAFLSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFQHLLRTLNQSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNGTRGKITDLIKDLDSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPQDTHQSRFYLSKKKWVMVPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVELK
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDYNLNDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKITRRSIDVETRTIVRF
NRPFLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

FIG. 7C

Itálico: Codão inicial ATG
Negrito: His-tag
Sublinhado: Sequência de DNA diferente da sequência ACTwt
Sublinhado e cinza: Sequência de DNA que codifica mutação em RSL

Sequência de DNA de Variantes de ACT: MD 83

SEQ ID N°5

ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCCACTTGACGAGGAGA
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCCTGTCTCTGGGGGCCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTCACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAACTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAAG
CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAAATCAGGGGGAGCATCTGAGTTAGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

Sequência de Proteína de Variantes de ACT: MD 83

SEQ ID N°6

MRGSHHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
SPLSISTALAFLSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFQHLLRTLNQSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNGTRGKITDLIKDLDSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPQDTHQSRFYLSKKKWVMVPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVELK
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWEDSLEFREIGELYLPKFSISRDYNLNDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTRASAATAVKIRGRSELVETRTIVRF
NRPFLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

FIG. 7D

Itálico: Codão inicial ATG
Negrito: His-tag
Sublinhado: Sequência de DNA diferente da sequência ACTwt
Sublinhado e cinza: Sequência de DNA que codifica mutação em RSL

Sequência de DNA de Variantes de ACT: MD 67

SEQ ID N°7

ATGAGAGGATCC**CATCACCATCACCATCAC**TCTAGACACCCTAACAGCCCACTTGACGAGGAGA
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCCTGTCTCTGGGGGCCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGCAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTCACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAACTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAAG
CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAAATCAAGCTTAGAACAACATTAGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

Sequência de Proteína de Variantes de ACT: MD 67

SEQ ID N°8

MRGSHHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
SPLSISTALAFLSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFQHLLRTLNQSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNGTRGKITDLIKDLDSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPQDTHQSRFYLSKKKWVMVPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVELK
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDYNLNDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKIKLRTTLVETRTIVRF
NRPFLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

FIG. 7E

Itálico: Codão inicial ATG
Negrito: His-tag
Sublinhado: Sequência de DNA diferente da sequência ACTwt
Sublinhado e cinza: Sequência de DNA que codifica mutação em RSL

Sequência de DNA de Variantes de ACT: MD 61

SEQ ID N°9

ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCCACTTGACGAGGAGA
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCCTGTCTCTGGGGGCCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTCACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAACTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAAG
CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAAATCATGACAAGATCTAACGCAGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

Sequência de Proteína de Variantes de ACT: MD 61

SEQ ID N°10

MRGSHHHHHHSRHFNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
SPLSISTALAFLSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFQHLLRTLNQSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNGTRGKITDLIKDLDSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPQDTHQSRFYLSKKKWVMVPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVELK
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDYNLNDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKIMTRSNAVETRTIVRF
NRPFLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

FIG. 7F

Itálico: Codão inicial ATG
Negrito: His-tag
Sublinhado: Sequência de DNA diferente da sequência ACTwt
Sublinhado e cinza: Sequência de DNA que codifica mutação em RSL

Sequência de DNA de Variantes de ACT: MD 518

SEQ ID N°11

ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCCACTTGACGAGGAGA
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCCTGTCTCTGGGGGCCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTCACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAACTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGCACGAGGAGCTGTCCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAAG
CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAAATCACCGAGCGTGTCTCGCCCGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

Sequência de Proteína de Variantes de ACT: MD 518

SEQ ID N°12

MRGSHHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
SPLSISTALAFLSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFQHLLRTLNQSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNGTRGKITDLIKDLDSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPQDTHQSRFYLSKKKWVMVPMMSLHNLTIPYFRDEELSCTVVELK
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDYNLNDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKITERVSPVETRTIVRF
NRPFLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

FIG. 7G

Itálico: Codão inicial ATG
Negrito: His-tag
Sublinhado: Sequência de DNA diferente da sequência ACTwt
Sublinhado e cinza: Sequência de DNA que codifica mutação em RSI.

