



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0602496-3 B1

(22) Data do Depósito: 03/07/2006

(45) Data de Concessão: 26/12/2017



(54) Título: USO DE INIBIDORES DE PROTEASES ISOLADOS DO TRIATOMA INFESTANS

(51) Int.Cl.: A61K 38/36; A61P 7/02; A61P 7/04

(73) Titular(es): FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO - FAPESP.
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - UNIFESP

(72) Inventor(es): IVAN TORRES NICOLAU DE CAMPOS; APARECIDA SADAE TANAKA

Relatório descritivo da patente de invenção para: "USO DE INIBIDORES DE PROTEASES ISOLADOS DO *TRIATOMA INFESTANS*".

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere ao uso de inibidores de proteases, mais especificamente, do fator XIIa isolados do barbeiro *Triatoma infestans* para o tratamento de doenças hemorrágicas e trombolíticas, em métodos diagnósticos ou no recobrimento de tubulações e demais superfícies que compõem um sistema de circulação extracorpóreo, bem como um kit para diagnóstico de doenças hemorrágicas e trombolíticas compreendendo os mesmos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O fator XII é uma das enzimas iniciadoras do processo de coagulação sangüínea e é fracamente ativado (ativação não proteolítica) quando exposto a superfícies negativas (como o colágeno subendotelial). O fator XII ativado ativa o fator XI em fator XIa, a precalicreína em calicreína e o plasminogênio em plasmina através da hidrólise controlada dos mesmos. A calicreína por sua vez é capaz de ativar o fator XII em fator XIIa (ativação hidrolítica). Assim, o fator XIIa participa não apenas da coagulação através da hidrólise do fator XI como também está presente em outros processos fisiológicos como a inflamação, fibrinólise e

sistema complemento [Fuhrer e cols., 1990]. O fator XIIa é um iniciador indireto do processo fibrinolítico devido a sua capacidade de ativar precalicreína, e esta ativa o uPA ("urokinase plasminogen activator"). A calicreína também
5 produz a bradicinina, esta induz a liberação de tPA ("tissue plasminogen activator") *in vivo* que juntamente com o uPA ativam o plasminogênio a plasmina, esta responsável pela degradação dos polímeros de fibrina [Blaat e cols., 1999]. Em concentrações plasmáticas o fator XIIa é um
10 importante ativador direto de plasminogênio a plasmina [Schousboe e cols., 1999].

O fator XIIa atua não só no sistema hemostático como também no sistema complemento, através da ativação do componente C1r. O fator XIIa também ativa indiretamente o
15 C3 a C3a através da ativação de trombina e plasmina, estes responsáveis pela ativação do C3 [Fuhrer e cols., 1990]. O fator XIIa também participa da inflamação através da ativação de calicreína que desempenha um importante papel na inflamação [Maeda e cols., 1999] liberando cininas e
20 outras moléculas mediadoras do processo inflamatório, bem como produzindo indiretamente fatores quimiotáticos [Muldbjerg e cols., 1993].

Em casos de infarto agudo do miocárdio, dentre os tratamentos utilizados, encontra-se a administração de

agentes trombolíticos (em geral, ativadores de plasminogênio) que têm como função dissolver os trombos de fibrina formados [Gulba 1991]. No entanto, a plasmina gerada desencadeia, posteriormente, o processo de coagulação sangüínea através da ativação do sistema de contato o que pode levar, não raramente, a uma falha na dissolução do trombo ou mesmo na reoclusão da artéria recém desobstruída [Ewald 1995]. Latacha e colaboradores [Latacha 2004] mostraram que a ativação paradoxal da coagulação está diretamente ligada à ativação do fator XII pela plasmina. Para contornar tais efeitos, geralmente é utilizada a administração de heparina, mas o uso desta também traz efeitos colaterais complicadores como episódios de hemorragia [Szabo 2002]. Szabo [Szabo 2002] propõe que o uso de fibrinolíticos mais específicos deve levar a uma menor ativação da fase de contato o que levaria a uma diminuição dos efeitos indesejados desse tratamento que, em conjunto com a administração de outros fármacos, poderia levar a uma diminuição na dose de uso de heparina, o que acarretaria numa redução de riscos e complicações. Nesse cenário, o uso de inibidores específicos da via de contato mostrou-se interessante como ferramenta e essa estratégia vem sendo testada como no caso da aprotinina mutada [Braufreton 1997; Bierlein 2005], um mutante do BPTI. Desta

