



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0819780-6 B1

(22) Data do Depósito: 25/11/2008

(45) Data de Concessão: 24/01/2023

(54) Título: POLINUCLEOTÍDEO E MÉTODO PARA PRODUZIR UM OU MAIS POLIPEPTÍDEOS DE PLASMINA RECOMBINANTE

(51) Int.Cl.: C12N 9/68; C12N 15/09.

(30) Prioridade Unionista: 29/11/2007 US 60/991,148.

(73) Titular(es): GRIFOLS THERAPEUTICS INC..

(72) Inventor(es): VALERY NOVOKHATNY.

(86) Pedido PCT: PCT US2008084645 de 25/11/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/073471 de 11/06/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 27/05/2010

(57) Resumo: POLINUCLEOTÍDEO, VETOR, CÉLULA E MÉTODO PARA PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO. A presente invenção refere-se a polinucleotídeos e polipeptídeos relacionados a uma molécula de plasmina (plasminogênio) modificada de forma recombinante. A molécula de plasmina (plasminogênio) tem um único domínio kring/e no N-terminal para o sítio de ativação presente na molécula de plasminogênio humano nativo, combinados de tal modo que nenhuma sequência estranha esteja presente, e apresenta características enzimáticas ligantes de lisina e significativas associadas à enzima nativa

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"POLINUCLEOTÍDEO E MÉTODO PARA PRODUZIR UM OU MAIS POLIPEPTÍDEOS DE PLASMINA RECOMBINANTE"**.

Referência Cruzada a Pedidos Relacionados

- 5 O presente pedido reivindica prioridade sob 35 USC § 119 ao pedido de patente provisório U.S. 60/991.148, depositado em 29 de Novembro de 2007, incorporado aqui por referência.

Antecedentes da Invenção

- 10 O plasminogênio humano é uma proteína de cadeia única contendo 791 resíduos de aminoácidos. A ativação de plasminogênio para plasmina resulta de uma única clivagem da ligação peptídica Arg561-Val562 no zimogênio. A molécula de plasmina resultante é uma serina protease ligada por dissulfeto em duas cadeias com especificidade semelhante a tripsina (cliva depois de Lys e Arg).

- 15 A cadeia pesada do amino-terminal de plasmina (resíduos 1-561, ~60 kDa) é constituída de cinco domínios kringle, cada um contendo aproximadamente 80 resíduos de aminoácidos. Os domínios kringle são responsáveis pelas propriedades reguladoras de plasminogênio, tal como a interação com inibidores de ativação, por exemplo, íons Cl^{-1} ; com estimulantes de ativação, por exemplo, ácido ϵ -aminocaproico; com células de mamíferos e bacterianas; e com outras proteínas, tais como substrato fisiológico de plasmina fibrina e inibidor de plasmina $\alpha 2$ -antiplasmina. Entre todos cinco kringles, kringle 1 é um dos mais multifuncionais: sua atividade ligante de lisina demonstrou ser responsável pela interação de plasmina com $\alpha 2$ -antiplasmina e fibrina. Vide Wiman, B., *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 579:142-154 (1979); e Lucas, M.A., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 258:4249-4256 (1983).

- 25 A cadeia leve do C-terminal de plasmina (resíduos 562-791, ~25kDa) é uma serina protease típica, homóloga a tripsina e contendo a tríade catalítica serina protease clássica: His603, Asp646 e Ser741. Plasminogênio contém 24 pontes dissulfeto e 2 sítios de glicosilação em Asn289 e Thr346.

A proteólise limitada de plasminogênio por elastase demonstrou

resultar em três fragmentos principais (Sottrup-Jensen, L., *et al.*, *Prog. Chem. Fibrinol. Thrombol.*, 3:191-209 (1978)). O primeiro fragmento, K1-3, inclui os três primeiros kringles e pode ser isolado em duas versões, Tyr80-Val338 e Tyr80-Val354. O segundo fragmento, K4, corresponde ao quarto kringle e inclui os resíduos Val355-Ala440. O último, fragmento do C-terminal (o assim denominado miniplasminogênio) inclui os resíduos Val443-Asn791 e consiste no quinto kringle e o domínio de serina protease. O miniplasminogênio pode ser ativado da mesma maneira que o plasminogênio, formando miniplasmina.

Por causa da estrutura complexa da molécula de plasminogênio de comprimento inteiro, os sistemas de expressão bacteriana não demonstraram ser úteis para a produção recombinante de plasminogênio. O plasminogênio é produzido na forma de corpos de inclusão insolúveis e não é redobrável a partir daquele estado. Além disso, a expressão de plasminogênio em células de mamíferos é complicada por ativação intracelular de plasminogênio em plasmina e a citotoxicidade resultante. A produção de plasminogênio completamente ativo usando células de insetos é possível; entretanto, este sistema não é apropriado para produção em larga escala devido ao baixo rendimento. Além disso, da mesma forma que com qualquer esquema de proteína recombinante, existe o potencial de encontrar problemas de imunogenicidade no indivíduo que recebe a proteína recombinante terapêutica.

A imunogenicidade pode ser uma barreira à utilização eficaz e/ou eficiente de certos esquemas terapêuticos com proteínas recombinantes. A imunogenicidade é uma série complexa de respostas a uma substância (por exemplo, a estrutura química de uma proteína, que inclui a sequência de aminoácidos) que é percebida como estranha e pode incluir a produção de anticorpos neutralizadores e não-neutralizadores, formação de complexos imunes, ativação de complementos, ativação de mastócitos, inflamação, e anafilaxia. A imunogenicidade pode limitar a eficácia e segurança de uma proteína terapêutica de múltiplas maneiras. A eficácia pode ser reduzida diretamente pela formação de anticorpos neutralizadores. A eficácia pode ser reduzida também indiretamente, pois a ligação a anticorpos neutralizado-

res ou não-neutralizadores leva tipicamente a uma rápida depuração do sorro. Efeitos colaterais severos e mesmo morte podem ocorrer quando uma reação imune é provocada. Uma classe especial de efeitos colaterais resulta quando anticorpos neutralizadores sofrem reação cruzada com uma proteína endógena e bloqueiam sua função.

Consequentemente, uma proteína recombinante modificada, que possui as características desejáveis (por exemplo, regiões com estruturas químicas semelhantes às nativas) de plasmina/plasminogênio, embora carecendo de certas características negativas e sendo capazes de produção em sistema de expressão de proteínas recombinantes, incluindo células bacterianas em quantidades substanciais, é desejável.

Sumário da Invenção

Em um aspecto, a presente invenção fornece um polinucleotídeo que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que tem

a) um domínio *kringle* no N-terminal homólogo a um domínio *kringle* de plasminogênio humano nativo, em que os quatro últimos resíduos de aminoácidos dentro do domínio *kringle* são V, P, Q, e C; e

b) um sítio de ativação do domínio do C-terminal e domínio de serina protease homólogo aos domínios correspondentes no plasminogênio humano; em que o polipeptídeo se liga à lisina imobilizada.

Em outro aspecto, a presente invenção fornece um polipeptídeo que compreende:

a) um único domínio *kringle* do N-terminal homólogo a um domínio *kringle* de plasminogênio humano nativo, em que os quatro últimos resíduos de aminoácidos dentro do domínio *kringle* são V, P, Q, e C; e

b) um sítio de ativação do domínio do C-terminal e um domínio de serina protease homólogo aos domínios correspondentes em plasminogênio humano; em que o polipeptídeo se liga à lisina imobilizada.

Em outros aspectos, a presente invenção fornece um vetor de expressão que compreende um polinucleotídeo da presente invenção. Em uma modalidade, o polinucleotídeo compreende uma sequência de nucleotí-

deos ilustrada em SEQ ID NO:1.

Em alguns aspectos, a presente invenção fornece uma célula cultivada que compreende um vetor de expressão que compreende um polinucleotídeo da presente invenção. Em uma modalidade, o polinucleotídeo
5 compreende uma sequência de nucleotídeos ilustrada em SEQ ID NO:1. Em outra modalidade, a célula cultivada é um organismo procariótico. Em uma modalidade, o organismo procariótico é *E. coli*.

Em um aspecto, a presente invenção fornece um método para produzir um ou mais polipeptídeos de plasmina recombinante. O método
10 compreende:

a) disponibilizar um polipeptídeo que tem um único domínio *kringle* no N-terminal homólogo a um domínio *kringle* de plasminogênio humano nativo, em que os quatro últimos resíduos de aminoácidos dentro do domínio *kringle* são V,P,Q, e C; e um sítio de ativação de domínio do C-terminal e
15 domínio de serina protease homólogo aos domínios correspondentes em plasminogênio humano; em que o polipeptídeo se liga à lisina imobilizada.

b) colocar o polipeptídeo obtido na etapa (a) em contato com uma protease sob condições suficientes para clivar uma ou mais ligações peptídicas, formando desta forma um ou mais polipeptídeos de plasmina
20 recombinante. Em uma modalidade, disponibilizar compreende expressar estrutura de leitura aberta que tem uma sequência correspondente à sequência ilustrada em SEQ ID NO:1, ou uma sua variante degenerada, em um hospedeiro apropriado. Em outra modalidade, o polipeptídeo tem uma sequência de aminoácidos ilustrada em SEQ ID NO:2.

25 Breve Descrição dos Desenhos

A figura 1 é uma representação esquemática de plasmina nativa depois da ativação por clivagem proteolítica. K1-K5 são as regiões de *kringle* 1-5; e SP é o domínio de serina protease. "α2-AP" é o sítio de ligação de α₂-antiplasmina em *kringle* 1.

30 A figura 2 é uma representação esquemática de uma deleção de plasminogênio mutante da invenção usando a mesma nomenclatura que na figura 1, e ilustrando a deleção de K2-5.

A figura 3 ilustra a sequência de aminoácidos de plasminogênio humano, ilustrando a sequência líder com 19 resíduos numerados como -19 a -1, e a sequência de plasminogênio ilustrada como resíduos 1-791 (vide SEQ ID NO:3, a sequência do cDNA para plasminogênio humano; e SEQ ID NO:4, sequência de aminoácidos codificada, como ilustrada na figura 3). I-

5 númeras das características estão ilustradas, incluindo a seguinte: uma modalidade da sequência de plasminogênio (TAL6003) (sombreada); domínios *kringle* 1-5 (sublinhado duplo); sítios de glicosilação Asn289 e Thr346 (em negrito); o sítio de ativação Arg-Val (R⁵⁶¹V⁵⁶² em negrito); e sítios de ligação

10 de lisina em *kringle* 1 (em sublinhado e com numeração específica da posição).

A figura 4 ilustra comparações de sequências de polipeptídeos (isto é, um alinhamento de intervalos) entre os cinco domínios *kringle* (1-5) de plasmina (plasminogênio) nativa humana. Os resíduos de aminoácidos,

15 que são idênticos àqueles da mesma posição relativa em *kringle* 1, estão indicados em sublinhado.

A figura 5 ilustra uma SDS-PAGE com gradiente de preparação de 8-25% de plasmina derivada de plasma (Fileira 1= não-reduzido (NR); Lane 2 = reduzido (R)) e (TAL6003)-plasmina (Fileira 3 = não-reduzido (NR);

20 Fileira 4 = reduzido (R)). A ativação de estreptocinase do plasminogênio derivado de plasma e plasminogênio (TAL6003) dentro de plasmina nativa e recombinante (TAL6003)-plasmina, respectivamente, resulta na formação de duas bandas correspondentes ao *kringle* e os domínios de serina protease. Consequentemente, depois da incubação com o agente redutor ditioneitol

25 (DTT) antes da eletroforese, plasmina derivada de plasma e (TAL6003)-plasmina, que são uma única banda em um gel não reduzido, reduzem para duas bandas correspondentes a *kringle* 1 (banda inferior) e o domínio de serina protease (banda superior) no mesmo gel não reduzido.

A figura 6 é uma representação gráfica da ativação de

30 (TAL6003)-plasminogênio por estreptocinase.

A figura 7 é um cromatograma que ilustra a ligação de (TAL6003)-plasminogênio à lisina-SEPHAROSE 4B: 0,5 mg de (TAL6003)-

plasminogênio purificado foi aplicado na mesma coluna de lisina-SEPHAROSE 4B (1 x 3 cm) equilibrada com solução salina tamponada com Tris, pH 7,4. A proteína ligada foi eluída a partir da coluna por um gradiente de 0-20 mM de ácido ϵ -aminocaproico (ϵ -ACA) como um único pico. A absorvância a 280 nm e a concentração de ϵ -ACA, em função do volume do efluente estão apresentadas no gráfico.

