

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

(51) Classificação Internacional:

C07K 5/06 (2016.01) **C07K 5/08** (2016.01)
A61K 38/00 (2016.01) **A61P 3/04** (2016.01)
C07K 5/62 (2016.01) **C07K 5/83** (2016.01)
C07K 5/87 (2016.01) **C07K 5/09** (2016.01)
C07K 5/65 (2016.01) **C07K 5/72** (2016.01)
A61K 38/05 (2016.01) **A61K 38/06** (2016.01)

(22) Data de pedido: **2008.12.03**

(30) Prioridade(s): **2007.12.03 US 996732 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2010.09.08**

(45) Data e BPI da concessão: **2016.03.09**
112/2016

(73) Titular(es):

OBE THERAPY BIOTECHNOLOGY
4 RUE PIERRE FONTAINE 91000 EVRY FR

(72) Inventor(es):

ITZIK HAROSH FR
SANDRINE BRAUD FR

(74) Mandatário:

ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO
RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **INIBIDORES BOROPEPTÍDICOS DE ENTEROPEPTIDASE E SUAS UTILIZAÇÕES NO TRATAMENTO DE OBESIDADE, EXCESSO DE PESO E/OU DOENÇAS ASSOCIADAS COM UM METABOLISMO ANORMAL DA GORDURA**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A NOVOS COMPOSTOS, PARTICULARMENTE DERIVADOS DE BOROARGININA, BOROORNITINA E BOROLISINA QUE MODULAM, REGULAM E/OU INIBEM SELETIVAMENTE A ENTEROPEPTIDASE. A INVENÇÃO TAMBÉM SE REFERE A COMPOSIÇÕES, PARTICULARMENTE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, ASSIM COMO A MÉTODOS PARA TRATAR O EXCESSO DE PESO, OBESIDADE E DOENÇAS ASSOCIADAS COM UM METABOLISMO ANORMAL DAS GORDURAS

RESUMO

"INIBIDORES BOROPEPTÍDICOS DE ENTEROPEPTIDASE E SUAS UTILIZAÇÕES NO TRATAMENTO DE OBESIDADE, EXCESSO DE PESO E/OU DOENÇAS ASSOCIADAS COM UM METABOLISMO ANORMAL DA GORDURA"

A presente invenção refere-se a novos compostos, particularmente derivados de boroarginina, boroornitina e borolisina que modulam, regulam e/ou inibem seletivamente a enteropeptidase. A invenção também se refere a composições, particularmente composições farmacêuticas, assim como a métodos para tratar o excesso de peso, obesidade e doenças associadas com um metabolismo anormal das gorduras.

DESCRIÇÃO

"INIBIDORES BOROPEPTÍDICOS DE ENTEROPEPTIDASE E SUAS UTILIZAÇÕES NO TRATAMENTO DE OBESIDADE, EXCESSO DE PESO E/OU DOENÇAS ASSOCIADAS COM UM METABOLISMO ANORMAL DA GORDURA"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a novos oligopéptidos não absorvíveis baseados em análogos de boro de aminoácidos incorporando uma função protonável na sua cadeia lateral, tais como boroarginina, borolisina, boroornitina e compostos relacionados, que modulam, regulam e/ou inibem seletivamente a enteropeptidase. Estes compostos são utilizados individualmente, em combinação ou em associação com outros compostos conhecidos para o tratamento de excesso de peso, obesidade e doenças associadas com um metabolismo anormal da gordura.

ANTECEDENTES E TÉCNICA ANTERIOR RELACIONADA

A obesidade é um estado crónico multifacetado e é hoje o problema nutricional mais predominante nos Estados Unidos. A obesidade, um estado causado por um excesso de ingestão de energia em comparação com o gasto de energia, contribui para a patogénese da hipertensão, diabetes mellitus tipo II ou não dependente de insulina, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, doença cardíaca, pancreatite e formas comuns de cancro, tais como cancro da mama, cancro da próstata, cancro uterino e cancro do cólon.

Presentemente, está comercialmente disponível apenas um número limitado de fármacos para tratamento da obesidade. Infelizmente, enquanto alguns destes fármacos podem proporcionar alívio de curto prazo ao doente, um tratamento de longo prazo bem-sucedido não foi ainda alcançado. Os métodos exemplificativos de tratamento da obesidade também são divulgados nas Pat. U.S. Nº 3867539; 4446138; 4588724; 4745122; 5019594; 5300298; 5403851; 5567714; 5573774; 5578613; e 5900411.

Um dos fármacos presentemente disponíveis para o tratamento da obesidade, desenvolvido pela Hoffman-LaRoche, é um inibidor da lipase pancreática (PL). A lipase pancreática é responsável pela degradação de triglicéridos em monoglicéridos. Contudo, tem sido associada a efeitos secundários, tal como diarreia grave, resultando na inibição da absorção de apenas uma fração específica de ácidos gordos e é sabido que induz reações alérgicas. O tratamento com inibidores da PL é, assim, altamente desvantajoso e pode até expor o indivíduo tratado a riscos potencialmente fatais.

Recentemente, foi sugerido que a absorção de gordura pode ser reduzida por inibição da atividade da proteína de transferência de triglicéridos microssómica (MTP), a qual está envolvida na formação e secreção de lipoproteínas de densidade muito leve (VLDL) e quilomicrons. Sharp *et al.*, [*Nature* (1993) 365:65-69] e Wetterau *et al.*, [*Science* (1994) 282:751-754,] demonstraram que o gene *mtp* é responsável pela doença da abetalipoproteinemia. Os documentos U.S. Nº 6066650, 6121283 e 6369075 descrevem composições que incluem inibidores de MTP, os quais são direcionados ao tratamento de diversos estados associados com excessiva absorção de gordura. Contudo, doentes tratados com inibidores de MTP sofrem importantes efeitos

secundários, incluindo esteatose hepática, os quais são atribuídos a atividade reduzida de MTP no intestino e no fígado. Tal não é surpreendente, dado que se mostrou que pessoas naturalmente deficientes para atividade de MTP desenvolvem fígados gordos [Kane e Havel (1989); *Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the apolipoprotein B*. pp. 1139-1164, em: "The metabolic basis of inherited disease" (Scriver et al., eds.). McGraw-Hill, Nova Iorque]. De facto, a empresa Bristol Myers Squibb, que desenvolveu inibidores de MTP para o tratamento da obesidade, decidiu recentemente abandonar este alvo, devido a este efeito secundário de fígado gordo.

Os alvos presentemente conhecidos para o tratamento da obesidade e distúrbios relacionados podem ser divididos em quatro classes principais: (i) bloqueadores do apetite, os quais incluem, por exemplo, o NPY (neuropéptido Y); (ii) estimuladores da saciedade, os quais incluem, por exemplo, o produto dos genes *ob*, *db* e *agouti*; (iii) agentes de queima de energia ou ácidos gordos, os quais incluem as UCP (Proteínas de Desconjugação); e (iv) inibidores de absorção de gordura, tais como os que atuam sobre PL e MTP no intestino, descritos acima.

Como aqui discutido, a utilização destes alvos está altamente limitada pela sua redundância, seu direcionamento múltiplo e/ou sua ausência de especificidade de tecido.

Existe, assim, uma necessidade largamente reconhecida para, e seria altamente vantajoso, ter-se composições e métodos para o tratamento da obesidade e doenças e distúrbios relacionados desprovidos das limitações acima.

As proteases de serina estão envolvidas num grande número de importantes processos fisiológicos. A inibição seletiva de uma dada protease de serina é uma das estratégias para o tratamento de estados patológicos associados com a atividade ou superatividade destas proteases de serina. Abaixo, encontra-se uma lista não exaustiva de inibidores de protease de serina divulgados na literatura:

- inibidores baseados em fósforo, tal como o diisopropilfosfofuloridato (DFP) (Jansen *et al.*, (1952) *Adv. Enzymol.* 13: 321-343) ou análogos do éster de difenilfosfonato;
- proteases de serina contendo flúor, tal como cetonas de trifluorometilo (TFMK);
- aldeídos baseados em péptidos, clorometilcetonas, fluorometilcetonas, sais de dimetilsulfónio, α -ceto-ácidos e amidas, α -ceto-ésteres e α -ceto-aldeídos (glioxais);
- produtos naturais, tal como as cicloteonamidas, derivadas da esponja marinha Japonesa *Theonella sp.*;
- moléculas baseadas em estrutura heterocíclica;
- heterociclos de N-hidroxissuccimida e compostos relacionados;
- isocumarinas, tal como 3,4-dicloroisocumarina;
- inibidores baseados em β -lactâmicos;
- compostos potenciados por metais;
- aprotinina (Trasylol®), utilizada para reduzir o sangramento; e
- serpinas (inibidores de protease de serina), tais como antitrombina e α -1-antitripsina, tendo um papel na coagulação/trombose e enfisema/AlAT, respetivamente.

O documento WO 95/09634 divulga análogos peptídicos eletrofílicos como inibidores de proteases de serina semelhantes a tripsina. Os compostos são dipéptidos nos quais um derivado eletrofílico de um α -aminoácido está conjugado com um α -aminoácido N,N-dissubstituído. Os conjugados de α -aminoácido N,N-dissubstituídos do análogo de aminoácido eletrofílico são derivados de um aminoácido onde o grupo α -amino está alquilado e acilado ou diacilado para dar substituintes alicíclicos ou cíclicos.

O documento EP 0293881 divulga péptidos compreendendo derivados de ácido borónico C-terminais de lisina, ornitina e arginina, homoarginina e seus correspondentes análogos de isotiourónio, os quais são descritos como sendo inibidores reversíveis de proteases de serina semelhantes a tripsina, tais como trombina, calicreína plasmática e plasmina.

O documento US 5814622 refere-se a compostos derivados de ácido borónico e à sua utilização como inibidores de proteases de serina semelhantes a tripsina de proteases de serina. Os compostos são referidos como tendo tempos de coagulação diferentes aumentados e atividade através da via oral.

O documento WO 2006/050999 pertence a um método de redução da gordura corporal de um indivíduo por meio de um agente capaz de regular negativamente a atividade e/ou expressão de, pelo menos, um componente que participa na digestão e/ou absorção de proteína. Os agentes propostos são um oligonucleótido dirigido a uma sequência de ácido nucleico endógena expressando o referido, pelo menos um, componente que participa na referida digestão e/ou absorção de proteína ou um inibidor de protease dirigido ao

referido, pelo menos um, componente que participa na digestão e/ou absorção de proteína.

Contudo, poucos compostos foram descritos como inibidores de proteases de serina, com uma inibição específica e seletiva de um alvo único. Além disso, não foram divulgados ou sugeridos compostos que seletivamente e especificamente inibem a enteropeptidase e sejam utilizados no tratamento de obesidade, excesso de peso ou doenças associadas com um metabolismo anormal da gordura.

A enteropeptidase é uma protease de serina situada na superfície de células intestinais epiteliais (enterócitos) (*Lancet*. 19 de Abril de 1969; 1 (7599):812-3; *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. Dezembro de 2003; 285(6):G1235-41; *Proc Soc Exp Biol Med*. Junho de 1994; 206(2):114-8; *Ciba Found Symp*. 16-18 de Janeiro de 1979; (70):169-87; *Lancet*. 28 de Agosto de 1982; 2(8296):504). O substrato da enteropeptidase é o tripsinogénio, um precursor para a tripsina. A enteropeptidase converte o tripsinogénio numa molécula de tripsina. Por sua vez, a tripsina, a qual também é uma protease de serina, converte os precursores de uma série de enzimas digestivas, tais como procarboxipeptidases A e B, quimotripsinogénio, prolipase pancreática e pro-elastase, nas formas ativas das enzimas (carboxipeptidases A e B, quimotripsina, lipase pancreática e elastase). As últimas formas ativas dessas enzimas digestivas são requeridas para o processamento e derradeira absorção de proteína e matéria gorda no tracto gastrointestinal (GI).

Em virtude de a enteropeptidase estar localizada no lúmen intestinal, a inibição desta enzima requer que os compostos inibam seletivamente a enteropeptidase, sem interferirem com

proteases de serina em circulação, tais como trombina e calicreína.

Assim, existe uma necessidade para compostos para tratar a obesidade, excesso de peso, assim como doenças associadas com um metabolismo anormal da gordura, numa base de longo prazo que tenham um alvo específico.

É um objetivo da presente invenção proporcionar compostos que inibam a enteropeptidase e, mais particular, que seletivamente inibam a enteropeptidase. Em particular, estes compostos são não absorvíveis, *i. e.*, não passam do intestino para o sangue.

É outro objetivo da presente invenção proporcionar compostos que sejam derivados de análogos de boro de aminoácidos incorporando uma funcionalidade protonável na sua cadeia lateral, tais como borolisina, boroornitina e boroarginina, e sejam inibidores fortes, não absorvíveis, da enteropeptidase.

É ainda outro objeto da invenção, composições, especialmente composições farmacêuticas, compreendendo, pelo menos, um dos compostos divulgados na presente invenção.

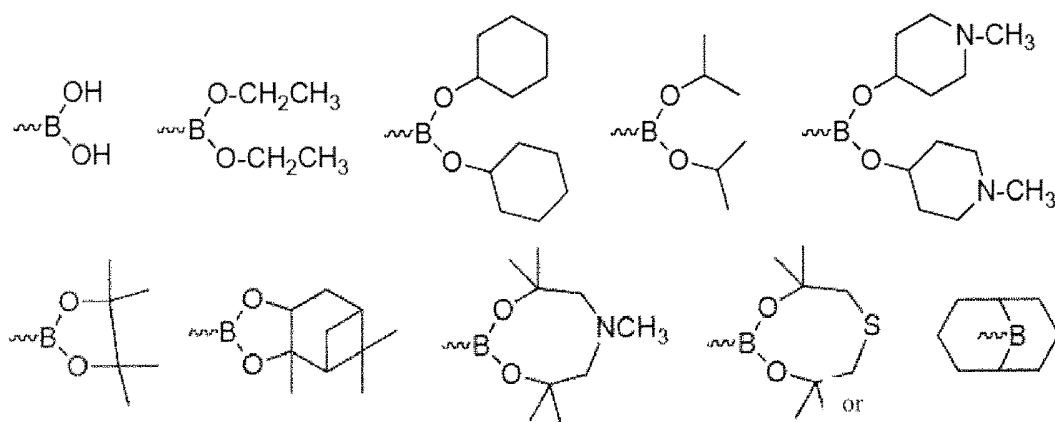
É ainda outro objetivo da presente invenção a utilização de, pelo menos, um dos compostos ou da composição aqui divulgados, para o tratamento de obesidade, excesso de peso e doenças associadas com um metabolismo anormal da gordura. Também é proporcionado um composto ou uma composição da invenção para utilização no tratamento da obesidade, excesso de peso e doenças associadas com um metabolismo anormal da gordura.

Estes e outros objetivos são alcançados pela presente invenção como evidenciado pelo sumário da invenção, descrição das formas de realização preferidas e das reivindicações.

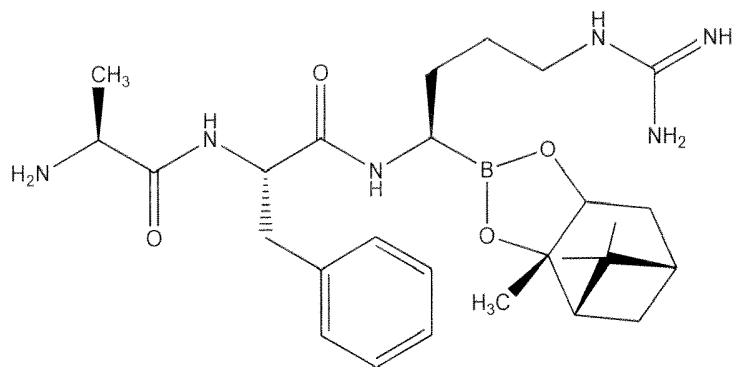
SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Num aspeto, a invenção refere-se a um composto selecionado do grupo consistindo em Glu-Gly-Boro-Arg, Ala-Phe-Boro-Arg, Ac-Glu-Gly-Boro-Arg e Ac-Ala-Phe-Boro-Arg, em que Ac é acetilo.

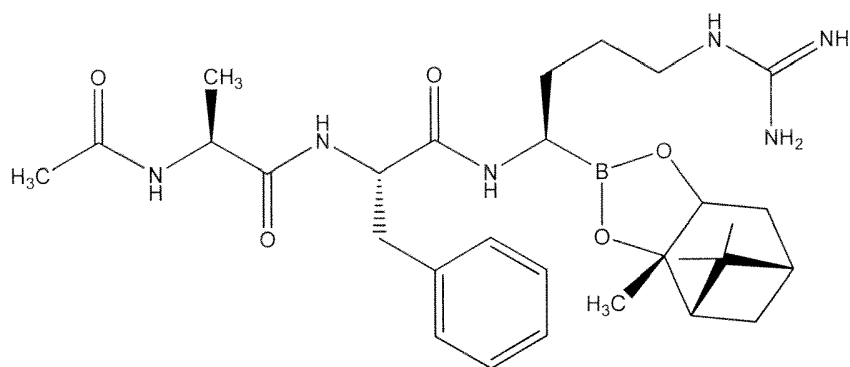
Em algumas formas de realização, a unidade de boroarginina (Boro-Arg) compreende um grupo da fórmula:



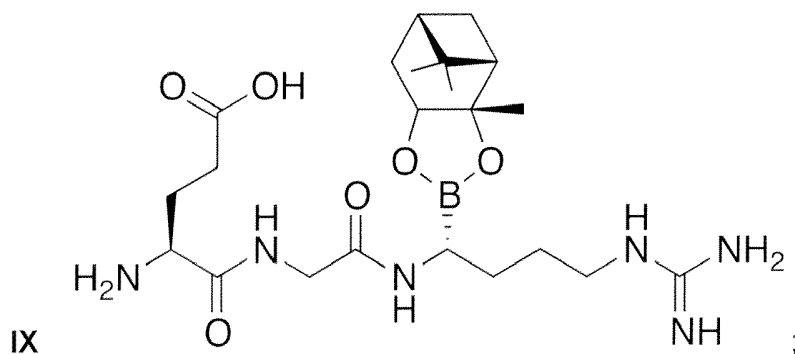
De acordo com outro aspeto, a presente invenção refere-se a um composto selecionado do grupo consistindo em:



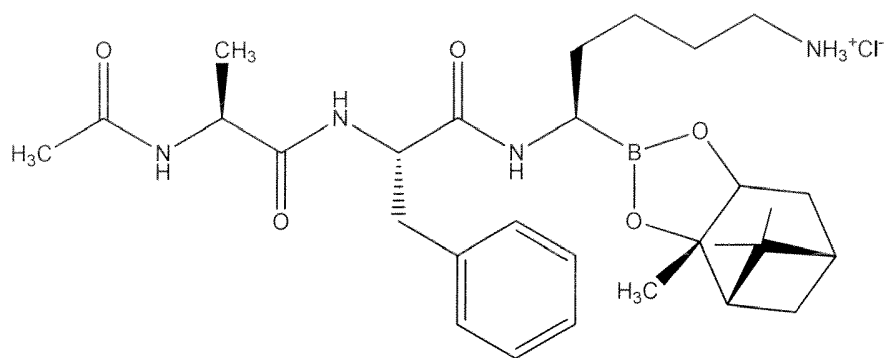
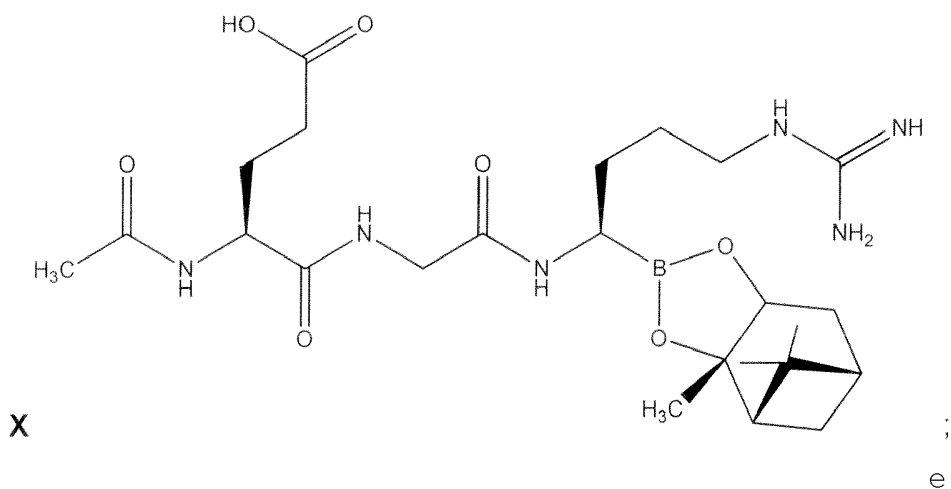
VII



VIII



IX



Os compostos de acordo com a presente invenção inibem a atividade enzimática de enteropeptidase. De um modo preferido, estes compostos inibem seletivamente a atividade enzimática da enteropeptidase em relação a outras proteases de serina. Em alguma forma de realização, os compostos são não absorvíveis.

Os compostos da invenção podem ser proporcionados na forma de base livre ou como um sal farmacêuticamente aceitável.

Noutro aspeto, a invenção também se refere a uma composição farmacêutica compreendendo, pelo menos, um composto como

descrito acima e, pelo menos, um veículo farmacêuticamente aceitável.

