



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0918959-9 B1



(22) Data do Depósito: 22/09/2009

(45) Data de Concessão: 27/07/2021

(54) Título: PROTEÍNAS RECOMBINANTES TENDO ATIVIDADE HEMOSTÁTICA E CAPAZES DE INDUZIR AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

(51) Int.Cl.: C07K 14/78; C07K 16/18; A61K 38/04.

(30) Prioridade Unionista: 24/09/2008 FR 085 64 23.

(73) Titular(es): CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE DIJON.

(72) Inventor(es): DAVID VANDROUX; EMMANUEL DE MAISTRE; EDOURD PROST.

(86) Pedido PCT: PCT EP2009062271 de 22/09/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/034718 de 01/04/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 23/03/2011

(57) Resumo: PROTEÍNAS RECOMBINANTES TENDO ATIVIDADE HEMOSTÁTICA E CAPAZES DE INDUZIR AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA. A presente invenção se refere a proteínas recombinantes capazes de induzir a agregação plaquetária e utilizações das mesmas.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para:
**"PROTEÍNAS RECOMBINANTES TENDO ATIVIDADE HEMOSTÁTICA E
CAPAZES DE INDUZIR AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA".**

Campo da Invenção

5 A presente invenção se refere às proteínas
recombinantes compostas pelo conjunto das sequências de
peptídeo descrito para interagir com os receptores do
colágeno de plaqueta. Essas proteínas têm atividade pró-
agregante, independente da formação de uma tripla hélice.
10 Elas podem ser produzidas em bactérias e em células de
mamíferos.

Antecedentes da Invenção

 Colágenos são os principais componentes estruturais da
matriz extracelular de todos os organismos multicelulares.
15 Eles são uma família de proteínas composta de 28 tipos
diferentes que desempenham um papel durante o
desenvolvimento e na homeostase tecidual. Eles são capazes
de serem montados em várias estruturas supramoleculares sob
a forma de fibrilas, microfibrilas ou redes.

20 Colágenos têm a característica comum de conter um ou
mais domínios que têm uma estrutura de tripla hélice
formada por três cadeias polipeptídicas, ou cadeias α ,
enroladas em conjunto. Como todos os três são aminoácidos,
esta característica é habilitada pela presença de uma

glicina nas porções helicoidais motivos que consistem de sequências G-X-Y repetidas, onde X é frequentemente uma prolina e Y uma hidroxiprolina. Esta hidroxiprolina é essencial para a estabilização da tripla hélice e é característica dos colágenos. Os resíduos de prolina são hidroxilados principalmente por prolil-4-hidroxilase (P-4-H) em 4-hidroxiprolina. Há uma segunda hidroxilase, prolil-3-hidroxilase, que permite a hidroxilação da prolina quando ela está na posição X, enquanto que na posição Y uma prolina hidroxilada por P-4-H já é encontrada. Em uma molécula de colágeno, as cadeias alfa podem ser idênticas ou diferentes.

Moléculas de colágeno são formadas de domínios helicoidais (ou domínios colágenos) flanqueadas pelos domínios não-helicoidais, chamados de propeptídeos N- e C-. O reconhecimento das três cadeias α que formam uma molécula e o início das suas montagens estão sob o controle da extremidade C-terminal (propeptídeo C). Este processo é realizado no retículo endoplasmático. Subsequentemente, os propeptídeos N- e C- são retirados durante a maturação do colágeno, deixando sequências não-helicoidais curtas, os telopeptídeos.

Colágenos desempenham um papel importante nas paredes dos vasos, mantendo a integridade e elasticidade dos

mesmos. Esta parede é formada por colágeno tipo I e colágeno tipo III, que são fibrilares, e de colágeno tipo IV, em forma de rede. Deve-se observar que o colágeno tipo III também é fortemente expresso em placas de ateroma. Além disso, os colágenos são capazes de modular as funções de células determinadas pela interação direta com receptores celulares específicos. Assim, o colágeno, principalmente dos tipos I e III, são potentes ativadores da função plaquetária.

Colágeno tipo III é um homotrímero composto por três cadeias $\alpha 1$ dispostas em uma tripla hélice. Dois tripletes G-P-P (potencialmente hidroxilado), presentes na extremidade C-terminal das cadeias $\alpha 1$, são então suficientes e necessários para a nucleação e o dobramento da tripla hélice (Bulleid et al., *EMBO J.* 1997 Nov 17; 16(22): 6694-701). Por outro lado, estes dois tripletes não são suficientes para permitir a combinação inicial das três cadeias. É interessante verificar que Bulleid et al. (1997) observaram maior eficiência de formação de tripla hélice quando três tripletes são mantidos, e essa eficiência é ainda maior do que para a molécula selvagem. Várias proteínas estão envolvidas no processo de montagem das cadeias monoméricas: HSP47 (proteína de choque térmico) e PDI (proteína dissulfeto isomerase). Propeptídeo C, situado

na extremidade C-terminal das cadeias monoméricas, aparece envolvido no alinhamento das cadeias α e a formação das pontes dissulfeto necessárias para a estabilização da proteína (Bulleid et al., *EMBO J.* 1997 Nov 17; 16(22): 6694-701). Este propeptídeo C é, desta forma, necessário apenas para assegurar a combinação das cadeias monoméricas. Vários pontos devem ser lembrados em relação a ele:

- Trata-se de uma sequência descontínua de 15 aminoácidos que determina a montagem padrão específica das cadeias $\alpha 1$ (Hulmes DJ, *J Struct Biol.* Jan-Fev 2002; 137(1-2): 2-10).