Sequência de DNA de Variantes de ACT: MDCI

SEQ ID N°13

ATGAGAGGATCC**CATCACCATCACCATCAC**TCTAGACACCCTAACAGCCCACTTGACGAGGAGA
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCCTGTCTCTGGGGGCCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTCACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAACTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAAG
CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAAATCACCTTTAGATCTGCATTAGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

Sequência de Proteína de Variantes de ACT: MD CI

SEQ ID N°14

MRGSHHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
SPLSISTALAFLSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFQHLLRTLNQSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNGTRGKITDLIKDLDSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPQDTHQSRFYLSKKKWVMVPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVELK
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDYNLNDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKITFRSALVETRTIVRF
NRPFLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

FIG. 8

Serpin	Sequências	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P'1	P'2	P'3	P'4	P'5
ACT_{wt}	Proteína (a.a) SEQ ID N° 15	V	K	I	T	L	L*	S	A	L	V	E
	DNA (codão)	GTC	AAA	ATC	ACC	CTC	CTT	TCT	GCA	TTA	GTG	GAG
MD820	Proteína (a.a) SEQ ID N° 16	V	K	I	T	L	R*	S	R	A	V	E
	DNA (codão)	GTC	AAA	ATC	ACC	CTC	CGT	TCT	CGA	GCA	GTG	GAG
MD62	Proteína (a.a) SEQ ID N° 17	V	K	I	T	R	R*	S	I	D	V	E
	DNA (codão)	GTC	AAA	ATC	ACC	AGG	AGG	TCT	ATC	GAT	GTG	GAG
MD83	Proteína (a.a) SEQ ID N° 18	V	K	I	R	G	R*	S	E	L	V	E
	DNA (codão)	GTC	AAA	ATC	AGG	GGG	AGA	TCT	GAG	TTA	GTG	GAG
MD87	Proteína (a.a) SEQ ID N° 19	V	K	I	K	L	R*	T	I	L	V	E
	DNA (codão)	GTC	AAA	ATC	AAG	CTT	AGA	ACA	ACA	TTA	GTG	GAG
MD91	Proteína (a.a) SEQ ID N° 20	V	K	I	M	T	R*	S	N	A	V	E
	DNA (codão)	GTC	AAA	ATC	ATG	ACA	AGA	TCT	AAC	GCA	GTG	GAG
MD518	Proteína (a.a) SEQ ID N° 21	V	K	I	T	E	R*	V	S	P	V	E
	DNA (codão)	GTC	AAA	ATC	ACC	GAG	CGT	GTC	TCG	CCG	GTG	GAG
MDCI	Proteína (a.a) SEQ ID N° 22	V	K	I	T	F	R*	S	A	L	V	E
	DNA (codão)	GTC	AAA	ATC	ACC	TTT	AGA	TCT	GCA	TTA	GTG	GAG