Noutro aspeto, a invenção refere-se a um composto de acordo com a presente invenção, ou uma composição compreendendo esse composto, para utilização no tratamento da obesidade num mamífero, de um modo preferido, um humano.

Noutro aspeto, a invenção refere-se a um composto de acordo com a presente invenção, ou uma composição compreendendo esse composto, para utilização no tratamento de excesso de peso num mamífero, de um modo preferido, um humano.

Noutro aspeto, a invenção refere-se a um composto de acordo com a presente invenção, ou uma composição compreendendo esse composto, para utilização no tratamento, num mamífero, de um modo preferido, um humano, de doenças associadas com o metabolismo anormal das gorduras, em que a referida doença do metabolismo das gorduras é, de um modo preferido, selecionada do grupo consistindo de doença da gota, diabetes tipo II, hiperglicemia, hiperinsulinemia, níveis sanguíneos elevados de ácidos gordos ou glicerol, síndrome X, complicações diabéticas, síndrome dismetabólica e doenças relacionadas, hipercolesterolemia, aterosclerose, hipertensão, pancreatite, hipertrigliceridemia, hiperlipidemia, acidente vascular cerebral, doenças coronárias, doenças vasculares periféricas, doenças arteriais periféricas, síndromes vasculares, distúrbios relacionados com colesterol e lipodistrofia induzida por fármacos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A **Fig 1** é um gráfico mostrando a atividade da enteropeptidase de acordo com concentrações crescentes do composto OBE 1999.

A **Fig 2** é um gráfico mostrando a atividade da enteropeptidase de acordo com concentrações crescentes do composto OBE 2000.

A **Fig 3** é um gráfico mostrando a atividade da enteropeptidase de acordo com concentrações crescentes do composto OBE 2001.

A **Fig 4** é um gráfico mostrando a atividade da enteropeptidase de acordo com concentrações crescentes do composto OBE 2002.

A **Fig 5** é uma Tabela mostrando a IC₅₀ (em nM) de enteropeptidase, diversas proteases de serina e outras famílias enzimáticas, na presença dos compostos OBE 1999, OBE 2000, OBE 2001 ou OBE 2002.

A **Fig 6** é as sequências nucleotídicas e proteicas da enteropeptidase humana (PRSS7). A primeira linha indica a sequência nucleotídica, agrupada por codões; a segunda linha indica a sequência de aminoácidos correspondendo aos codões acima com o código de três letras. O primeiro codão de tradução e o codão de terminação são mostrados em negrito. A numeração do ácido nucleico está na extremidade direita da primeira linha e a numeração dos aminoácidos está indicada sob o resíduo de aminoácido (terceira linha).

A **Fig. 7** representa exemplos de processos para sintetizar os compostos da invenção. (**A**): exemplo de um processo para a síntese da Acetil-Ala-Phe-BoroLisina (*pin: grupo pinandiol); (**B e Cv**): primeiro exemplo de um processo para a síntese da Acetil-Ala-Phe-BoroArginina; (**D**): segundo exemplo de um processo para a síntese da Acetil-Ala-Phe-BoroArginina; este segundo processo também possibilita a síntese da Acetil-Ala-Phe-BoroOrnitina (composto 8), dado que a Acetil-Ala-Phe-BoroOrnitina é um composto intermediário na síntese de Acetil-Ala-Phe-BoroArginina por este processo; (**E**): síntese do grupo Acetil-Ala-Phe-OH, a ser inserido no passo 10 do processo na Figura 7C ou no passo 7 do processo na Figura 7D.

A **Fig. 8** é um gráfico ilustrando o seguimento em dias do peso (em gramas) de murganhos tendo recebido água (transportador), em comparação com murganhos tendo recebido OBE2001 a uma concentração de 40 mg/kg/dia (**B**).

A **Fig. 9** é um gráfico ilustrando o seguimento em minutos dos triglicéridos presentes no plasma de murganhos tendo recebido água (solvente), uma dosagem de OBE2001 (OBE 25 mg/kg) ou duas dosagens de OBE2001 (OBE 25 +25 mg/kg).

A **Fig. 10** é um gráfico ilustrando o seguimento em horas de proteínas marcadas no plasma de murganhos tendo recebido água (solvente), uma dosagem de OBE2001 (OBE 5 mg/kg) ou duas dosagens de OBE2001 (OBE 50 mg/kg).

A **Fig. 11** é uma representação esquemática do processo utilizado para se obter um alelo nocaute (KO) de enteropeptidase constitutivo em murganhos, utilizando a deleção dos exões 23-28 do gene Prss7.

A **Fig. 12** é uma representação esquemática de um vetor compreendendo o alelo nocaute (KO) de enteropeptidase constitutivo, assim como a sequência nucleotídica de 17480 pb deste vetor.

A **Fig. 13** é o mapa de restrição de AfIII do alelo de enteropeptidase de tipo selvagem (acima) e o alelo de enteropeptidase (KO) nocaute (abaixo).

A **Fig. 14** é uma Transferência de Southern obtida com ADN genómico de células estaminais embrionárias (ES) transformadas com sucesso com o alelo KO de enteropeptidase (A-D2 e A-E8) e obtida com o ADN genómico de células não transformadas (WT).

A **Fig. 15** é uma transferência na qual foram corridos fragmentos de PCR, de uma amplificação simultânea com os iniciadores 1260_1 e 1260_2 e 1472_23 e 1472_24. O ADN genómico foi extraído de murganhos heterólogos (115695, 115702, 115706, 115707 e 115708) ou murganhos de tipo selvagem (115696 ou 115705). 585 pb (c): fragmento de controlo; 412 pb (conv): alelo KO.

A **Fig. 16** é uma transferência na qual foram corridos fragmentos de PCR, obtidos de uma amplificação simultânea com o iniciador 1472_23 e o iniciador PRRS7 WT e os iniciadores direto e inverso de beta actina. O ADN genómico foi extraído de murganhos heterólogos (115755 e 115648) ou crias KO homólogas (1A, 2A, 3A, 4A e 5A); 533 pb (c): WT alelo de enteropeptidase; 300 pb: alelo de controlo (actina).

A **Fig. 17** é uma fotografia mostrando um murganho homozigótico para o alelo nocaute de enteropeptidase (Ho) e um

murganho heterozigótico para o alelo nocaute de enteropeptidase (He), ambos de 7 dias de idade.

A **Fig. 18** é as sequências nucleotídicas e proteicas de tripsina humana.

DESCRIÇÃO DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS DA INVENÇÃO

A expressão "*sal farmaceuticamente aceitável*" significa um sal de ácido ou um sal básico que é adequado ou compatível com o tratamento do indivíduo.

Por "*inibição da atividade da enteropeptidase*", significa-se que é obtida uma diminuição de 50% da atividade *in vitro* da enteropeptidase, com uma concentração do composto da invenção que é inferior a 10 μ M, inferior a 1 μ M, inferior a 100 nM, inferior a 10 nM ou inferior a 1 nM, para 1 nM de enteropeptidase. A referida concentração pode ser determinada como descrito em detalhes no ponto 2.1. abaixo e, particularmente, utilizando Np Tosilo Gly Pro Arg pNa como um substrato.

A expressão "*inibição específica da protease de serina semelhante a tripsina*" refere-se à inibição de proteases da família das proteases de serina e, de um modo mais particular, a protease de serina apenas do subtipo semelhante a tripsina. Em contraste, a atividade de outras proteases, tais como peptidases de cisteína, peptidases de aspartato, metaloproteases, lipases e/ou glucosidases, não são alteradas pelo composto da invenção. Noutra forma de realização, em combinação com a anterior, a

atividade de proteases de serina semelhantes a quimotripsina não é alterada pelo composto da invenção.

A expressão "*inibição seletiva da enteropeptidase*" refere-se à inibição apenas da enteropeptidase (*in vivo*), enquanto que a atividade de outras proteases do mesmo subtipo (subtipo semelhante a tripsina) não é alterada pelos compostos da invenção. Esta distinção entre a especificidade e seletividade foi tornada possível pelo facto de que os compostos da invenção são não absorvíveis e, deste modo, a inibição está limitada à enteropeptidase cuja localização é intestinal.

A determinação da IC_{50} dos compostos da invenção na enteropeptidase ou noutra protease de serina pode ser testada *in vitro* como descrito nos exemplos abaixo.

O termo "*tratamento*", como aqui utilizado, refere-se não apenas à perda de peso do mamífero após a administração de, pelo menos, um composto ou da composição da invenção, mas também à manutenção do peso, de tal modo que não haja aumento de peso.

O termo "*mamífero*" abrange qualquer de diversos animais vertebrados de sangue quente da classe dos Mamíferos, incluindo humanos, caracterizados por uma cobertura de pêlos na pele e, na fêmea, glândulas mamárias produtoras de leite para alimentar o jovem.

"*Transportadores ou veículos farmacêuticamente aceitáveis*" abrange qualquer substância que possibilita a formulação dos compostos da invenção numa composição. Um transportador é qualquer substância ou combinação de substâncias fisiologicamente aceitáveis, *i. e.*, apropriadas para a sua

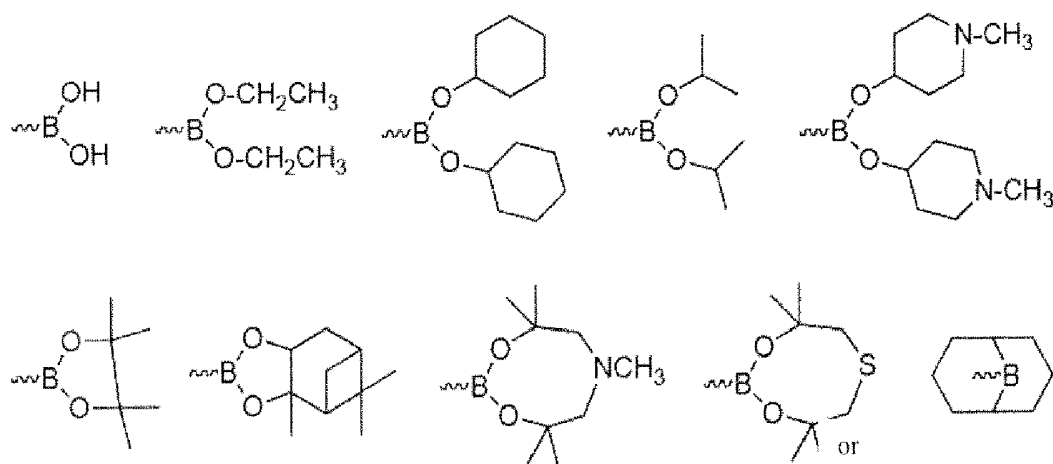
utilização numa composição em contacto com um mamífero e, assim, não tóxicas. São exemplos desses transportadores soluções salinas tamponadas com fosfatos, água destilada, emulsões, tais como emulsões óleo/água, e diversos tipos de soluções estéreis de agentes molhantes.

"Obesidade" é, em geral, definida em humano por, pelo menos, 20% acima do peso médio para a idade, sexo e altura da pessoa. A obesidade é definida por um índice de massa corporal ($IMC = kg/m^2$) acima de 30. A obesidade também pode ser definida por circunferência absoluta da cintura (>102 cm nos homens e >88 cm nas mulheres) ou razão Cintura/anca (WHR) (WHR mais de 0,7 para mulheres e mais de 0,9 para homens). "Peso excessivo" é definido por um IMC que está compreendido entre 25 e 29,9.

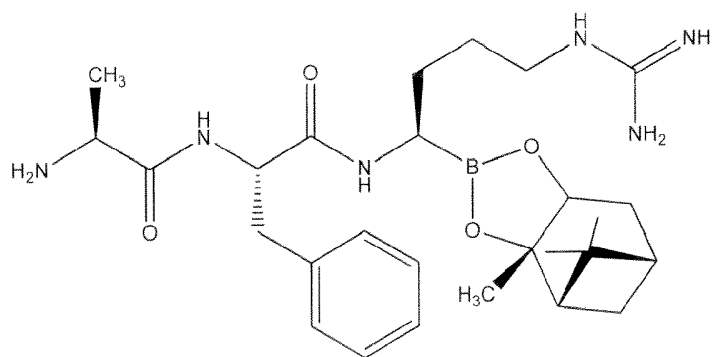
De um modo mais específico, numa primeira forma de realização, a presente invenção refere-se a compostos tendo uma atividade inibidora na atividade enzimática da enteropeptidase. Noutro aspeto, são proporcionados compostos que têm uma atividade inibitória seletiva na atividade enzimática da enteropeptidase.

Os compostos da invenção são selecionados do grupo consistindo em Glu-Gly-Boro-Arg, Ala-Phe-Boro-Arg, Ac-Glu-Gly-Boro-Arg e Ac-Ala-Phe-Boro-Arg, em que Ac é acetilo.

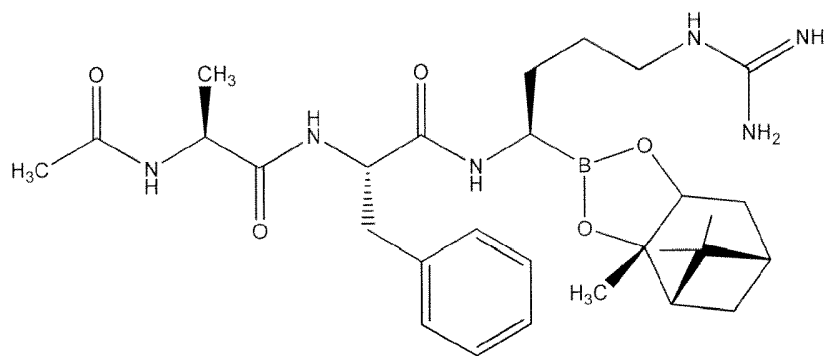
Em algumas formas de realização, a unidade de boroarginina (Boro-Arg) compreende um grupo de fórmula:



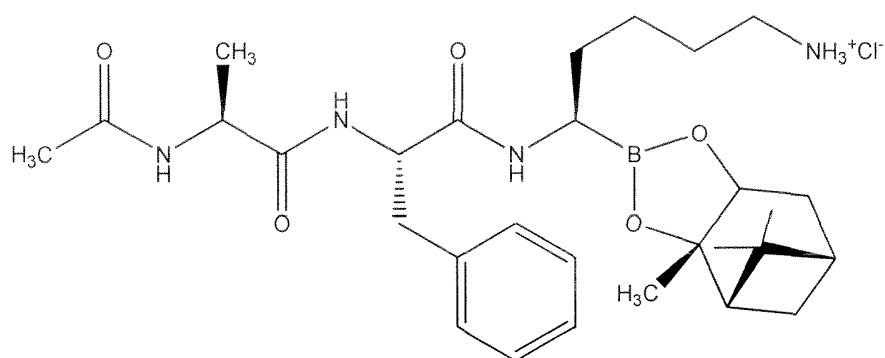
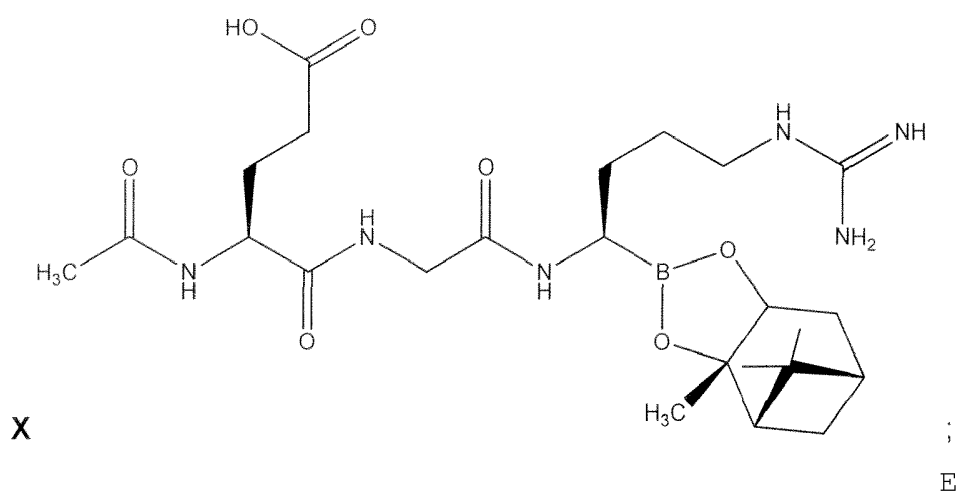
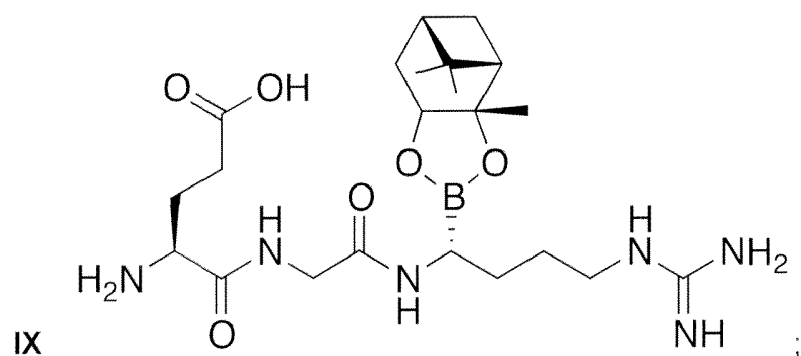
De acordo com outro aspeto, a presente invenção refere-se a um composto selecionado do grupo consistindo de:



VII



VIII



Todos os compostos da invenção divulgados no presente pedido, estão sob uma forma de base livre ou são os seus sais farmacologicamente aceitáveis.

Os compostos da invenção não são, pelo menos, um dos seguintes:

- Ac-(D,L)Phe-boroArg-C₁₀H₁₆.BSA (ácido benzenossulfônico),
 Ac-Phe-boroOrn-C₁₀H₁₆.BSA, Ac-Phe boroArg-C₁₀H₁₆.HCl,
 H-(D)Phe-Pro-borolrg-C₁₀H₁₆.HBr.HCl, Boc-(D)Phe-Pro-
 borolrg-C₁₀H₁₆. HBr, Ac-Phe-borolrg-C₁₀H₁₆.HBr,
 Ac-Ala-Lys(Boc)-boroOrn-C₁₀H₁₆.BSA, Ac-Ala-Lys(Boc)-
 borolrg-C₁₀H₁₆.HBr, Boc-(D)Phe-Pro-boroArg-C₁₀H₁₆.BSA,
 Boc-(D)Phe-Phe-Borolrg-C₁₀H₁₆.HBr, H-(D)Phe-Pro-boroArg-
 C₁₀H₁₆.HCl, Boc-(D)Phe-Phe-boroOrn-C₁₀H₁₆. BSA, Boc-(D)Phe-
 Phe-boroArg-C₁₀H₁₆.BSA, Ac-Ala-Lys(Boc)-boroArg-C₁₀H₁₆.BSA,
 Ac-(D)Phe-Pro-boroArg-C₁₀H₁₆.HCl, Ac-(D)Phe-Pro-boroArg-
 OH.HCl, Boc-Leu-Gly-Leu-Ala-borolrg-C₁₀H₁₆.HBr, Boc-Leu-
 Gly-Leu-Ala-boroOrn-C₁₀H₁₆.BSA, Boc-Leu-Gly-Leu-Ala-
 boroArg-C₁₀H₁₆.BSA, Bz-Pro-Phe-boroOrn-C₁₀H₁₆.BSA, Bz-Pro-
 Phe-boroArg-C₁₀H₁₆. BSA, Boc-Ala-Phe-(D,L)borolrg-
 C₁₀H₁₂.HBr, Bz-Glu(OBu)-Gly-borolrg-C₁₀H₁₆.HBr, Bz-Glu-Gly-
 boroArg-C₁₀H₁₆.BSA, Bz-Glu(OBu)-Gly-boroOrg-C₁₀H₁₆.BSA,
 Bz-Glu(OBu)-Gly-boroArg-C₁₀H₁₆.BSA, Bz-Pro-Phe-borolrg-
 C₁₀H₁₆.HBr, Z-Phe-Gly-Gly-borolrg-C₁₀H₁₆.HBr, Boc-Ala-Phe-
 (D,L)borohomolrg-C₁₀H₁₂.HBr, Bz-Pro-Phe-boroArg-OH.HCl,
 Bz-Pro-Phe-boroArg-F, H-(D)Phe-Pro-boroArg-C₁₀H₁₆.2HCl,
 H-(D)Phe-Phe-boroArg-C₁₀H₁₆.2HCl, Ac-Ala-Lys-boroArg-
 C₁₀H₁₆.2HCl, H-Leu-Gly-Leu-Ala-boroArg-C₁₀H₁₆.HCl.BSA,
 Boc-Ala-Phe-(D,L)boroLys-C₁₀H₁₂.HCl, H-Ala-Phe-
 (D,L)boroLys-C₁₀H₁₂.2HCl, Boc-(D)Val-Leu-boroLys-C₁₀H₁₂.HCl,
 Ac-Phe-boroLys-C₁₀H₁₂.HCl, Bz-Glu-Gly-boroArg-C₁₀H₁₆.BSA,
 H-(D)Phe-Phe-borolrg-C₁₀H₁₆.2HBr, H-Leu-Gly-Leu-Ala-
 borolrg-C₁₀H₁₆.2HBr, H-Ala-Phe-(D,L)borolrg-C₁₀H₁₂.2HBr,
 Bz-Glu-Gly-borolrg-C₁₀H₁₆.HBr, H-Ala-Phe-(D,L)boroHomolrg-

- $C_{10}H_{12}.2HBr$, $Ac-Ala-Lys-borolrg-C_{10}H_{16}.2HBr$, $Bz-borolrg-C_{10}H_{12}.HBr$, $Bz-boroOrn-C_{10}H_{12}.BSA$, $Bz-boroArg-C_{10}H_{12}.BSA$,
 $Ac-Leu-Thr(OBu)-boroOrn-C_{10}H_{16}.BSA$, $Ac-Leu-Thr(OBu)boroArg-C_{10}H_{16}.BSA$, $Ac-Leu-Thr-boroArg-C_{10}H_{16}.BSA$,
 $Ac-Lys(Boc)-Pro-boroOrn-C_{10}H_{16}.BSA$, $Ac-Lys(Boc)-Pro-boroArg-C_{10}H_{16}.BSA$, $Ac-Lys-Pro-boroArg-C_{10}H_{16}.BSA$, $Ac-Ala-Glu(OBu)-boroOrn-C_{10}H_{16}.BSA$,
 $Ac-Ala-Glu(OBu)-boroArg-C_{10}H_{16}.BSA$, $Ac-Ala-Glu-boroArg-C_{10}H_{16}.BSA$, $Boc-Val-Val-boroLys-C_{10}H_{12}.BSA$,
 $H-Val-Val-boroLys-C_{10}H_{12}.BSA.TFA$, $Boc-(D)Phe-Phe-boroLys-C_{10}H_{12}.BSA$, $H-(D)Phe-Phe-boroLys-C_{10}H_{12}.BSA.TFA$, $Boc-Glu-Phe-boroLys-C_{10}H_{12}.BSA$ e $PyroGlu-Phe-boroLys-C_{10}H_{12}.BSA$,
 divulgados no documento US 5187157;
- $Ac-boroArg-OH.HCl$, divulgado em Lebarbier *et al.*; (1998) *Biorganic and Medicinal Chemistry letters* 8: 2573-2576;
 - $Ac-(D)-Phe-Pro-boroArg-OH$, divulgado em Quan *et al.*; (1997) *Biorganic and Medicinal Chemistry letters* 7(13): 1595-1600;
 - $Ac-Ala-Lys-boroArg-OH_2$, divulgado em Holyoak *et al.* (2003); *Biochemistry* 42: 6709-6718.
 - $Pro-Phe-BoroArg-OH$, divulgado em Stadnicki *et al.* (1998); *The FASEB Journal* 12: 325-333.
 - $Bz-Nle-Lys-Lys-boroArg-OH_2$, divulgado em Yien *et al.* (2006); *Biorganic and Medicinal Chemistry letters* 16: 36-39.
 - $H-Phe-Pro-BoroArg$, divulgado em Kettner *et al.* (1990); *The Journal of Biological Chemistry* 265(30): 18289-18297.
 - $Ac-Arg-Glu-Lys-boroArg$ pinanediol, divulgado em Komiyama *et al.* (2005); *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(9): 3875-3882.