mesma forma, o uso dos mutantes de infestina 4 em combinação com a heparina, permite que a quantidade de heparina por dose seja menor, sem que o efeito seja diminuído. Uma menor quantidade de heparina por dose leva a uma diminuição nos riscos e efeitos colaterais da mesma.

A transmissão de doenças contagiosas como AIDS, hepatite B e C associadas à transfusão sangüínea tem sido motivo de preocupação para pacientes e médico-cirurgiões [Duchow 2001]. Em vista disso, a autotransfusão vem sendo utilizada em cirurgias ortopédicas, a fim de diminuir as perdas sanguíneas e conseqüentemente diminuir a necessidade de sangue heterólogo. Atualmente, vem sendo utilizada a doação pré-operatória e a re-infusão de sangue drenado na cirurgia para tais fins. Diversos trabalhos vêm descrevendo os prós e contras de cada técnica, mas seu uso ainda é muito controverso. Especificamente no caso da re-infusão, a ativação do sistema do complemento vem sendo um dos possíveis fatores que levam às complicações [Palatianos 2003]. Neste caso, inibidores específicos de enzimas do sistema de contato (em especial os mutantes de infestina 4) podem ser utilizados durante essas cirurgias a fim de diminuir as chances de episódios de trombose pós-cirúrgicos, impedindo a ação do fator XIIa, a enzima proteolítica iniciadora da fase de contato.

Da mesma forma que as infestinas mutantes podem ser utilizadas em cirurgias na autotransfusão e re-infusão sangüíneas, as mesmas podem vir a ser utilizadas em cirurgias cardíacas onde há a realização do "bypass" (desvio) cardio-pulmonar (BCP). Para a realização do BCP, são injetadas sistemicamente grandes doses de heparina a fim de reduzir o risco de trombose no paciente, e tal procedimento acarreta riscos e efeitos colaterais já descritos antes [Wagner 1994]. Neste caso, os inibidores aqui apresentados, se utilizados, poderiam vir a diminuir a dose de heparina necessária, diminuindo-se assim os riscos aos pacientes. Nos casos de BCP, a inibição do fator XIIa pode vir ainda a ser benéfica no controle do processo inflamatório uma vez que a ativação deste através do sistema de contato, é um dos fatores pós-operatórios que aumenta o tempo de permanência do paciente na UTI [Taylor 1996; Cremer 1996].

Ainda no caso da BCP, as infestinas mutantes podem vir a serem utilizadas como um dos componentes do "coating" (cobertura em forma de uma fina camada) das membranas e tubulações da maquinaria do BCP. Diversos tipos de cobertura vêm sendo desenvolvidos e testados, no entanto, não há uma solução definitiva para tal [Palatianos 2003], pois mesmo utilizando-se uma cobertura com heparina ou

derivados, há a geração de fator XIIa bem como de trombina, esta resultante em parte da ação do fator XIIa. Assim, o inibidor poderia eventualmente ser utilizado no desenvolvimento ou mesmo como um dos componentes de
5 cobertura de superfícies.

Embora altos níveis de fator XIIa plasmáticos não sejam causadores da doença coronariana, os mesmos apresentam uma correlação linear com a calcificação da artéria coronariana [Colhoun 2002]. O grau de calcificação
10 da artéria coronariana pode ser utilizado como marcador da arteriosclerose coronariana, que é um fator de risco para doenças coronarianas [Colhoun 2002; Colhoun 2000]. Assim, inibidores específicos de fator XIIa podem ser utilizados no desenvolvimento de métodos alternativos para a
15 quantificação desta protease dada a sua importância clínica na determinação de grupos de risco para arteriosclerose coronariana. Recentemente, Lo e Diamond [Lo 2004] desenvolveram um método de "high-throughput" (grande quantidade de resultados em um pequeno período de tempo)
20 para monitoramento em tempo real da coagulação sangüínea que tem como característica a utilização de um inibidor de fator XIIa. Tal metodologia, inviável na ausência do inibidor, permite mapeamento automático do sangue, utilizando baixíssimas quantidades do mesmo, gerando

rapidamente grandes quantidades de dados para testes cinéticos, rastreamento de interações de medicamentos bem como permitindo o monitoramento do fenótipo funcional de uma amostra de sangue de um paciente.