A figura 8 ilustra a ligação de (TAL6003)-plasminogênio à fibrina avaliada pela sua subsequente ativação por tPA e a lise do coágulo resultante.

A figura 9 ilustra uma comparação *in vitro* da eficácia trombolítica de (TAL6003)-plasmina com plasmina derivada de plasma.

A figura 10 ilustra o padrão de ligação dissulfeto de (TAL6003)-plasmina (SEQ ID NO:2). Na figura, (X) representa a sequência de aminoácidos RDVVLFEK.

15 Descrição da Invenção

Os presentes inventores descobriram polipeptídeos de plasminogênio recombinantes inusitados, ou variantes deles, aqui referidos como plasminogênios (TAL6003) que têm características semelhantes ao plasminogênio nativo apesar da deleção de 4 kringles da sua estrutura. Estes plasminogênios (TAL6003), ou as variantes deles, são zimogênios que são capazes de se tornarem ativados para enzimas plasminas funcionais aqui referidas como plasminas (TAL6003) depois de um episódio de ativação que envolve pelo menos a clivagem proteolítica de uma ligação peptídica Arg-Val localizada entre o domínio *kringle* e o domínio de serina protease do zimogênio.

O plasminogênio (TAL6003), ou uma variante do mesmo, da presente invenção tem ligação de fibrina antiplasmina bem como propriedades de ativação de plasminogênio humano nativo de comprimento inteiro. Além disso, o plasminogênio (TAL6003) tem inúmeras características inusitadas e desejáveis incluindo alto nível de expressão em produção recombinante e certas estruturas químicas de proteínas idênticas ou muito similares às formas de ocorrência natural de plasminogênio derivado de plasma hu-

mano.

A plasmina ou plasminogênios (TAL6003) de acordo com a presente invenção podem ser caracterizados pelo menos pelo seguinte:

- i) os pesos moleculares mais baixos (por exemplo, em uma modalidade cerca de 36.911 a cerca de 37.039 Da) de plasminas (TAL6003) criados depois da ativação de plasminogênios (TAL6003) resultam em atividade específica aumentada (por mg de proteína);
- ii) a falta de pelo menos dois sítios de glicosilação encontrados na proteína nativa (vide a figura 3, isto é, N²⁸⁹ e T³⁴⁶), combinado com os pesos moleculares mais baixos, facilitata a produção recombinante desta proteína usando sistemas de expressão bacteriana e em leveduras relativamente baratos;
- iii) os plasminogênios (TAL6003) podem ser ativados por ativadores de plasminogênios tPA, urocinase, e estreptocinase;
- iv) a presença do único domínio *kringle* do N-terminal homólogo a um domínio *kringle* de plasminogênio humano nativo preserva as propriedades de ligação de fibrina da plasmina que são importantes para a eficácia trombolítica;
- v) a presença de sítios de ligação de α_2 -antiplasmina no único domínio *kringle* do N-terminal homólogo a um domínio *kringle* no plasminogênio humano nativo permite que as plasminas (TAL6003) sejam inibidas rapidamente por este inibidor fisiológico de plasmina (uma característica que pode prevenir sangramento);
- vi) o menor tamanho das plasminas (TAL6003) pode facilitar sua inibição por α_2 -macroglobulina, diminuindo ainda mais a possibilidade de complicações de sangramento em relação à plasmina nativa. Em modalidades específicas, a ausência de *kringle* 5, que retém o sítio de ligação primário para fibrina ou fibrinogênio não digerido intacto, pode permitir o uso das plasminas (TAL6003) com depleção reduzida de fibrinogênio circulante;
- vii) a presença de um único domínio *kringle* no terminal homólogo a um domínio *kringle* de plasminogênio humano nativo, em que os últimos quatro resíduos de aminoácidos dentro do domínio *kringle* são V, P, Q, e C,

proporciona uma ligação semelhante à nativa do domínio de serina protease (isto é, uma ligação similar à junção de domínios que ocorre naturalmente entre o domínio *kringle* 5 e o domínio de serina protease de plasminogênio humano); e

- 5 viii) depois da expressão do plasminogênio (TAL6003) recombinante, seu N-terminal pode ser clivado de volta (por exemplo, clivado de volta durante a ativação) para produzir um N-terminal semelhante ao nativo.

 Genericamente, a invenção fornece polipeptídeos de plasmina ou plasminogênio (TAL6003) recombinante tendo uma única região de kringle do N-terminal para o sítio de ativação e domínio de serina protease, tendo certas vantagens em relação a miniplasmina ou miniplasminogênio. Embora os plasminogênios (TAL6003) da invenção têm apenas um domínio *kringle*, e assim sendo, o N-terminal para o sítio de ativação, algumas modalidades incluem sequências adicionais no N-terminal para o sítio de ativação.

10 As equências adicionais do N-terminal podem ser derivadas a partir daquelas de *regiões* kringle nativas de plasminogênio.

 Os domínios *kringle* do N-terminal da presente invenção incluem sequências kringle de kringles 1 e 4 de plasmina ou plasminogênio nativo e seus equivalentes funcionais. Particularmente, vide a discussão abaixo que

20 fornece orientação quanto à preservação de função em variantes de polipeptídeos, incluindo preservação de resíduos que participam ou influenciam a ligação de lisina.

 Além disso, modalidades específicas dos polipeptídeos da presente invenção podem apresentar imunogenicidade reduzida em virtude de estruturas semelhantes às nativas. Por exemplo, em algumas modalidades,

25 o plasminogênio recombinante da presente invenção tem um N-terminal idêntico àquele de formas de ocorrência natural de plasminogênio derivado de plasma humano, o qual, após ativação por estreptocinase, produz polipeptídeos de plasmina que compreendem N-terminais semelhantes ao nativo.

30 Adicionalmente, os polipeptídeos inusitados da presente invenção têm uma sequência entre os domínios *Kringle* e Serina protease que é similar à junção entre kringle 5 e o domínio SP em plasmina humana de ocorrência

natural.

Definições

Os termos “domínio” e “região” de um polipeptídeo são genericamente sinônimos como aqui utilizados, a menos que diferentemente indicado. Quando enunciados junto com designações estruturais ou funcionais bem reconhecidas, tais como “kringle” ou “serina protease,” etc., tais termos introduzirão uma característica do polipeptídeo referente a pelo menos algumas características comumente reconhecidas e entendidas como estando associadas às estruturas de polipeptídeos correspondentes a tais designações.

O termo “célula hospedeira cultivada”, como aqui utilizado, refere-se a uma célula procariótica ou eucariótica que contém o DNA heterólogo que foi introduzido na célula por qualquer meio, por exemplo, eletroporação, precipitação com fosfato de cálcio, microinjeção, transformação, infecção viral, e técnicas similares.

O termo “heterólogo”, como aqui utilizado, significa “de origem diferente da natural” ou representando um estado não-natural. Por exemplo, caso uma célula hospedeira cultivada seja transformada com um DNA ou gene derivado de outro organismo, particularmente de outra espécie, esse gene é heterólogo em relação à célula hospedeira cultivada e também em relação aos descendentes da célula hospedeira cultivada que carregam esse gene. Similarmente, “heterólogo” refere-se à sequência de nucleotídeos derivada de e inserida no mesmo tipo de célula original natural, mas que está presente em um estado não-natural, por exemplo, um número de cópias diferente ou sob o controle de diferentes elementos reguladores. Além disso, quando utilizado no contexto de um ácido nucleico ou sequência de aminoácidos, o termo “heterólogo” pode se referir também a qualquer região da sequência que é de uma origem natural diferente do que outra região da mesma sequência. Por exemplo, caso uma proteína recombinante compreenda um domínio *kringle* derivado de apolipoproteína (a) e um domínio de serina protease derivada de plasminogênio, o domínio *kringle* e o domínio de serina protease são “heterólogos” um em relação ao outro, particularmente se

cada domínio for derivado de uma espécie ou organismo diferente.

Uma molécula de “vetor” é uma molécula de ácido nucleico dentro da qual pode ser inserido um ácido nucleico heterólogo que pode ser então introduzido dentro de uma célula hospedeira cultivada apropriada. Os vetores têm, de preferência, uma ou mais origens de replicação, e um ou mais sítios dentro dos quais o DNA recombinante pode ser inserido. Os vetores têm frequentemente meios convenientes pelos quais as células com vetores podem ser selecionadas entre aquelas sem, por exemplo, que elas codifiquem genes de resistência a fármacos. Os vetores comuns incluem plasmídeos, genomas virais, e (principalmente em leveduras e bactérias) “cromossomas artificiais”.

Como aqui utilizado, o termo “sequência de controle transcricional” refere-se a sequências de ácido nucleicos, tais como sequências iniciadoras, sequências intensificadoras e sequências promotoras, que induzem, reprimem, ou controlam de outra forma a transcrição de sequências de ácidos nucleicos que codificam proteínas às quais elas estão ligadas operacionalmente.

O termo “polipeptídeo” é aqui utilizado de forma intercambiável com os termos “peptídeo” e “proteína”.

Os termos “polinucleotídeo” e “ácido nucleico” são aqui utilizados de forma intercambiável, e podem se referir a qualquer ácido nucleico que contenha as informações necessárias para o propósito indicado pelo contexto. Isto é, o ácido nucleico pode ser DNA ou RNA, seja ele de filamento único ou filamento duplo, ou outro ácido nucleico, desde que o polímero seja capaz de representar as informações apropriadas, por exemplo, em relação a um peptídeo codificado, e possa incluir sequências complementares, por exemplo, filamentos *senso* e filamentos *antisense* de polímeros de ácidos nucleicos.

O termo “variante” de um polipeptídeo refere-se a uma sequência de aminoácidos que é alterada por um ou mais aminoácidos. A variante pode ter mudanças “conservativas”, em que um aminoácido substituído tem propriedades estruturais ou químicas similares, por exemplo, substituição de

leucina por isoleucina. Alternativamente, uma variante pode ter mudanças “não-conservativas”, por exemplo, substituição de uma glicina por um triptofano. Uma variação análoga menor pode incluir também deleção ou inserção de aminoácido, ou ambas. Uma forma específica de um polipeptídeo “variante” é um polipeptídeo “funcionalmente equivalente”, isto é, um polipeptídeo que apresenta atividade *in vivo* ou *in vitro* substancialmente similar à dos exemplos do polipeptídeo da invenção, como descrito mais detalhadamente abaixo. Uma orientação ao determinar quais resíduos de aminoácidos podem ser substituídos, inseridos, ou deletados sem eliminar atividade biológica ou imunológica pode ser encontrada usando os programas de computador bem-conhecidos nessas técnicas, por exemplo, o *software* DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, WI). Além disso, uma orientação específica é fornecida abaixo, incluindo aquela fornecida nas referências citadas que são aqui inteiramente incorporadas por referência.

Os termos “N-terminal” e “C-terminal” são aqui utilizados para designar a posição relativa de qualquer sequência de aminoácidos ou domínio ou estrutura de polipeptídeo à qual eles são aplicados. O posicionamento relativo ficará evidente a partir do contexto; isto é, uma característica de “N-terminal” ficará localizada pelo menos mais perto do N-terminal da molécula de polipeptídeo do que outra característica discutida no mesmo contexto (a outra característica possível referida como “C-terminal” para a primeira característica). Similarmente, os termos “5’-” e “3’-” podem ser utilizados para designar as posições relativas de características de polinucleotídeos.

Os polipeptídeos aqui referidos como tendo um domínio de N-terminal “homólogo a um domínio kringle de plasminogênio humano nativo” apresentam características estruturais e funcionais similares aos domínios *kringle* nativos de plasminogênio. Além disso, os polipeptídeos aqui referidos como tendo um domínio do N-terminal “homólogo a kringle 1” apresentam características similares ao kringle 1 nativo, pelo menos até o grau em que os polipeptídeos podem ter uma afinidade mais alta por ácidos ω -amino-carboxílicos (e homólogos funcionais tais como ácido *trans*-4-amino-metil-cicloexano-1-carboxílico, um ácido cíclico) do que kringle 5. Vide, por exem-

plo, Chang, Y., *et al.*, *Biochemistry* 37:3258-3271 (1998), aqui incorporado como referência, quanto às condições e protocolos para comparação de ligação de polipeptídeos com domínio *kringle* isolados com ácido 5-amino-pentanoico (5-APnA); 6-amino-hexanoico (6-AHxA), conhecido também como ácido ϵ -amino-caproico (ϵ ACA); ácido 7-amino-heptanoico (7-AHpA); e ácido *trans*-4-amino-metil-ciclo-hexano-1-carboxílico (t-AMCHA).