- (BOC)-Ala-Val-Lys-boronato, divulgado em Katz et al. (1995); *Biochemistry* 34: 8264-8280.

As moléculas da invenção são sintetizadas, utilizando processos bem conhecidos. Como um exemplo, a Figura 7 divulga diversos processos para sintetizar qualquer composto da presente invenção. Os exemplos divulgados referem-se à síntese de um tripéptido de borolisina (7A), um tripéptido de boroarginina e um tripéptido de boroornitina (7B a 7E). Estes exemplos podem ser facilmente aplicados para sintetizar outros compostos aqui divulgados. Especialmente, o indivíduo especialista na técnica pode substituir a natureza e número de resíduos de aminoácidos para ligação à unidade de boroarginina, borolisina ou boroornitina.

Além da sua característica estrutural, os compostos da invenção têm a capacidade de inibir especificamente a atividade de proteases de serina e, especialmente, a atividade de proteases de serina do subtipo semelhante a tripsina. Noutra forma de realização, os compostos da invenção e, especialmente, os tri ou tetraboropéptidos têm a capacidade de inibir seletivamente a atividade de enteropeptidase, especialmente enteropeptidases de mamífero e, mais especialmente, enteropeptidase humana. A sequência da enteropeptidase humana é divulgada na Figura 6.

É ainda proporcionada uma composição compreendendo um ou mais de um composto da invenção, especialmente 2, 3 ou 4 compostos.

Essa composição pode tomar a forma de uma composição farmacêutica, a qual pode ser formulada utilizando veículos

farmaceuticamente aceitáveis bem conhecidos na técnica, em dosagens adequadas.

Numa forma de realização particular, a composição compreende ainda um excipiente ou veículo e/ou transportador farmaceuticamente adequado, quando utilizada para administração entérica ou oral.

Esses veículos permitem que as composições farmacêuticas sejam formuladas como comprimidos, pílulas, drageias, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, pastas fluidas e suspensões.

As preparações farmacológicas para utilização oral podem ser preparadas utilizando um excipiente sólido, opcionalmente triturando a mistura resultante e processando a mistura de grânulos, após a adição de auxiliares adequados, se desejado, para se obter comprimidos ou núcleos de drageias. São excipientes adequados, em particular, espessantes, tais como açúcares, incluindo lactose, sacarose, manitol ou sorbitol; preparações de celulose, tais como, por exemplo, milho, trigo, arroz ou amido de batata, gelatina, goma tragacanta, metilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, carboximetilcelulose sódica; e/ou polímeros fisiologicamente aceitáveis, tal como polivinilpirrolidona (PVP). Se desejado, podem ser adicionados agentes desintegrantes, tais como polivinilpirrolidona reticulada, ágar ou ácido algínico ou um seu sal, tal como alginato de sódio.

Os núcleos de drageia são proporcionados com revestimentos adequados. Para este fim, podem ser utilizadas soluções concentradas de açúcar, as quais podem, opcionalmente, conter goma-arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol,

polietilenoglicol, dióxido de titânio, soluções de laca e solventes orgânicos ou misturas de solventes adequados. Podem ser adicionados corantes ou pigmentos aos revestimentos de comprimidos ou drageias, para identificação ou para caracterizar diferentes combinações de doses de composto ativo.

As composições farmacêuticas, as quais podem ser utilizadas oralmente, incluem cápsulas de ajustamento deslizante, feitas de gelatina, assim como cápsulas moles, vedadas, feitas de gelatina e um plastificante, tal como glicerol ou sorbitol. As cápsulas de ajustamento deslizante podem conter os ingredientes ativos em mistura íntima com espessante, tais como lactose, aglutinantes, tal como amidos, lubrificantes, tais como talco ou estearato de magnésio e, opcionalmente, estabilizantes. Nas cápsulas moles, os ingredientes ativos podem ser dissolvidos ou suspensos em líquidos adequados, tais como óleos gordos, parafina líquida ou polietilenoglicóis líquidos. Além disso, podem ser adicionados estabilizantes. Todas as formulações para administração oral devem ser em dosagens adequadas para a via administração escolhida.

Para administração bucal, as composições podem tomar a forma de comprimidos ou pastilhas, formulados de modo convencional.

Além dos ingredientes ativos, estas composições farmacêuticas também podem conter veículos farmacêuticamente aceitáveis adequados, compreendendo excipientes e auxiliares, os quais facilitam o processamento dos compostos ativos em preparações, as quais podem ser utilizadas farmacêuticamente. Detalhes adicionais sobre técnicas para formulação e administração podem ser consultados na última edição do

Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, Pa.).

Os compostos da presente invenção podem ser administrados em combinação com, pelo menos, um outro fármaco, para alcançar efeitos melhorados, por exemplo, com outros fármacos visando enzimas diferentes da enteropeptidase. Como um exemplo, os compostos da invenção podem ser combinados com fármaco(s) capaz(es) de inibir(em) a adsorção ou o metabolismo dos triglicéridos.

A presente invenção refere-se à utilização de qualquer composto, como definido acima, para o tratamento de obesidade, excesso de peso e doenças associadas com um metabolismo anormal das gorduras. Deste modo, os compostos da invenção podem ser utilizados no tratamento de obesidade, excesso de peso e/ou doenças associadas com um metabolismo anormal da gordura, assim como para o fabrico de um fármaco para tratar a obesidade, excesso de peso e/ou doenças associadas com um metabolismo anormal da gordura.

É proporcionado um método para tratar um mamífero tendo obesidade, tendo excesso de peso e/ou sofrendo de doenças associadas com um metabolismo anormal da gordura, compreendendo administrar, pelo menos, um composto ou uma composição da invenção a um mamífero que dele necessita.

Qualquer composto da invenção pode ser utilizado para diminuir a absorção *in vivo* de proteínas. Noutra forma de realização, qualquer composto da invenção pode ser utilizado para diminuir a absorção *in vivo* de triglicéridos. Numa forma de realização adicional, qualquer composto da invenção pode ser

utilizado para diminuir a absorção *in vivo* de proteínas e a absorção *in vivo* de triglicéridos.

Num aspeto adicional, independentemente ou em combinação com a utilização dos compostos da invenção na diminuição da absorção, qualquer composto da invenção pode ser utilizado para diminuir a ingestão de alimento, *i. e.*, para diminuir o apetite (bloqueador do apetite).

O composto ou a composição da invenção pode ser utilizado em dosagem variando desde 10 mg a 10 g por dia ou desde 100 mg a 1 g por dia, uma ou várias vezes diariamente. A quantidade de composto(s) ou da composição da presente invenção pode ser administrada em dosagens de acordo com a gravidade da obesidade, a quantidade de excesso de peso, a idade do mamífero e/ou a saúde geral do mamífero.

Os compostos ou composições da invenção são adequados para o tratamento de diversas formas de obesidade e, em particular, obesidade resultante de causas ambientais (ingestão excessiva de nutrientes e/ou um estilo de vida sedentário), resultante de alterações genéticas (tal como o gene FTO), resultante de enfermidade médica (tais como hipotireoidismo, síndrome de Cushing, deficiência de hormona do crescimento), resultante de cessação tabágica, resultante de medicações (tais como esteroides, antipsicóticos atípicos ou alguma medicação para fertilidade) e resultante de distúrbios neurológicos.

Também está contemplado o tratamento através de, pelo menos, um dos compostos ou pelas composições da invenção de doenças associadas com um metabolismo anormal das gorduras. Essas doenças são as seguintes: doença da gota (artrite

metabólica), diabetes tipo II, hiperglicemia, hiperinsulinemia, níveis sanguíneos elevados de ácidos gordos ou glicerol, síndrome X, complicações diabéticas, síndrome dismetabólica e doenças relacionadas, hipercolesterolemia, aterosclerose, hipertensão, pancreatite, hipertrigliceridemia, hiperlipidemia, acidente vascular cerebral, doenças coronárias, doenças vasculares periféricas, doenças arteriais periféricas, síndromes vasculares, distúrbios relacionados com colesterol (e. g., padrão B de LDL e padrão L de LDL) e lipodistrofia induzida por fármacos.

É ainda proporcionado um modelo animal, no qual o gene da enteropeptidase foi inativado. Este modelo abrange um modelo de mamífero (não humano) ou um modelo murino (tal como um murganho). Por "*inativado*", pretende-se significar que o gene da enteropeptidase incorporado neste modelo codifica uma proteína tendo menos de 50% de atividade de enteropeptidase, em comparação com a enteropeptidase de tipo selvagem. Numa forma de realização, a enteropeptidase inativa tem menos de 40% de atividade de enteropeptidase, em comparação com a enteropeptidase de tipo selvagem. Noutra forma de realização, a enteropeptidase do modelo animal tem menos de 30% de atividade de enteropeptidase, em comparação com a enteropeptidase de tipo selvagem. Ainda noutra forma de realização, a enteropeptidase do modelo animal tem menos de 20% ou menos de 10% de atividade de enteropeptidase, em comparação com a de enteropeptidase tipo selvagem. Ainda noutra forma de realização, a enteropeptidase inativada não tem qualquer atividade de peptidase. Noutro aspeto, a percentagem de atividade de enteropeptidase é definida de acordo com a conversão de tripsinogénio em tripsina.

O modelo animal tendo um gene de enteropeptidase inativado pode ser obtido por quaisquer técnicas convencionais conhecidas do indivíduo especialista na técnica, para se obter um modelo animal nocaute (KO), tal como por inserção de uma ou mais substituições afetando a atividade de peptidase da enteropeptidase ou por deleção de um ou vários exões do gene da enteropeptidase. Quando o modelo animal é um roedor, tal como um murganho, as mutações podem ser, por exemplo, uma deleção dos exões 23-28 do gene *prss7*, i. e., o homólogo murino da enteropeptidase humana.

É ainda proporcionada a utilização deste modelo animal no desenvolvimento de fármacos, por exemplo, na triagem de fármacos ou moléculas tendo efeitos no peso. Deste modo, o modelo pode ser utilizado num processo para determinar o efeito de um fármaco ou uma molécula no peso, compreendendo (a) administrar um fármaco ao modelo e (b) medir o peso do animal. O efeito do fármaco é determinado por comparação do peso do animal administrado com o referido fármaco com animais de controlo (os quais são administrados com moléculas conhecidas ou com um placebo).

A expressão "*efeito no peso*" significa que o fármaco ou molécula é capaz de aumentar o peso do modelo animal em comparação com um placebo ou, pelo contrário, com a diminuição do peso do modelo animal em comparação com um placebo. O efeito da molécula pode ser observado sob um regime calórico baixo, normal ou elevado.

A administração do fármaco ou da molécula ao modelo animal pode ser efetuada oralmente, intravenosamente,

intraperitonealmente, intramuscularmente, intra-arterialmente ou por sistemas de liberação prolongada.

EXEMPLOS

A. EXPERIÊNCIAS *IN VITRO*

1. MATERIAIS

1.1. *Tampão:*

- **TN:** Tris a 50 mM, pH =7,5, NaCl a 150 mM (Tris: Euromedex Ref 26-128-3097; NaCl: Euromedex Ref 1112);
- **TCN:** Tris a 50 mM, pH =7,5, NaCl a 150 mM, CaCl₂ a 10 mM;
- **TCNB:** Tris a 50 mM, pH =7,5, NaCl a 150 mM, CaCl₂ a 10 mM, 0,05% de Brij 35 (Brij: sigma Ref B4184);
- Tris a 25 mM, pH 8;
- **Tampão de Lipase pancreática:** Tris a 25 mM, pH 9,2 - CaCl₂ a 0,1 mM - sódio a 20 mM;
- Desoxicolato;
- Termolisina (Sigma, ref T7902);
- Sal dissódico de fosforamidon (Sigma, ref R7385);
- Ácido Acético (Sigma ref A0808)

1.2. *Placas*

- Microplaca 384 de pequeno volume, clara (Greiner, ref 784101)
- Microplaca 384 de fundo plano preta (Corning, ref 3573)

- Placa 96 preta Nunc (VWR, ref 13634.01)
- Placa 96 - 1/2 área (Corning, Ref 3695)
- Microplaca Unifilter 96 poços de 800 µL (Whatman, Ref 7700-1804)

1.3. Compostos

A Tabela I abaixo lista quatro compostos da invenção (triboropéptidos) e seus nomes.

Tabela I

Nome	Composto/Composição	Proteção
Obe 1999	Ala-Phe-BoroArg DMSO a 10 mM	Não
Obe 2000	Glu-Gly-BoroArg DMSO a 10 mM	Não
Obe 2001	Acetil-Ala-Phe-BoroArg DMSO a 10 mM	Sim (Acetilo na primeira Ala)
Obe 2002	Acetil-Glu-Gly-BoroArg DMSO a 10 mM	Sim (Acetilo do primeiro Glu)

1.4. Enzimas:

A Tabela II abaixo lista as enzimas testadas para inibição pelos compostos da invenção, assim como os fornecedores e as referências comerciais associadas.

Tabela II

Enzima	Fornecedor, referência
Enteropeptidase humana recombinante	RD system, ref. 1585SE
Tripsina de pâncreas humano	SIGMA, ref. T6424
Trombina de plasma humano	SIGMA, ref. T1063
Calicreína de plasma humano	SIGMA, ref. K2638
Plasmina de plasma humano	SIGMA, ref. P1867
Elastase	Calbiochem, ref. 324682
Quimotripsina	Sigma, ref. C8946
DPPIV (Dipeptidil peptidase IV)	RD System, ref. 1180-SE
Carboxipeptidase A1 humana recombinante	RD System, ref. 2856-ZN
Carboxipeptidase B1 humana recombinante	RD System, ref. 2897-ZN
Alfa Amilase de pâncreas humano	Sigma, ref. A9972
Lipase	Sigma, ref. L0382

1.5. Substratos:

A Tabela III abaixo lista os substratos utilizados para testar a inibição das enzimas acima pelos compostos da invenção, assim como os fornecedores e as referências comerciais associadas.

Tabela III

Substrato	Fornecedor, referência	Enzima correspondente
N-p-Tosilo-Gly-Pro-Arg-pNa	SIGMA, ref T1637	Enteropeptidase, Tripsina e Trombina
H-D-Pro-Phe-Arg-pNa	Chromogenix, ref. S-2302	Calicreína
D-Ile-Phe-Lys-pNa	SIGMA, ref I6886	Plasmina
N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe- pNA	Sigma, ref S7388	Quimotripsina
Suc-Ala-Ala-Pro-Abu-pNA	Calbiochem, ref. 324699	Elastase
Ala-Pro-7-amido-4- trifluorometilcumarina	Calbiochem, ref. 125510	DPPIV
Sal de potássio de N-(4- Metoxifenilazoformil)-Phe- OH	Bachem, ref. M2245	Carboxipeptidase A1
N-(4 - Metoxifenilazoformil)-Arg- OH HCl	Bachem, ref. M2525	Carboxipeptidase B1
6,8-difluoro- metilumbeliferil octanoato (DIFMu)	InVitrogen, ref. D12200	Lipase
Amido Azur	Sigma, ref. S7629	Alfa Amilase

2. Protocolos

2.1. Ensaio de enteropeptidase

- Ativação da enteropeptidase

Foi preparada uma mistura de enteropeptidase a 58,8 nM (final) e termolisina a 1,58 ng/L (final), em tampão de TCN; a mistura foi incubada a 37 °C, durante 30 minutos, para ativação. Foi adicionado fosforamidon (10 µM final) para parar a ativação pela termolisina.

- Medição da atividade de enteropeptidase sem inibidor (controle positivo)

Em 17 µL de TCN, foram misturados 1 µL de enzima ativa (2,9 nm final) e 2 µL de Np Tosilo Gly Pro Arg pNa (1 mM final), imediatamente antes da leitura. A Absorvência foi medida a 405 nm em EnVision (Perkin Elmer).

- Inibição em placa de 384 poços de pequeno volume (20 µL final)

Em 15 µL de TCN, 1 µL de enzima ativa e 2 µL de Inibidor (composto da invenção), a diferentes concentrações, foram misturados e incubados, à T.A. (temperatura ambiente), durante 30 minutos; imediatamente antes da leitura, foram adicionados 2 µL de Np Tosilo Gly Pro Arg pNa (1 mM final). A Absorvência foi medida a 405 nm em EnVision (Perkin Elmer).

2.2. Ensaio de Trombina, Tripsina, Calicreína, Plasmina, Quimotripsina e Elastase

A Tabela IV abaixo lista as concentrações finais das enzimas testadas e os substratos correspondentes, na determinação da IC_{50} sem inibidor (controle positivo) e em protocolos de inibição:

Tabela IV

Enzima	Substrato
Tripsina a 10 nM	N-p-Tosilo-Gly-Pro-Arg-pNa a 1 mM
Trombina a 10 nM	N-p-Tosilo-Gly-Pro-Arg-pNa a 0,75 mM
Plasmina a 50 nM	D-Ile-Phe-Lys-pNa a 1 mM
Calicreína a 10 nM	H-D-Pro-Phe-Arg-pNa a 1 mM
Quimotripsina a 50 nM	N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA a 0,5 mM
Elastase a 25 nM	Suc-Ala-Ala-Pro-Abu-pNA a 0,5 mM

- Medição sem inibidor (controle positivo)

Em 17 μ L de TN, foram misturados 1 μ L de enzima e 2 μ L de substrato, imediatamente antes da leitura; A Absorvência foi medida a 405 nm em EnVision (Perkin Elmer).

- Inibição em placa de 384 poços de pequeno volume (20 µL final)

Em 15 µL de TN, foram misturados 1 µL de enzima e 2 µL de Inibidor (composto da invenção) a diferentes concentrações e incubados, à T.A., durante 30 minutos; foram adicionados 2 µL de substrato, imediatamente antes da leitura; A Absorvência foi medida a 405 nm em EnVision (Perkin Elmer).

2.3 Ensaio de Carboxipeptidase A1 e B1

- Ativação de Carboxipeptidase A1

Em 20 µL de TCNB, foram misturados Carboxipeptidase A1 (100 µg/mL final) e tripsina (1 µg/mL final) e incubados, à T.A., durante 2 horas.

- Ativação de Carboxipeptidase B1

Em 20 µL de TCNB, foram misturados Carboxipeptidase B1 (100 µg/mL final) e tripsina (1 µg/mL final) e incubados, à T.A., durante 1 hora.