FIG. 9

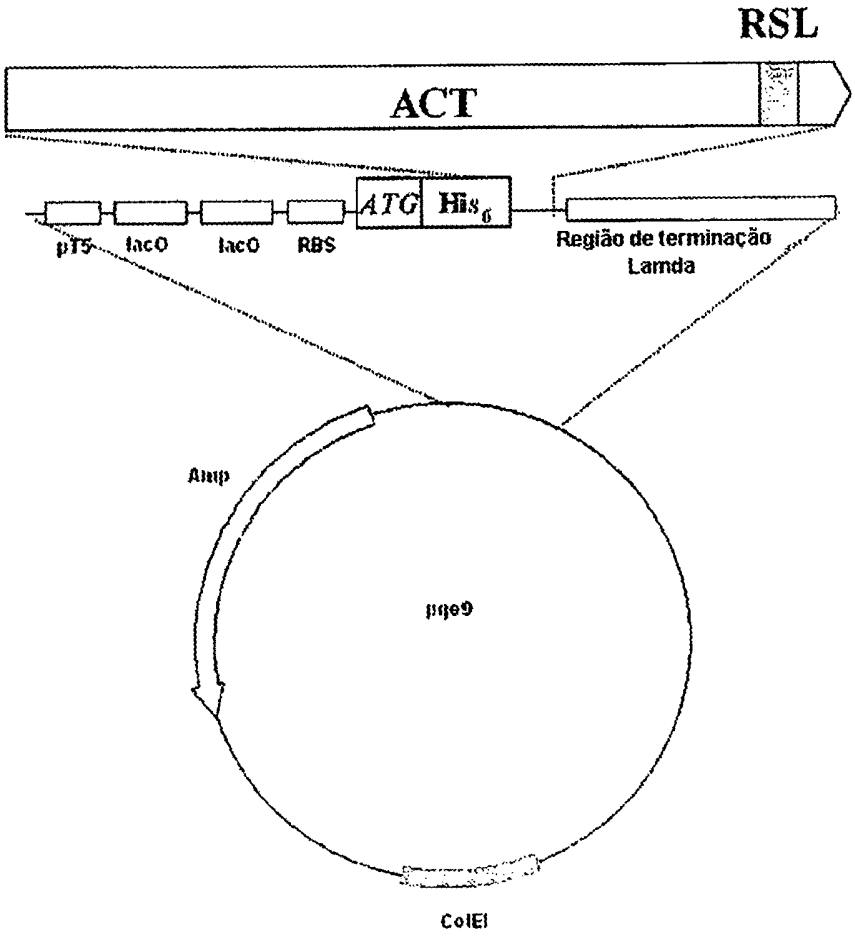

RSL
ACT
ATG
His6
pT5
lacO
lacO
RBS
Região de terminação