- Um domínio espiral enovelado localizado no início do propeptídeo-C está envolvido na trimerização do colágeno III (Bulleid et al., *EMBO J.* 17 de novembro de 1997; 16(22): 6694-701). Este domínio é composto por quatro heptapeptídeos (McAlinden et al, *J Biol Chem.* 24 de outubro de 2003; 278(43): 42200-7).

- Ele contém oito resíduos de cisteína, que permitem a formação de pontes dissulfeto intra e intercatenárias.

20 A presença de pontes dissulfeto entre cadeias no C-telopeptídeo ou C-propeptídeo não é necessário para a combinação das cadeias e a formação da tripla hélice (Bulleid et al., *Biochem J.* 1º de Jul 1996; 317(Pt 1): 195-202). Deve-se notar que os experimentos são realizados com

o N-propeptídeo. As noções de trímero e de alfa-tripla hélice parecem paradoxalmente independentes. Na ausência de N-propeptídeo, parece sensato deixar ou a cisteína 2 do C-propeptídeo, ou as duas cisteínas do C-telopeptídeo. Esta
5 última porção, chamada de seqüência nó (GPCCG), permite a formação de pontes dissulfeto apenas em virtude de um fenômeno preliminar de montagem e dobramento das cadeias α 1 (Boudko e Engel, *J Mol Biol.* 30 Jan 2004; 335(5): 1289-97).

Seja de origem traumática ou a consequência da
10 aterosclerose, os danos à parede arterial são acompanhados pela destruição do endotélio vascular e exposição dos componentes trombogênicos, como o colágeno. Isto é seguido pela adesão de plaquetas no local danificado, em contato com superfícies ricas em colágeno ou fragmentos de
15 colágeno, a sua ativação e a formação de um trombo. A adesão e estabilização das plaquetas em contato com este colágeno são permitidos por meio de interações múltiplas, de afinidades altas, entre os receptores presentes na superfície das plaquetas e o colágeno. Esta adesão pode
20 ocorrer de forma indireta, após a ligação do domínio A1 do fator de von Willebrand (vWF) com o complexo plaquetário formado de glicoproteínas (Gp) GPIb-V-IX, em si ligado ao colágeno pelo seu domínio A3, ou pela interação direta entre um receptor de plaquetas e colágeno. Vários

receptores podem ligar-se às moléculas de colágeno em sequências peptídicas altamente específicas, ou seja, a integrina $\alpha 2\beta 1$, que desempenha um papel importante na estabilização das plaquetas em contato com o colágeno, e GpVI, considerado o mais importante para o receptor para a 5 ativação plaquetária. Outro receptor, TIIICBP (proteína de ligação ao colágeno tipo III), tem sido descrito como sendo capaz de se ligar ao colágeno diretamente.

A taxa de fluxo do vaso sanguíneo é um determinante principal que define o tipo de receptores de colágeno das 10 plaquetas recrutados. Com uma taxa de fluxo elevada, as plaquetas interagem com colágeno via vWF através do receptor GpIb e depois elas são ativadas pela ligação via GpVI; a integrina $\alpha 2\beta 1$ intervém apenas como um 15 estabilizador da ligação plaqueta-colágeno. Em uma baixa taxa de fluxo, as plaquetas se ligam ao colágeno através da integrina $\alpha 2\beta 1$, seguido pela ligação ao GpVI, levando assim à ativação das mesmas, que é a etapa que prepara a agregação plaquetária. Da mesma forma, outros receptores de 20 colágeno das plaquetas estão envolvidas, tais como TIIICBP. Em todos os casos, GpVI desempenha um importante papel na ativação plaquetária.

A adesão plaquetária é um processo que agora está dissociado da ativação plaquetária. De fato, muitos

peptídeos, correspondendo às porções de peptídeo curto de colágeno, são capazes de induzir a adesão de plaquetas sem levar a ativação das mesmas. No entanto, alguns desses peptídeos têm a capacidade de induzir a ativação 5 plaquetária e exibem uma chamada atividade pró-agregante. Suas estruturas de tripla hélice parecem ser um pré-requisito essencial para esta atividade. Deve-se notar que quando alguns desses peptídeos permanecem na forma monomérica, eles exibem uma atividade anti-agregante por um 10 mecanismo que continua a ser identificado, mas que poderia ser a ocupação dos sítios que se tornam indisponíveis para o colágeno natural.

A maioria dos trabalhos que visam identificar as sequências de peptídeo envolvidas na adesão de plaquetas 15 com o colágeno tipo III usam o fragmento $\alpha 1(\text{III})\text{CB4}$ correspondendo ao fragmento de digestão por CNBr apresentando a maior atividade de agregação.

Várias porções do peptídeo foram descritas nos últimos anos, como sendo capazes de se ligar e ativar as plaquetas. 20 Elas foram testadas sob a forma de peptídeos de duas naturezas possíveis:

- Semelhantes ao colágeno, formados pela repetição de porções GPO conservadas repetidas n vezes, não presentes na sequência natural de colágeno tipo III;

- Ou correspondentes aos peptídeos formados das porções peptídicas presentes na sequência $\alpha 1(\text{III})\text{CB}_4$, principalmente obtidas por síntese química (Farndale et al., *Biochem Soc Trans.* Abr 2008; 36(Pt 2): 241-50).