5 BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra a TTPA da infestina 4 nativa e dos mutantes selecionados. No ensaio foram utilizados uma mistura de plasma de doadores normais e os inibidores nas quantidades indicadas. Cada barra indica a média dos
10 experimentos realizados e os valores são correspondentes ao aumento do tempo de TTPA com relação ao controle (30.4 segundos) em vezes.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere ao uso de inibidores
15 seletivos para fator XIIa obtidos a partir de uma biblioteca de mutantes de um inibidor de fator XIIa isolado do barbeiro *Triatoma infestans* para o tratamento de doenças hemorrágicas e trombolíticas, em métodos diagnósticos como na dosagem de fator XIIa, em intervenções cirúrgicas como
20 anticoagulante ou mesmo no recobrimento de tubulações e demais superfícies que compõem um sistema de circulação extracorpóreo.

Em um outro aspecto da presente invenção, os referidos mutantes de inibidor de fator XIIa de *Triatoma infestans*

podem ser utilizados em um kit para diagnóstico de doenças hemorrágicas e trombolíticas através da quantificação de fator XIIa circulante de pacientes.

A seguir, a presente invenção será explicada de maneira mais pormenorizada com o auxílio da descrição de sua modalidade preferida.

Construção dos fragmentos de infestina 4 contendo as mutações

Utilizaram-se os oligonucleotídeos MUT4PCAN
10 (GCGGCCAGC CGGCCGAGGT CAGAAACCCT TGCGCCTGTN **NBNNBNNBNN**
BGTTNNBGTG TGTGGTTCAG ATGGG) e INF4PCANR (GGGAAGAAGT
CCAAGCGGCC GCAAACCTGTT CAAC) e o plasmídeo pIC 13.1.4
(Infestina 4 em pCANTAB 5E) em reações de PCR. Os produtos
das reações foram aplicados em eletroforese em gel de
15 agarose 2 % e a banda correspondente as infestinas mutantes
foi recortada do gel, o DNA extraído e digerido com a
enzima de restrição Sfi I (60 U). O produto da reação foi
precipitado com acetato de sódio e etanol e digerido com a
enzima de restrição Not I (40 U). O produto de digestão foi
20 novamente aplicado em gel de agarose e as bandas
correspondentes as infestinas mutantes foram purificadas.

Ligação dos fragmentos ao vetor pCANTAB 5E

O vetor pCANTAB 5E foi previamente digerido com as enzimas de restrição Sfi I e Not I. A reação de digestão

foi precipitada e o DNA defosforilado utilizando-se a enzima CIAP 4 U (MBI Fermentas) durante 2 h a 37°C. O produto de defosforilação foi aplicado em um gel de agarose e a banda correspondente ao plasmídio foi recortada do gel e o DNA purificado utilizando se o kit "QIAEX II" (Qiagen). O vetor (353,5 fmols) e os fragmentos (15,9 pmols) foram ligados utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (1,5 U) durante 16 h à 18°C (5 reações). Os produtos de ligação foram precipitados e utilizados em transformações por eletroporação de bactérias *E. coli* cepa TG1 competentes recém preparadas. Às células eletroporadas foi adicionado 1 ml de meio SOC e as mesmas foram incubadas por 1 hora à 37°C sob agitação a 200 rpm. Em seguida, as transformações foram unidas, o material foi inoculado em 300 ml de meio SOBAG contendo ampicilina e agitado a 220 rpm à 30°C durante a noite. Na manhã seguinte, o material foi estocado a 4°C.