Lamda
Amp
pqe9
ColEI

FIG. 10 A

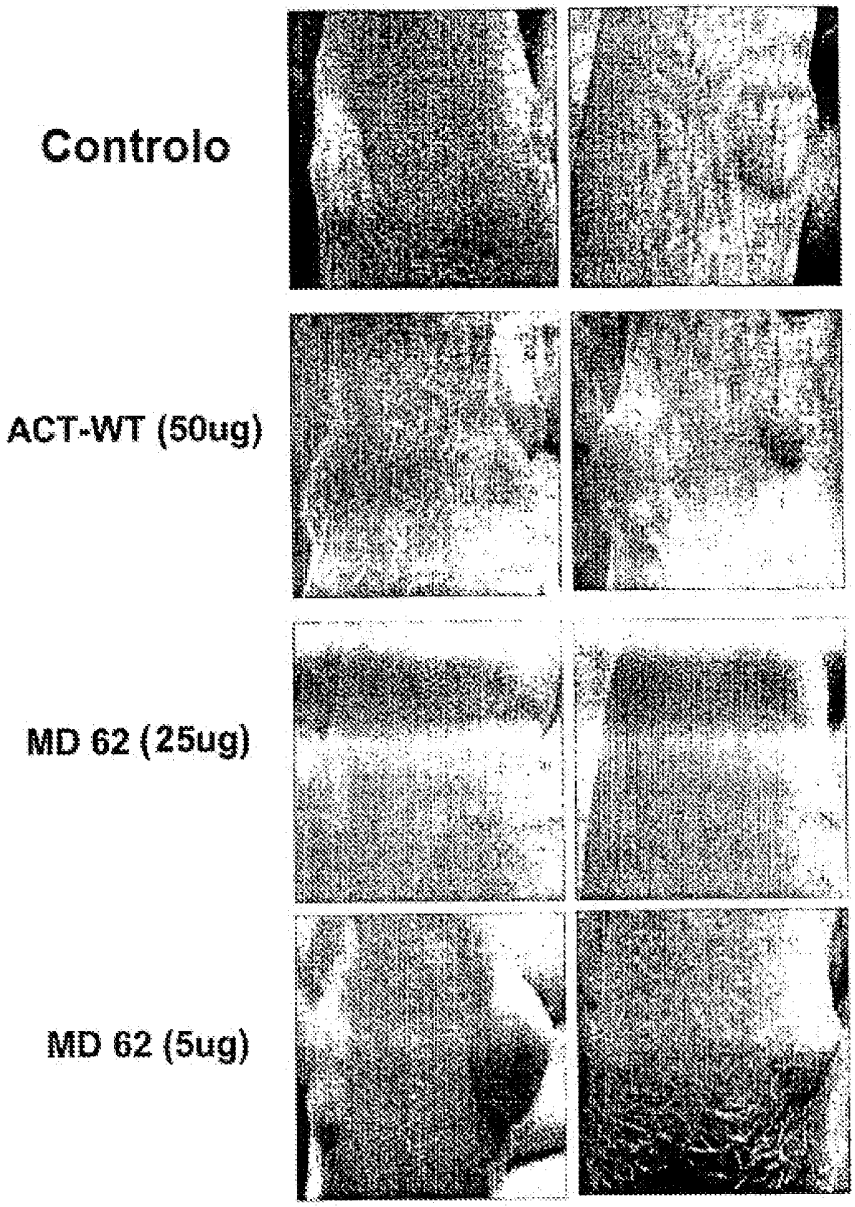


FIG. 10 B