5 Integrina $\alpha 2\beta 1$ é um receptor para colágenos, laminina e outros ligantes em vários tipos celulares, incluindo células endoteliais e plaquetas. $\alpha 2\beta 1$ se liga ao colágeno através do seu domínio I nas porções dos peptídeos presentes na sequência de colágenos fibrilares. Várias
10 porções foram descritas com maior afinidade por GFOGER presente na cadeia $\alpha 1$ de colágeno tipo-I. Para o colágeno tipo III, e ao contrário do colágeno tipo I, parece que várias porções GXYGER são necessárias para a ótima ligação, com GLOGER, GMOGER, GROGER e GAOGER como as porções
15 principais (Kim et al., *J Biol Chem.* 16 Set 2005; 280(37): 32512-20). Outras porções, como GLOGEN e GLKGEN, foram descritas, mas apresentam baixa afinidade por $\alpha 2\beta 1$ (Raynal et al., *J Biol Chem.* 17 Fev 2006; 281(7): 3821-31).
Observa-se que todos os peptídeos sintetizados a partir
20 dessas porções apresentam uma atividade de adesão quando elas são organizadas sob a forma de uma hélice tripla.

Glicoproteína VI (GPVI) é uma glicoproteína transmembranar tipo I de 60-65 kDa pertencente à superfamília da imunoglobulina (Ig). Ela é expressa

constitutivamente na superfície das plaquetas na forma de um complexo não-covalente com a cadeia γ comum aos receptores de Ig (FcR γ). Os peptídeos descritos como interativos com estes receptores são peptídeos semelhantes ao colágeno formado a partir da repetição de 4 a 10 tripletes de GPO (Morton et al., *Biochem J.* 1º Mar 1995; 306(Pt 2): 337-44 e Smethurst et al., *J Biol Chem.* 12 Jan 2007; 282(2): 1296-304). Embora compreendendo 10% de porções GPO, o número máximo de repetições deste triplete não ultrapassa três na sequência natural de colágeno tipo III. Deve ainda ser observado aqui que a formação da tripla hélice ou de uma forma polimérica, obtida quimicamente após uma modificação dos resíduos de cisteína ou lisina, é fundamental para conferir a estes peptídeos uma atividade pró-agregadora. Além disso, a presença de uma hidroxiprolina na posição 3 é essencial para esta atividade. Por outro lado, quando estão na forma monomérica, esses peptídeos apresentam uma atividade anti-agregante (Asselin et al., *Biochem J.* 15 Abr 1999; 339 (Pt. 2): 413-8). Recentemente, Jarvis et al. identificaram a porção peptídica na sequência de colágeno tipo III que apresenta a maior atividade de adesão. Ela é composta dos resíduos GAOGLRGGAGPOGPEGGKGAAGPOGPO localizados nos aminoácidos 523 a 549 de $\alpha 1(\text{III})\text{CB4}$ (Jarvis et al., *Blood.*

15 Mai 2008; 111(10): 4986-96). Esta porção peptídica é composta de três GPOs, que não são consecutivos e que parecem ser o número mínimo necessário para uma adequada interação com GpVI.

5 A interação indireta entre o receptor plaquetário GpIb e colágeno é dependente do vWF, que é uma proteína plasmática multimérica secretada pelas células endoteliais e plaquetas, em resposta aos danos vasculares ou após um aumento da pressão parietal. Ela desempenha um papel principal no recrutamento de plaquetas em sítios danificados dos territórios vasculares sujeitos a taxas de fluxo elevadas. Este fator é composto por três domínios chamados A1, A2 e A3. Ele se liga ao colágeno através de seu domínio A3 e se liga ao receptor GpIb pelo seu domínio 10 A1. O colágeno tipo III parece ter um único sítio, de alta afinidade, para o domínio A3 de vWF, que também está presente no colágeno tipo II. Esta porção peptídica está localizada entre os aminoácidos 403 e 413 e é composta por GPRGQOVMGFO, com certos aminoácidos críticos para a ligação 15 ao FvW (*Lisman T et al., Blood. 1º Dez 2006; 108(12): 3753-6*). Verkleij *et al.* identificaram como um sítio de ligação potencial os aminoácidos 541 a 558 compostos por GAAGPOGPOGSAGTOGLQ (*Verkleij et al., Blood. 15 Mai 1998; 91(10): 3808-16*). Esta porção peptídica está localizada 20

entre a porção vWF descrita por Lisman et al. e a porção de ligação $\alpha 1\beta 2$ à integrina GMOGER .