Referências a domínios *kringle* "homólogos a *kringle* 4" são definidas similarmente, como assinalado acima quanto à expressão "homólogos a *kringle* 1". Isto é, eles apresentam características funcionais similares a *kringle* 4 de plasminogênio humano nativo como discutido acima. Estes polipeptídeos se ligam à lisina imobilizada como descrito acima.

Os polipeptídeos da invenção se ligam à lisina imobilizada. Como aqui utilizada, a expressão "ligação à lisina imobilizada" significa que os polipeptídeos assim caracterizados são retardados em sua progressão relativa para miniplasminogênio quando submetidos a uma cromatografia de coluna usando lisina-SEPHAROSE como meio cromatográfico. Tipicamente, os polipeptídeos da invenção podem ser eluídos a partir desse meio cromatográfico (resinas de afinidade por lisina) usando soluções que contêm o ligante específico, por exemplo, ϵ ACA, como eluentes.

Além disso, além de Chang *et al.*, *supra*, outras referências podem ser consultadas pelos versados nessas técnicas para determinar quais resíduos podem ser variados por substituição, deleção ou adição conservativa ou não-conservativa, para produzir um mutante de deleção dentro do âmbito da presente invenção. Por exemplo, as seguintes referências fornecem informações quanto aos resíduos específicos dos domínios *kringle* nativos que podem ser importantes para a ligação de ácidos ω -amino-carboxílicos: patente nº US 6.538.103 expedida para Ji, *et al.*; patente nº US 6.218.517 expedida para Suzuki; Douglas, J.T., *et al.*, *Biochemistry* 41(10):3302-10 (2002); Zajicek, J., *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 301(2):333-47 (2000); Lee, H., *et al.*, *Arch Biochem Biophys.*, 375(2):359-63 (2000); Castellino, F. e S. McCance, *Ciba Found Symp.* 212:46-60 (1997); McCance, S., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269:32405-32410 (1994); Rejante, M.R. e M. Llinas, *Eur. J. Biochem.*,

221(3):939-49 (1994); Wu, T.P., *et al.*, *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 5(2):157-66 (1994); Hoover, C.J., *et al.*, *Biochemistry*, 32(41):10936-43 (1993); Menhart, N., *et al.*, *Biochemistry*, 32:8799-8806 (1993); Thewes, T., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 265 (7):3906-3915 (1990); Novokhatny, V., *et al.*, *Thromb Res.*, 53(3):243-52 (1989); Motta, A., *et al.*, *Biochemistry*, 26(13):3827-36 (1987); Novokhatny, V., *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 179:215-232 (1984); Lerch, P.G., *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 107(1):7-13 (1980); Sottrup-Jensen, L., *et al.*, *Prog. Chem. Fibrinol. Thrombol.*, 3:191-209 (1978); e Wiman, B. e D. Collen, *Nature* 272, 549-545 (1978), todos aqui incorporados como referência em sua totalidade.

10 Devido ao fato de os presentes inventores terem reconhecido que pode ser preparada uma molécula de plasmina (plaminogênio) simplificada valiosa tendo um único domínio *kringle* no N-terminal, que tem características funcionais vantajosas (que podem ser avaliadas, em parte, testando quanto à ligação de lisina imobilizada como aqui descrito), a presente
15 invenção pode englobar outros domínios ligantes de fibrina ou regiões no N-terminal para o sítio de ativação. Por exemplo, a invenção pode incluir polipeptídeos nos quais o domínio de serina protease de plasmina está anexado a um *kringle* ligante de fibrina selecionado no grupo que inclui, porém sem limitações, *kringle* 4 de plasminogênio humano, *kringle* 2 de tPA, ou um *kringle* de apolipoproteína (a). Além disso, a invenção pode incluir polipeptídeos
20 nos quais um domínio de serina protease de plasmina está anexado a quaisquer outros módulos ligantes de fibrina conhecidos, tais como o domínio "*finger*" de tPA ou fibronectina, ou o fragmento FAB de IgG específica de fibrina.

25 Em alguns aspectos, os polipeptídeos da presente invenção têm estruturas químicas de proteínas (por exemplo, N-terminal semelhante ao nativo e junção semelhante à nativa entre o domínio *kringle* e de serina protease) que são idênticas às estruturas químicas encontradas nas formas de ocorrência natural de plasmina(plasminogênio) derivado de plasma humano.
30 Sem estar ligado a uma teoria específica, acredita-se que certas características de uma proteína podem contribuir para sua imunogenicidade, incluindo, porém sem limitações, para sua sequência de aminoácidos. Consequentemente-

mente, a presente invenção fornece uma proteína terapêutica eficaz baseada em plasminogênio (TAL6003) recombinante reduzindo preemptivamente a imunogenicidade potencial do plasminogênio (TAL6003) através da incorporação de sequências de aminoácidos que se assemelham às sequências de plasminogênio humano nativo.

Em um aspecto, o polipeptídeo de plasminogênio (TAL6003) recombinante da presente invenção compreende (a) um único domínio *kringle* no N-terminal homólogo a um domínio *kringle* de plasminogênio humano nativo, em que os quatro últimos resíduos de aminoácidos dentro do domínio *kringle* são V, P, Q, e C; e (b) um sítio de ativação do domínio do C-terminal e domínio de serina protease homólogo aos domínios correspondentes no plasminogênio humano; em que o polipeptídeo se liga à lisina imobilizada. Em uma modalidade, o único domínio *kringle* do N-terminal é homólogo ao *kringle* 1 ou *kringle* 4 de plasminogênio humano nativo. Em algumas modalidades, a lisina imobilizada é lisina ligada a uma matriz de suporte sólido selecionada no grupo que consiste em lisina-agarose, lisina-hidrogel, lisina-agarose reticulada. Em outra modalidade, a lisina imobilizada é lisina-agarose reticulada.

Os polipeptídeos de plasminogênio (TAL6003) recombinante da presente invenção podem ser ativados pelos versados nessas técnicas para produzir um polipeptídeo de plasmina (TAL6003). Em uma modalidade, o polipeptídeo de plasmina (TAL6003) apresente uma atividade fibrinolítica que é inibida por α_2 -antiplasmina em uma taxa de inibição que é pelo menos cerca de 5 vezes mais rápida do que a taxa de inibição da atividade fibrinolítica de miniplasmina por α_2 -antiplasmina. Em outra modalidade, a taxa de inibição é pelo menos cerca de 10 vezes, 20 vezes, 30 vezes, ou 40 vezes mais rápida do que a taxa de inibição de miniplasmina.

Em uma modalidade, o polipeptídeo de plasminogênio (TAL6003) recombinante é pelo menos 90% ou 95%, ou 98% idêntica à sequência ilustrada em SEQ ID NO: 2. Em outra modalidade, o único domínio *kringle* do N-terminal é pelo menos 90% idêntico ao domínio *kringle* 1 ou *kringle* 4 de plasminogênio humano nativo; e o domínio do C-terminal é pelo

menos 90% idêntico ao domínio do sítio de ativação e de serina protease de plasminogênio humano. Em algumas modalidades, o polipeptídeo tem uma sequência de aminoácidos como ilustrada em SEQ ID NO: 2, e suas substituições conservativas. Em outras modalidades, o polipeptídeo tem um resí-
 5 duo de arginina em uma posição relativa análoga àquela da posição 85 da sequência de aminoácidos ilustrada em SEQ ID NO: 2.

Em outras modalidades, o único domínio *kringle* do N-terminal tem pelo menos uma identidade de resíduo de sequência de aminoácidos maior com kringle 1 ou kringle 4 de plasminogênio humano nativo do que
 10 kringle 5 de plasminogênio humano nativo, e em que as substituições conservativas do único domínio *kringle* do N-terminal em relação às sequências nativas de kringles 1 e 4 de plasminogênio humano não são consideradas como diferindo das sequências nativas para os propósitos da comparação de identidades com kringle 5.

15 Por exemplo, o plasminogênio (TAL6003) descrito nesta invenção faz uso de modificações de resíduos de aminoácidos para a região de junção que une o único domínio *kringle* e o domínio de serina protease. Consequentemente, esta junção entre os dois domínios se assemelha mais intimamente à junção de ocorrência natural entre o domínio *kringle* 5 e o
 20 domínio de serina protease do plasminogênio humano.

Em outra modalidade, o plasminogênio (TAL6003) descrito nesta invenção compreende ainda uma sequência do N-terminal semelhante à nativa. O plasminogênio (TAL6003) produzido de forma recombinante pode ser clivado depois da ativação para produzir polipeptídeos de plasmina
 25 (TAL6003) recombinante que também têm N-terminais semelhantes aos nativos.

Em modalidades específicas, os resíduos em certas posições do domínio *kringle* do N-terminal de plasminogênio (TAL6003) são conservados em relação ao kringle 1 de plasminogênio humano nativo. Estes podem ser
 30 resíduos em posições associadas a ligações dissulfeto de ligação de lisina, e incluem Cys84, Cys105, Cys133, Cys145, Cys157, e Cys162, e Pro136-Pro140, Pro143-Tyr146, e Arg153-Tyr156, respectivamente (posições nume-

radas como indicado na figura 3). Adicionalmente, modalidades específicas da invenção podem ser caracterizadas quimicamente por contraste com miniplasmin(ogênio) que tem uma composição análoga de domínios (isto é, kringle-serina protease (K-SP) (vide Sottrup-Jensen, L., *et al.*, "Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis", Volume 3, (Editores: J. F. Davidson, *et al.*) Raven Press, New York (1978)), mas, *inter alia*, carece de uma arginina (Arg) em uma posição relativa análoga àquela da posição 85 da sequência de aminoácidos ilustrada em SEQ ID NO: 2. Em algumas modalidades, plasminogênio (TAL6003) da invenção compreende um único domínio *kringle* no N-terminal que compreende um resíduo Arg em uma posição relativa análoga àquela da posição 85 da sequência de aminoácidos ilustrada em SEQ ID NO: 2. Os exemplos não-limitativos de uma posição relativa análoga àquela da posição 85 da sequência de aminoácidos ilustrada em SEQ ID NO: 2 incluem as posições Arg(153), Arg(234), Arg(324), e Arg(426) da sequência de aminoácidos ilustrada em SEQ ID NO:4.

Em outras modalidades, as posições específicas dos resíduos nominados podem variar um pouco enquanto ainda estão presentes no polipeptídeo em posições estrutural e funcionalmente análogas (isto é, em relação à estrutura *kringle* do domínio do N-terminal; vide Chang, Y., *et al.*, como discutido acima). Em algumas modalidades, o único domínio *kringle* do N-terminal do polipeptídeo de plasmino(gênio) (TAL6003) tem pelo menos uma identidade percentual maior de resíduo com *kringle* 1 ou *kringle* 4 de plasminogênio humano nativo do que com *kringle* 5 de plasminogênio humano nativo.

Além disso, modalidades específicas da invenção podem ser caracterizadas funcionalmente por contraste com miniplasmin(ogênio). Em modalidades preferidas, a plasmina (TAL6003) da invenção apresenta uma taxa aumentada de inibição por α_2 -antiplasmina, por exemplo, tanto quanto cerca de uma ou duas ordens de magnitude mais rápida do que a taxa de inibição de miniplasmina. Além disso, em modalidades específicas, plasmina (TAL6003) se liga à lisina imobilizada (por exemplo, lisina-SEPHAROSE).

A caracterização da único domínio *kringle* do N-terminal de

plasminogênio (TAL6003) como "N-terminal" significa apenas que o domínio está presente no N-terminal para o sítio de ativação e não significa que resíduos de aminoácidos adicionais do N-terminal para o domínio em si não estão presentes. Além disso, o número e a identidade de resíduos intercalados entre o resíduo de cisteína mais C-terminal do domínio kringle do N-terminal (isto é, o resíduo de Cys mais C-terminal ilustrado na figura 4) e o sítio de ativação de plasminogênio podem ser variados sem fugir do âmbito da presente invenção. Os versados nessas técnicas devem ser capazes de determinar estas variações que atingem os benefícios da invenção (ligação semelhante a kringle 1 de ácidos ω -aminocarboxílicos, sem substancial aumento no tamanho do mutante de deleção ou introdução de sítios de glicosilação potencialmente problemáticos) sem experimentação excessiva, baseado na presente descrição e nas referências aqui citadas para orientação quanto à função e estrutura de kringle 1.