Determinação do título da biblioteca

Uma fração do conjunto de células incubadas em meio SOC a 37°C por uma hora foi diluída (10^2 , 10^3 e 10^4) em meio LB, parte das diluições foi plaqueada em SOBAG/Amp-ágar e esta foi incubada durante a noite à 30°C. No dia seguinte, o número de colônias em cada placa foi determinado e a quantidade total de transformantes da biblioteca foi

calculada.

Seleção da biblioteca de mutantes de infestina 4 em "Phage-Display" (exposição em fagos)

A seleção de mutantes de infestina 4 expostos em fagos
5 de fusão foi realizada como em Tanaka e cols [1999].

Preparo dos fagos de fusão

A 1,8 ml de meio 2YT contendo glicose (2 %) foram
adicionados 200 μ l da biblioteca de mutantes de infestina
previamente preparada e a mesma foi incubada por 1 hora a
10 37°C sob agitação a 200 rpm a 37°C. Em seguida, adicionou-
se 20 μ l de ampicilina (20 mg/ml) e 1 ml da solução de
fagos M13K07 (título: $3,7 \times 10^9$ pfu/ml), e as células foram
incubadas por mais 1 hora a 37°C, sob agitação a 200 rpm. A
cultura foi centrifugada a 1000 g, por 10 min para
15 sedimentação das células e o meio foi cuidadosamente
descartado. As células foram ressuspensas gentilmente em 2
ml de meio 2YT/Amp e canamicina (50 μ g/ml) (sem glicose) e
incubadas durante a noite a 37°C sob agitação 220 rpm. No
dia seguinte, a cultura foi centrifugada a 1000 g por 20
20 min, as bactérias foram descartadas e o sobrenadante
contendo os fagos foi filtrado em membrana de 0,22 μ m
estéril e estocado a 4°C.

Seleção da biblioteca de infestina 4 mutante para α -fator

XIIa

Inicialmente, o α -fator XIIa foi diluído em tampão de ligação (tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5, contendo NaCl 0,1 M) a uma concentração de 40 $\mu\text{g/ml}$. Em seguida, 100 μl da solução de enzima foram colocados em uma microplaca de 96 poços para ELISA (Maxisorp, Nunc) e esta foi incubada durante a noite a 4°C em câmara úmida. No dia seguinte, a solução da placa foi descartada e o poço foi bloqueado com 200 μl de tampão de bloqueamento (tampão PBS pH 7,4 contendo Tween 20 0,005 % e albumina 2 %) por 2 h à temperatura ambiente. Novamente, a solução da placa foi descartada e o poço foi incubado com 100 μl da solução de fagos (diluída 1:1 no tampão de bloqueamento e pré-incubada por 30 min à temperatura ambiente) por 90 min a 30°C. O poço foi lavado exaustivamente com solução de lavagem (10 ml de PBS pH 7,4 contendo Tween 20 0,1 %) e o mesmo foi incubado por 15 min a temperatura ambiente com 200 μl de solução de pré-eluição (solução KCl 0,2 M pH 5,0). Finalmente, os fagos foram eluídos com 200 μl (10 min) da solução de eluição (solução KCl 0,2 M pH 2,0). Os fagos eluídos foram transferidos para um tubo contendo 4 μl de tampão Tris-HCl 1 M, pH 8,0.

Titulação dos fagos obtidos na 1ª seleção

Parte da solução de fagos (25 μl) foi utilizada no preparo de soluções diluídas (10^2 , 10^3 e 10^4) para

determinação do número de fagos ligantes. 100 μ l de uma cultura de bactérias *E.coli* TG1 (em fase logarítmica, OD₆₀₀ = 0,5) foram incubados com 100 μ l de cada diluição do fago por 30 min a 37°C e destes, 100 μ l foram plaqueados em 5 placas SOBAG/Amp-ágar. O restante do material eluído (~175 μ l) foi incubado com 400 μ l de bactérias *E.coli* TG1 (em fase logarítmica) durante 30 min a 37°C, centrifugado a 1000 g por 5 min e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 3 ml de 2YT contendo glicose 10 2 % e ampicilina, e foram incubadas durante a noite à 30°C para amplificação das células contendo os fagomídios selecionados.