A equipe de Fauvel-Lafève descreveu a existência de um octapeptídeo, KOGEOGPK, situado entre os aminoácidos 655 e 5 662 do fragmento $\alpha 1(\text{III})\text{CB4}$. O receptor plaquetário reconhecido por este octapeptídeo foi identificado e nomeado TIIIICBP (proteína de ligação ao colágeno tipo III) (*Monnet E et al., J Biol Chem. 14 Abr 2000; 275(15): 10912-7*). Este octapeptídeo é capaz de inibir a interação das 10 plaquetas com o colágeno tipo III, mas não com colágeno tipo I, tanto em condições estáticas quanto fluidas. Mais recentemente, Pires et al. mostraram que este octapeptídeo tem uma atividade inibitória sobre a agregação somente quando ele está na forma homotrímera. Pelo contrário, a sua 15 estrutura em tripla hélice formada adicionando a estas extremidades cisteínas e GPP dá-lhe uma atividade pró-agregatória (*Pires et al., Eur J Med Chem. Mai 2007; 42(5): 694-701*).

As propriedades biológicas e ultraestruturais dos 20 colágenos, e notoriamente as suas capacidades de ligação aos receptores de membrana, abrem um vasto campo de aplicações por causa de suas múltiplas funções nos tecidos. No entanto, essas aplicações só têm sentido se for possível ter preparações homogêneas destes colágenos em grandes

quantidades e de forma reprodutível.

Dois métodos de produção foram utilizados para esta finalidade. O trabalho e os desenvolvimentos realizados nessas duas áreas são geralmente altamente direcionados para uma determinada aplicação. Assim, a síntese química
5 pode produzir peptídeos curtos que representam apenas uma pequena parte da proteína, em geral porções peptídicas de interesse. Sua principal aplicação refere-se à hemostasia e, mais precisamente, à modulação da ligação entre o
10 colágeno e as plaquetas.

No entanto, esses peptídeos têm em geral apenas uma das atividades procuradas e isso pode depender da conformação tridimensional do peptídeo e, notoriamente, da formação de uma tripla hélice. Assim, há uma necessidade
15 significativa pelo desenvolvimento de proteínas de colágeno recombinantes funcionalizadas que podem ser produzidas por sistemas biológicos que oferecem alta produtividade. Um grande obstáculo são as dificuldades de produção e purificação destas proteínas derivadas do colágeno devido
20 às suas tendências de agregar e aderir.

Até o momento sequências peptídicas curtas (menos de 50 aminoácidos) foram todas produzidas por síntese química, e não através de sistemas de produção celulares (*Farndale et al., Biochem Soc Trans. Abr 2008; 36(Pt 2): 241-50*).

Além disso, estas porções foram sintetizadas de forma isolada. Por outro lado, a síntese de colágeno tipo III recombinante exibindo atividade de ligação plaquetária, foi realizada através de sistemas de produção celulares e é a
5 totalidade da sequência, por exemplo, pro α 1 (III), que foi utilizada. O objetivo visado é a síntese de um procolágeno inteiro passíveis de ser organizado em uma tripla hélice (WO 9 307 889). Estes colágenos recombinantes têm em princípio aplicações múltiplas, nomeadamente aqueles da
10 sequência completa do colágeno.

É, portanto, uma questão de sintetizar proteínas menores de estrutura mais simples que sejam, portanto, menos exigentes em termos de produção, mas que preservem as atividades biológicas de interesse da proteína nativa.

15 Sumário da Invenção

A presente invenção, portanto, se refere às proteínas recombinantes que possuem as porções necessárias para obter uma atividade pró-agregadora, sintetizada na forma de um monômero incapaz de ser estruturado na forma de uma tripla
20 hélice. A impossibilidade de formar esta tripla hélice é a consequência da ausência de: I) porções de reconhecimento de cadeia α entre eles, II) domínios N- e C-terminais de colágeno não-helicoidais, bem como III), dois triplete GPO necessários para a iniciação da tripla hélice.

Surpreendentemente, a atividade pró-agregadora é obtida na ausência da formação de uma tripla hélice.

O depositante demonstrou de maneira surpreendente que é possível unir três tipos de sequências peptídicas dentro
5 de uma única proteína monomérica com atividade pró-agregadora.

As proteínas recombinantes da presente invenção, desta forma, reúnem:

- porções de peptídeo com pelo menos uma repetição dos
10 quatro tripletes GPO,

- sequências peptídicas descritas como tendo atividade de ligação aos vários receptores plaquetários presentes na sequência de colágeno nativa,

- sequências de ligação entre essas porções formadas
15 da repetição de tripletes GXY.

A produção dessas proteínas por bactérias e células de mamíferos faz com que seja possível ter em grandes quantidades esses colágenos recombinantes da nova geração, resultado da combinação de sequências de peptídeo
20 semelhantes ao colágeno e sequências presentes sob a forma natural do colágeno. Estes tipos de proteínas não exigem o favorecimento de células que não produzam colágenos constitutivamente como células hospedeiras para essa produção. Na verdade, suas sequências não permitem o

reconhecimento das cadeias alfa de vários colágenos nativos. Pelo contrário, é necessário favorecer as células produtoras de colágeno que expressam as enzimas-chave da maturação do colágeno, como prolil-4-hidroxilase (P4H) e HSP47. Os sistemas de produção de colágeno recombinantes atuais, ao contrário utilizam células que não produzem naturalmente o colágeno (Olsen et al., *Adv Drug Deliv Rev.* 28 Nov 2003; 55(12): 1547-67 e Ruggiero e Koch, *Methods.* Mai 2008; 45(1): 75-85). Isso envolve co-tansfectar o gene que codifica as enzimas como P4H.