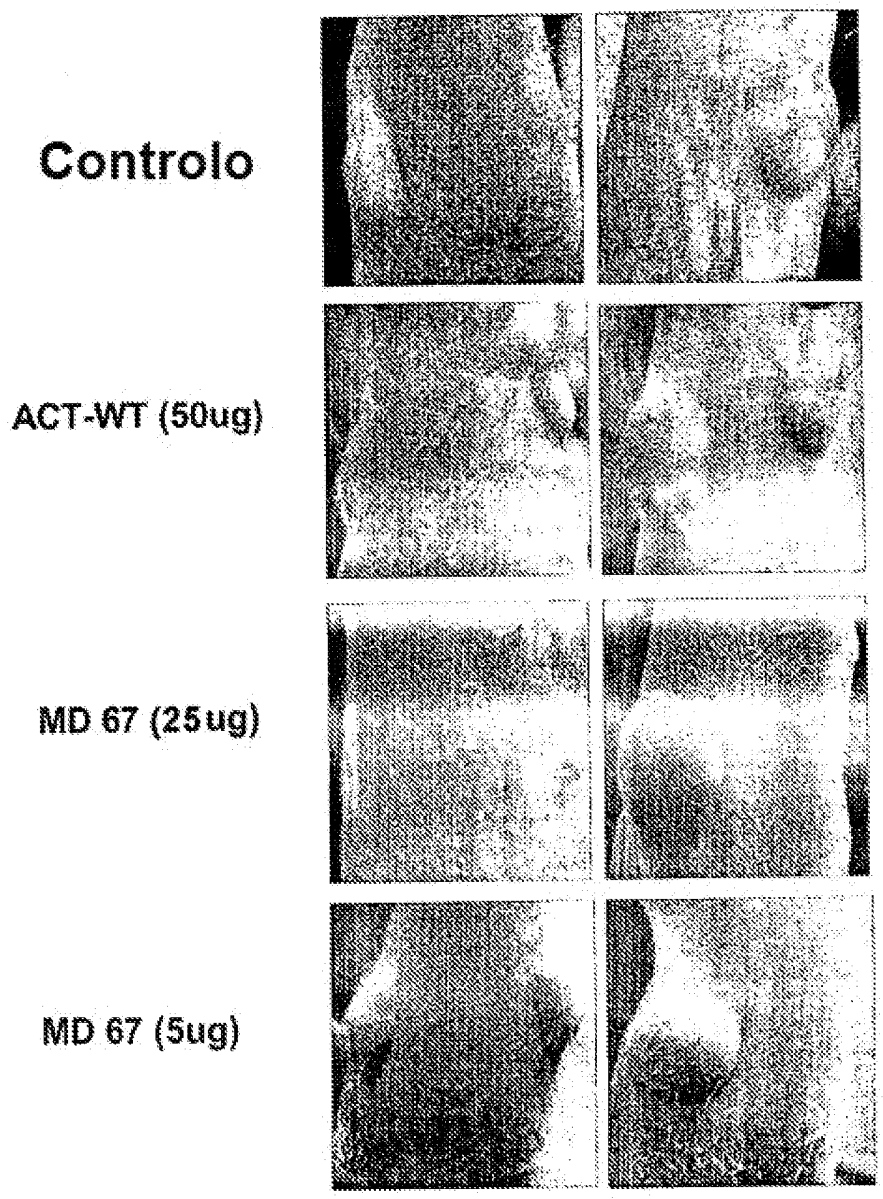


FIG. 11

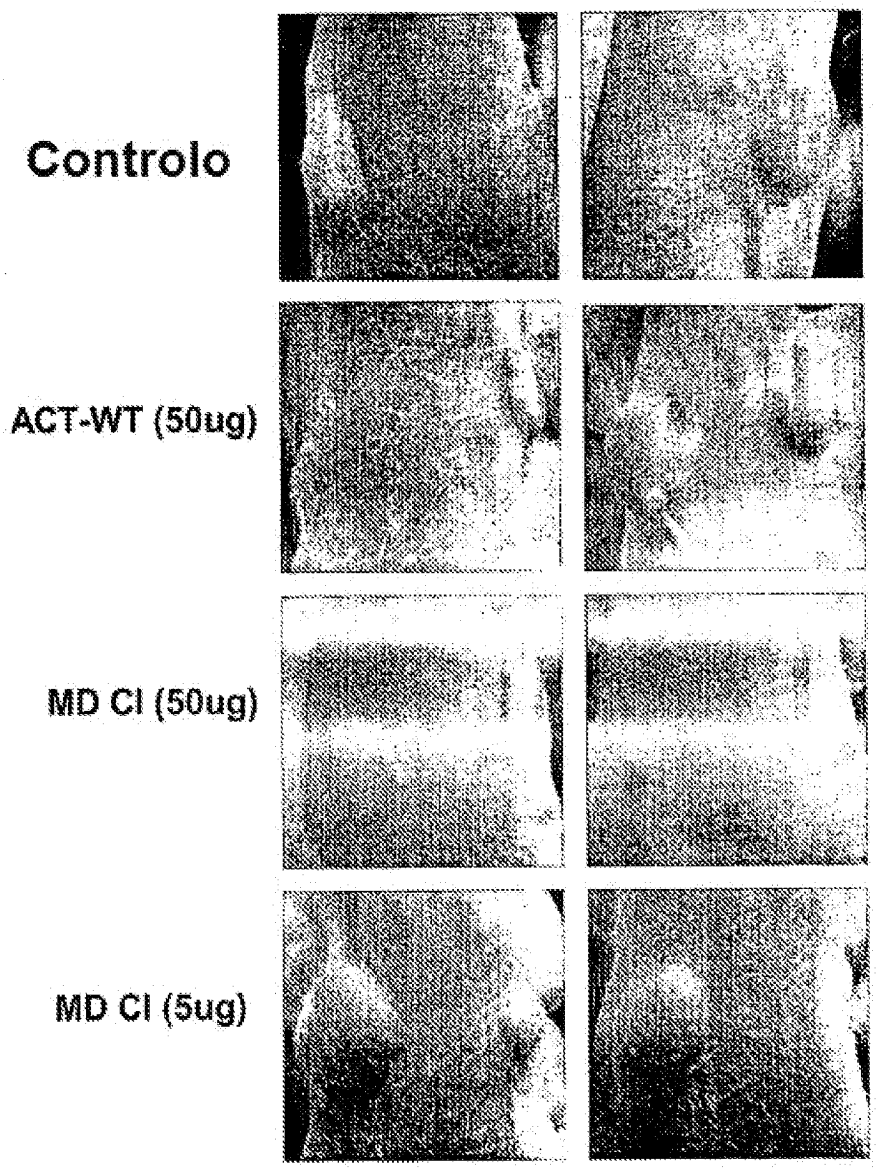


FIG. 11