Demais ciclos de seleção

As células amplificadas foram utilizadas na preparação 15 de fagos e os mesmos foram selecionados, realizando-se assim mais um ciclo de seleção. Realizou-se ainda um terceiro ciclo de seleção, ao final do qual, bactérias utilizadas na titulação foram aleatoriamente escolhidas e tiveram seus plasmídios seqüenciados.

20 **Clonagem e expressão das infestinas mutantes em *P. pastoris***

O DNA codante para os clones selecionados foi amplificado (PCR) utilizando-se os oligonucleotídeos INF4PICF (GCTCTCGAGA AAAGGGAGGT CAGAAACCC) e INF4PICR (GAAGTCGCGG CCGCTCAAAA CTGTTC) e o produto desta reação foi

sub-clonado no vetor pPIC9 para expressão em *P. pastoris*. Leveduras *P. pastoris* foram transformadas com os plasmídios contendo os genes das infestinas mutadas e utilizadas na expressão dos mutantes como descrito em Campos e cols [2004]. Após fermentação de 96 h em meio BMMY, o sobrenadante da cultura foi utilizado em ensaios de inibição frente a diferentes proteases.

Purificação e determinação das atividades inibitórias dos mutantes expressos

As infestinas 4 mutantes 3 e 15 expressas foram purificadas através de cromatografia de troca-iônica utilizando-se uma coluna Hitrap SP (5 ml) (Amersham Biosciences). Na caracterização cinética dos inibidores (realizadas como em Campos e cols 2004) utilizaram-se as enzimas e os substratos presentes na tabela 1.

Tabela 1. Serinoproteases e substratos utilizados em ensaios de inibição.

Protease	Substrato	Seqüência dos substratos
Fator XIIa humano (4U)	S2302 (100 μ M)	HD-Pro-Phe-Arg-pNa
Tripsina bovina (1U)	----- (100 μ M)	Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNa
Plasmina humana (4U)	S2251 (100 μ M)	HD-Val-Leu-Lys-pNa
Fator Xa humano (2U)	S2222 (100 μ M)	Bz-Ile-Gly-Arg-pNa
Trombina humana (2U)	S2238 (100 μ M)	HD-Phe-Pip-Arg-pNa

Protease	Substrato	Seqüência dos substratos
Calicreína plasmática humana (2U)	S2302 (100 μ M)	HD-Pro-Phe-Arg-pNa
Elastase neutrófilo humana (4U)	S2484 (100 μ M)	Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNa
Subtilisina A (5U)	----- (62,5 μ M)	Boc-Gly-Gly-Leu-pNa
Elastase pancreática porcina	S2484 (100 μ M)	Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNa
Proteinase K (1U)	----- (200 μ M)	Bz-Ala-Ala-Leu-pNa
Papaina (1U)	BAPA (625 μ M)	Bz-Arg-pNa
Quimotripsina humana (3U)	----- (100 μ M)	Suc-Phe-pNa
Catepsina G (2U)	----- (150 μ M)	Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa
u-PA (2U)	S2444 (100 μ M)	piroGlu-Pro-Val-pNa
t-PA (2U)	S2288 (100 μ M)	HD-Ile-Pro-Arg-pNa

Os números em parênteses indicam a quantidade utilizada em cada ensaio.

1U - quantidade de enzima que produz $\Delta A_{405}/\text{min} = 60$

Tempo de Tromboplasmina Parcial Ativada (TTPA)

5 Foi realizado como em Campos e cols [2004]. 50 μ l da
solução do inibidor a ser testado foi pré-incubada com 50
 μ l de plasma deficiente em fator XII (Stago), 50 μ l de
plasma humano normal e 50 μ l de reagente de cefaloplastina
ativa (Dade) por 3 min a 37°C. Uma solução de cloreto de
10 cálcio pré-aquecida (37°C) foi então adicionada e o tempo
de coagulação medido. O experimento foi realizado em
duplicata.

Os inibidores mutantes foram caracterizados

cineticamente e apresentaram alta afinidade e especificidade para o fator XIIa conforme tabela 2.