As proteínas recombinantes de acordo com a presente invenção têm muitas vantagens, incluindo:

- reúnem porções de interesse em pequenas proteínas que são mais fáceis de produzir utilizando sistemas de produção celulares,
- atividade pró-agregante, na ausência de uma estrutura de hélice tripla,
- a ausência, em suas sequências de sítios de reconhecimento de colagenase, mas a presença de sítios de reconhecimento de HSP47, permitindo as suas produções pelas células produtoras de colágeno,
- as suas atividades biológicas demonstradas por testes de referência (testes de agregação plaquetária), que são usados para monitorar os atuais tratamentos

antiplaquetários e para explorar as funções plaquetárias.

As propriedades biológicas das proteínas recombinantes de acordo com a presente invenção tornam possível prever muitas aplicações.

5 A primeira aplicação diz respeito à utilização destas proteínas como ferramenta de diagnóstico na exploração da doença trombotica: testes de agregação plaquetária, modelos de trombose *in vitro* e avaliação da eficácia dos tratamentos antiplaquetários atuais (aspirina, clopidogrel)
10 e futuros tratamentos. As proteínas produzidas são derivadas de proteínas humanas e têm em suas sequências sítios de ligação para certos receptores plaquetários descritos por seus papéis na adesão e ativação das plaquetas. Os testes atuais usam colágenos de origem
15 animal, cujas sequências não têm perfeita homologia com as dos seres humanos. Além disso, a variação do número e localização dos sítios de interação do receptor plaquetário entre as várias proteínas torna possível propor testes de validação alvo relevantes. Há fragmentos de peptídeos que
20 tornam possível trabalhar mais especificamente sobre cada receptor plaquetário, mas seus métodos de produção são diferentes da invenção, com a síntese química versus a produção natural por células (importância de modificações pós-tradução).

A presente invenção pode desempenhar uma parte na composição das bandagens hemostáticas (reforçando assim o recrutamento no sítio das plaquetas no caso de lesão vascular), ou dos adesivos hemostáticos para evitar o risco de sangramento (contexto cirúrgico). Os produtos estão atualmente no mercado, mas com um colágeno de origem animal.

Outra aplicação é o uso destas proteínas para ativar a cicatrização. A cicatrização de certas feridas requer a migração, adesão e diferenciação no sítio de certas populações de células, incluindo plaquetas. Estes processos são dependentes das integrinas de superfície dessas células. Certas porções peptídicas presentes na estrutura das proteínas da invenção são, assim, capazes de interagir com estas integrinas, promovendo a cicatrização.

Em um campo muito próximo, estas proteínas recombinantes podem ser propostas na composição de alguns cremes dermatológicos.

Outra aplicação de proteínas que inibem a função plaquetária é o tratamento da aterotrombose. Receptores plaquetários são alvos terapêuticos com um futuro para combater as complicações da doença aterotrombótica. Até o momento, não há nenhuma molécula capaz de bloquear a fase inicial da adesão plaquetária no subendotélio. As várias

estruturas protéicas das proteínas da invenção permitem a interação destas com esses receptores, levando a efeitos anti-adesão de plaquetas (mascaramento de sítio) e/ou efeitos pró-adesão de plaquetas. Os vários efeitos podem ser obtidos com a mesma proteína, modulando suas propriedades físico-químicas.

Esta invenção fornece, deste modo, um reagente biológico com inúmeras aplicações que podem desempenhar um papel na composição dos kits: para avaliar as funções plaquetárias, para ativar a diferenciação de células para o diagnóstico de disfunções hematológicas, para detecção por áreas de imagem de fibrose. Esta invenção também pode entrar na composição de bandagens hemostáticas para o recrutamento no sítio de plaquetas (em caso de lesão vascular), adesivos hemostáticos para evitar o risco de sangramento, ou cremes dermatológicos.

Descrição das sequências

SEQ ID No. 1: Proteína recombinante tipo Coll-III

SEQ ID No. 2: Polinucleotídeo que codifica a proteína recombinante tipo Coll-III

SEQ ID Nos. 3 a 6: Iniciadores

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção diz respeito aos polipeptídeos isolados que têm a sequência do polipeptídeo da SEQ ID No.

1 ou o polipeptídeo da posição 25 até a posição 152 da SEQ ID No. 1.

A presente invenção também diz respeito aos polipeptídeos isolados com pelo menos 70% de identidade em todo seu comprimento com o polipeptídeo da SEQ ID N °1 ou com o polipeptídeo da posição 25 até a posição 152 da SEQ ID No. 1, e capaz de induzir uma agregação de plaquetas de sangue humano superior a 30% em um agregômetro plaquetário a 37 °C com agitação de 1000 rpm.

10 Em uma modalidade preferida, estes polipeptídeos compreendem as seguintes porções peptídicas:

- GX_1X_2GER , em que X_1 e X_2 representam, independentemente, um aminoácido selecionado de A, R, N, D, Q, E, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V e O;

15 - $(GPX_3)_n$, com n entre 4 e 10 e X_3 representando p ou O;

- $GPRGQX_4GVMGFX_5$, onde X_4 e X_5 representam independentemente P ou O.

P é prolina e O é hidroxiprolina.

20 Em outra modalidade preferida, estes polipeptídeos compreendem as seguintes partes peptídicas:

- GAPGER,

- KPGEPGPK,

- $(GPP)_n$ com n entre 4 e 10,

- RGD.