Consequentemente, a invenção refere-se a polinucleotídeos, polipeptídeos, métodos recombinantes para produção de polipeptídeos, vetores contendo os polinucleotídeos, sistemas de expressão para produzir os polipeptídeos, e células hospedeiras cultivadas que compreendem tais sistemas de expressão.

Como assinalado, em um aspecto, a invenção refere-se a um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo aqui descrito ou um polipeptídeo que tem suas substituições conservativas de aminoácidos. Uma orientação quanto à seleção de substituições de aminoácidos "conservativas" é fornecida mais detalhadamente abaixo. Em uma modalidade, o polinucleotídeo é DNA.

Em outro aspecto, a invenção refere-se a um método para preparar um vetor, compreendendo inserir o polinucleotídeo da invenção em um vetor. Em outro aspecto, a invenção refere-se a um vetor produzido pelo método da invenção.

Em outro aspecto, a invenção refere-se a um método para preparar uma célula hospedeira cultivada, compreendendo introduzir o vetor da invenção em uma célula hospedeira cultivada. Em outro aspecto, a invenção

refere-se a uma célula hospedeira cultivada produzida pelo método da invenção.

Em outro aspecto, a invenção refere-se a um polipeptídeo isolado da invenção, produzido por um método que compreende: (a) introduzir
 5 um vetor que compreende um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo em uma célula hospedeira cultivada; (b) cultivar a célula hospedeira; e (c) recuperar o polipeptídeo. Em outro aspecto, a invenção refere-se a um método para produzir um polipeptídeo, compreendendo: (a) cultivar a célula hospedeira da invenção sob condições nas quais o vetor é expressado; e (b) recuperar o polipeptídeo.
 10

Em outro aspecto, a invenção refere-se a células que contêm pelo menos um polinucleotídeo da invenção.

Em uma modalidade, o polinucleotídeo compreende a sequência de nucleotídeos ilustrada em SEQ ID NO: 1. Em outra modalidade, o polinucleotídeo compreende os nucleotídeos 4 até 1.032 da sequência de nucleotídeos ilustrada em SEQ ID NO:1. Em outras modalidades, o polipeptídeo
 15 compreende a sequência de aminoácidos indicadas em SEQ ID NO: 2.

Polinucleotídeos

Os polinucleotídeos da invenção incluem variantes que têm substituições, deleções e/ou adições que podem envolver um ou mais nucleotídeos. As variantes podem ser alteradas em regiões codificadoras, regiões não-codificadoras, ou ambas. As alterações nas regiões codificadoras podem produzir substituições, deleções ou adições conservativas ou não-conservativas de aminoácidos. São especialmente preferidas entre estas a
 20 substituições, adições e deleções silenciosas, que não alteram as propriedades e atividades da proteína de plasmin(ogênio) (TAL6003) ou suas partes. São também especialmente preferidas a este respeito as substituições conservativas (vide abaixo).
 25

Outras modalidades da invenção incluem moléculas de ácidos nucleicos que compreendem um polinucleotídeo que tem uma sequência de nucleotídeos pelo menos 90% idêntica, e mais preferivelmente, pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a (a) uma sequência de nucleotídeos
 30

- que codifica um polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos completa em SEQ ID NO:2; (b) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos em SEQ ID NO:2; e (c) uma sequência de nucleotídeos complementar a qualquer uma das sequências de nucleotídeos em (a) ou (b) acima.

Em uma modalidade, a molécula de ácido nucleico da presente invenção compreende um polinucleotídeo que tem uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos indicada em SEQ ID NO: 2. Em outras modalidades, a molécula de ácido nucleico compreende um polinucleotídeo que tem a sequência de nucleotídeos indicada em SEQ ID NO:1, ou uma variante degenerada dela.

Pretende-se que um polinucleotídeo que tem uma sequência de nucleotídeos pelo menos, por exemplo, 95% "idêntica" a uma sequência de nucleotídeos referencial, que codifica um plasminogênio (TAL6003), signifique que a sequência de nucleotídeos do polinucleotídeo seja idêntica à sequência referencial exceto quando a sequência do polinucleotídeo puder incluir até cinco mutações pontuais por cada 100 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos referencial que codifica o polipeptídeo do plasminogênio (TAL6003). Em outras palavras, para obter um polinucleotídeo que tem uma sequência de nucleotídeos pelo menos 95% idêntica a uma sequência de nucleotídeos referencial, até 5% dos nucleotídeos na sequência referencial podem ser deletados ou substituídos por outro nucleotídeo, ou um número de nucleotídeos até 5% dos nucleotídeos totais na sequência referencial podem ser inseridos na sequência referencial. Estas mutações da sequência referencial podem ocorrer nas posições dos terminais 5' ou 3' da sequência de nucleotídeos referencial ou em qualquer lugar entre essas posições terminais intercaladas seja individualmente entre nucleotídeos na sequência referencial ou em um ou mais grupos contíguos dentro da sequência referencial.

Como assinalado acima, duas ou mais sequências de polinucleotídeo podem ser comparadas determinando sua identidade percentual. Duas ou mais sequências de aminoácidos podem ser similarmente comparadas

determinando sua identidade percentual. A identidade percentual de duas sequências, sejam elas sequências de ácidos nucleicos ou peptídeos, é descrita genericamente como o número de equivalências exatas entre duas sequências alinhadas dividido pelo comprimento da sequência mais curta e multiplicado por 100. Um alinhamento aproximado para sequências de ácidos nucleicos é fornecido pelo algoritmo de homologia local de Smith e Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489 (1981). Este algoritmo pode ser estendido ao uso com sequências de peptídeos, usando a matriz de pontuação desenvolvida por Dayhoff, "Atlas of Protein Sequences and Structure", editor M. O. Dayhoff, suplemento 5, 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, DC, EUA, e normalizada por Gribskov, *Nucl. Acids Res.* 14(6):6745-6763 (1986). Uma implementação deste algoritmo para sequências de ácidos nucleicos e peptídeos é fornecida por Genetics Computer Group (Madison, Wis.) em sua aplicação de utilidade BESTFIT. Os parâmetros de omissão para este método estão descritos no Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Versão 8 (1995) (disponível em Genetics Computer Group, Madison, Wis.).

Por exemplo, devido à degeneração do código genético, os versados nessas técnicas reconhecerão imediatamente que um grande número das moléculas de ácidos nucleicos que têm uma sequência pelo menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% idêntica à sequência de ácidos nucleicos indicada em SEQ ID NO: 1 codificará um polipeptídeo de plasminogênio (TAL6003). De fato, devido ao fato de que todas as variantes degeneradas destas sequências de nucleotídeos codificarão o mesmo polipeptídeo, isto ficará evidente para os versados nessas técnicas mesmo sem realizar quaisquer ensaios ou medições funcionais aqui descritas. Deve ser ainda reconhecido nessas técnicas que, no caso das moléculas de ácidos nucleicos, que não são variantes degeneradas, um número razoável também codificará um polipeptídeo que tem atividade de polipeptídeo do plasminogênio (TAL6003). Por isso é que os versados nessas técnicas estão inteiramente a par de substituições de aminoácidos que são menos possíveis ou impossíveis de efetuar significativamente a função da proteína (por exemplo, substi-

tuindo um aminoácido alifático por um segundo aminoácido alifático).

Recentemente, avanços na produção sintética de sequências de polinucleotídeos mais longas permitiram a produção sintética de ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos significativamente mais longos sem o uso de técnicas de clonagem tradicionais. Os provedores comerciais desses serviços incluem Blue Heron, Inc., Bothell, WA (<http://www.blueheronbio.com>). A tecnologia utilizada pela Blue Heron, Inc. está descrita nas patentes n^{os} US 6.664.112; 6.623.928; 6.613.508; 6.444.422; 6.312.893; 4.652.639; pedidos de patente publicados n^{os} US 2002/0119456A1; 2002/0077471A1; e pedidos de patente internacionais publicados n^{os} (publicações n^{os}) WO 03054232A3; WO 0194366A1; WO 9727331A2; e WO 9905322A1, todos aqui incorporados como referência.

Evidentemente, técnicas tradicionais de biologia molecular, microbiologia, e ácido nucleico recombinante também podem ser usadas para produzir os polinucleotídeos da invenção. Estas técnicas são bem conhecidas e estão explicadas, por exemplo, em "Current Protocols in Molecular Biology", editor F. M. Ausubel, Volumes I, II e III (1997); Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2^a Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989); "DNA Cloning: A Practical Approach", editor D. N. Glover, Volumes I e II (1985); "Oligonucleotide Synthesis", editor M. L. Gait (1984); "Nucleic Acid Hybridization", editores Hames e Higgins (1985); "Transcription and Translation", editores Hames e Higgins (1984); "Animal Cell Culture", editor R. I. Freshney (1986); "Immobilized Cells and Enzymes", IRL Press (1986); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning"; a série, "Methods in Enzymology", Academic Press, Inc. (1984); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells", editors J. H. Miller e M. P. Calos, Cold Spring Harbor Laboratory (1987); e "Methods in Enzymology", editores Wu e Grossman e Wu, respectivamente, Volumes 154 e 155, todos aqui incorporados como referência.

30 Vetores e Células Hospedeiras Cultivadas

A presente invenção refere-se também a vetores que incluem as moléculas de ácidos nucleicos isoladas da presente invenção, células hos-

pedeiras cultivadas que são geneticamente manipuladas com vetores recombinantes, e a produção dos polipeptídeos de plasmin(ogênio) (TAL6003) por técnicas recombinantes.

Os constructos recombinantes podem ser introduzidos em células hospedeiras cultivadas usando técnicas bem-conhecidas tais como infecção, transdução, transfecção, transvecção, electroporação e transformação. O vetor pode ser, por exemplo, um fago, plasmídeo, vetor viral ou retroviral. Os vetores retrovirais podem ser competentes em replicação ou defeituosos em replicação. Neste último caso, a propagação viral ocorrerá genericamente apenas em células hospedeiras cultivadas complementares.

Os polinucleotídeos podem ser unidos a um vetor que contém um marcador selecionável para propagação em uma célula hospedeira cultivada. Genericamente, um vetor plasmídico é introduzido em um precipitado, tal como um precipitado com fosfato de cálcio, ou em um complexo com um lipídeo carregado. Caso o vetor seja um vírus, ele pode ser empacotado *in vitro* usando uma linhagem apropriada de células empacotadoras e depois transduzido em células hospedeiras cultivadas.

São preferidos os vetores que compreendem regiões de controle atuantes em *cis* para o polinucleotídeo de interesse. Os fatores atuantes em *trans* podem ser supridos pela hospedeira cultivada, supridos por um vetor complementar ou supridos pelo vetor em si depois da introdução na célula hospedeira cultivada.

Em certas modalidades a este respeito, os vetores proporcionam expressão específica, que pode ser induzível e/ou específica do tipo de célula. São particularmente preferidos entre tais vetores aqueles induzíveis por fatores ambientais que são fáceis de manipular, tais como temperatura e aditivos nutrientes.

Os vetores de expressão úteis na presente invenção incluem vetores derivados de cromossomas, epissomas e vírus, por exemplo, vetores derivados de plasmídeos bacterianos, bacteriófagos, epissomas de leveduras, elementos cromossômicos de leveduras, vírus tais como baculovírus, papovavírus, vírus da vacínia, adenovírus, vírus do epiteloma contagioso,

vírus da pseudorraiva e retrovírus, e vetores derivados de combinações deles, tais como cosmídios e fagomídios.

As inserções de DNA devem ser ligadas operacionalmente a um promotor apropriado, tal como o promotor do fago lambda PL, os promotores lac, trp e TAC de *E. coli*, os promotores precoce e tardio de SV40 e os promotores de LTRs retrovirais, para mencionar alguns. Outros promotores apropriados devem ser conhecidos pelos versados nessas técnicas. Os constructos de expressão devem conter ainda sítios para iniciação e terminação da transcrição e, na região transcrita, um sítio de ligação de ribossoma para tradução. A parte codificadora dos transcritos maduros expressados pelas constructos pode incluir um códon iniciador da tradução no início e um códon de terminação (UAA, UGA or UAG) adequadamente posicionados na extremidade do polipeptídeo a ser traduzido.

Como indicado, os vetores de expressão devem incluir, de preferência, pelo menos um marcador selecionável. Tais marcadores incluem a di-hidrofolato redutase ou genes de resistência à neomicina para cultura de células eucarióticas e genes de resistência à tetraciclina ou ampicilina para cultivar em bactérias *E. coli* e outras bactérias. Os exemplos representativos de células hospedeiras cultivadas apropriadas incluem, porém sem limitações, células bacterianas, tais como células de *E. coli*, *Streptomyces* e *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tais como células de leveduras; células de insetos, tais como células de *Drosophila* S2 e *Spodoptera* Sf9; células de animais tais como CHO, COS e células de melanoma de Bowes; e células vegetais. Os meios de cultura e condições apropriadas para as células hospedeiras cultivadas descritas acima são conhecidas nessas técnicas.