Tabela 2. Constantes de inibição (K_i) dos mutantes de infestina 4 para diferentes serinoproteases.

K_i (nM)

	Infestina 4 tipo selvagem						Infestina 4 mut 3						Infestina 4 mut 15					
	P_3	P_2	P_1	P_1'	P_2'	P_3'	P_3	P_2	P_1	P_1'	P_2'	P_3'	P_3	P_2	P_1	P_1'	P_2'	P_3'
	F	R	N	Y	V	P	S	R	R	L	V	H	T	R	R	F	V	A
Fator	0.128						4.6						0.003					
XIIa																		
Tripsina	11						9.5						2.3					
Fator Xa	53						n.i						n.i					
Plasmina	2.1						n.i						n.i					

5 n.i. - não inibe

Diferentemente da infestina 4 nativa, que inibe fator XIIa, fator Xa, plasmina e tripsina, os mutantes inibem apenas tripsina e fator XIIa sendo que o mutante 15 apresenta uma afinidade aproximadamente 750 vezes maior para fator XIIa do que para tripsina. Ambos inibidores não apresentaram inibição para trombina, fator Xa, calicreína plasmática humana, plasmina, t-PA, u-PA, elastase de neutrófilos humanos, quimotripsina, calicreína plasmática

de porco e demais proteases testadas (tabela 1), demonstrando a sua alta especificidade.

Quando avaliados em ensaios de TTPA (Tempo de Tromboplasmina Parcial Ativada), que mede a intervenção dos
5 inibidores na via extrínseca da coagulação, ambos apresentaram potência similar ao inibidor nativo (figura 1), sendo capazes de prolongar o tempo de coagulação a baixas concentrações.

Assim, até o presente momento, não há inibidores de
10 fator XIIa tão potentes ou específicos como os mutantes de infestina 4 (inf 4 mut 3 e 15) da presente invenção. A seletividade destes inibidores ao fator XIIa reduz a possibilidade de reações adversas indesejadas ocasionadas por uma interação inespecífica dos mesmos com outras
15 proteases. Uma vez que a infestina 4 selvagem não apresentou imunogenicidade quando injetada com adjuvantes em camundongos Balb-C para a produção de anticorpos, acreditamos que os mutantes apresentem também baixos potenciais imunogênicos o que possibilitaria o seu uso em
20 mamíferos superiores. Os inibidores são pertencentes à família Kazal sendo compostos por 56 aminoácidos cada.

Inf 4 mut 3 - E V R N P C A C **S R R L V H V C G S D G**
K T Y G N P C M L N C A A Q T K V P G L K L V H E G R C Q R
S N V E Q F

Inf 4 mut 15 - E V R N P C A C T R R F V A V C G S D G
K T Y G N P C M L N C A A Q T K V P G L K L V H E G R C Q R
S N V E Q F

Terapeuticamente, os inibidores da presente invenção
5 podem ser utilizados em medicamentos compreendendo heparina
e agentes trombolíticos para o tratamento de infarto do
miocárdio. Nestes medicamentos, os inibidores teriam como
função a diminuição da dose de heparina e o controle da
ativação paradoxal da coagulação através da inibição do
10 fator XIIa gerado pela plasmina ativada pelos agentes
trombolíticos. Acarretando efeitos colaterais e riscos
menores que os obtidos atualmente.

De maneira semelhante à utilização no tratamento do
infarto do miocárdio, estes inibidores podem ser aplicados
15 em caso de cirurgias ortopédicas que se utilizam de
autotransfusão ou re-infusão sangüinea objetivando-se a
diminuição de episódios de trombose pós-cirúrgica.

Outra forma terapêutica potencial destes inibidores é
a sua aplicação em cirurgias cardíacas onde se utiliza a
20 BCP. O uso desses inibidores da BCP permitiria o uso de
menores dosagens de heparina levando a menores chances de
efeitos colaterais da cirurgia (como episódios trombóticos)
ou efeitos danosos da heparina (como hemorragias pós-
cirúrgicas).