A presente invenção também se refere a um polinucleotídeo isolado caracterizado pelo fato de que codifica um polipeptídeo de acordo com a invenção.

5 Em uma modalidade preferida, o polinucleotídeo tem a seqüência de polinucleotídeo da SEQ ID No. 2.

A invenção também se refere a um anticorpo que se liga especificamente ao polipeptídeo da SEQ ID N ° 1.

A presente invenção também se refere aos cassetes de
10 expressão que compreendem na direção de transcrição:

- um promotor funcional em um organismo hospedeiro,

- um polinucleotídeo de acordo com a presente invenção,

- uma seqüência de terminação funcional no mesmo
15 organismo hospedeiro.

A invenção também se refere a um vetor compreendendo um polinucleotídeo de acordo com a invenção e/ou um cassete de expressão de acordo com a invenção.

A invenção também se refere a um organismo hospedeiro
20 transformado com um polinucleotídeo de acordo com a invenção, um cassete de expressão de acordo com a invenção e/ou um vetor de acordo com a invenção.

A invenção também se refere às composições para uso como um fármaco, que compreendem um polipeptídeo de acordo

com a invenção, um polinucleotídeo de acordo com a invenção, um cassete de expressão de acordo com a invenção, um vetor de acordo com a invenção e/ou um organismo hospedeiro de acordo com a invenção.

5 Em uma modalidade preferida, a invenção se refere às composições para o tratamento de doenças trombóticas.

Em outra modalidade preferida, a presente invenção refere-se às composições para o tratamento de distúrbios da hemostasia.

10 A presente invenção também se refere ao uso dessas composições como um agente de cicatrização.

Por último, a invenção refere-se às composições cosméticas que compreendem um polipeptídeo como descrito acima.

15 A presente invenção diz respeito aos polipeptídeos isolados que têm a sequência do polipeptídeo da SEQ ID No. 1 ou o polipeptídeo da posição 25 até a posição 152 da SEQ ID No. 1.

20 O peptídeo da posição 1 até a posição 24 da SEQ ID No. 1 corresponde ao peptídeo sinal que permite a secreção de proteínas recombinantes por uma célula hospedeira. Este peptídeo sinal pode estar ausente ou ser substituído por outro peptídeo sinal de acordo com técnicas bem conhecidas para a pessoa versada na técnica. A pessoa versada na

técnica será capaz de escolher o peptídeo de sinal homólogo ou heterólogo adequado para a expressão e a secreção de polipeptídeos da presente invenção em vários sistemas de expressão procarióticos ou eucarióticos. Preferivelmente, os polipeptídeos da presente invenção são produzidos em células eucarióticas, ou organismos e, em particular, em células de mamíferos. Em uma modalidade particular da invenção, os polinucleotídeos da presente invenção compreendem um peptídeo sinal que permite a secreção destes no meio extracelular. Em outra modalidade, a invenção refere-se ao polipeptídeo maduro obtido após clivagem do peptídeo sinal.

Os polipeptídeos da presente invenção têm uma atividade biológica e, notoriamente, uma atividade pró-agregante nas plaquetas do sangue humano detectada usando um agregômetro de plaquetas (Regulest, Florange, França), de acordo com a técnica de referência (Born, 1962). Plasma rico em plaquetas (PRP) é colocado em contato com um agonista (10 μ L em 290 μ L de PRP) e a limpeza do meio (relacionada com a formação de agregados que caem para o fundo do tubo) é monitorada em tempo real (curva de agregação). Na ausência da agregação plaquetária, o sinal permanece plano (meio turvo persistente). É possível verificar a ausência ou presença de agregados, através de

exame do tubo no final da medição. A avaliação da resposta do teste de agregação plaquetária é realizada a 37 °C, com agitação contínua (1000 rpm). O aparelho é calibrado da seguinte forma: agregação de 0% com plasma rico em 5 plaquetas (preparação obtida por centrifugação lenta e concentração ajustada para $300 \times 10^9/L$) e agregação de 100% com plasma pobre em plaquetas (preparação obtida por centrifugação rápida). A qualidade das preparações de plaquetas foi validada através da verificação da resposta 10 aos agonistas de referência (5 μM de ADP e 1 $\mu g/mL$ de colágeno), utilizada para o desenvolvimento da terapêutica antiplaquetária. Uma proteína é considerada pró-agregante quando é capaz de induzir a agregação maior do que 30%, e de forma irreversível.

15 As porções do peptídeo de reconhecimento do receptor expressas na superfície de muitos tipos celulares, conferem no polipeptídeo atividade dos seguintes tipos:

- adesão celular,
- recrutamento de células.

20 O efeito pró-agregante do polipeptídeo, independente de sua estrutura de tripla hélice, é a consequência da ativação de um ou mais receptores presentes na superfície plaquetária ($\alpha 1\beta 2$, TIIICBP e GPVI).

A presente invenção também se refere aos fragmentos do

polipeptídeo da SEQ ID No. 1 que preservam pelo menos uma das atividades do polipeptídeo da SEQ ID No. 1. O termo "fragmento" de um polipeptídeo indica um polipeptídeo compreendendo uma parte, mas não a totalidade do polipeptídeo a partir do qual é derivado. A invenção, portanto, refere-se a um polipeptídeo compreendendo um fragmento de pelo menos 100, 110, 120, 130, 140 ou 150 aminoácidos do polipeptídeo da SEQ ID No. 1.