Dentre os vetores preferidos para uso em bactérias estão incluídos, por exemplo, pET24b ou pET22b disponíveis na Novagen, Madison, WI (pET-24b(+) e pET-22b(+)) = Sistema de Expressão pET 24b (N do Catálogo 69750) e 22b (Nº do Catálogo 70765), respectivamente, EMD Biosciences, Inc., Novagen Brand, Madison, WI; vide <http://www.emdbiosciences.com> seção de informações de produtos quanto a pET-24b e pET-22b para detalhes quanto ao vetor), pQE70, pQE60 e pQE-9, disponíveis na Qiagen Inc., Va-

lencia, CA; vetores pBS, vetores PHAGESCRIPT, vetores BLUESCRIPT, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponíveis na Stratagene, LaJolla, CA; e ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponíveis na Pharmacia (agora Pfizer, Inc., New York, NY). Dentre os vetores eucarióticos preferidos

5 estão pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 e pSG disponíveis na Stratagene; e pSVK3, pBPV, pMSG e pSVL disponíveis na Pharmacia. Outros vetores apropriados devem ficar facilmente evidentes para os versados nessas técnicas.

Os promotores bacterianos apropriados para uso na presente

10 invenção incluem os promotores *lacI* e *lacZ* de *E. coli*, os promotores T3 e T7, o promotor *gpt*, os promotores *lambda* PR e PL, e o promotor *trp*. Os promotores eucarióticos incluem o promotor precoce imediato de CMV, o promotor de timidina cinase de HSV, os promotores precoce e tardio de SV40, os promotores de LTRs retrovirais, tais como aqueles do vírus do sar-

15 coma de Rous (RSV), e os promotores de metalotioneína, tal como o promotor de metalotioneína-I do camundongo.

A introdução de um constructo de vetor na célula hospedeira cultivada pode ser efetuada por transfecção com fosfato de cálcio, transfecção mediada por DEAE-dextrana, transfecção mediada por lipídeo catiônico,

20 eletroporação, transdução, infecção ou outros métodos. Tais métodos estão descritos em muitos manuais de laboratório padronizados, tais como Davis *et al.*, "Basic Methods In Molecular Biology", 2ª Edição (1995).

A transcrição do DNA que codifica os polipeptídeos da presente invenção por eucariotos superiores pode ser aumentada inserindo uma se-

25 quência intensificadora no vetor. Os intensificadores são elementos atuantes em *cis* do DNA, usualmente cerca de 10 a 300 pb que atuam para aumentar a atividade transcricional de um promotor em um dado tipo de célula hospedeira cultivada. Os exemplos de intensificadores incluem o intensificador de SV40, que fica localizado no lado tardio da origem de replicação em pb 100

30 a 270, o intensificador do promotor precoce de citomegalovírus, o intensificador de polioma no lado tardio da origem de replicação, e os intensificadores de adenovírus.

Para secreção da proteína traduzida dentro do lúmen do retículo endoplasmático, dentro do espaço periplasmático ou dentro do ambiente extracelular, sinais apropriados de secreção podem ser incorporados dentro do polipeptídeo expressado. Os sinais podem ser endógenos ao polipeptídeo ou eles podem ser sinais heterólogos.

O polipeptídeo pode ser expressado em uma forma modificada, tal como uma proteína de fusão, e pode incluir não apenas sinais de expressão, mas também regiões funcionais heterólogas adicionais. Por exemplo, uma região de aminoácidos adicionais, particularmente aminoácidos carregados, podem ser adicionados ao N-terminal, por exemplo, ao polipeptídeo para melhorar a estabilidade e persistência na célula hospedeira cultivada, durante a purificação, ou durante o subsequente manuseio e estocagem. Além disso, porções peptídicas podem ser adicionadas ao polipeptídeo para facilitar a purificação. Tais regiões podem ser removidas antes da preparação final do polipeptídeo. A adição de porções peptídicas aos polipeptídeos para engendrar a secreção ou excreção, para melhorar a estabilidade e para facilitar a purificação, dentre outros, são técnicas conhecidas e rotineiras nesse campo. Uma proteína de fusão preferida compreende uma região heteróloga de imunoglobulina que é útil para solubilizar proteínas. Por exemplo, o documento nº EP 0 464 533 A1 (equivalente canadense, 2.045.869) descreve proteínas de fusão que compreendem várias partes da região constante de moléculas de imunoglobulina junto com outra proteína humana ou parte dela. Em muitos casos, a parte Fc em uma proteína de fusão é perfeitamente vantajosa para uso em terapia e diagnóstico, e assim sendo, resulta, por exemplo, em melhores propriedades farmacocinéticas. Por outro lado, para alguns usos seria desejável ser capaz de deletar a parte Fc depois que a proteína de fusão foi expressada, detectada e purificada da maneira vantajosa descrita. Este é o caso quando a parte Fc comprova ser um impedimento para ser usada em terapia e diagnóstico, por exemplo, quando a proteína de fusão vai ser usada como antígeno para imunizações. Na descoberta de fármacos, por exemplo, as proteínas humanas foram fundidas com partes Fc com o propósito de ensaios de triagem com alta produ-

ção (tais como receptor de hIL5, para identificar antagonistas de hIL-5). Vide Bennett, D., *et al.*, *J. Molecular Recognition*, 8:52-58(1995) e Johanson, K. *et al.*, *J. Biol.Chem.*, 270(16):9459-9471 (1995).

O plasminogênio (TAL6003) pode ser recuperado e purificado a
 5 partir de culturas de células recombinantes por métodos bem-conhecidos, incluindo aqueles descritos nos exemplos abaixo. Os polipeptídeos da presente invenção incluem produtos naturalmente purificados, produtos de procedimentos sintéticos químicos, e produtos produzidos por técnicas recombinantes a partir de uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica culti-
 10 vada, incluindo, por exemplo, células bacterianas, de leveduras, plantas superiores, insetos e mamíferos. Além disso, os polipeptídeos da invenção podem incluir também um resíduo de metionina inicial modificado, em alguns casos como resultado de processos mediados pela célula hospedeira.

Polipeptídeos

15 Os polinucleotídeos da invenção incluem aqueles que codificam variações e exemplos específicos dos polipeptídeos da invenção. Por exemplo, uma orientação referente a como preparar substituições de aminoácidos fenotipicamente silenciosos [e fornecida em Bowie, J. U. *et al.*, "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions,"
 20 *Science* 247:1306-1310 (1990), em que os autores indicam que proteínas são surpreendentemente tolerantes a substituições de aminoácidos. Embora qualquer número de substituições dentro do âmbito da invenção possa ser obtido por aplicação desses princípios genéricos, para orientação específica referente a substituições, as referências aqui citadas quanto à estrutura e
 25 funções de domínios *kringle* 1 podem ser consultadas pelos versados nessas técnicas.

Deve-se avaliar ainda que, dependendo dos critérios usados, a "posição" exata ou a sequência do *kringle*, o sítio de ativação, e os domínios de serina protease do plasminogênio (TAL6003) podem diferir ligeiramente
 30 em variações específicas dentro do âmbito da presente invenção. Por exemplo, a localização exata do domínio *kringle* em relação ao sítio de ativação pode variar ligeiramente e/ou o N-terminal da sequência para o domínio

kringle pode variar em comprimento. Assim sendo, a invenção inclui tais variações de polipeptídeos de plasminogênio (TAL6003) que apresentam atividade de polipeptídeo de plasminogênio (TAL6003), como aqui descrito. Tais variantes incluem deleções, inserções, inversões, repetições, e substituições. Como indicado acima, uma orientação quanto a quais mudanças de

5 aminoácidos são possivelmente fenotipicamente silenciosas pode ser encontrada em Bowie, J. U., *et al.*, "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions," *Science* 247:1306-1310 (1990).

Assim sendo, fragmentos, derivados ou análogos do polipeptídeo de SEQ ID NO:2 podem ser (i) aqueles nos quais um ou mais dos resíduos de aminoácidos (por exemplo, 3, 5, 8, 10, 15 ou 20 resíduos) são substituídos por um resíduo de aminoácido conservado ou não-conservado (de preferência, um resíduo de aminoácido conservado). Tais resíduos substituídos de aminoácidos podem ou não ser codificados pelo código genético, ou

10 (ii) aqueles nos quais um ou mais dos resíduos de aminoácidos incluem um grupo substituinte (por exemplo, 3, 5, 8, 10, 15 or 20), ou (iii) aqueles nos quais o polipeptídeo maduro está fundido com outro composto, tal como um composto para aumentar a meia-vida do polipeptídeo (por exemplo, polietilenoglicol), ou (iv) aqueles nos quais aminoácidos adicionais estão fundidos

15 ao polipeptídeo maduro, tal como um peptídeo da região de fusão Fc de IgG ou sequência líder ou secretória ou uma sequência que é empregada para purificação do polipeptídeo maduro ou uma sequência de pró-proteína. Tais fragmentos, derivados e análogos são julgados como estando dentro do âmbito dos presentes ensinamentos.

25 Como indicado, as mudanças são, de preferência, de uma natureza desimportante, tal como substituições conservativas de aminoácidos que não afetam significativamente a dobragem ou atividade da proteína. Evidentemente, o número de substituições de aminoácidos que os versados nessas técnicas fariam depende de muitos fatores, incluindo aqueles descritos

30 acima. Dito genericamente, o número de substituições para qualquer dado polipeptídeo de plasminogênio (TAL6003) não será maior do que 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5 ou 3.

Os aminoácidos no plasminogênio (TAL6003) da presente invenção que são essenciais para a função podem ser identificados por métodos conhecidos nessas técnicas, tais como mutagênese direcionada a sítio ou mutagênese de varredura de alanina (Cunningham e Wells, *Science* 244:1081-1085 (1989)). Este último procedimento introduz mutações individuais de alanina em cada resíduo na molécula. As moléculas mutantes resultantes são então testadas quanto à atividade biológica, por exemplo, como indicado nos exemplos aqui fornecidos. Os sítios que são críticos para a ligação de ligantes também podem ser determinados por análise estrutural tais como cristalização, ressonância magnética nuclear ou marcação de fotoafinidade (Smith, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 224:399-904 (1992), e de Vos, *et al.* *Science* 255:306-312 (1992)). Mesmo se a deleção de um ou mais aminoácidos do N-terminal de uma proteína resultar em modificação ou perda de uma ou mais funções biológicas da proteína, outras atividades biológicas ainda podem permanecer retidas.

Contempla-se também que os polipeptídeos úteis na produção dos "polipeptídeos isolados" da invenção podem ser produzidos por métodos de síntese em fase sólida. Vide Houghten, R. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5131-5135 (1985); e patente nº US 4.631.211 expedida para Houghten *et al.* (1986).

Os polipeptídeos da presente invenção podem ser fornecidos em uma forma isolada. O termo "polipeptídeo isolado" significa um polipeptídeo removido do seu ambiente nativo. Assim sendo, um polipeptídeo produzido e/ou contido dentro de uma célula hospedeira recombinante cultivada é considerado isolado com os propósitos da presente invenção. O termo "polipeptídeo isolado" significa também polipeptídeos que foram purificados, parcial ou substancialmente, a partir de uma Célula hospedeira recombinante cultivada.

Os polipeptídeos que têm uma sequência de aminoácidos com uma identidade percentual indicada a uma sequência de aminoácidos referencial de um polipeptídeo de plasminogênio (TAL6003) podem ser determinados usando os métodos, incluindo métodos assistidos por computador, indicados acima no caso de polinucleotídeos. As sequências de aminoácidos

de polipeptídeos são examinadas e comparadas apenas como são as sequências de nucleotídeos na discussão precedente. Os versados nessas técnicas devem reconhecer que conceitos tais como pontos finais moleculares discutidos para polinucleotídeos terão análogos diretos quando se considera o uso correspondente de tais métodos e programas para análise de polipeptídeos. Por exemplo, as correções manuais discutidas no caso de polinucleotídeos se referem aos pontos finais 5' e 3' de ácidos nucleicos, mas a mesma discussão será reconhecida como aplicável aos N-terminais e terminais C de polipeptídeos.