A Tabela V abaixo lista as concentrações finais das enzimas testadas e o substrato correspondente, na determinação da IC₅₀ sem inibidor (controle positivo) e em protocolos de inibição:

Tabela V

Enzima	Substrato
Carboxipeptidase A1, 20 nM	Sal de potássio de N-(4-Metoxifenilazoformil)-Phe-OH, 100 µM
Carboxipeptidase B1, 20 nM	N-(4-Metoxifenilazoformil)-Arg-OH, HCl a 100 µM

- Medição sem inibidor (controle positivo)

Em 17 µL de TN, foram misturados 1 µL de enzima ativada e 2 µL de substrato, imediatamente antes da leitura; A Absorvência foi medida a 355 nm em EnVision (Perkin Elmer).

- Inibição em placa de 384 poços de pequeno volume (20 µL final)

Em 15 µL de TN, foram misturados 1 µL de enzima ativada e 2 µL de Inibidor (compostos da invenção) a diferentes concentrações e incubados, à T.A., durante 30 minutos; foram adicionados 2 µL de substrato, imediatamente antes da leitura; A Absorvência foi medida a 355 nm em EnVision (Perkin Elmer).

2.4. Ensaio de DPPIV

- Medição sem inibidor (controle positivo)

Em 17 μL de Tris a 25 mM, pH 8, foram misturados 1 μL de enzima (1 nM final) e 2 μL de substrato (Ala-Pro-7-amido-4-trifluorometilcumarina, a 100 μM final), imediatamente antes da leitura. A Absorvência foi medida em EnVision (Perkin Elmer) (Excitação a 400 nm/Emissão a 505 nm).

- Inibição em placa de 384 poços preta (20 μL final)

Em 15 μL de Tris a 25 mM, pH 8, foram misturados 1 μL de enzima (1 nM final) e 2 μL de Inibidor (compostos da invenção) a diferentes concentrações e incubados, à T.A., durante 30 minutos. Imediatamente antes da leitura, foram adicionados 2 μL de substrato (Ala-Pro-7-amido-4-trifluorometilcumarina, a 100 μM final). A Absorvência foi medida em EnVision (Perkin Elmer) (Excitação a 400 nm/Emissão a 505 nm).

2.5. Ensaio de Amilase pancreática

- Medição sem inibidor (controle positivo)

Em 50 μL , foram misturados 5 μL de Amilase (a uma concentração de partida de 0,25 mg/mL) e 45 μL de Amido Azur (a uma concentração de partida de 2% em NaH_2PO_4 a 20 mM/ NaCl a 50 mM, pH 7) e incubados 1 h, a 37 °C, com agitação. Foram adicionados 20 μL de Solução de Ácido Acético (concentração de

partida de 2,75 M) e a suspensão filtrada. A absorvência foi medida em microplaca Unifilter de 96 poços, Whatman, a 595 nm.

- Inibição em placa de 96 poços preta

Em 35,5 µL de tampão ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaCl}$ a 50 mM, pH 7 - 37 °C) foram misturados 5 µL de amilase (0,25 mg/mL) e 5 µL de Inibidor (compostos da invenção) a diferentes concentrações e incubados, 30 minutos, à T.A. Foram adicionados 4,5 µL de substrato (Amido Azur a 20% em tampão) e incubados, 1 hora, a 37 °C, sob agitação. Depois, foram adicionados 20 µL de Solução de Ácido Acético (2,75 M) e a suspensão foi filtrada numa microplaca Unifilter de 96 poços, Whatman. A absorvência foi lida a 595 nm em EnVision (PerkinElmer).

2.6. Ensaio de Lipase

- Medição sem inibidor (controlo positivo)

Em 85 µL de tampão de lipase, foram misturados 5 µL de lipase (56 U/mL final) e 10 µL de substrato (DiFMu a 10 µM final), imediatamente antes da leitura. A fluorescência foi medida em EnVision (Perkin Elmer) (Excitação a 358 nm/Emissão a 452 nm).

- Inibição em placa de 96 poços preta (20 µL final)

Em 80 µL de tampão de lipase, foram misturados 5 µL de lipase (56 U/mL final) e 5 µL de Inibidor (compostos da

invenção) a diferentes concentrações e incubados, à T.A., durante 30 minutos. Adicionar 10 µL de substrato (DiFMu a 10 µM final) imediatamente antes da leitura. A Absorvência foi medida em EnVision (Perkin Elmer) (Excitação a 358 nm/Emissão a 452 nm).

3. Resultados

Como mostrado nas Figuras 1 a 4, os 4 compostos (OBE1999 a OBE2000), pertencendo à família dos boropéptidos, são particularmente eficientes *in vitro* contra a enteropeptidase e inibem a atividade da enteropeptidase, com uma elevada constante de inibição IC₅₀, a uma gama nanomolar, de 7 a 63 nM. Além disso, estes quatro compostos são específicos de proteases de serina, subtipo semelhante a tripsina, e, pelo contrário, não inibem proteases de serina semelhantes a quimotripsina, metaloproteases ou glucosidases (Figura 5).

De um modo mais específico, o OBE1999 é um inibidor muito bom de enteropeptidase (IC₅₀ de 33 nM). Contudo, também inibe com uma boa IC₅₀ (7,5 a 29,8 nM) outras enzimas, tais como tripsina, calicreína e plasmina. Dado que a enteropeptidase está especificamente localizada no intestino lumenal e este composto é não absorvível, este composto é uma excelente molécula para inibir seletivamente a enteropeptidase e não é, assim, esperado que iniba *in vivo* outra protease de serina (cuja localização é não intestinal). No que toca ao OBE2001, este composto partilha o mesmo perfil que o de OBE 1999 e, deste modo, preenche os mesmos critérios de especificidade e seletividade.

O OBE2000 é mais específico para enteropeptidase e tripsina do que os compostos OBE1999 e OBE2001, com baixo valor de IC50 para enteropeptidase e elevado valor de IC50 não apenas para trombina mas também para plasmina (7100 nM) e calicreína (260 nM). O OBE2002 apresenta o mesmo perfil que o OBE2000, exceto para o baixo valor de IC50 contra calicreína e plasmina, em comparação com OBE2000.

Consequentemente, estes resultados também mostram claramente que todos os compostos testados têm uma notável eficiência na inibição *in vitro* de enteropeptidase e podem ser considerados como moléculas promissoras para experiências *in vivo* futuras em animais e/ou em humanos. Mostrou-se que estes compostos preenchem, pelo menos, dois requisitos necessários para tratamento: a especificidade de inibição para proteases de serina do subtipo semelhante a tripsina e a seletividade da inibição para a enteropeptidase.

B. EXPERIÊNCIAS IN VIVO

1. Efeito de OBE2001 no peso

O objetivo desta primeira experiência *in vivo* é determinar o efeito anti-obesidade de OBE2001, num modelo de obesidade induzido por uma dieta hiperlipídica em murganhos.

O OBE2001 (Acetil-Ala-Phe-BoroArg) foi proporcionado sob a forma de sal (peso molecular de 568,3 g/mol). Murganhos Swiss macho, 4 semanas de idade, foram divididos em 2 grupos de 10 animais cada, recebendo o seguinte:

Número de grupo	Dieta	Dosagem
1	Elevado teor de gordura, <i>ad libitum</i>	Transportador (água)
2	Elevado teor de gordura, <i>ad libitum</i>	OBE2001 (40 mg/kg/dia)

A administração de OBE2001 foi realizada como uma solução em água. OBE2001 ou transportador (água utilizada como controle negativo) foram administrados aos animais diariamente pela via oral, numa administração de 5 mL/kg de peso corporal.

Quanto à alimentação dos animais, antes das experiências (período de aclimação), a dieta normal (referência No. 824050, alimento SDSIDIETEX) estava disponível *ad libitum* durante o período de aclimação. 7 Dias antes do início do estudo, uma dieta hipercalórica de Elevado Teor de Gordura (45% de proteínas, 4,73 Kcal/g; referência 824053 SDSIDIETEX) foi dada aos grupos 1 e 2.

Os animais foram pesados diariamente a partir do D-8 (8 dias antes do início da experiência), depois, do D-5 até ao final do estudo. A partir do D1 (primeiro dia da experiência), o alimento foi dado *ad libitum*.

Resultados

O peso corporal inicial (em g) dos murganhos dos grupos 1 e 2 no D-1 (um dia antes da experiência), assim como o ganho ou

perda de peso de acordo com o peso inicial (para D1 até D13), estão resumidos na seguinte tabela e representados na Fig. 8.

Grupo		D-1	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
1	Média	28,3	-2,8	-0,3	1,0	2,3	2,7	3,2	3,9
	SEM	0,7	0,2	0,1	0,2	0,3	0,4	0,4	0,5
2	Média	28,5	-2,7	-1,2	-0,8	0,2	0,7	1,0	0,9
	SEM	0,7	0,2	0,2	0,3	0,5	0,6	0,9	1,0
	p	NS	NS	NS	NS	*	*	*	*

Grupo		D8	D9	D10	D11	D12	D13
1	Média	4,4	4,7	5,1	5,4	5,9	6,3
	SEM	0,6	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8
2	Média	1,3	1,0	1,1	0,5	1,8	2,0
	SEM	1,3	1,3	1,4	1,5	1,0	1,1
	p	**	**	**	**	**	**

Média: peso médio dos 10 murganhos por grupo; SEM: erro padrão da média; NS: diferença não significativa entre os dois grupos ($p > 0,05$); *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$

Como mostrado na Figura 8, esta experiência mostrou que o peso dos murganhos tendo recebido o composto OBE2001 é significativamente inferior ao peso dos murganhos do grupo de controlo. Esta diferença é significativa a partir do dia 4 e altamente significativa a partir do dia 8 (ver a Tabela). Consequentemente, a administração de OBE 2001 em murganhos resultou na diminuição do peso logo no dia 4.

2. Efeito de OBE2001 na absorção de triglicéridos

O âmbito desta segunda experiência *in vivo* foi o de analisar os efeitos do composto OBE2001 na absorção de

triglicéridos. Para esse objetivo, os murganhos foram injetados com OBE2001, antes e/ou após sonda esofágica com uma solução enriquecida com colesterol e ácidos gordos livres (clinoleico a 20%).

Neste estudo, murganhos Swiss CD1 macho de 7 semanas de idade foram pesados e aleatorizados para peso corporal; 3 grupos de 5 murganhos foram depois constituídos de:

- Grupo 1 (solvente): grupo de controlo. Transportador (H₂O + DMSO a 2%) em t-5 min + solução A (clinoleico a 20% + colesterol) em t0.
- Grupo 2 (OBE 25+25): OBE2001 a 25 mg/kg (antes e após sonda esofágica). OBE2001 25 mg/kg (solução B) em t-5 min + OBE2001 25 mg/kg em solução A (solução C) em t0.
- Grupo 3 (OBE 25): OBE2001 25 mg/kg (antes de sonda esofágica). Transportador (H₂O + DMSO a 2%) em t-5 min + OBE2001 a 25 mg/kg em solução A (solução C) em t0.

30 Minutos antes do tratamento (com solução A, B ou C), foi recolhido sangue por punção retroorbital, após uma ligeira anestesia (Isoflurano), para determinar níveis basais (t0) de triglicéridos. Todas as soluções foram, depois, administradas por sonda esofágica oral em t-5 (transportador ou solução B) ou t0 (solução A ou C). Após administração da solução A ou C (contendo ácidos gordos + colesterol), foi novamente recolhido sangue por punção retroorbital, após uma ligeira anestesia (Isoflurano), no tempo 60, 120, 180, 300 e 360 minutos, para

medição dos níveis de triglicéridos. No tempo 360 minutos, os murganhos foram sacrificados.

Resultados: Os seguintes valores foram obtidos em diferentes tempos após administração da solução:

	% do valor basal					
Tempo (min)	0	60	120	180	300	360
Grupo 1	100,00	227,30	298,72	203,76	109,67	89,41
Grupo 2	100,00	243,39	202,34	127,81	62,35	56,71
Grupo 3	100,00	293,17	269,24	126,45	70,22	60,92

A sonda esofágica oral com uma solução de clinoleico a 20% conduziu a um aumento nos níveis sanguíneos de triglicéridos em todos os grupos de estudo nas três primeiras horas. Os murganhos tratados com OBE2001 a 25 mg/kg no grupo 2 e 3 mostram uma diminuição na absorção de triglicéridos, em comparação com o grupo de controlo 1 (Figura 9).

Além disso, para cada grupo, a área sob a curva foi calculada de acordo com os valores da Tabela acima.

	Área sob a curva		
Grupo 1	65453		% de diminuição
Grupo 2	48559	Grupo 2/grupo 1	26%
Grupo 3	56273	Grupo 3/grupo 1	14%

Este cálculo demonstrou que a absorção global de triglicéridos é reduzida em 26% no grupo 2, em comparação com o grupo 1 e de 14% no grupo 3, em comparação com o grupo 1. Consequentemente, estes resultados demonstram que o OBE2001 é capaz de inibir a enteropeptidase e reduz significativamente a absorção de triglicéridos em animais tratados.

3. Efeito de OBE2001 na absorção de proteína

Esta terceira experiência *in vivo* foi concebida para se obter informação sobre a absorção de proteínas ^{14}C na ausência ou na presença de OBE2001, a duas doses (5 mg/kg ou 50 mg/kg) diferentes, após uma administração oral a murganhos Swiss macho.

15 Murganhos Swiss macho (CD-1), 5 semanas de idade e tendo um peso corporal médio de $0,021 \pm 0,002$ kg foram divididos em 3 grupos:

- Grupo De Controlo (G1; solvente) contendo 5 murganhos, recebeu água a 5 mL/Kg em t-5 min e proteínas ^{14}C a 10 mL/Kg em T = 0 min;
- Grupo 2 (G2) contendo 5 murganhos (OBE 5 mg/kg), recebeu OBE2001 a 5 mg/kg em t-5 min e proteínas ^{14}C a 10 mL/Kg em T = 0 min;
- Grupo 3 (G3) contendo 5² murganhos (OBE 50 mg/kg), recebeu OBE2001 a 5 mg/kg em t-5 min e proteínas ^{14}C a 10 mL/Kg em T = 0 min.

Foi preparada uma preparação contendo 5 mL de Clinoleico 20 (Baxter Ref. DDB9500) com 1 g de glucose (Sigma; ref.: G8270) e 1 g de caseína (Sigma; ref: C3400). Foi adicionada água até a solução ter atingido 10 mL. Após concentração da solução radioativa contendo as proteínas ^{14}C (GE Healthcare; ref.: CFA626) (x10), 200 μL desta solução radioativa foram adicionados a 2,8 mL da preparação, de modo a atingir uma concentração de cerca de 3,3 $\mu\text{Ci/mL}$. Antes da administração desta preparação radioativa, os animais foram submetidos a jejum. A preparação radioativa foi administrada oralmente por sonda esofágica intragástrica, com uma única dosagem (cerca de 33,3 $\mu\text{Ci/kg}$) num volume de cerca de 10 mL/kg de peso corporal.

O OBE2001 foi proporcionado numa mistura de dois sais (HCl e TFA), com uma pureza de 90%. O OBE2001 foi administrado oralmente por sonda esofágica intragástrica, com uma única dosagem de 5 mg/kg para G2 e 50 mg/kg para G3, num volume de cerca de 5 mL/kg de peso corporal.

As alíquotas de plasma foram removidas e colocadas em frasquinhos de plástico pré-pesados de 6 mL, em t+15, t+30, t+60, t+120 e t+240 min. Cerca de 4 mL de *Pico-fluor 40* foram adicionados e, após agitação, a radioatividade total contida nas diferentes amostras foi determinada por cintilação líquida, utilizando um espectrómetro Packard 1900 CA equipado com um sistema padrão externo (análise espectral). Foi implementada uma curva de extinção para fins de calibração, utilizando um kit de ^{14}C extinto, fornecido pela Packard Instruments.

A Contagem de cintilação líquida (LS) foi efetuada com 2 sigma = 2% e por uma duração máxima de 5 minutos (de acordo com o método criado no software 1900CA®). Os valores de dpm

(desintegração por minuto) inferiores a duas vezes o nível de fundo do meio biológico branco foram referidos como BLQ (Abaixo do Limite de Quantificação).

Resultados:

Durante esta experiência animal, não ocorreu sinal de morbidade ou mortalidade e não foi observado um efeito particular relacionado com o regime de dosagem.

Uma Cmax de $0,9\% \pm 0,27$ de dose administrada/g ocorrendo aos 15 min foi observada para o grupo 1 (controlo), enquanto a Cmax para os grupos tratados tendeu a ser inferior. De facto, para os grupos tratados (5 mg/kg e 50 mg/kg), as Cmax foram $0,58\% \pm 0,54$, e $0,54\% \pm 0,24$ de dose administrada/g, respetivamente. Os dados cinéticos tenderam para um patamar a concentrações a partir de 1 h até 4 h após administração, atingindo respetivamente 0,5% de dose administrada/g para o grupo 1 e 0,4% de dose administrada/g para os grupos 2 e 3 (Figura 10).

A média de AUC para o grupo 1 foi $2,214 \pm 0,1875\%$ dose.h.g-1. A média de AUC para os dois outros grupos foi, respetivamente, $1,841 \pm 0,6402\%$ dose.h.g-1 e $1,718 \pm 0,4366\%$ dose.h.g-1.

Este resultado demonstra que a absorção de proteína é grandemente diminuída em murganhos tendo recebido OBE2001, em comparação com murganhos de controlo, nos primeiros 30 minutos após administração de proteína e que esta diminuição é mantida durante, pelo menos, 4 horas.

C. Produção de um murganho Nocaute (KO) Constitutivo para Enteropeptidase

De modo a verificar que a enteropeptidase é uma proteína alvo correta na neutralização da obesidade, um murganho nocaute (KO) imitando a deficiência de enteropeptidase foi produzido para, em primeiro lugar, validar o alvo e para utilização como um modelo animal para o desenvolvimento de fármacos.

A produção de murganhos Nocaute Constitutivos consiste nos seguintes passos:

1. Conceção e Construção do Vetor de Direcionamento;
2. Células estaminais (ES) embrionárias C57BL/6 visadas;
3. Produção de murganhos heterozigóticos para o Nocaute Constitutivo;
4. Produção de murganhos homozigóticos para o Nocaute Constitutivo.

1. Conceção e construção do Vetor de Direcionamento

O homólogo murino da enteropeptidase humana é denominado Prss7 e está localizado no cromossoma 16 do murganho.

De modo a inativar o gene da enteropeptidase, os exões 23-28, os quais codificam o domínio catalítico, foram substituídos por uma cassete NeoR flanqueada por FRT. O alelo KO constitutivo (exões 1-22) codifica uma proteína truncada no C-terminal, a qual é desprovida do domínio catalítico. A cassete

NeoR foi excisada através de recombinação mediada por Flp *in vivo*. A interferência com a expressão do gene posicionado cauda-com-cauda (Chod1) através desta modificação do gene Prss7 não pode ser completamente excluída. A substituição dos exões 23-28 (aproximadamente 15 kb) com uma cassete FRT-Neo (aproximadamente 2 kb) diminui a eficiência de recombinação homóloga. Uma revisão da construção do alelo KO é divulgada na Figura 11.

Esta estratégia de direcionamento permitiu a construção de um vetor compreendendo um alelo KO de enteropeptidase constitutivo (sequência e esquema representados na Figura 12).

2. Células estaminais (ES) embrionárias C57BL/6 visadas

Num segundo passo, as células estaminais (ES) embrionárias C57BL/6N foram transfectadas pelo vetor compreendendo o alelo KO de enteropeptidase constitutivo por eletroporação. As células transformadas foram selecionadas para a sua resistência a G418 e ganciclovir. Foram recolhidos até 251 clones de ES individuais e foram obtidos 2 clones de ES positivos (A-D2 e A-E8). Neste passo, todas as Células ES (ESC) foram cultivadas em células alimentadoras embrionárias multirresistentes a fármacos sem antibióticos e foram monitorizadas regularmente por PCR e ensaios luminométricos para ausência de bactérias e micoplasma contaminantes. O controlo de qualidade (QC) também incluiu cariotipagem (contagem de cromossomas) de todos os clones e linhas de ES expandidos (para um exemplo de uma publicação referindo a produção de murganhos KO, ver Roberds *et al.* *Human molecular Genetics*, 2001, Vol 10, Nº 12, 1317-1324).

Antes de serem injetados em blastocistos, os clones de células ES foram extensivamente validados por Análise de Transferência De Southern com diversas sondas. Deste modo, o ADN genómico de células WT e clones A-D2 ou A-E8 foi digerido com AfIII, corrido num gel e a membrana de transferência hibridada com uma destas sondas, sonda 5e2 (sequência: GCCGCACTATTTGCAGCATG) (Figura 13). A deleção dos exões 23-28 de Prss7 resultou num fragmento AfIII de 11,7 kb (da posição 5373 à posição 17180), em vez do alelo de tipo selvagem (WT) de 18,8 kb (da posição 5373 à posição 24211).

Como mostrado na Figura 14, os clones AD-2 e A-E8 têm um alelo de tipo selvagem (18,8 kb), assim como um alelo KO (11,7 kb). Em contraste, as células de tipo selvagem (WT) têm dois alelos WT (não delecionados) (18,8 kb).

Estes resultados confirmam que os clones AD-2 e A-E8 foram incorporados com sucesso no alelo KO.

3. Produção de murganhos heterozigóticos para o Nocaute Constitutivo

Num terceiro passo, 2 clones de células ES foram injetados em blastocistos de hospedeiro diploide e o blastocisto injetado transferido em recetores pseudoprenhes (microoperação sob condições específicas isentas de patogénios (SPF)). Deste modo, foram produzidas quimeras de pelo colorido heterozigóticas (>50%) e reproduzidas para heterozigoticidade.