Esses fragmentos do polipeptídeo da SEQ ID No. 1 preservam pelo menos uma das atividades do polipeptídeo da SEQ ID No. 1, na atividade pró-agregante particular nas plaquetas de sangue humano. A invenção refere-se, portanto, aos fragmentos biologicamente ativos do polipeptídeo da SEQ ID No. 1. O termo "fragmento biologicamente ativo" indica um fragmento de um polipeptídeo que preserva a função do polipeptídeo a partir do qual ele é derivado. Os fragmentos biologicamente ativos do polipeptídeo da SEQ ID No. 1, assim, preservam pelo menos uma das funções deste polipeptídeo e, de preferência, preservam todas as atividades biológicas do polipeptídeo da SEQ ID NO. 1. Os métodos para a preparação dos fragmentos de um polipeptídeo, bem como as técnicas para medir as atividades biológicas dos polipeptídeos da presente invenção, são bem conhecidos para um técnico versado no assunto. A invenção

também se refere aos polipeptídeos que têm pelo menos uma das atividades do polipeptídeo da SEQ ID No. 1, e com aminoácidos pelo menos 70% idênticos ao polipeptídeo da SEQ ID No. 1. Preferencialmente, estes polipeptídeos têm as mesmas propriedades e, notoriamente, as mesmas atividades biológicas que o polipeptídeo da SEQ ID No. 1. A invenção refere-se aos polipeptídeos com aminoácidos pelo menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98% e, preferencialmente, pelo menos 99% idênticos ao polipeptídeo da SEQ ID No. 1. "Aminoácidos idênticos" significa aminoácidos que são invariáveis ou inalterado entre duas sequências. Estes polipeptídeos podem ter uma exclusão, uma adição ou uma substituição de pelo menos um aminoácido em relação ao polipeptídeo da SEQ ID No. 1.

15 A presente invenção também se refere aos polipeptídeos com pelo menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98% e, preferencialmente, pelo menos 99% de homologia com o polipeptídeo da SEQ ID No. 1. "Homologia" significa a medida da semelhança entre as sequências de proteínas.

20 Estes polipeptídeos podem ter uma exclusão, uma adição ou uma substituição de pelo menos um aminoácido em relação ao polipeptídeo da SEQ ID No. 1. O grau de homologia entre duas sequências, quantificado por uma pontuação, é com base na porcentagem de identidades e/ou preservação das

substituições das sequências.

Os polipeptídeos da presente invenção com certo grau de homologia ou identidade com o polipeptídeo da SEQ ID No. 1, compreendem, pelo menos, 100 ou 150 aminoácidos.

5 Métodos para medir e identificar o grau de identidade e o grau de homologia entre os polipeptídeos são conhecidos pelas pessoas versadas na técnica. A ferramenta de alinhamento AlignX (algoritmo Clustal W) do pacote de software Vector NTI 9.1.0 (Invitrogen INFORMAX,
10 <http://www.invitrogen.com>), por exemplo, pode ser usada, de preferência usando as configurações padrão.

Os polipeptídeos de acordo com a presente invenção são isolados ou purificadas a partir de seu ambiente natural. Os polipeptídeos podem ser preparados por meio de vários
15 métodos. Estes métodos são, notoriamente, a produção de polipeptídeos recombinantes por células hospedeiras adequadas e suas subseqüentes purificações, a produção por síntese química ou, finalmente, uma combinação destas várias abordagens. Esses vários métodos de produção são bem
20 conhecidos pela pessoa versada na técnica. Preferivelmente, os polipeptídeos da presente invenção são produzidos por células procarióticas ou eucarióticas recombinantes. Os polipeptídeos da presente invenção podem, deste modo, ser produzidos em bactérias ou em células de mamíferos.

A presente invenção também se refere às proteínas de fusão, proteínas ou proteínas quiméricas compreendendo os polipeptídeos de acordo com a invenção. O termo "polipeptídeo" indica proteínas, bem como polipeptídeos modificados.

Em uma modalidade da presente invenção, os polipeptídeos de acordo com a invenção são glicosilados. O polipeptídeo da SEQ ID No. 1 tem notoriamente sítios de O-glicosilação nos ácidos aminados lisina presentes nas posições 102 e 141 (na posição 3 de um triplete GXY). Em uma modalidade preferida, o resíduo de asparagina na posição 93 do polipeptídeo da SEQ ID No. 1 é glicosilado.

A invenção também se refere aos polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos acima definidos. De acordo com a presente invenção, "polinucleotídeo" significa uma cadeia de nucleotídeos de fita única ou o seu complemento de DNA ou RNA, ou uma cadeia de nucleotídeos de fita dupla que pode ser de DNA complementar ou genômico. Preferencialmente, os polinucleotídeos da invenção são DNA, em particular DNA de fita dupla. O termo "polinucleotídeo" também significa polinucleotídeos modificados. Os polinucleotídeos da presente invenção são isolados ou purificados a partir de seu ambiente natural. Preferencialmente, os polinucleotídeos da presente invenção

podem ser preparados por técnicas de biologia molecular clássicas, como descrito por Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989) ou por síntese química.