10 A invenção engloba polipeptídeos de plasminogênio (TAL6003) que são modificados diferencialmente durante ou depois da tradução, por exemplo, por glicosilação, acetilação, fosforilação, amidação, transformação por grupos protetores/bloqueadores conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a uma molécula de anticorpo ou outro ligante celular, etc. Qualquer uma entre inúmeras modificações químicas pode ser conduzida por técnicas conhecidas, incluindo, porém sem limitações, clivagem química específica por brometo de cianogênio, tripsina, quimiotripsina, papaína, *S. aureus* V8 protease, NaBH₄; acetilação, formilação, oxidação, redução; síntese metabólica na presença de tunicamicina; etc..

20 Modificações pós-tradução adicionais englobadas pela invenção incluem, por exemplo, cadeias de carboidrato ligadas por N ou ligadas por O, processamento de extremidades dos N-terminais ou C-terminais, anexação de porções químicas ao esqueleto de aminoácidos, modificações de cadeias de carboidratos ligadas por N ou ligadas por O, e adição de um resíduo de metionina ao N-terminal-C-terminal como resultado de vetores e constructos adaptados para expressão de polipeptídeos de plasminogênio (TAL6003) em células hospedeiras procarióticas cultivadas. Os polipeptídeos podem ser modificados também com um marcador detectável, tal como um marcador enzimático, fluorescente, isotópico ou de afinidade, para permitir a detecção e isolamento da proteína.

Composições Farmacêuticas e Métodos de Tratamento

O plasmin(ogênio) (TAL6003) pode ser formulado para uso tera-

pêutico de acordo com os métodos e composições descritas no pedido de patente nº US 10/143.112; e Novokhatny, V., *et al.*, *J. Thromb. Haemost.* 1(5):1034-41 (2003), ambos aqui incorporados como referência. Por exemplo, um tampão com baixo pH (entre cerca de 2,5 e cerca de 4), e baixa capacidade de tamponamento pode ser usado para a formulação de plasmina (TAL6003). Adicionalmente, outros métodos e formulações conhecidas pelos versados nessas técnicas, como praticados com plasmina, miniplasmina, e/ou microplasmina, podem ser usados para formular a plasmina (TAL6003) da invenção para administração terapêutica.

O plasmin(ogênio) (TAL6003) pode ser usado para tratar uma série de doenças ou condições trombóticas, por exemplo, de acordo com os métodos descritos nas patentes nºs US 6.355.243, 6.964.764, e 6.969.515, todas aqui incorporadas como referência. Novamente, da mesma forma que com as formulações farmacêuticas possíveis aplicáveis à plasmina (TAL6003), a plasmina (TAL6003) também pode ser administrada terapêuticamente por métodos conhecidos nessas técnicas, por exemplo, aqueles atualmente praticados com plasmina, miniplasmina, e/ou microplasmina.

Exemplos

Desenho de Vetores de Expressão

A sequência de aminoácidos para plasminogênio (TAL6003) está indicada em SEQ ID NO: 2. Um polinucleotídeo que tem a sequência de nucleotídeos que codifica o plasminogênio (TAL6003) foi otimizada com códons para expressão em *E. coli* e estabilidade de RNAm para produzir a sequência de DNA indicada em SEQ ID NO:1. Este polinucleotídeo foi clonado nos sítios NdeI e BamHI do vetor de expressão em *E. coli* pET24b(+) (Novagen; Madison, WI) para produzir proteína citosólica.

Como ilustrado na Tabela 1, a expressão em bactérias (por exemplo, *E. coli*) produziu um polipeptídeo de plasminogênio recombinante (TAL6003) que tem a sequência de aminoácidos indicada em SEQ ID NO: 2 (isto é, um plasminogênio (TAL6003) recombinante com uma metionina no N-terminal (isto é, M¹) imediatamente precedente ao resíduo de aminoácido arginina (isto é, R²) correspondente à arginina na posição 70 (isto é, R⁷⁰) da

sequência de aminoácidos do plasminogênio humano nativo indicada em SEQ ID NO: 4 (vide também, por exemplo, a figura 3). Tal produto recombinante era suscetível à clivagem adicional para produzir proteínas adicionais que têm diferentes N-terminais que incluem uma proteína com uma lisina (isto é, K¹⁰) ou valina (isto é, V¹¹) no N-C-terminal correspondente, respectivamente, à lisina na posição 78 (isto é, K⁷⁸) ou à valina na posição 79 (isto é, V⁷⁹) de plasminogênio humano nativo.

Tabela 1: N-terminais de plasmin(ogênio) nativo (por exemplo, baseado em SEQ ID NO: 4) e plasmin(ogênio) (TAL6003) (por exemplo, baseado em SEQ ID NO: 2, ou uma sua variante)

Plasminogênio Nativo que compreende 19 sequências de aminoácidos líderes (por exemplo, baseada em SEQ ID NO: 4):	
	$M^{19}EHKE \dots E^{01}PLDDY \dots M^{69}R^{70}DVLFEEKK^{78}V^{79}YLSEC \dots$
"Lys-Plasminogênio" Nativo (isto é, clivagem de sequência líder):	
	$E^{01}PLDDY \dots M^{69}R^{70}DVLFEEKK^{78}V^{79}YLSEC \dots$ <p>(SEQ ID NO:5)</p>
Espécies possíveis de Plasmina Nativa, baseado na clivagem, caso haja, de Lys-Plasminogênio:	
	$(SEQ ID NO:6) M^{69}R^{70}DVLFEEKK^{78}V^{79}YLSEC \dots$
	$(SEQ ID NO:7) K^{78}V^{79}YLSEC \dots$
	$(SEQ ID NO:8) V^{79}YLSEC \dots$
Polipeptídeos de Plasminogênio (TAL6003) recombinante da presente invenção:	
(por exemplo, baseado em SEQ ID NO: 2)	$M^{01}R^{02}DWLFEEKK^{10}V^{11}YLSEC \dots$
Proteínas adicionais baseadas em clivagem adicional de um plasminogênio (TAL6003):	
	$(SEQ ID NO:9) K^{10}V^{11}YLSEC \dots$
	$(SEQ ID NO:10) V^{11}YLSEC \dots$

↓ indica sítios de clivagem potenciais.

Expressão e Purificação de Plasminogênio (TAL6003)

O vetor de expressão que compreende o DNA que codifica o plasminogênio (TAL6003) foi transformado em uma série de células incluindo BL21(DE3) RIL (Stratagene, La Jolla, CA), BL21(DE3) (genótipo: *F⁻ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm* (DE3)) (EMB Biosciences, Inc., San Diego, CA), e BLR(DE3) (genótipo: *F⁻ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm* (DE3) Δ (*srl-recA*)306::Tn10(Tet^R)), e superexpressão de proteína depois da indução por

IPTG 1 mM (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo) foi analisado por SDS-PAGE. As estimativas de expressão foram pelo menos cerca de 250 mg/L de cultura de células em frascos de *shaker (pag 16 linha 15).

O tipo de célula BL21(DE3) RIL é manipulado para expressar
 5 tRNAs raros de *E. coli* que codificam Arg, Ile, e Leu. Além disso, BL21(DE3) e também BLR(DE3) são cepa B de *E. coli* que é classificada como não-patogênica para seres humanos e animais, baseado na ausência de fatores de virulência e colonização. As células BLR(DE3) carecem do gene *recA* para recombinação de DNA, e a indução de fago lambda não foi relatada
 10 com estas células. Um banco de células para pesquisa do constructo do plasminogênio (TAL6003) em células BLR(DE3) foi produzido e testado quanto à pureza, identidade, e indução de bacteriófago em Charles River Laboratories (Malvern, PA). Os testes confirmaram a identidade e pureza do banco de células para pesquisa e as células passaram no teste de indução
 15 com nenhum fago observado (dados não indicados).

A produção de plasminogênio (TAL6003) (isto é, baseado em SEQ ID NO: 2) foi confirmada em expressão em escala maior na qual as células foram lisadas e proteína solúvel e corpos de inclusão purificados foram examinados por SDS-PAGE.

20 O seguinte protocolo típico foi usado para a expressão de plasminogênio (TAL6003):

Uma única colônia de células de *E. coli* (por exemplo, BL21(DE3) RIL, BL21(DE3), ou BLR(DE3) que contém o vetor de plasminogênio (TAL6003) foi usada para inocular 5 mL de LB/canamicina (30 µg/mL)
 25 e foi incubada por 8 horas a 37°C em uma *batedeira (pag 27 linha 13). Depois disso, uma alíquota de 50 µL foi retirada da suspensão bacteriana cultivada para desenvolvimento adicional em meio fresco. O procedimento foi repetido depois de 16 horas com 6 mL de cultura bacteriana e 250 mL do meio. As culturas foram desenvolvidas com agitação a 37°C até uma
 30 DO600 nm de ~ 1,0 e IPTG foi adicionado até uma concentração final 1 mM. As culturas foram desenvolvidas por mais 5 horas. As células foram colhidas por centrifugação a 5.000 x g e os péletes celulares foram dissolvidos em

Tris 20 mM, pH 8,0, contendo EDTA 20 mM e congelados a -80°C .

Para purificar o plasminogênio (TAL6003), os péletes celulares foram descongelados e um tampão foi adicionado até que o volume da solução atingisse aproximadamente um vigésimo daquele volume original da cultura de células. Depois disso, lisozima foi adicionada até uma concentração final de 0,5 mg/mL e as células foram agitadas rapidamente a 4°C por 10 - 15 minutos. Depois, Triton X-100 foi adicionado até uma concentração final de 1% e a agitação foi continuada por mais 10 min. DNase I (0,05 mg/mL) e MgCl_2 (2,5 mM) foram adicionados e a gitação foi continuada a 4°C por 30 minutos ou até que a solução não estivesse mais viscosa. A solução final foi centrifugada a 4°C por 30 min a 15.000 x g e o sobrenadante foi descartado.

O pélete celular foi lavado três vezes com solução de lavagem (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contendo EDTA 10 mM, 1% de Triton-X-100, e 0,5 M de urpeia), e o pélete final foi dissolvido em 40 mL de tampão de extração (PBS, pH 7,4, contendo EDTA 10 mM, DTT 20 mM, e guanidina-HCl 6 M) e estocado a 4°C de um dia para o outro. Depois de 16 horas, a solução foi centrifugada por 30 minutos a 15.000 x g para remover os sólidos, e o sobrenadante foi adicionado lentamente à solução de redobragem (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, guanidina.HCl 3,5 M, arginina.HCl 0,5 M, EDTA 10 mM, GSH 3 mM, GSSG 0,3 mM) sob agitação a 4°C . O procedimento de redobragem foi conduzido em uma concentração de proteína de cerca de 0,29 g/L.

A solução de redobragem foi mantida por 2 dias a 4°C sem perturbadura e depois dialisada contra um volume de 8 vezes de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo EDTA 10 mM, NaCl 0,15 M, arginina-HC 0,15 M, durante um período de 8-10 horas com mudanças frequentes da solução do tampão.

A solução de proteína foi então removida da diálise e concentrada usando filtros AMICON com a membrana cortada em 10 kDa até aproximadamente 10-20 mL e dialisada durante a noite inteira versus um volume de 100 vezes de Tris 0,1 M, pH 8,0 contendo EDTA 10 mM, NaCl 0,15 M. Este material foi centrifugado para remover particulados, e depois passado

sobre resina de afinidade de lisina (Lysine-SEPHAROSE 4B; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). O plasminogênio (TAL6003) foi eluído da resina usando solução salina tamponada com Tris, pH 8,0, contendo 0.2 M ácido ϵ -amino-caproico (ϵ ACA).

- 5 Tipicamente, 80 mg de corpos de inclusão poderiam ser isolados a partir de 1 litro de cultura de células e 40 mg poderiam ser eluídos na etapa de cromatografia com lisina-SEPHAROSE.

Propriedades de plasminogênio (TAL6003)

- 10 O plasminogênio (TAL6003) purificado apareceu como uma banda na região de 35-40 kDa na análise por SDS-PAGE de proteína reduzida (tratada com ditioneitol) e não-reduzida. Sua massa molecular, determinada por espectrometria de massas MALDI, foi de cerca de 38.140 Da, o que é perto do valor esperado.