Estes inibidores podem ainda ser utilizados não apenas na terapêutica, mas ainda como componente da camada que recobre tubulações e maquinarias de BCP, impedindo ativação da coagulação sangüínea e seqüestrando moléculas de fator
5 XIIa circulantes. Outra aplicação potencial é a imobilização desses inibidores em resinas para utilização destas na purificação de fator XIIa humano ou recombinante utilizado no tratamento de alguns tipos de hemofilia.

Finalmente, os presentes inibidores podem ser
10 utilizados no desenvolvimento de métodos de diagnóstico para a quantificação de fator XIIa circulante de pacientes, uma vez que níveis elevados desta protease estão relacionados à arteriosclerose coronariana, que é um fator de risco para doenças coronarianas.

15 Todas as publicações mencionadas no relatório descritivo apresentado acima são aqui incorporadas por referência. Várias modificações e variações da presente invenção vão ser evidentes para aqueles versados na técnica, sem que se afaste do âmbito e do espírito da
20 invenção. Embora a invenção tenha sido descrita em conjunto com a modalidade preferida específica, deve-se entender que a invenção, como reivindicada, não deve ser indevidamente limitada a essa modalidade específica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baufreton, C., P. G. Jansen, et al. (1997). "Heparin coating with aprotinin reduces blood activation during coronary artery operations." *Ann Thorac Surg* 63(1): 50-6.

Beierlein, W., A. M. Scheule, et al. (2005). "Forty years
5 of clinical aprotinin use: a review of 124 hypersensitivity reactions." *Ann Thorac Surg* 79(2): 741-8.

Braat, E. A., G. Dooijewaard, et al. (1999). "Fibrinolytic properties of activated FXII." *Eur J Biochem* 263(3): 904-11.

10 Campos, I. T., A. M. Tanaka-Azevedo, et al. (2004). "Identification and characterization of a novel factor XIIa inhibitor in the hematophagous insect, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae)." *FEBS Lett* 577(3): 512-6.

Colhoun, H. M., M. B. Rubens, et al. (2000). "The effect of
15 type 1 diabetes mellitus on the gender difference in coronary artery calcification." *J Am Coll Cardiol* 36(7): 2160-7.

Colhoun, H. M., F. Zito, et al. (2002). "Activated factor XII levels and factor XII 46C>T genotype in relation to
20 coronary artery calcification in patients with type 1 diabetes and healthy subjects." *Atherosclerosis* 163(2): 363-9.

Cremer, J., M. Martin, et al. (1996). "Systemic inflammatory response syndrome after cardiac operations."

Ann Thorac Surg 61(6): 1714-20.

Duchow, J., M. Ames, et al. (2001). "Activation of plasma coagulation by retransfusion of unwashed drainage blood after hip joint arthroplasty: a prospective study." J Arthroplasty 16(7): 844-9.

Ewald, G. A. and P. R. Eisenberg (1995). "Plasmin-mediated activation of contact system in response to pharmacological thrombolysis." Circulation 91(1): 28-36.

Fuhrer, G., M. J. Gallimore, et al. (1990). "Fxi." Blut 61(5): 258-66.

Latacha, M. P., W. T. Schaiff, et al. (2004). "Factor XII-dependent increases in thrombin activity induce carboxypeptidase-mediated attenuation of pharmacological fibrinolysis." J Thromb Haemost 2(1): 128-34.

Lo, K. and S. L. Diamond (2004). "Blood coagulation kinetics: high throughput method for real-time reaction monitoring." Thromb Haemost 92(4): 874-82.

Maeda, H., J. Wu, et al. (1999). "Kallikrein-kinin in infection and cancer." Immunopharmacology 43(2-3): 115-28.

Muldbjerg, M., S. Markussen, et al. (1993). "Bovine factor XIIa inhibitor." Blood Coagul Fibrinolysis 4(1): 47-54.

Palatianos, G. M., C. N. Foroulis, et al. (2003). "A prospective, double-blind study on the efficacy of the bioline surface-heparinized extracorporeal perfusion

circuit." Ann Thorac Surg 76(1): 129-35.

Schechter, I. and A. Berger (1967). "On the size of the active site in proteases. I. Papain." Biochem Biophys Res Commun 27(2): 157-62.