Para controlar o sucesso deste terceiro passo, a descendência foi genotipada pelo seguinte protocolo de PCR. O

ADN genómico, extraído da cauda de murganho, foi amplificado simultaneamente com um primeiro conjunto de iniciadores (iniciador 1472_23 com a sequência: CGTTACTATCCATCACCTAAGC e o iniciador 1472_24 com a sequência GGGAATTCAGCTGTGTCTGAAC) correspondendo ao alelo KO de enteropeptidase e um segundo conjunto de iniciadores (iniciador 1260_1: GAGACTCTGGCTACTCATCC e iniciador 1260_2: CCTTCAGCAAGAGCTGGGGAC) correspondendo a um controlo interno. O tamanho do alelo KO de enteropeptidase foi 412 pb (conv) e o tamanho do controlo interno foi 585 pb (c).

Como esperado, a amplificação de ADN genómico de murganhos WT (115696 e 115705) deu uma única banda a 585 pb. Pelo contrário, a amplificação de ADN genómico de murganhos heterozigóticos (115695, 115702, 115706, 115707 e 115708) deu duas bandas, uma para o alelo de controlo (585 pb) e uma para o alelo KO (412 pb) (Figura 15).

4. Produção de crias homozigóticas para enteropeptidase

Num último passo, foram produzidas crias homozigóticas para KO de enteropeptidase. Os heterozigóticos KO de enteropeptidase foram cruzados e foram obtidas 46 crias. Entre os recém-nascidos, 30% (14 crias) eram homozigóticos para o KO de enteropeptidase, 50% eram heterozigóticos (22 crias) e 20% eram de tipo selvagem (homozigótico dominante para o gene de enteropeptidase).

A presença da enteropeptidase KO numa estirpe homozigótica foi verificada por análise de PCR, a partir de ADN genómico, extraído da cauda de murganho. O ADN genómico foi simultaneamente amplificado com um primeiro conjunto de

iniciadores (iniciador 1472_23 com a sequência: CGTTACTATCCATCACCTAAGC e iniciador PRRS7 com a sequência ATCAAGGAATCTTGGGAGCA) correspondendo ao alelo de enteropeptidase WT e um segundo conjunto de iniciadores (iniciador direto de actina: CGGAACCGCYCATTTGGC e iniciador inverso de actina: ACCCACACTGTGCCCATCTA) correspondendo ao controlo de actina. O tamanho do alelo de enteropeptidase foi 533 pb e o tamanho do controlo de actina foi 300 pb.

Como pode ser verificado a partir da Figura 16, os fragmentos amplificados de murganhos heterozigóticos, nas pistas denominadas 115755 e 115648, apresentam duas bandas, uma correspondendo ao controlo de actina (300 pb) e uma ao alelo de enteropeptidase WT (533 pb). Pelo contrário, os fragmentos amplificados a partir dos recém-nascidos 1A, 2A, 3A, 4A e 5A têm um tamanho de 300 pb e correspondem, assim, ao único controlo de actina, demonstrando que são desprovidos de um alelo de enteropeptidase WT.

5. Observações fenotípicas

Os recém-nascidos, obtidos do cruzamento de heterozigóticos nocaute (KO) de enteropeptidase, foram cultivados durante 7 dias e o seu tamanho comparado.

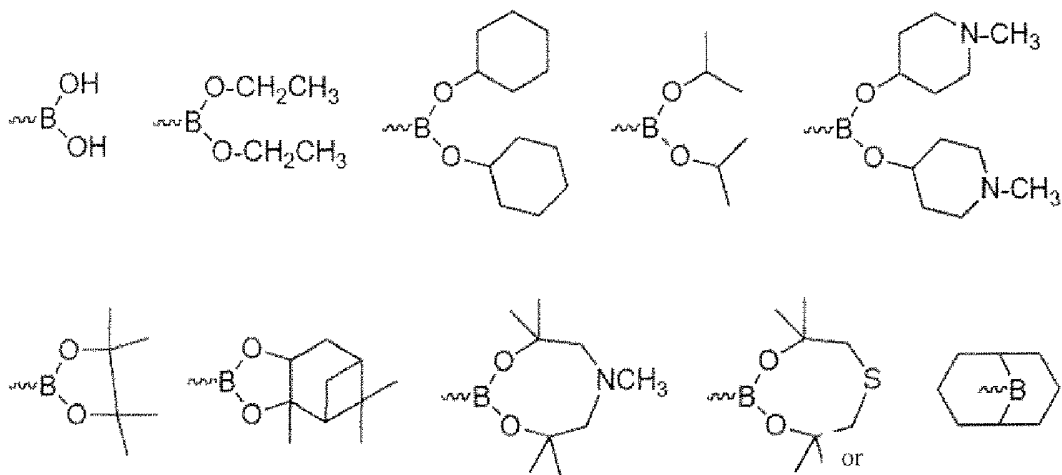
Como pode ser observado na Figura 17, o murganho homozigótico para o KO de enteropeptidase (Ho) é duas vezes mais pequeno do que o murganho heterozigótico para KO de enteropeptidase (He).

Estes resultados demonstraram que a enteropeptidase é um bom alvo para combater a obesidade, dado que a sua inibição específica completa resulta numa diminuição significativa de tamanho.

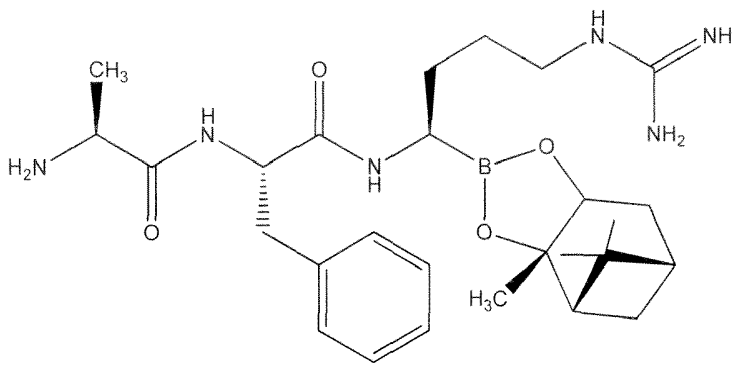
Lisboa, 3 de junho de 2016

REIVINDICAÇÕES

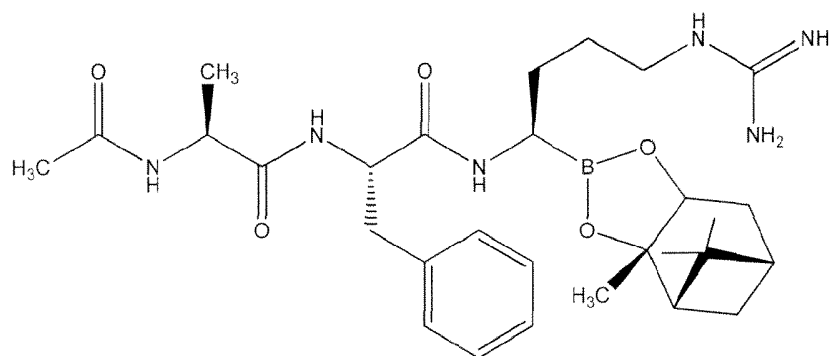
1. Composto selecionado do grupo consistindo de Glu-Gly-Boro-Arg, Ala-Phe-Boro-Arg, Ac-Glu-Gly-Boro-Arg e Ac-Ala-Phe-Boro-Arg, em que Ac é acetilo.
2. Composto de acordo com a reivindicação 1, em que a unidade de boroarginina compreende um grupo da fórmula:



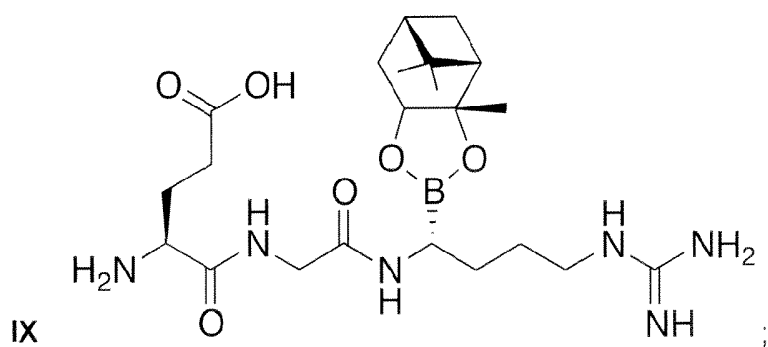
3. Composto selecionado do grupo consistindo de:



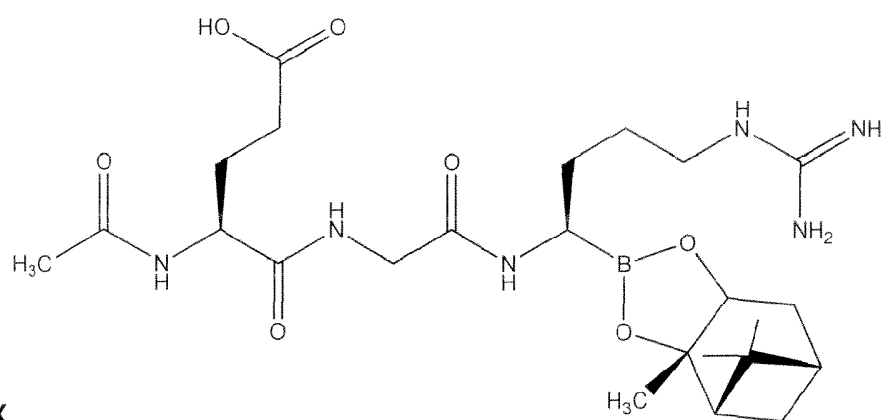
VII



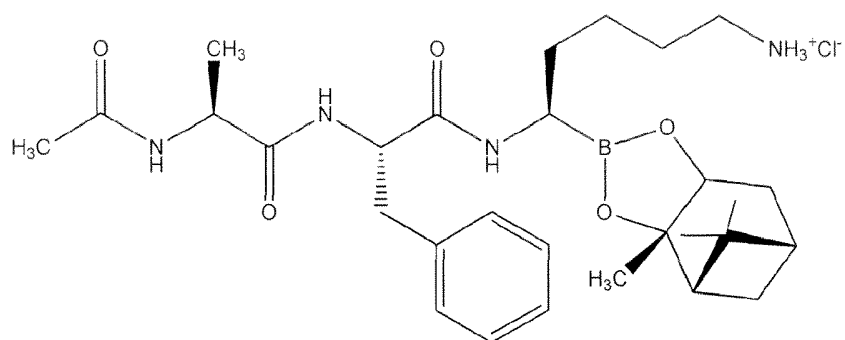
VIII



IX



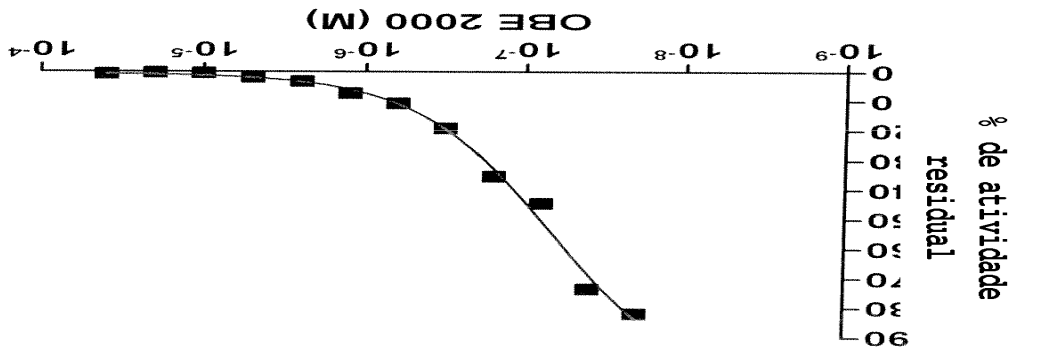
X

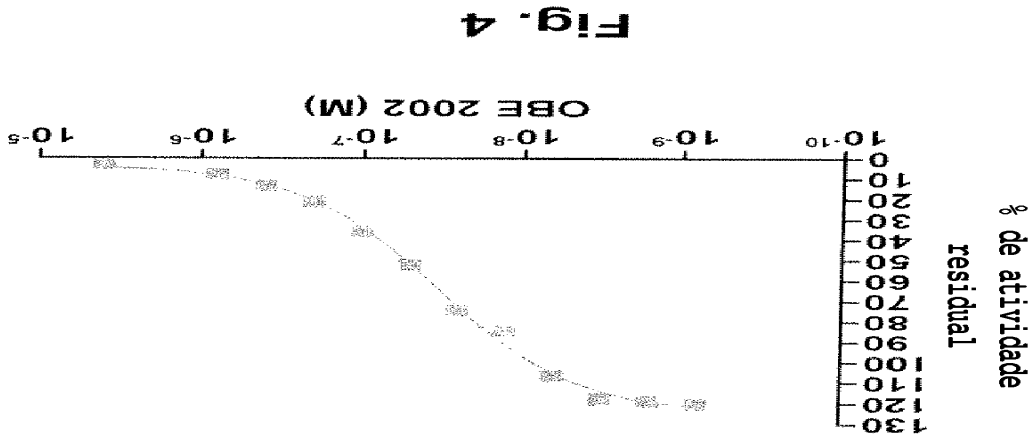
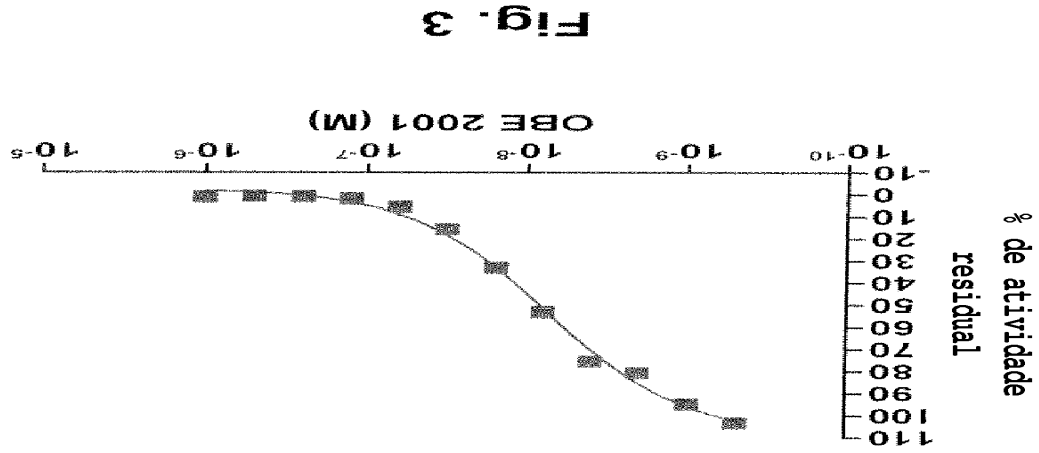


4. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, o qual inibe a atividade enzimática da enteropeptidase, de um modo preferido, o qual inibe seletivamente a atividade enzimática da enteropeptidase em relação a outras proteases de serina.
5. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, o qual é não absorvível.
6. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, o qual está numa base livre num seu sal farmaceuticamente aceitável.
7. Composição compreendendo, pelo menos, um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, compreendendo ainda opcionalmente, pelo menos, um veículo farmaceuticamente aceitável.
8. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 ou a composição de acordo com a reivindicação 7, para utilização no tratamento da obesidade num mamífero, de um modo preferido, um humano.
9. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 ou a composição de acordo com a reivindicação 7, para utilização no tratamento do excesso de peso num mamífero, de um modo preferido, um humano.
10. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 ou a composição de acordo com a reivindicação 7, para utilização no tratamento, num mamífero, de um modo

preferido, um humano, de doenças associadas com o metabolismo anormal da gordura, em que a referida doença do metabolismo da gordura é, de um modo preferido, selecionada do grupo consistindo de doença da gota, diabetes tipo II, hiperglicemia, hiperinsulinemia, níveis sanguíneos elevados de ácidos gordos ou glicerol, síndrome X, complicações diabéticas, síndrome dismetabólica e doenças relacionadas, hipercolesterolemia, aterosclerose, hipertensão, pancreatite, hipertrigliceridemia, hiperlipidemia, acidente vascular cerebral, doenças coronárias, doenças vasculares periféricas, doenças arteriais periféricas, síndromes vasculares, distúrbios relacionados com colesterol e lipodistrofia induzida por fármacos.

Lisboa, 3 de junho de 2016





Enzima	IC 50 (nM)			
	OBE 1999	OBE 2000	OBE 2001	OBE 2002
E Enteropeptidase	33,2	68	7,3	33,6
T Tripsina	10,8	10,6	157	10,5
T Trombina	6400	3220	4000	4000
P Plasmina	29,8	7100	21,7	3800
K Calicreína	7,5	260	6,9	81,4
C Quimotripsina	Sem inibição	Sem inibição	Sem inibição	Sem inibição
E Elastase	Sem inibição	Sem inibição	Sem inibição	Sem inibição
C Carboxipeptidase A1	Sem inibição	Sem inibição	Sem inibição	Sem inibição
C Carboxipeptidase B1	Sem inibição	Sem inibição	Sem inibição	Sem inibição
α α-amilase	Sem inibição	Sem inibição	Sem inibição	Sem inibição
DPPIV	Sem inibição	Sem inibição	Sem inibição	Sem inibição

Fig. 5

accagacagt tcttaaatta gcaagccttc aaaaccasaaa atg ggg tcg aaa aga	55
Met Gly Ser Lys Arg	
1 5	
ggc ata tct tct agg cat cat tct ctc agc tcc tat gaa atc atg ttt	103
Gly Ile Ser Ser Arg His His Ser Leu Ser Ser Tyr Glu Ile Met Phe	
10 15 20	
gca gct ctc ttt gcc ata ttg gta gtg ctc tgt gct gga tta att gca	151
Ala Ala Leu Phe Ala Ile Leu Val Val Leu Cys Ala Gly Leu Ile Ala	
25 30 35	
gta tcc tgc ctg aca atc aag gaa tcc caa cga ggt gca gca ctt gga	199
Val Ser Cys Leu Thr Ile Lys Glu Ser Gln Arg Gly Ala Ala Leu Gly	
40 45 50	
cag agt cat gaa gcc aga gcg aca ttt aaa ata aca tcc gga gtt aca	247
Gln Ser His Glu Ala Arg Ala Thr Phe Lys Ile Thr Ser Gly Val Thr	
55 60 65	
tat aat cct aat ttg caa gac aaa ctc tca gtg gat ttc aaa gtt ctt	295
Tyr Asn Pro Asn Leu Gln Asp Lys Leu Ser Val Asp Phe Lys Val Leu	
70 75 80 85	
gct ttt gac ctt cag caa atg ata gat gag atc ttt cta tca agc aat	343
Ala Phe Asp Leu Gln Gln Met Ile Asp Glu Ile Phe Leu Ser Ser Asn	
90 95 100	
ctg aag aat gaa tat aag aac tca aga gtt tta caa ttt gaa aat ggc	391
Leu Lys Asn Glu Tyr Lys Asn Ser Arg Val Leu Gln Phe Glu Asn Gly	
105 110 115	
agc att ata gtc gta ttt gac ctt ttc ttt gcc cag tgg gtg tca gat	439
Ser Ile Ile Val Val Phe Asp Leu Phe Phe Ala Gln Trp Val Ser Asp	
120 125 130	
caa aat gta aaa gaa gaa ctg att caa ggc ctt gaa gca aat aaa tcc	487
Gln Asn Val Lys Glu Glu Leu Ile Gln Gly Leu Glu Ala Asn Lys Ser	
135 140 145	
agc caa ctg gtc act ttc cat att gat ttg aac agc gtt gat atc cta	535
Ser Gln Leu Val Thr Phe His Ile Asp Leu Asn Ser Val Asp Ile Leu	
150 155 160 165	
gac aag cta aca acc acc agt cat ctg gca act cca gga aat gtc tca	583
Asp Lys Leu Thr Thr Ser His Leu Ala Thr Pro Gly Asn Val Ser	
170 175 180	
ata gag tgc ctg cct ggt tca agt cct tgt act gat gct cta acg tgt	631
Ile Glu Cys Leu Pro Gly Ser Ser Pro Cys Thr Asp Ala Leu Thr Cys	
185 190 195	
ata aaa gct gat tta ttt tgt gat gga gaa gta aac tgt cca gat ggt	679
Ile Lys Ala Asp Leu Phe Cys Asp Gly Glu Val Asn Cys Pro Asp Gly	
200 205 210	