- 15 Para determinar a taxa de ativação do plasminogênio (TAL6003) por estreptocinase, 1 mg/mL de plasminogênio (TAL6003) recombinante foi misturado com estreptocinase em uma razão 1:100 plasminogênio (TAL6003) para estreptocinase e incubado à temperatura ambiente em pH 7. Em vários pontos no tempo, amostras foram removidas e extintas com tampão de SDS-PAGE e analisadas em SDS-PAGE reduzido, e em seguida, por
20 densitometria para determinar a conversão da molécula de plasminogênio (TAL6003) de cadeia única em uma plasmina (TAL6003) de duas cadeias. A ativação percentual do plasminogênio (TAL6003) por estreptocinase está ilustrada na figura 6 como perda de plasminogênio (TAL6003) de comprimento inteiro no decorrer do tempo, como determinado por SDS-PAGE.

- 25 Para confirmar a funcionalidade de kringle 1, determinou-se a ligação de plasminogênio (TAL6003) à lisina-SEPHAROSE 4B. Como ilustrado na A figura 7, o plasminogênio (TAL6003) ligou-se à lisina-SEPHAROSE e pôde ser eluído da coluna por um gradiente de ϵ ACA 0-20 mM como um único pico a cerca de 4 mM. A capacidade de plasminogênio (TAL6003) redobrado se ligar à lisina-SEPHAROSE indica que o domínio *kringle* da molécula está adequadamente dobrado e o sítio de ligação de lisina está completamente ativo.
30

Para confirmar ainda mais a funcionalidade de kringle 1, a ligação de ϵ ACA ao plasminogênio (TAL6003) foi medida monitorando as mudanças associadas na fluorescência da proteína, como descrito por Matsuka *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 190:93-97 (1990) e Douglas *et al.*, *J. Biochemistry* 5 41:3302-3310 (2002), ambos aqui incorporados como referência. A ligação de ϵ ACA ao kringle 1 do plasminogênio (TAL6003) resulta em um decréscimo na fluorescência, possivelmente devido à extinção dos resíduos de triptofano que fazem parte do sítio de ligação de lisina.

Para monitorar este processo, alíquotas de 4 μ L a 16 μ L de uma 10 solução concentrada de ϵ ACA foram adicionadas a 2 mL de plasminogênio (TAL6003) 5 μ M em tampão Tris 50 mM, contendo NaCl 20 mM, pH 8,0, 25 $^{\circ}$ C. A fluorescência foi monitorada em um comprimento de onda de excitação de 298nm e um comprimento de onda de emissão de 340nm em um espectrofotômetro de fluorescência FLUOROMAX (Jobin Yvon, Inc., Edison, 15 NJ); depois de cada adição de ϵ ACA, a solução foi deixada equilibrar até que não sejam observadas mais quaisquer mudanças no fluorescência.

Os valores resultantes da fluorescência foram corrigidos para diluição e plotados versus a concentração de ϵ ACA entre uma faixa 0 - 50 μ M de ϵ ACA. Os dados foram ajustados por regressão não-linear para obter 20 uma K_d de cerca de 19 μ M.

Uma propriedade do plasminogênio é sua capacidade de se ligar a fibrina. Para determinar se o plasminogênio (TAL6003) retém a capacidade de interagir com com fibrina, suas propriedades de ligação à fibrina foram testadas em um ensaio com placa de microtitulação, no qual a ligação de 25 plasminogênio (TAL6003) à fibrina foi avaliada por sua subsequente ativação por tPA e lise de coágulo resultante. Com este propósito, 100 μ L de 5mg/mL de fibrinogênio foram polimerizados com trombina em cada poço da placa de microtitulação. Várias concentrações de plasminogênio (TAL6003) foram adicionadas sobre o topo dos coágulos de fibrina incubadas por 1 hora a 30 37 $^{\circ}$ C. A placa foi lavada amplamente com PBS enquanto os coágulos de fibrina ainda estavam intactos e afixados aos poços. Depois da lavagem, uma solução de 0,1 mg/mL de tPA foi adicionada a cada poço e a placa foi

incubada por 2 horas a 37°C. Como resultado, alguns dos coágulos foram dissolvidos completamente e alguns foram parcialmente dissolvidos, enquanto que os poços com quantidades muito pequenas de plasminogênio (TAL6003) e os poços de controle permaneceram praticamente intactos. O grau de fibrinólise foi monitorado medindo a absorvância em 280 nm dos coágulos remanescentes entre os coágulos iniciais reconstituídos em NaOH 1 M. Os valores da absorvância foram plotados em função da concentração de plasminogênio (TAL6003).

Como ilustrado na figura 8, a ligação de plasminogênio (TAL6003) à fibrina seguiu uma curva de ligação sigmoide clássica. Usando este ensaio, descobriu-se que o plasminogênio (TAL6003) se liga à fibrina com afinidade comparável àquela do plasminogênio de comprimento inteiro, e a C_{50} desta interação ($\sim 0,3 \mu\text{M}$) é comparável à K_d de ligação de fibrina do plasminogênio de comprimento inteiro.

Estes experimentos indicam que o plasminogênio (TAL6003) pode se ligar à fibrina. Além disso, pelo menos a interação de plasminogênio (TAL6003) com lisina-Sepharose, sua capacidade de se ligar a ϵ ACA com a K_d esperada, sua capacidade de se ligar à fibrina, e sua capacidade de ser ativado por um ativador de plasminogênio tudo indicou que esta molécula foi produzida no sistema de *E. coli* em uma forma completamente funcional.

Purificação e Formulação de Plasmina (TAL6003)

A adição de SK à solução de plasminogênio (TAL6003) purificado efetua a conversão de plasminogênio (TAL6003) em plasmina (TAL6003). A proteína foi concentrada até 2 mg/mL e diluída 1:1 com glicerina a 50% para produzir uma solução a 1 mg/mL em glicerina a 25%. A solução foi levada até a temperatura ambiente e a estreptocinase foi adicionada em uma razão molar 1:100 de SK:plasminogênio (TAL6003). A reação foi incubada sem agitar à temperatura ambiente por 4,5 h. A reação foi então desacelerada pela adição de NaCl até uma concentração final 0,5 M. A análise da ativação por SDS-PAGE indicou um rendimento de 90% de proteína ativada.

A plasmina (TAL6003) ativada foi purificada por Cromatografia

de Afinidade com Benzamidina. O propósito da purificação por afinidade com benzamidina foi a separação de plasminogênio (TAL6003) não ativado e impurezas, incluindo produtos da degradação de plasmina (TAL6003), da plasmina (TAL6003) ativa. A solução de ativação de SK foi aplicada a uma
 5 coluna com Fluxo Rápido de Benzamidina-SEPHAROSE 4. A plasmina (TAL6003), grampeada e intacta, foi capturada pela resina de afinidade enquanto que as impurezas supramencionadas escoavam através da coluna. A coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio até que a absorvância em 280 nm atingisse um valor basal. A plasmina (TAL6003) ligada foi então elu-
 10 ída usando uma etapa com ϵ ACA em pH baixo para extrair toda proteína remanescente da coluna. Os rendimentos típicos foram 75%, com proteína que é 95% ativa como medida pelo ensaio de potência de plasmina cromogênica.

Devido ao fato de que a plasmina (TAL6003), similarmente à
 15 plasmina de comprimento inteiro, é suscetível a uma autodegradação em pH fisiológico, um pH 3,6 foi escolhido para a formulação final (acidificada com ácido acético-solução salina). Como ilustrado anteriormente para plasmina por Novokhatny *et al.*, *J. Thromb. Haemost.*, 1(5):1034-41 (2003), aqui incorporado como referência, e confirmado em experimentos com plasmina
 20 (TAL6003), esta formulação em baixo pH de baixa capacidade de tamponamento não apenas permite a estocagem segura de plasminas ativas por períodos de tempo prolongados, mas é também compatível com a administração parenteral destes trombolíticos diretos. Quando misturada com plasma ou tampões de pH neutro, a plasmina (TAL6003) é reativada rapidamente.

25 Propriedades Enzimáticas da Plasmina (TAL6003)

A atividade amidolítica da plasmina (TAL6003) foi examinada usando o substrato de plasmina D-Val-Leu-Lys-p-nitroanilida (S-2251) (Dia-Pharma, West Chester, OH).

Para plasmina (TAL6003), em pH 7,4, 25°C em tampão de PBS,
 30 a constante Michaelis-Menten (K_M) para S-2251 foi descoberta como sendo também 141 μ M (Tabela 3). A k_{cat} para a preparação foi encontrada como sendo cerca de 725 min^{-1} . Usando titulação com cloridrato de 4-nitrofenil 4-

- guanidinobenzoato (pNPGB) (Chase, T. e E. Shaw, *Methods Enzymol.* 197:20-27(1970)), a porcentagem de sítios funcionais foi encontrada como sendo 67%. Corrigindo k_{cat} para sítios de ativação percentual, uma k_{cat} de cerca de 725 min^{-1} foi determinada. Este valor era muito perto do valor determinado no mesmo ensaio para plasmina de comprimento inteiro, $820 \pm 23 \text{ min}^{-1}$ e para microplasmina (sem todos cinco kringles), $795 \pm 24 \text{ min}^{-1}$. Estes dados indicam que a presença ou ausência de kringles não afeta a atividade catalítica do domínio de serina protease.

10 **Tabela 3. Parâmetros em Estado de Equilíbrio para Várias Espécies de Plasmina com substrato S-2251, em tampão de PBS, pH 7,4, 25°C.**

	K_M	K_{CAT}
Plasmina	$220 \pm 9 \mu\text{M}$	$820 \pm 23 \text{ min}^{-1}$
Miniplasmina	$160 \pm 30 \mu\text{M}$	$770 \pm 70 \text{ min}^{-1}$
Microplasmina	$145 \pm 13 \mu\text{M}$	$795 \pm 24 \text{ min}^{-1}$
Plasmina (TAL6003)	$141 \pm 9 \mu\text{M}$	725 min^{-1}

- A taxa de inibição de plasmina (TAL6003) por α_2 -antiplasmina foi determinada como sendo $1,8 \pm 0,06 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ usando o método de Wiman e Collen (Wiman, B. e D. Collen, *Eur. J. Biochem.* 84:573-578 (1978)) no qual a plasmin e α_2 -antiplasmina são misturadas e depois testadas quanto à atividade S-2251 em pontos no tempo específicos (Tabela 4). Este valor é comparável aos valores relatados para plasmina de $2,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (vide Anonick, *et al.*, *Thrombosis Res.* 59:449 (1990)).

Tabela 4. Taxas de Inibição para Várias Espécies de Plasminas e Inibidores Determinados a 22°C em tampão de PBS, pH 7,4.

	α_2 -antiplasmina
Plasmina	$2,5 \pm 0,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (lit.)
Miniplasmina	$2,4 \pm 0,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
Microplasmina	$1,8 \pm 0,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
Plasmina (TAL6003)	$1,8 \pm 0,06 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

- 20 Os mesmos experimentos conduzidos com microplasmina revelaram taxas de inibição por α_2 -antiplasmina de $1,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $3,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

¹ s⁻¹ em dois experimentos separados. A taxa de inibição por α_2 -antiplasmina de miniplasmina (composição de domínio de miniplasmina, K5-SP) foi determinada como sendo $2,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Estes dados estão em concordância razoável com os valores da literatura para microplasmina e miniplasmina e indicam que a inibição de plasmina (TAL6003) por α_2 -antiplasmina é 40 vezes mais rápida do que a inibição de microplasmina ou miniplasmina. Assim sendo, estes resultados indicam que a plasmina (TAL6003) deve ser inibida rapidamente por α_2 -antiplasmina devido à presença de kringle 1 em sua estrutura. Na totalidade, os dados apresentados nesta seção indicam que as propriedades enzimáticas e inibitórias de plasmina (TAL6003) são similares à plasmina de comprimento inteiro.

Os valores da literatura foram retirados de Anonick, *et al.*, *Thrombosis Res.* 59:449(1990). Todas as taxas foram medidas de acordo com os métodos publicados em Anonick, *et al.*

15 Eficácia Fibrinolítica *In Vitro*

A eficácia fibrinolítica de plasmina (TAL6003) foi testada em um modelo *in vitro* de ensaio de lise de coágulos usando o seguinte protocolo experimental.

Uma comparação *in vitro* da eficácia trombolítica de plasmina (TAL6003) com plasmina derivada de plasma. Quantidades equimolares de plasmina derivada de plasma (0,25 mg/mL) e plasmina (TAL6003) (0,11 mg/mL) foram misturadas com coágulos sanguíneos no tubo de ensaio e o grau de lise de coágulos foi monitorado por absorvância A_{280} de material liberado a partir do coágulo.

25 As concentrações de plasmina ou plasmina (TAL6003) necessárias para superar inibidores plasmáticos na presença de fibrina e iniciar a lise de coágulos estão ilustradas na figura 9.