- 5 Schousboe, I., K. Feddersen, et al. (1999). "Factor XIIa is a kinetically favorable plasminogen activator." Thromb Haemost 82(3): 1041-6.

- Szabo, S., R. Letsch, et al. (2002). "Absence of paradoxical thrombin activation by fibrin-specific
10 thrombolytics in acute myocardial infarction: comparison of single-bolus tenecteplase and front-loaded alteplase." Thromb Res 106(2): 113-9.

- Tanaka, A. S., M. M. Silva, et al. (1999). "Functional phage display of leech-derived tryptase inhibitor (LDTI):
15 construction of a library and selection of thrombin inhibitors." FEBS Lett 458(1): 11-6.

Taylor, K. M. (1996). "SIRS--the systemic inflammatory response syndrome after cardiac operations." Ann Thorac Surg 61(6): 1607-8.

- 20 Wagner, W. R., P. C. Johnson, et al. (1994). "Heparin-coated cardiopulmonary bypass circuits: hemostatic alterations and postoperative blood loss." Ann Thorac Surg 58(3): 734-40; discussion 741.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de inibidores mutantes de proteases isolados do *Triatoma infestans*, em que os referidos inibidores mutantes estão indicados nas SEQ. IDs. 1 e 2, **caracterizado** por ser na preparação de um medicamento para o tratamento de doenças hemorrágicas e trombolíticas.

2. Uso de inibidores mutantes de proteases isolados do *Triatoma infestans*, em que os referidos inibidores mutantes estão indicados nas SEQ. IDs. 1 e 2, **caracterizado** por ser em um kit para diagnóstico de doenças hemorrágicas e trombolíticas por quantificação de fator XIIa circulante de pacientes.

3. Uso de inibidores mutantes de proteases isolados do *Triatoma infestans*, em que os referidos inibidores mutantes estão indicados nas SEQ. IDs. 1 e 2, **caracterizado** por ser no recobrimento de tubulações e demais superfícies que compõem um sistema de circulação extracorpóreo.

4. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizado** pelo fato de que os referidos inibidores mutantes são obtidos a partir de uma biblioteca de mutantes de um inibidor de fator XIIa isolado do barbeiro *Triatoma infestans*.

5. Kit para diagnóstico de doenças hemorrágicas e trombolíticas **caracterizado** por fato de que compreende

mutantes de um inibidor de serinoproteases isolado do barbeiro *Triatoma infestans* altamente seletivos ao fator XIIa, os referidos inibidores mutantes indicados nas SEQ. IDs. 1 e 2.

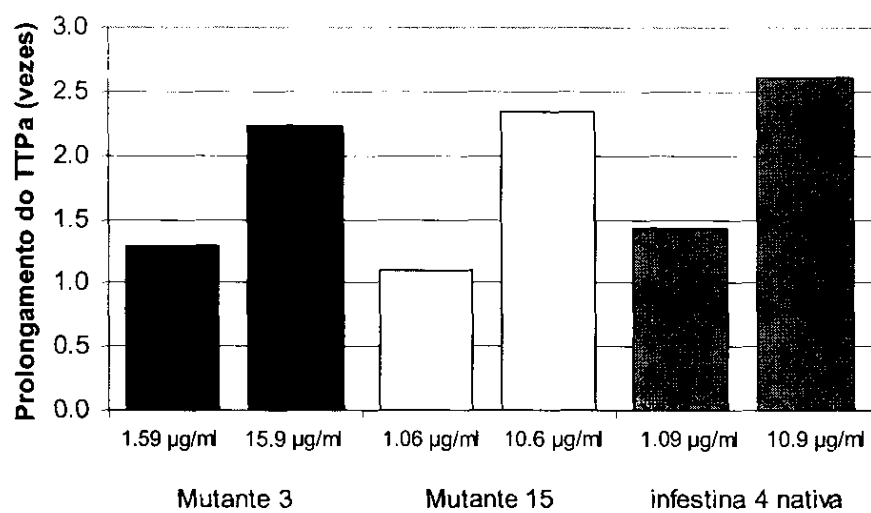


Figura 1