Fig. 6A

tct gac gaa gac aat aaa atg tgt gcc aca gtt tgt gat gga aga ttt Ser Asp Glu Asp Asn Lys Met Cys Ala Thr Val Cys Asp Gly Arg Phe 215 220 225	727
ttg tta act gga tca tct ggg tct ttc cag gct act cat tat cca aaa Leu Leu Thr Gly Ser Ser Gly Ser Phe Gln Ala Thr His Tyr Pro Lys 230 235 240 245	775
cct tct gaa aca agt gtt gtc tgc cag tgg atc ata cgt gta aac caa Pro Ser Glu Thr Ser Val Val Cys Gln Trp Ile Ile Arg Val Asn Gln 250 255 260	823
gga ctt tcc att aaa ctg agc ttc gat gat ttt aat aca tat tat aca Gly Leu Ser Ile Lys Leu Ser Phe Asp Asp Phe Asn Thr Tyr Tyr Thr 265 270 275	871
gat ata tta gat att tat gaa ggt gta gga tca agc aag att tta aga Asp Ile Leu Asp Ile Tyr Glu Gly Val Gly Ser Ser Lys Ile Leu Arg 280 285 290	919
gct tct att tgg gaa act aat cct ggc aca ata aga att ttt tcc aac Ala Ser Ile Trp Glu Thr Asn Pro Gly Thr Ile Arg Ile Phe Ser Asn 295 300 305	967
caa gtt act gcc acc ttt ctt ata gaa tct gat gaa agt gat tat gtt Gln Val Thr Ala Thr Phe Leu Ile Glu Ser Asp Glu Ser Asp Tyr Val 310 315 320 325	1015
ggc ttt aat gca aca tat act gca ttt aac agc agt gag ctt aat aat Gly Phe Asn Ala Thr Tyr Thr Ala Phe Asn Ser Ser Glu Leu Asn Asn 330 335 340	1063
tat gag aaa att aat tgt aac ttt gag gat ggc ttt tgt ttc tgg gtc Tyr Glu Lys Ile Asn Cys Asn Phe Glu Asp Gly Phe Cys Phe Trp Val 345 350 355	1111
cag gat cta aat gat gat aat gaa tgg gaa agg att cag gga agc acc Gln Asp Leu Asn Asp Asp Asn Glu Trp Glu Arg Ile Gln Gly Ser Thr 360 365 370	1159
ttt tct cct ttt act gga ccc aat ttt gac cac act ttt ggc aat gct Phe Ser Pro Phe Thr Gly Pro Asn Phe Asp His Thr Phe Gly Asn Ala 375 380 385	1207
tca gga ttt tac att tct acc cca act gga cca gga ggg aga caa gaa Ser Gly Phe Tyr Ile Ser Thr Pro Thr Gly Pro Gly Gly Arg Gln Glu 390 395 400 405	1255
cga gtg ggg ctt tta agc ctc cct ttg gac ccc act ttg gag cca gct Arg Val Gly Leu Leu Ser Leu Pro Leu Asp Pro Thr Leu Glu Pro Ala 410 415 420	1303
tgc ctt agt ttc tgg tat cat atg tat ggt gaa aat gtc cat aaa tta Cys Leu Ser Phe Trp Tyr His Met Tyr Gly Glu Asn Val His Lys Leu 425 430 435	1351

Fig. 6B

agc att aat atc agc aat gac caa aat atg gag aag aca gtt ttc caa ser ile asn ile ser asn asp gln asn met glu lys thr val phe gln 440 445 450	1399
aag gaa gga aat tat gga gac aat tgg aat tat gga caa gta acc cta lys glu gly asn tyr gly asp asn trp asn tyr gly gln val thr leu 455 460 465	1447
aat gaa aca gtt aaa ttt aag gtt gct ttt aat gct ttt aaa aac aag asn glu thr val lys phe lys val ala phe asn ala phe lys asn lys 470 475 480 485	1495
atc ctg agt gat att gcg ttg gat gac att agc cta aca tat ggg att ile leu ser asp ile ala leu asp asp ile ser leu thr tyr gly ile 490 495 500	1543
tgc aat ggg agt ctt tat cca gaa cca act ttg gtg cca act cct cca cys asn gly ser leu tyr pro glu pro thr leu val pro thr pro pro 505 510 515	1591
cca gaa ctt cct acg gac tgt gga gga cct ttt gag ctg tgg gag cca pro glu leu pro thr asp cys gly gly pro phe glu leu trp glu pro 520 525 530	1639
aat aca aca ttc agt tct acg aac ttt cca aac agc tac cct aat ctg asn thr thr phe ser ser thr asn phe pro asn ser tyr pro asn leu 535 540 545	1687
gct ttc tgt gtt tgg att tta aat gca caa aaa gga aag aat ata caa ala phe cys val trp ile leu asn ala gln lys gly lys asn ile gln 550 555 560 565	1735
ctt cat ttt caa gaa ttt gac tta gaa aat att aac gat gta gtt gaa leu his phe gln glu phe asp leu glu asn ile asn asp val val glu 570 575 580	1783
ata aga gat ggt gaa gaa gct gat tcc ttg ctc tta gct gtg tac aca ile arg asp gly glu glu ala asp ser leu leu leu ala val tyr thr 585 590 595	1831
ggg cct ggc cca gta aag gat gtg ttc tct acc acc aac aga atg act gly pro gly pro val lys asp val phe ser thr thr asn arg met thr 600 605 610	1879
gtg ctt ctc atc act aac gat gtg ttg gca aga gga ggg ttt aaa gca val leu leu ile thr asn asp val leu ala arg gly gly phe lys ala 615 620 625	1927
aac ttt act act ggc tat cac ttg ggg att cca gag cca tgc aag gca asn phe thr thr gly tyr his leu gly ile pro glu pro cys lys ala 630 635 640 645	1975
gac cat ttt caa tgt aaa aat gga gag tgt gtt cca ctg gtg aat ctc asp his phe gln cys lys asn gly glu cys val pro leu val asn leu 650 655 660	2023

Fig. 6C

tgt gac ggt cat ctg cac tgt gag gat ggc tca gat gaa gca gat tgt	2071
Cys Asp Gly His Leu His Cys Glu Asp Gly Ser Asp Glu Ala Asp Cys	
665 670 675	
gtg cgt ttt ttc aat ggc aca acg aac aac aat ggt tta gtg cgg ttc	2119
Val Arg Phe Phe Asn Gly Thr Thr Asn Asn Asn Gly Leu Val Arg Phe	
680 685 690	
aga atc cag agc ata tgg cat aca gct tgt gct gag aac tgg acc acc	2167
Arg Ile Gln Ser Ile Trp His Thr Ala Cys Ala Glu Asn Trp Thr Thr	
695 700 705	
cag att tca aat gat gtt tgt caa ctg ctg gga cta ggg agt gga aac	2215
Gln Ile Ser Asn Asp Val Cys Gln Leu Leu Gly Leu Gly Ser Gly Asn	
710 715 720 725	
tca tca aag cca atc ttc tct acc gat ggt gga cca ttt gtc aaa tta	2263
Ser Ser Lys Pro Ile Phe Ser Thr Asp Gly Gly Pro Phe Val Lys Leu	
730 735 740	
aac aca gca cct gat ggc cac tta ata cta aca ccc agt caa cag tgt	2311
Asn Thr Ala Pro Asp Gly His Leu Ile Leu Thr Pro Ser Gln Gln Cys	
745 750 755	
tta cag gat tcc ttg att cgg tta cag tgt aac cat aaa tct tgt gga	2359
Leu Gln Asp Ser Leu Ile Arg Leu Gln Cys Asn His Lys Ser Cys Gly	
760 765 770	
aaa aaa ctg gca gct caa gac atc acc cca aag att gtt gga gga agt	2407
Lys Lys Leu Ala Ala Gln Asp Ile Thr Pro Lys Ile Val Gly Gly Ser	
775 780 785	
aat gcc aaa gaa ggg gcc tgg ccc tgg gtt gtg ggt ctg tat tat ggc	2455
Asn Ala Lys Glu Gly Ala Trp Pro Trp Val Val Gly Leu Tyr Tyr Gly	
790 795 800 805	
ggc cga ctg ctc tgc ggc gca tct ctc gtc agc agt gac tgg ctg gtg	2503
Gly Arg Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Val Ser Ser Asp Trp Leu Val	
810 815 820	
tcc gcc gca cac tgc gtg tat ggg aga aac tta gag cca tcc aag tgg	2551
Ser Ala Ala His Cys Val Tyr Gly Arg Asn Leu Glu Pro Ser Lys Trp	
825 830 835	
aca gca atc cta ggc ctg cat atg aaa tca aat ctg acc tct cct caa	2599
Thr Ala Ile Leu Gly Leu His Met Lys Ser Asn Leu Thr Ser Pro Gln	
840 845 850	
aca gtc cct cga tta ata gat gaa att gtc ata aac cct cat tac aat	2647
Thr Val Pro Arg Leu Ile Asp Glu Ile Val Ile Asn Pro His Tyr Asn	
855 860 865	
agg cga aga aag gac aac gac att gcc atg atg cat ctg gaa ttt aaa	2695
Arg Arg Arg Lys Asp Asn Asp Ile Ala Met Met His Leu Glu Phe Lys	
870 875 880 885	

Fig. 6D

gtg aat tac aca gat tac ata caa cct att tgt tta cag gaa gaa aat	2743
Val Asn Tyr Thr Asp Tyr Ile Gln Pro Ile Cys Leu Pro Glu Glu Asn	
890 895 900	
caa gtt ttt cct cca gga aga aat tgt tct att gct ggt tgg ggg acg	2791
Gln Val Phe Pro Pro Gly Arg Asn Cys Ser Ile Ala Gly Trp Gly Thr	
905 910 915	
gtt gta tat caa ggt act act gca aac ata ttg caa gaa gct gat gtt	2839
Val Val Tyr Gln Gly Thr Thr Ala Asn Ile Leu Gln Glu Ala Asp Val	
920 925 930	
cct ctt cta tca aat gag aga tgc caa cag cag atg cca gaa tat aac	2887
Pro Leu Leu Ser Asn Glu Arg Cys Gln Gln Gln Met Pro Glu Tyr Asn	
935 940 945	
att act gaa aat atg ata tgt gca ggc tat gaa gaa gga gga ata gat	2935
Ile Thr Glu Asn Met Ile Cys Ala Gly Tyr Glu Glu Gly Gly Ile Asp	
950 955 960 965	
tct tgt cag ggg gat tca gga gga cca tta atg tgc caa gaa aac aac	2983
Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Gln Glu Asn Asn	
970 975 980	
agg tgg ttc ctt gct ggt gtg acc tca ttt gga tac aag tgt gcc ctg	3031
Arg Trp Phe Leu Ala Gly Val Thr Ser Phe Gly Tyr Lys Cys Ala Leu	
985 990 995	
cct aat cgc ccc gga gtg tat gcc agg gtc tca agg ttt acc gaa	3076
Pro Asn Arg Pro Gly Val Tyr Ala Arg Val Ser Arg Phe Thr Glu	
1000 1005 1010	
tgg ata caa agt ttt cta cat tag cgcattttctt aaactaaaca ggaaagtcgc	3130
Trp Ile Gln Ser Phe Leu His	
1015	
attatttttcc cattctactc tagaaagcat ggaaattaag tgttttcgtac aaaaattttta	3190
aaaagttacc aaagggttttt attcttaoct atgtcaatga aatgctaggg ggccagggaa	3250
acaaaaatfff aaaaataata aaattcacca tagcaatata gaataacttt aaaataccat	3310
taaatacatt tgtatttcat tgtgaacagg tattttcttca cagatctcat ttttaaaatt	3370
cttaatgatt atttttatta cttaactgttg ttttaaaggga tggtattttta aagcatatac	3430
catacactta agaaatttga gcagaattta aaaaagaaag aaaataaatt gtttttccca	3490
aagtatgtca ctggttgaaa taaactgcca taaattttct agttccagtt tagtttgctg	3550
ctattagcag aaactcaatt gtttctctgt cttttctatc aaaattttca acatatgcat	3610
aaccttagta ttttcccaac caatagaaac tattttattgt aagcttatgt cacaggcctg	3670
gactaaattg attttacgtt cctctt	3696

Fig. 6E

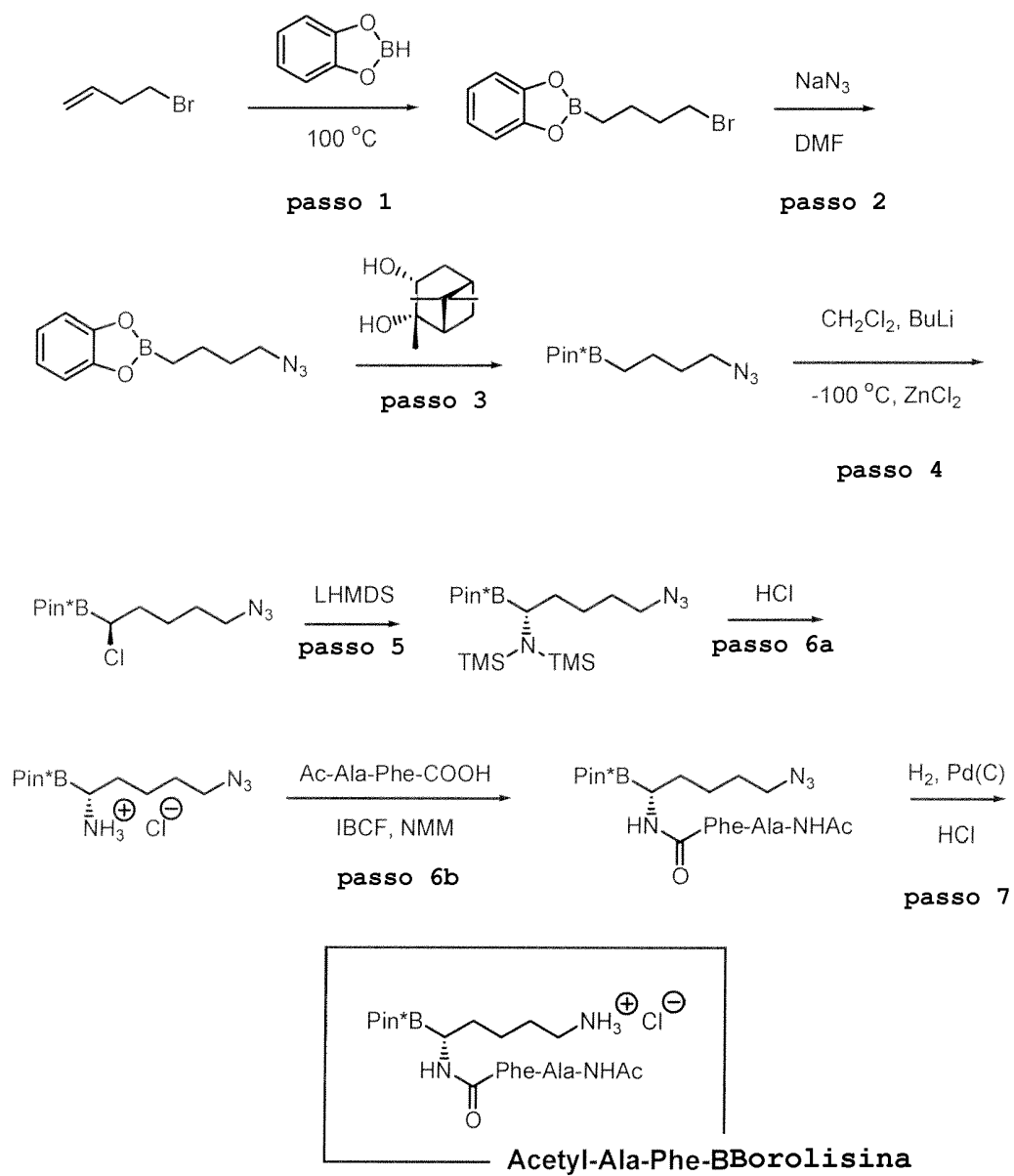
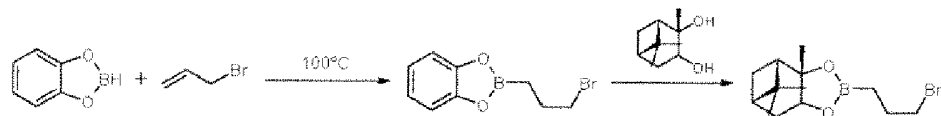
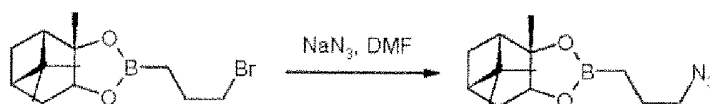
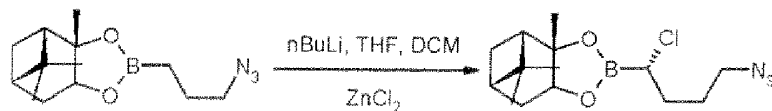
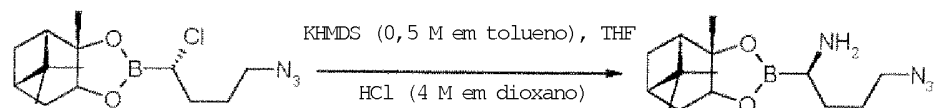
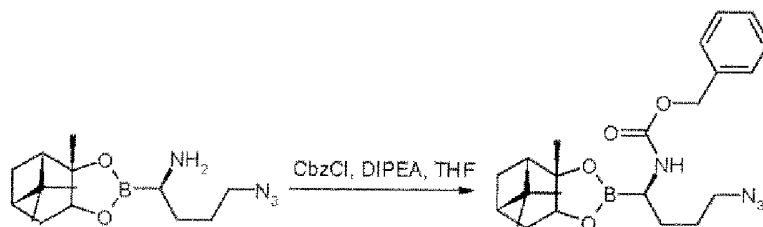
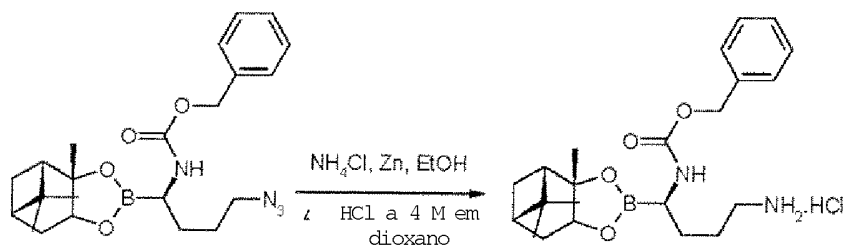
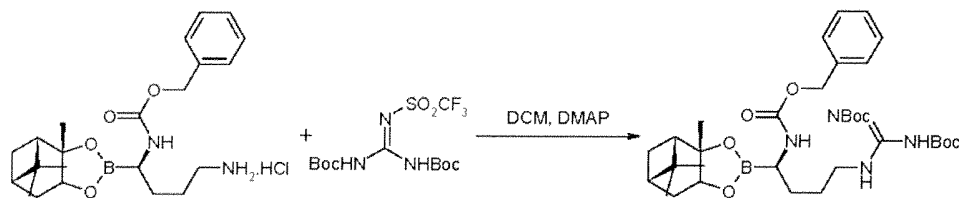
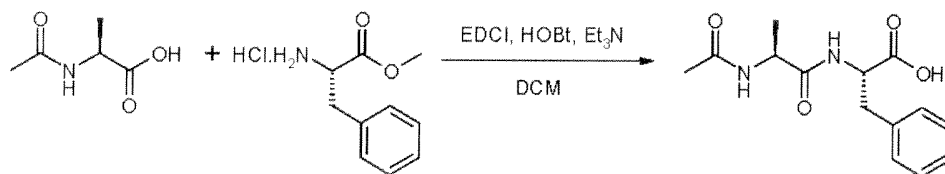


Fig. 7A

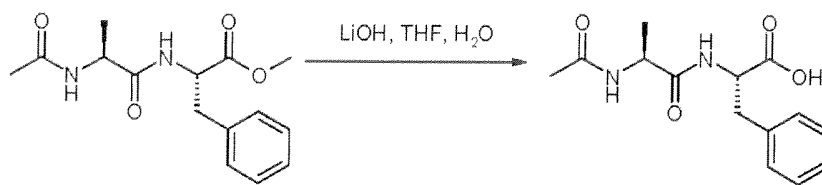
Passo 1:Passo 2:Passo 3:Passo 4:Passo 5:Passo 6:Passo 7:**Fig. 7B**



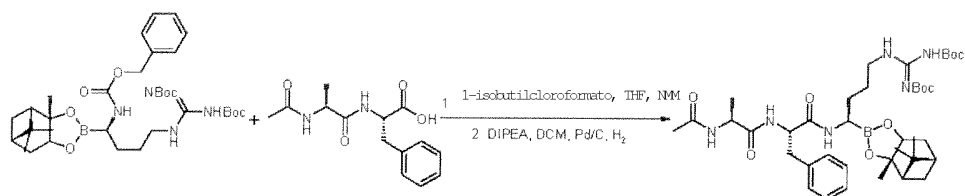
Passo 8:



Passo 9:



Passo 10:



Passo 11:

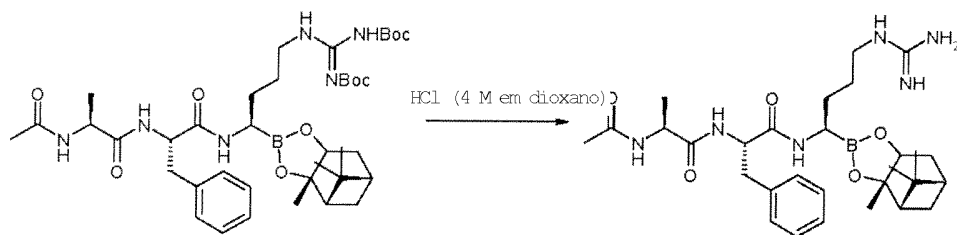


Fig. 7C

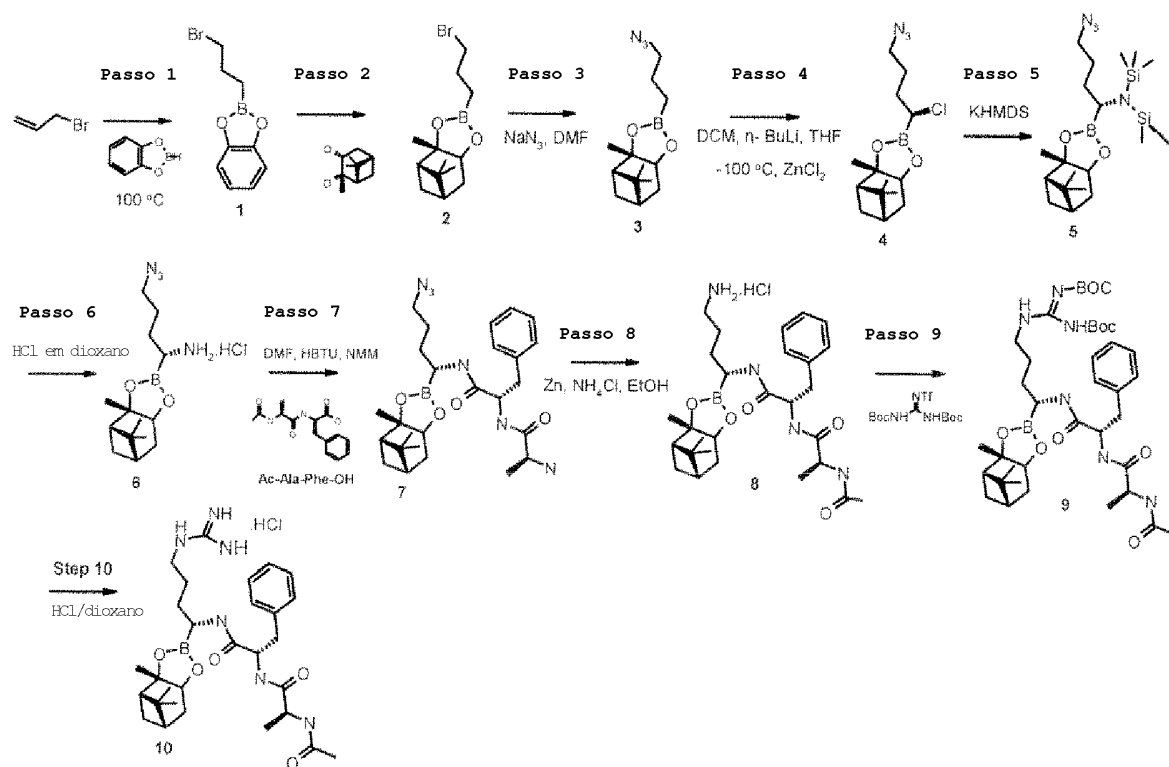


Fig. 7D

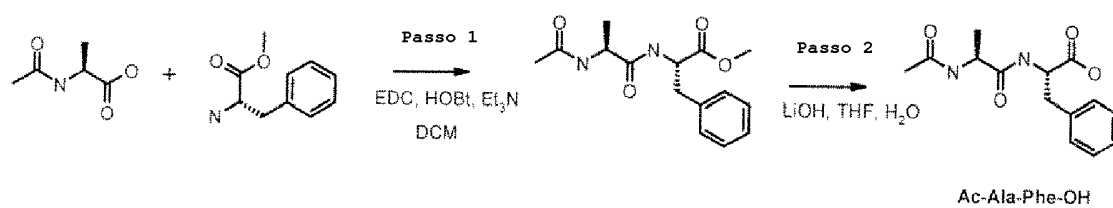
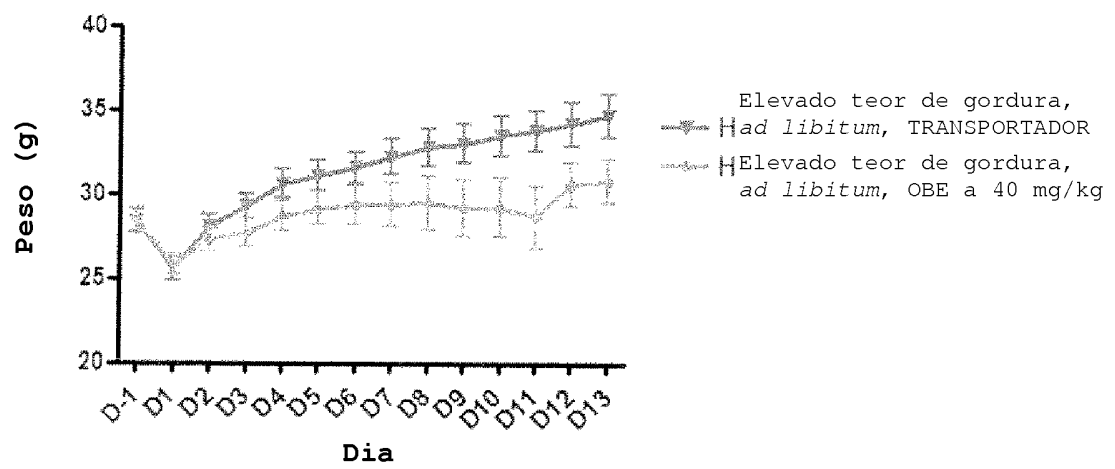


Fig. 7E

**Fig. 8**

Triglicéridos plasmáticos

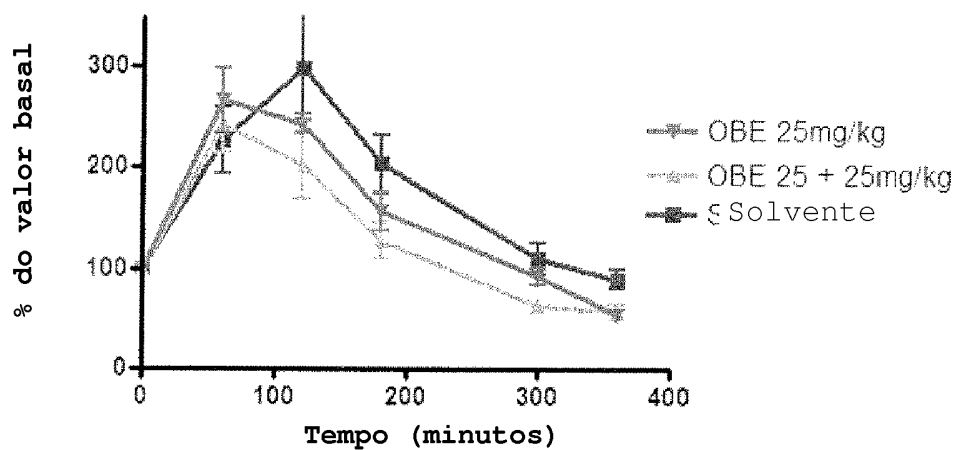


Fig. 9

14C plasmático

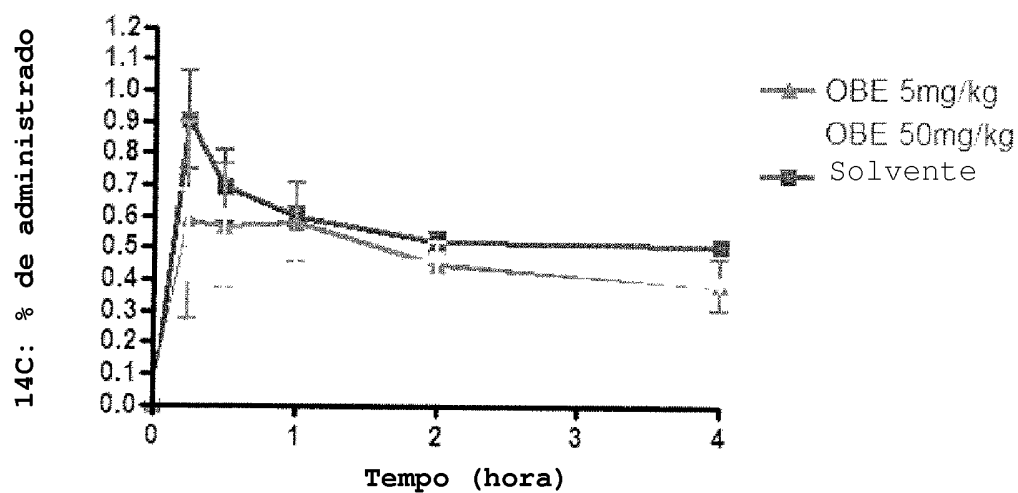


Fig. 10



Fig. 11

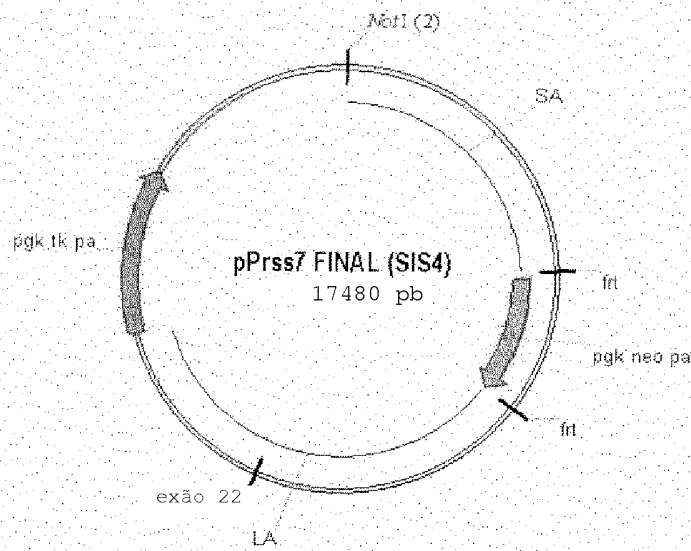


Fig. 12A

cggcgcgcctgtcagttgcgggagtgagcttaagtcctttgtccatcattcttagatcc
 tccctttttcttttcttccaggaaagcaaggagacacttcatcaaagactccactccatt
 atcatctgagtgcccttgcagaaagtttaaattccaatctggtagacatggcgggttctct
 cattccataccattttccaaaataactctcttcccttaactagtagaacatttttttagtg
 aatgattaagcacaaattgagggccacatggatatcttaactacttttcttaccatttaaaa
 tcccttctctctcataaaactttgctgacttactttctctcatgctggatatacctggg
 aacattatgttgatcttatttgattagaaggaatatccatagaatgtgtaatttggaaattt
 tatttatcacacacacactcaaattgatatgaagcaagtgtttttgcatcataatgctca
 aggttttagaagtagatctttttgtctttaaagagttctgc aaatcgacaggatgggtgga
 atgttgcaaaggtgtatctgtgagtgggggccaaaagctattaggggttgaactgtggga
 accttggggccacataagggaactaaacatagggggctgtggatagaccaagtgaagatta
 tttccaggaaacgaaggcaagaaatgcagatcttgacatttgatcttggggatacttac
 aggcacttttaccgtagccagaacatgactactatgggaaagaacaaactgaatccag
 gcacaatcccataagggcctaggtctcgttctagggaaatggaaacttadactgtcagaccta
 tcttggaggaagaactcacaagcccccgagtcggtgaatgtgcatctgcttggacatac
 attgattcgagagagaggccacaatgaacctttcagtagacacaaaggacttaaatccagttt
 aggaagactaaaggaaaaaaacaaatagatgggttacttgcacctagggaactggagcat
 gtgtttgggaacgattggacactaatgttatcaacaatttatatcagagtgcacataaagc
 gagattcagaaacctggccaaagaaaacaaggtttattgggggaggggggaatgggaggt
 tttagtactctgctgggcactgttgcacatgcgtgtttgagctctatggttagtgaagaa
 atacaaatatgcaaatatgcttgtctgttctcaacactcataagaactgtttgcatttt
 tcatctcttggaaataatctagactttttttttaggaatggaaagtattctcaggagggga
 agaagaactcataatatctgtctgactgttctccatttggaccgagacacatttagtttga
 taccactcaagaactgaattttatttcttcttatgttttttccagtaaaagggaagatcaa
 aaactagccgaatcagttctacactgtggatttcaaaaagcacagggaaggaaagtggca
 tggagggtataataatgaactggcatgttctggaaaaataaaatagttttgaatcgtttg
 atcaatgttaagggaatggcatcatcaccttggaaatggcttgaaatctcaaaaggatctgcaa
 gatggactgtgaagctcccccttgaggcaaatgtcaaaaataatttttagaagtttatagtt
 tcaactacaacatatgctgagtgagacctgggttactctctcaaaaggatcacctaaattt
 catgtaaaagaaatggaccatgcggatataatttctgtggaccaatctggaatccctgtg
 ttgggagtagttactcttgcctctcttcttttttcatcttccataaaattttgatctatgtc
 atgtaatatataaattgtattttcaattttacgggtgtgcagaaacatttccactttgcaaaagt
 gtttgatgaaaaatagagtgttctgatatttatatttatgacatttgatttttcatatata
 agtgtttttcattaaaaactgaattcacacagacacaaagaaatccttgcatagggaaaaac
 atttctttggtaggtagttcatgtttgttctgtttcttctgtttgggttcgataaagt
 taggaagtattctcagaaataagaaactatttccattgactgtgctgtlaatctgctgaaa
 cactttacttagaggcaagaactgttcaacttcaattgtgcaagacagtgcccttacaat
 tacttcttaatttataaataaacagatttttgaataaagtatctttaaataacttctgtat
 agacaccaatagagtttaaccttgaaaaaaatggcatctgcagtacaaatcacagggtcttc
 acatgttgcctatagaatttgcaaatagctccccagagtgtaggaatcaatgtggctcct
 ccttttcaatcaaacagagtagaactatttgaaggctttggagtcagacagttgctgtttgg
 ctgaggttctcctaactgaatttagcctgtataatatataaagctcaatgggtttccagca
 gtgtgatgctaaagcagaacacactgatattaatgattaaaagaagaagaagaagaaaaac
 aaaactacaaatcacatcatttaattgggcccagggaactcgaggttgcgtgatgtttgcttat
 ctttgatgagtggttgtttgtggttgtgaactgtggcttctctctgtctgatggagtttcc
 tcaacacgttagcacttgttctctcaagagagttgttaactattttgtcttcaaatgtccc
 tgtgtcacttttagccaaataaagagttcttgttctgaagaatgatctttgggtgttgc
 tacattcttbaagggaaccaaggccagatgtgtttcatcattacctgaggaatgaatcaaa
 cattgcatgtgaagagcccagacagcggcagatctgaagggaacagggaatgtttcttctt
 ctctgtcagttcttgttcagtttagacagtccttaagtagacttgggttttccaaaacagag
 gcaaaaatgggctctcagatcttttctgctgcttggagactgaatggacaaactgcattc
 taagctcagctgccccacttagctccatccttttgggtcaaatgggaggccagctgttt
 ggaactatgttttgcctgtatgccaaactccactcgtttctccatttagctatccagaact
 ctacacagctgaaggatggaagcacaaaactgaaagggaaggctgggtgtttcttttattat
 caaggctcaggaaagcatccagtggttaatggcaaaactccatctgtgacaagggtgggaaaa
 caattctctgtcctctttaaagatgggtgatgataccatctttgaaaagggtttgtaaagt
 tttagctggcccttgcaaaaacgggtacatgatgtaactgctctgtattttcagaacata

Fig. 12B

[illegible]

Fig. 12C

gtatggatttacccttttaatacttttagactatgattggccattttgggtgacagacgtagt
 agaaacaaactgtaagaaaaagatgaactgatgaagacccgcttccagttctcatctactt
 cagggctgttcagtgacaagcccttctatgaggctgtgaaatttcattctggaaagcaaat
 gggcttacgctggtaaaagaggcagacatgtgcgtagcgactataaaataacgactacgc
 gtaaaactactgaaatcacatcgccctatagttttgaaatttggtttttccaaagccaggaa
 aacttacattaaaaaataaaattgtttacgagggtttatatacaatttgaccagcagagggc
 aatggttacaccaggaatcataacactgccactattctgcctctgoggatataccacacat
 taaatatgttatatgtgtgcccacacatagaattaaatgctctacacttatgtacttac
 ttaaatgacgtgtgcatgttgcttgagtactcttactttggaaaaaggataaaagaaaaa
 aaaaaaacacaaaaacaaagctatgtgctcactaaaagcaactccatagtttttagaacacg
 aatggtaaaagcttattttaaaaaagaacgtacgacattctattatcaacattctctttta
 atataagacaacttcaatagaaatataagaaaaatgtactttgtgaatgatcagttattct
 atatacctctctataaaatgcttcgaaaatctcaattaatctcccttttgatgctcaggt
 gtgttttgaaagaaaagtaggctacaggatgcattgtaggatactttcaagttctcacaaat
 ggcgttttcaaatctacagtgctcatttaataaaaaatccatattcagaatggctcctggga
 cagtgttactggccttagaaagggaacacagtgcttaaatatttttaatacgaacacataa
 gcagtttaataagctcattggccatctcacagaaatttcacattttctccgataacctcttc
 ctattttgttacagcttttagaagaaggataccctccaaagcactatttttccatctt
 acactaaatgccacaattatataacatttaactaagggaactgaataaatcaatatgt
 ctcaattttgectgctcagttataatagggecaattaaagaaaggattgaagacatttagc
 taactggcttttttgggtgtaaatgagcataaaagggtacatctatataaagtctttctttt
 ttcaactaccatgaatataagttataatcgtggcaactaatattagttgaaactgtcacctg
 actcctacaactttgtagcagatgctcagctgggtcttcatgtgggtccctgacaattg
 tagcaggcactgtctctgaatctattgectgaacctggatcccttccctctagctgaact
 gecttgttgggctcagtggaagggtgcaacttagtccctgcaacagtttgatctgcttgg
 gcaggttggtaaccggatgtgtgtgaggccttccatctcaggagggatagttggggagg
 ggctggggaggatgagcctgggagggagggagggtgctgcaatcagggatgtaaag
 tgaataaataaattaaagaaaaaaagaaaaaaaggaaataatacggttttctctgaaaga
 ggcattcaatttaattgaatggctttaaactttgttttctcttcttactaatatttaca
 tctaggaacctgaataggtagaattctcagcataccggagaacctgggctctcagaac
 gccttattagaaagggaagtgtgaaacctgtgtgaaaacttccaggtggattgggtcaaa
 cccactgggatcgctatctgtcaacactgacagacagtgctaaaccccaagattctctcg
 cagatactaaatgtagagcttacaattttgttttattgtctgagctttggggagtgctga
 ctttctctgagcagtggaataagctgatgtgttttaacgtcaagttctgttaagtaagtg
 tactggtaacaggatgctaactgttaagagtgaattctgatgtctctttgcagtcattt
 ctcatcccgagtttatctgtagtgggaatatgagattcagaggccaatttccctcagttct
 aaacaaaaatcactactaatgtctaataggagaaattacataatatactatgacagaat
 ttttgaatlagagggaaggatgctgattttttaacttccaaaaaagggtataagagaaga
 tctagcttaaaatagcaaaaaaaagatacaatataggactaatttatatttttttaaat
 atattcatattttgtttgctaagaaagataaaccccttgattctcacgtaaaccccttgcct
 ttgatgggtgtctgaggcgtattttatctctattttattctaaaacttacaattttattttcat
 gatatttagagcttttagagtatgagactaagaacagttatttggtatatcatcttccctct
 ctgtatgtcataacagcaatggcttaaaaacagtaaattagaactgtcttatataaatgaag
 atcaaaacatccatcaggaaaaaacaaacccatattgtttgttgacattacacaaataaa
 agccaggcagtggtggcacataccttttaattccagcacttgggaggcagaggcaggcgga
 tttctgagtttgagaccagcctggctacagagtgagttccaggacagccagggtacac
 agagaaacccctgtctcaaaacaaacaaaaagcaagcaagcaagcaagcaagcaagcaac
 aacaagcaaaagaaattgaaaaaaatttcaaatgtatgtgtgtcaatgtgtgtgtggcact
 gacacattaatggctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctatata
 tatatatatatatatatatatatatatatatatatatatatatatatatatatatatat
 cctatgtaccaataaaaaataaaacatctctggcaccacccataggagttagttatcaagctt
 ccattaggggcttgggttactctcacaaatgggtccacctccggtagatgatattggcatt
 gatgagtttgcactcctaaggtagaataaacgacatatgaacaggagataaaattacca
 cattaatgctacattttcattatttggtgagacataattggaagttaaattatgttaatac
 ttgggaaaagtggagggcagagaaactgggcaggatctattgtataagggaagaattccat
 tttcaatagataaataatcaacaataattatagaccgttagcaaaattattacttaggac
 attaaatattgtcagtttttgggaaagccttttagtacacgtttgaatatcgtacattata