REIVINDICAÇÕES

1. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de que consiste em uma sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO 1 ou sequências de nucleotídeos da mesma codificando um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO 2, em que a SEQ ID NO 2 tem:

a) um domínio kringle no N-terminal único homólogo a um domínio kringle de plasminogênio humano nativo, em que os quatro últimos resíduos de aminoácidos dentro do domínio kringle são V, P, Q e C; e

b) um sítio de ativação do domínio C-terminal e domínio de serina protease homólogo aos domínios correspondentes no plasminogênio humano; em que o polipeptídeo se liga à lisina imobilizada.

2. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo codificado apresenta uma afinidade de ligação por fibrinogênio inferior à afinidade de ligação por fibrinogênio de miniplasmina.

3. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo apresenta uma afinidade de ligação por fibrina parcialmente clivada superior à afinidade de ligação por fibrina parcialmente clivada de miniplasmina.

4. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo tem uma imunogenicidade reduzida em comparação com um polipeptídeo de referência, em que o polipeptídeo de referência tem uma sequência de aminoácidos primária idêntica à sequência de aminoácidos primária do polipeptídeo, com a condição de que os quatro últimos resíduos de aminoácidos do único domínio kringle no N-terminal do polipeptídeo de referência não sejam V, P, Q e C.

5. Método para produzir um ou mais polipeptídeos de plasmina recombinante, tendo diferentes N-terminais, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) proporcionar um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO 2;

b) contatar o polipeptídeo obtido na etapa (a) com uma protease sob condições suficientes para clivar uma ou mais ligações peptídicas, formando desta forma um ou mais polipeptídeos de plasmina recombinante que têm diferentes N-terminais.

- 5 6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que proporcionar compreende expressar uma sequência de DNA ilustrada em SEQ ID NO:1, ou sequências de nucleotídeos degenerada da mesma, em *E. Coli*.

FIG. 1

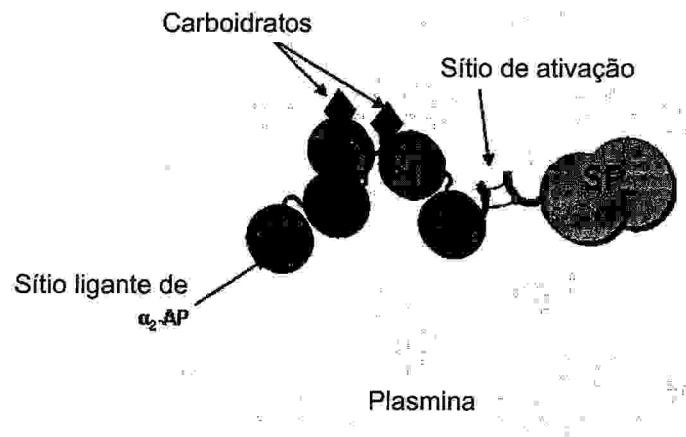


FIG. 2



Plasminogênio (TAL6003)

FIG. 3

-19 1
MEHKEVLLLLLLFLKSGQGEPLDDYVNTQGASLPSVTKKQLGAGSIEECAAKCEDEEFTCRAFQ

78
YHSKEQQCVIMAENRKSSIIIR

136 143 153 162
ILECEECECMHCSENYDG
kringle 1

234
KISKMSGLECAWDSQSPHAGYIPSKFPNKNLKKNYCRNPDRELRPWCFTTDPNKRWELCDIP
kringle 2

RCTTPPPSSGPTYQCLKGTGENYRGNVAVTVSGHTCQHWSAQTPTHMRTPENFPCKNLDENYCR
kringle 3

324
NPDGKRAPWCHTTNSQVRWEYCKIPSCDSSPVSTEQLAAPTAPPELTPVVQDCYHGDGQSYRGTS

426
TTTGKKCQSWSSMTPHRHQKTFENYPNAGLTMNYCRNPDADKGPWCFTTDPNKRWELCDIP
kringle 4

GTEASVVAPPVLLPDVETPSEEDCMFGNGKGYRGKRATTVTGTQDWAQEPHRSIFTPET
kringle 5

532 542 561
NPRAGLEKNYCRNPDGDVGGPWCYTNPRLYDYCD

791
(SEQ ID NO:4)

FIG. 4

HK1	<u>CKTGNGKNYR</u>	<u>GTMSKTKNGI</u>	<u>TCQKWSSTSP</u>	<u>HR-PRFSPAT</u>	<u>HPSEGLEENY</u>
HK2	<u>CMHCSGENYD</u>	<u>GKISKTMISGL</u>	<u>ECQAWDSQSP</u>	<u>HA-HGYIPSK</u>	<u>FPNKNLKKNY</u>
HK3	<u>CLKGTGENYR</u>	<u>GNVAVTVSGH</u>	<u>TCQHWSAQTP</u>	<u>HT-HNRTPEN</u>	<u>FPCKNLDENY</u>
HK4	<u>CYHGDGQSYR</u>	<u>GTSS'TTTGK</u>	<u>KCQSWSSMTF</u>	<u>HR-HQKTPEN</u>	<u>YPNAGLTMNY</u>
HK5	<u>CMFGNGKGYR</u>	<u>GKRATTVTGT</u>	<u>PCQDWAAQEP</u>	<u>HRHSIFTPET</u>	<u>NPRAGLEKNY</u>

(con't)

HK1	<u>CRNPDNDPQG</u>	<u>PWCYTDDPEK</u>	<u>RYDYCDILEC</u>	(SEQ ID NO:11)
HK2	<u>CRNPDRE-LR</u>	<u>PWCFTTDPNK</u>	<u>RWELCDIPRC</u>	(SEQ ID NO:12)
HK3	<u>CRNPDGK-RA</u>	<u>PWCHTTNSQV</u>	<u>RWEYCKIPSC</u>	(SEQ ID NO:13)
HK4	<u>CRNPDAD-KG</u>	<u>PWCFTTDPVS</u>	<u>RWEYCNLKCC</u>	(SEQ ID NO:14)
HK5	<u>CRNPDGDVGG</u>	<u>PWCYTTPNPK</u>	<u>LYDYCDVPQC</u>	(SEQ ID NO:15)

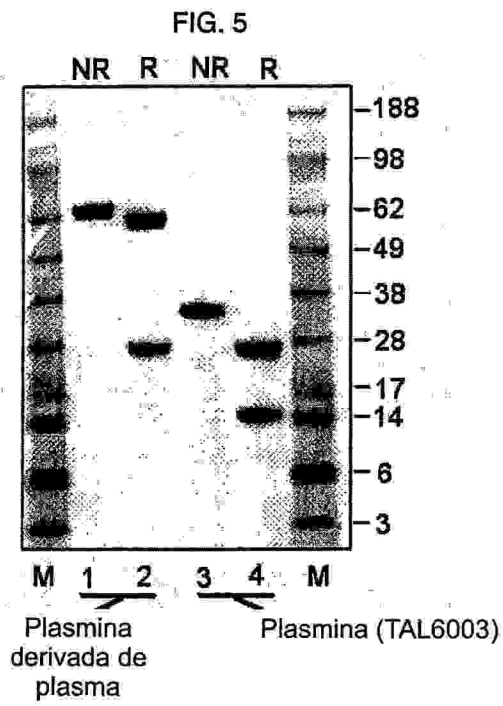


FIG. 6

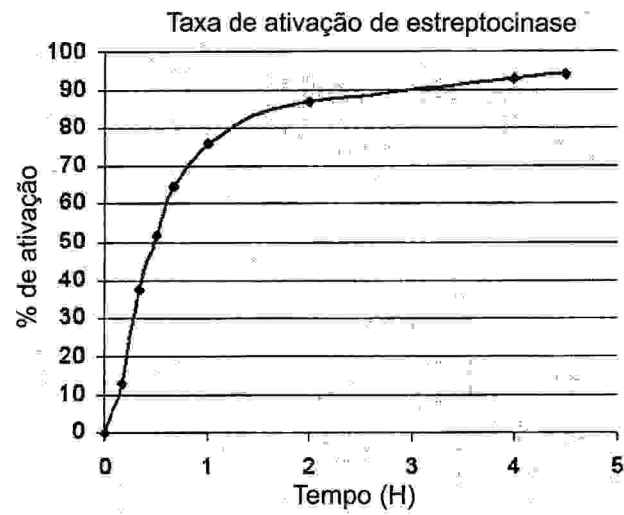


FIG. 7

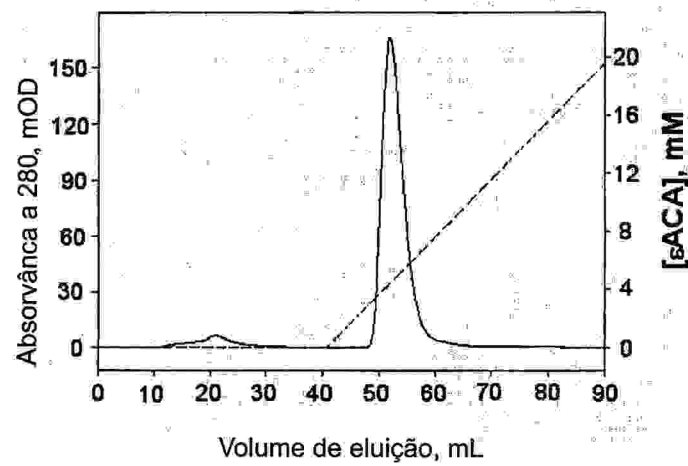


FIG. 8

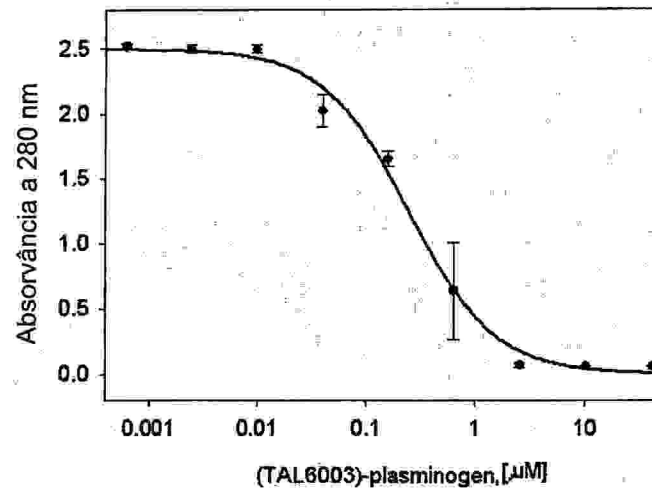


FIG. 9

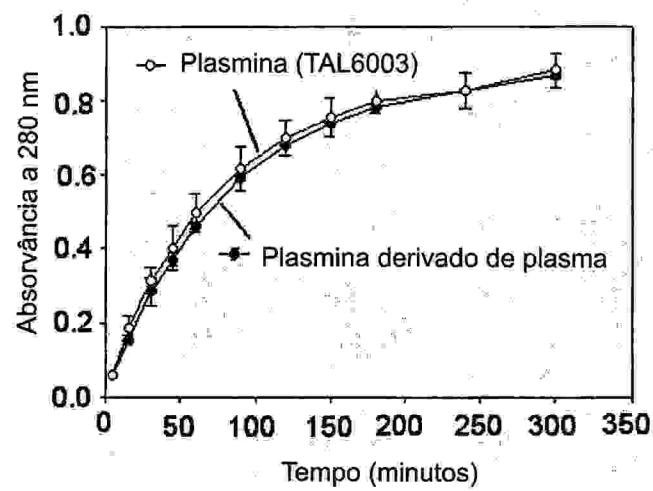


FIG. 10

1 M(X)KVYLSE CKTGNGKNYRGTMSTKNGIT CQKWSSTSPHRPRFSPATHPSE
59 GLEENY CRNPDNDPQGPW CYTTDPEKRYDY CDVPQ CAAPSFD CGKPQVEP
109 KK C PGRVVG CVAHPHSWPWQVSLRTRFGMHF C GGT LISPEWVLTAAH CL
159 EKSPRPSSYKMLGAHQEVNLEPHVQEIEVSRLFLEPTRKDIALKLSSP
209 AVITDKVIPA CLPSPNYVADRTE CFITGWGETQGTFGAGLLKEAQLPVI
259 ENKV CNRYEFLNGRVQSTEL CAGHLAGGTDS CQGDSSGGLV CFEKDKYIL
309 QGVTSWGLG CARPNKPGVYVRSRFTWIEGVMRNN
X=RDVVLFEK
(SEQ ID NO:2)