Fig. 12D

ttacaagggtcgctacacattttctctcgaggatctgattttctgttctgttctgttttcccc
 ttttcaatgctgttgagaggatgtgaatagttttaatggatcagctcatataaaatttgaa
 ttaagtttgatgagaaaaataaatacacccgattataaatttaagcctttctttaaggagg
 tataactcatctttcaagaaaatcaaatcgcttaagaactacacagagtagttctagctt
 tagtagttcggagtttagctttctagtttttttttttggcttttggtatctcattaaattta
 aagtcaaaagcagtcctcaaatccaaggacgaagacaagcgggttgctccgagggcctccata
 acctccatctgcagttgccaactggtagccacccgagggtagacaaaagacacctccatg
 taacacagcatccaatctcttaggctacaacctgtggcatctgcaccatctgctgtgagg
 cttagtgaaggtttctcttaatttaattttactttttatttttaaaatttaactaaatttagt
 taaattaaaatctgaccttttttaaaataaltcttttactcaatcaatatcttagtatta
 atataaaactatgccttttaaatgtgaaagtcagtgggctgaacctgcaaaggggaaaagt
 gatgggttaaaagtgatacaatatgcatgtgggaaatcgtagcagttaaatcaccatcac
 catcaccatcatcatcaccatcaccatcaccatcatcaccatcaccatcaccacacctcac
 cctcaccctcaccctcaccatcaccctcaccctcaccctcaccctcaccatcatcattaccatcac
 caggtttgctctggtttctaggtatatttaattttactgttctctatggttgtaggaga
 caalgtaacctctagctactgaaataaacaagttgagtggtgcttggttgctctccagaata
 tttaatgtctctctggatgatagcaaaataaacaatgtgtttaggtgcacgggaaatg
 gaccaggagcaccctaaattcttatgagcagtgaaaagaaaaacaaatgttcaagaggt
 agttcctctctcttccaaagccttcgtcagacttagcctttatttgcgtgcttccagcca
 ctgaacattatgttgggaaaatagatgctctgtctaatgtcccaatatttgggtatatttc
 acttccacttgataagcaaaataatgcaatgaaagaacacaaagccattaatctctcttt
 acaaaaatatcaaatagattttccgaatcaagagaagtcttgctgtgttatttttggga
 tttgatactatcttctccaaaccacatgagcagaagagttatttccatttaaatagctctat
 gcaatgtattttgctgaagcttaggggaaaaaaagggggggggcagaagtggatgtagaag
 cttagggatgcttgagtcatagaacttctaccgatataaaactagtcacagggtgaagaac
 cacacattttttgtgagagcaaatgtagatcaaggcctctatgttttatcaggggtgtggc
 tctgggtagatcgcatcaacgcacccaggtaaagtatcaggcctcctgaatgttggcttc
 aggcctcagttctggaaattgggttagtgccactgcacgcggggggcggggggtgggtggg
 gtaagtccacagtgatgattactctctaatctctctcagacagcgttctctctctgtt
 tactcgagttacagttccttatctgectacgggtttgcagccttgaggacactttctacg
 tagctctctaagtctcttatcttccaggagacattgtcacagtgctctgtcaacagtagc
 ggcggtcgctccagaagatttaaaatttaaaacgataaaactaccagagccacttagatc
 aaatgggatttgaaagttaggttgcctatccagcgtgctacagtaagaaacctttcaaat
 gatcctaataatttgctatagaaaaggaaacgaggtcgggcccggccaagcttaaggaattc
 gctagcatgcatgttaacggatccttaattaatgtacaggggtcccgtttaaacagtaacg
 ctagggtataacagggtaataataatcgagctgcaggatttcaggggccccggcaggtcaatt
 ctaccgggtaggggaggcgcttttcccaaggcagctctggagcatgcgcttttagcagcccc
 gctgggcacttggcgctacacaagtggcctctggcctcgacacattccacatccacgg
 tagggcccaacgggctccgttctttgggtggcccccttcgcgcacacttctactcctccct
 agtcagggaagttccccccgcgcgcagctcgctcgtgcaggacgtgacaaatggaagt
 agcagctctcactagttctcgtgcagatggacagcaccgctgagcaatggaagcgggtagg
 cctttggggcagcggccaatagcagctttgctccttcgctttctgggctcagaggctggg
 aagggtgggtccggggcggtctcagggcggtctcagggcgggcgggcgggcgccgaag
 gtctctcgggagcccggtctctgcacgcttcaaaagcgcacgtctgcgcgctgttctc
 ctcttctcatctccggcctttcgacctgcagccaatgcacgctccttgccatcatggc
 ctcgtaaccggccatcaacacggctctcggttcgaccaggctgcggttctcgcgcca
 tagcaaccgacgtacggcgttgccgctcgcggcagcaagaagccacgggaagtccgccc
 ggagcagaaaaatgccacgctactgcgggtttatatagacgggtccccacgggatggggaa
 aaccaccaccgcaactgctgggtggcctgggttcgcgcgacgatctcgtctacgtacc
 cgagccgatgacttactggcggtgctgggggttccgagacaatcgcaacatctacac
 cacacaacaccgctcgaccagggtgagatatcggcgggggacgcggcggttggtaatgac
 aagcgcocagatacaaatgggcatgccttatgcggtgacgcagcgcgttctggctcctca
 tatcggggggggagggtgggagctcacatgccccgccccggcctcaccctcatcttcga
 cggcatcccatcgccgctcctgtgtacccggcgcggtacotttatgggagcat
 gacccccaggcgtgctggcgttctggcctcatccgcgcaccttgccccgaccaa
 catcgtgcttggggcccttcgggaggacagacacatcgaccgctggccaaacgcagcg
 ccccgcgagcggctggacctggctatgctggctgcgattcgccgcttcaagggtact

Fig. 12E

tgccaatacgggtgeggatctgcagtgccggcgggtcgtggcgggaggactggggacagct
 ttgggggacggcgggtgccgccccaggggtgccgagccccagagcaacgcgggcccacgacc
 ccataatcggggacacgttatttaccctgtttcgggcccccgaggttgetggcccccaacgg
 cgacctgtataacgtgtttgcctgggccttggacgtcttggccaaacgcctccgttccat
 gcacgtctttatcctggattacgaccaatcgcccgccgggtgcggggaacgccttgcgtga
 acttaccctccgggatgggtccagaccacgtcaccacccccgggtccataccgacgatatg
 cgacctggcgccgacgtttgcccgggagatgggggagggttaactgaggggatcgatccgt
 cctgtaagtctgcagaaattgatgatctattaaacaataaagatgtccactaaaatggaa
 gtttttccctgtcatactttgttaagaagggtgagaacagagtacctacattttgaatgga
 aggattggagctacgggggtgggggtgggggtgggattagataaatgcctgtctttactg
 aaggtctcttactattgtctttatgataatgtttccatagttggatatcataatttaaaaca
 gcaaaaccaaatttaaggccagctcattccctcccactcatgatctatagatctatagatc
 tctcgtgggatcattgtttttctcttgatbccaactttgtggttctaagtactgtggttt
 ccaaatgtgtcagtttcatagcctgaagaacgagatcagcagcctctgttccacatacac
 ttccattctcagttattgttttgccaaagtctctaattccatcagaagctgactctagggccga
 cgcggggcgacccggcgagctccaattcgccctatagttagtgctattacaattcactg
 ccgctcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaacccctggcgttaaccaacttaactgcctt
 gcagcacatcccccttgcgcagctggcgttaatagcgaagaggcccgccacccgatcgccct
 tcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatgggacgcgcctctgtagcggcgcatthaagc
 gcggcggtgtggtggttaacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagcgccttagcgcgc
 gctcctttcgtttcttcccttcccttctcgcacagttcgcgggtttcccccgtcaagct
 ctaaatcgggggctccctttagggttccgatttagtgctttaecggcacctcgaccccaaa
 aaacttgattagggtgatgggtcacgtagtggggccatcgccctgatagacgggttttgcg
 cctttgacgttggagtccacgttctttaatagtggactctgttccaaactggaacaaaca
 ctcaacccctatctcgggtctattcttttgatttataagggtttttgcccatttccggctat
 tgggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttaacgcgaattttaacaaaaatattaaag
 cttacaatttaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcgggaacccctatttgtttatctt
 tctaaatcacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaacctgataaatgcttcaat
 aatattgaaaaaggaagagtatgagttattcaacatttccgtgtcgccttattccctttt
 ttgoggcattttgccttccctgtttttgctcaccacagaaacgctgggtgaaagttaaagatg
 ctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaaga
 tcccttgagagttttcgcocccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgc
 tatgtggcggggtattatcccgatttgacgcggggcaagagcaactcgggtcgcgcatac
 actattctcagaatgacttgggtgagtaactcaacagtcacagaaaagcatcttacggatg
 gcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataaacactgcggcca
 acttacttctgacaaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgacaaacatgg
 gggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaacccggagctgaatgaagccataccaaacg
 acgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaaactattaaactg
 gcgaactacttactctagcttccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaag
 ttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttatttctgataaaatctg
 gagccgggtgagcgtgggtctcgcgggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccct
 cccgtatcgtagtattctacacgaacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagac
 agatcgtgagatagggtgcctcactgatttaagcatttggttaactgtcagaccaagtttact
 catatatacttttagattgattttaaacttcatttttbaattttaaaggatctagggtgaaga
 tccctttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgt
 cagaccccgtagaaaagatcaaaggatctctcttgagatcccttttttctgcgcgttaactc
 gctgcttgcaaaaaaaaccacgcctaccagcgggtggtttgtttgcgggatcaagagc
 taccacactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtcc
 ttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacc
 tcgctctgctaactcctgttaccagtggtcgtgcagtgggcgataagtcggtcttaccg
 ggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggctgaacgggggggtt
 cgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtg
 agctatgagaaagcgcacgccttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggtaagcg
 gcaggggtcggaacaggagagcgcacagggagcttccagggggaaacgcctggtatcttt
 atagtccgtcgggtttcgcacacctctgacttgagcgtcgattttttgtgatgctcgtcag
 gggggcggagcctatggaaaaacgcgcagcaacgcggcctttttacgggttccctggcctttt
 gctgggccttttgcacatgttcttccctgcgttatccctgattctgtggataaacgta

Fig. 12F

```

ttaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagt
cagtgagcgcaggaagcggaagagcgcccaatacgcgaacgcctctccccgcgcgttggc
cgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgca
acgcaattaatgtgagtttagctcactcattaggcaccccaggtttacactttatgcttc
cggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatg
accatgattacgccaagctcgaaattaacctcactaaagggaacaaaagctgtcgagat
ctagatatcgatggccatag

```

Fig. 12G

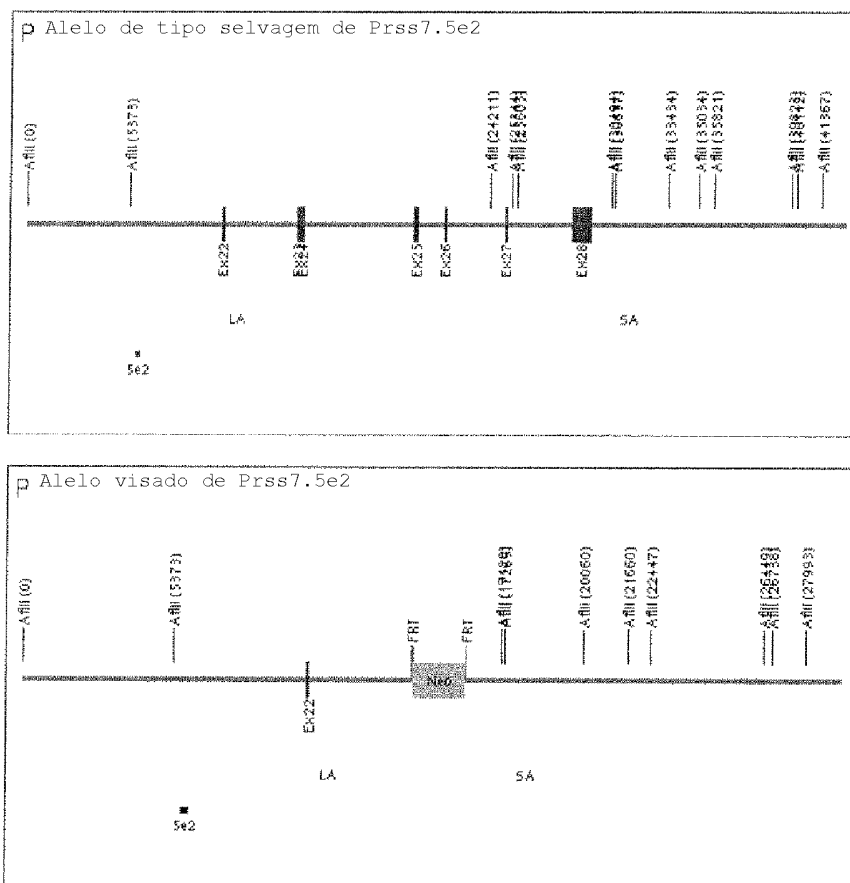


Fig. 13

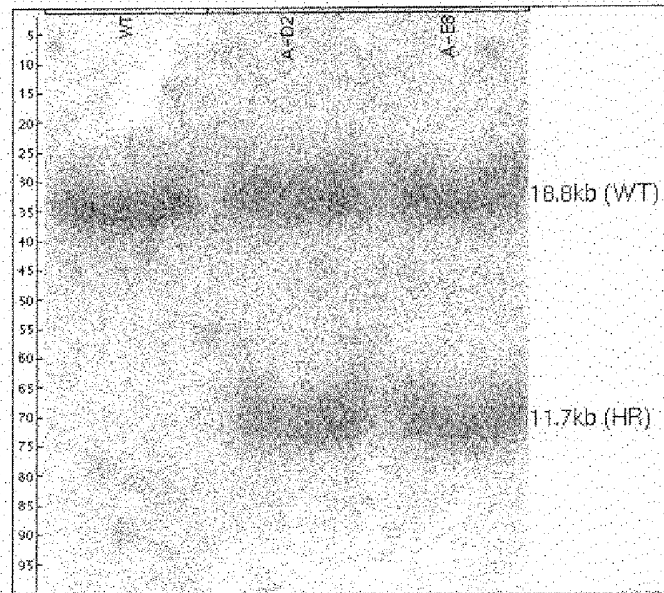


Fig. 14

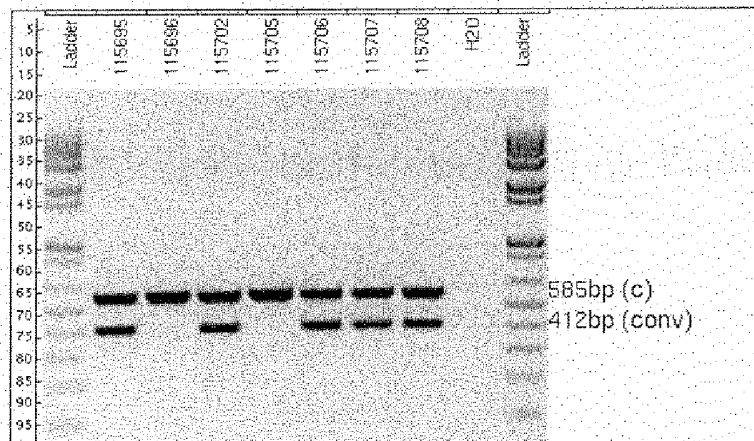


Fig. 15

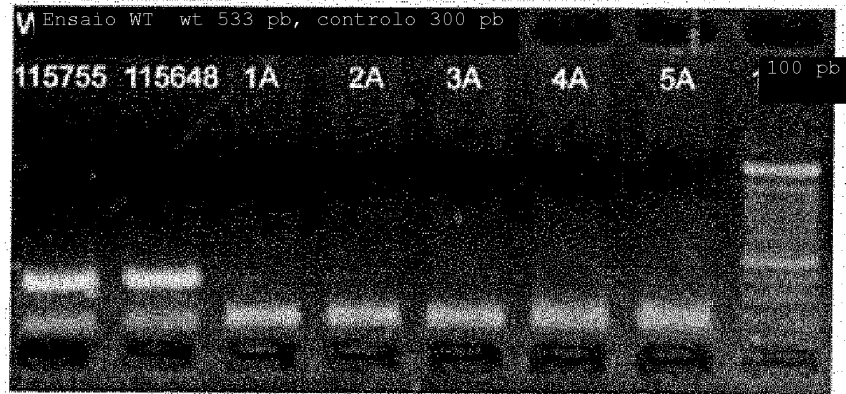


Fig. 16

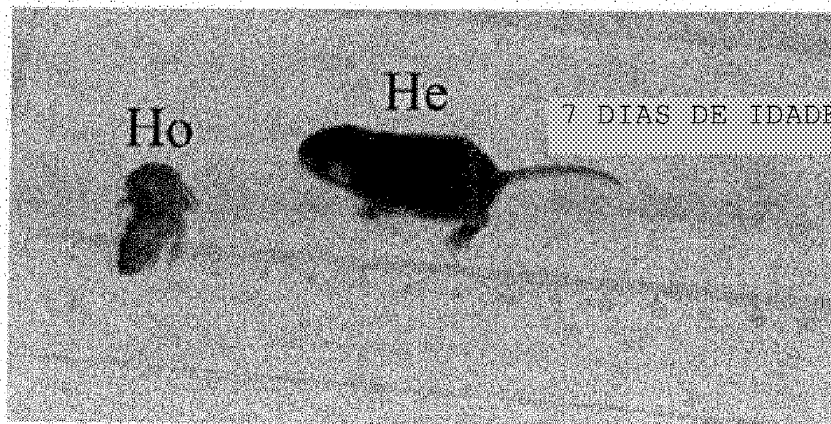


Fig. 17

accacc	atg	aat	cca	ctc	ctg	atc	ctt	acc	ttt	gtg	gca	gct	gct	ctt	48	
Ala	Met	Asn	Pro	Leu	Leu	Ile	Leu	Thr	Phe	Val	Ala	Ala	Ala	Leu		
15	1				5					10						
gct	gcc	ccc	ttt	gat	gat	gat	gac	aag	atc	gtt	ggg	ggc	tac	aac	tgt	96
Ala	Ala	Pro	Phe	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Ile	Val	Gly	Gly	Tyr	Asn	Cys	
15				20				25					30			
gag	gag	aat	tct	gtc	ccc	tac	cag	gtg	tcc	ctg	aat	tct	ggc	tac	cac	144
Glu	Glu	Asn	Ser	Val	Pro	Tyr	Gln	Val	Ser	Leu	Asn	Ser	Gly	Tyr	His	
			35					40					45			
ttc	tgt	ggt	ggc	tcc	ctc	atc	aac	gaa	cag	tgg	gtg	gta	tca	gca	ggc	192
Phe	Cys	Gly	Gly	Ser	Leu	Ile	Asn	Glu	Gln	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Gly	
		50					55					60				
cac	tgc	tac	aag	tcc	cgc	atc	cag	gtg	aga	ctg	gga	gag	cac	aac	atc	240
His	Cys	Tyr	Lys	Ser	Arg	Ile	Gln	Val	Arg	Leu	Gly	Glu	His	Asn	Ile	
	65					70				75						
gaa	gtc	ctg	gag	ggg	aat	gag	cag	ttc	atc	aat	gca	gcc	aag	atc	atc	288
Glu	Val	Leu	Glu	Gly	Asn	Glu	Gln	Phe	Ile	Asn	Ala	Ala	Lys	Ile	Ile	
	80				85					90						
cgc	cac	ccc	caa	tac	gac	agg	aag	act	ctg	aac	aat	gac	atc	atg	tta	336
Arg	His	Pro	Gln	Tyr	Asp	Arg	Lys	Thr	Leu	Asn	Asn	Asp	Ile	Met	Leu	
95				100						105					110	
atc	aag	ctc	tcc	tca	cgt	gca	gta	atc	aac	gcc	cgc	gtg	tcc	acc	atc	384
Ile	Lys	Leu	Ser	Ser	Arg	Ala	Val	Ile	Asn	Ala	Arg	Val	Ser	Thr	Ile	
			115					120					125			
tct	ctg	ccc	acc	gcc	cct	cca	gcc	act	ggc	acg	aag	tgc	ctc	atc	tct	432
Ser	Leu	Pro	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	Thr	Gly	Thr	Lys	Cys	Leu	Ile	Ser	
			130					135					140			
ggc	tgg	ggc	aac	act	gcg	agc	tct	ggc	gcc	gac	tac	cca	gac	gag	ctg	480
Gly	Trp	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Ser	Gly	Ala	Asp	Tyr	Pro	Asp	Glu	Leu	
	145					150					155					
cag	tgc	ctg	gac	gct	cct	gtg	ctg	agc	cag	gct	aag	tgt	gaa	gcc	tcc	528
Gln	Cys	Leu	Asp	Ala	Pro	Val	Leu	Ser	Gln	Ala	Lys	Cys	Glu	Ala	Ser	
	160					165					170					
tac	cct	gga	aag	att	acc	agc	aac	atg	ttc	tgt	gtg	ggc	ttc	ctt	gag	576
Tyr	Pro	Gly	Lys	Ile	Thr	Ser	Asn	Met	Phe	Cys	Val	Gly	Phe	Leu	Glu	
175					180					185				190		
gga	ggc	aag	gat	tca	tgt	cag	ggt	gat	tct	ggt	ggc	cct	gtg	gtc	tgc	624
Gly	Gly	Lys	Asp	Ser	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Val	Val	Cys	
			195					200					205			
aat	gga	cag	ctc	caa	gga	gtt	gtc	tcc	tgg	ggt	gat	ggc	tgt	gcc	cag	672
Asn	Gly	Gln	Leu	Gln	Gly	Val	Val	Ser	Trp	Gly	Asp	Gly	Cys	Ala	Gln	
			210					215					220			

Fig. 18A

```
aag aac aag cct gga gtc tac acc aag gtc tac aac tat gtg aaa tgg      720
Lys Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Tyr Asn Tyr Val Lys Trp
      225                      230                      235

att aag aac acc ata gct gcc aat agc taa agccccccagt atctcttcag      770
Ile Lys Asn Thr Ile Ala Ala Asn Ser
      240                      245

tctctataacc aataaaagtga ccctgttctc      800
```

Fig. 18B