Em uma primeira modalidade, a presente invenção se refere ao polinucleotídeo da SEQ ID No. 2. Em uma segunda modalidade, a invenção refere-se ao polinucleotídeo da SEQ ID No. 2, cuja sequência encontra-se entre a posição 73 e a posição 459 da SEQ ID No. 1. Estes polinucleotídeos codificam os polipeptídeos acima definidos.

A presente invenção também se refere aos polinucleotídeos com pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% e, de preferência, 99% de identidade com o polinucleotídeo da SEQ ID No. 2 ou com o polinucleotídeo cuja sequência se encontra entre a posição 73 e a posição 459 da SEQ ID No. 2. Estes polinucleotídeos codificam de preferência um polipeptídeo que preserva as atividades biológicas do polipeptídeo da SEQ ID No. 1.

"Nucleotídeos idênticos" significa nucleotídeos que são invariáveis ou inalterados entre duas sequências. Estes polinucleotídeos podem ter uma exclusão, uma adição ou uma substituição de pelo menos um nucleotídeo em comparação com o polinucleotídeo de referência.

A presente invenção também refere-se aos polinucleotídeos com pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%,

95%, 98% e, de preferência, pelo menos 99% de homologia com o polinucleotídeo da SEQ ID NO. 2 ou com o polinucleotídeo cuja sequência encontra-se entre a posição 73 e a posição 459 da SEQ ID No. 2. Estes polinucleotídeos codificam de preferência um polipeptídeo que preserva as atividades biológicas do polipeptídeo da SEQ ID No. 1.

"Homologia" significa a medida da semelhança entre as sequências nucleicas. Estes polinucleotídeos podem ter uma exclusão, uma adição ou uma substituição de pelo menos um nucleotídeo em comparação com o polinucleotídeo de referência. O grau de homologia entre duas sequências, quantificado por uma pontuação, é com base na porcentagem de idênticas e/ou substituições de preservação das sequências.

Métodos para medir e identificar o grau de identidade e do grau de homologia entre as sequências de ácidos nucleicos são bem conhecidos para a pessoa versada na técnica. A ferramenta de alinhamento AlignX (algoritmo Clustal W) do pacote de software Vector NTI 9.1.0 (Invitrogen INFORMAX, <http://www.invitrogen.com>), por exemplo, pode ser usada, de preferência usando os parâmetros predefinidos.

A presente invenção também se refere aos polinucleotídeos capazes de hibridizar seletivamente com o

polinucleotídeo da SEQ ID NO. 2 ou com o polinucleotídeo cuja seqüência encontra-se entre a posição 73 e a posição 459 da SEQ ID No. 2. De preferência, a hibridização seletiva é realizada sob condições de estringência média e preferencialmente sob condições de alta estringência. Estes polinucleotídeos codificam de preferência polipeptídeos tendo as atividades biológicas do polipeptídeo da SEQ ID No. 1. "Seqüência capaz de hibridar seletivamente" significa, de acordo com a presente invenção, as seqüências que hibridizam com a seqüência de referência a um nível significativamente maior do que o ruído de fundo. O nível do sinal gerado pela interação entre a seqüência capaz de hibridizar seletivamente e as seqüências de referência é geralmente 10 vezes mais intenso, de preferência 100 vezes mais intenso do que o da interação das outras seqüências de DNA que geram o ruído de fundo. As condições de hibridização estringentes que permitam a hibridização seletiva são bem conhecidas para as pessoas versadas na técnica. Em geral, a temperatura de hibridação e lavagem é pelo menos 5 °C mais baixa do que a T_m da seqüência de referência em um dado pH e para uma determinada força iônica. Tipicamente, a temperatura de hibridização é de pelo menos 30 °C para um polinucleotídeo de 15 a 50 nucleotídeos, e de pelo menos 60 °C para um polinucleotídeo

de mais de 50 nucleotídeos. Por exemplo, a hibridação é realizada no seguinte tampão: 6X SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, 0,02% de PVP, 0,02% de Ficoll, 0,02% de BSA, 500 µg/mL de DNA de espermatozoides de salmão desnaturado.

5 Lavagens, por exemplo, são realizadas sucessivamente, com baixa estrinência em 2X SSC, tampão SDS 0,1%, com estrinência média em 0,5X SSC, 0,1% de tampão SDS e com alta estrinência em 0,1X SSC, 0,1% de tampão SDS. A hibridização pode naturalmente ser realizada de acordo com
10 outros métodos comuns conhecidos para as pessoas versadas na técnica (ver, em particular Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989). Preferencialmente, os polinucleotídeos que hibridizam seletivamente a um polinucleotídeo de referência preservam a função da
15 sequência de referência.

A presente invenção de forma geral se refere aos polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos de acordo com a invenção. Devido à degeneração do código genético, diferentes polinucleotídeos podem codificar o mesmo
20 polipeptídeo.

A invenção também se refere a uma ligação do anticorpo especificamente ao polipeptídeo da SEQ ID N ° 1.

"Ligação especificamente" significa que esses anticorpos se ligam apenas ao polipeptídeo da SEQ ID N ° 1.

Em particular, os anticorpos não se ligam aos outros antígenos e, notoriamente, não a outras proteínas colagenosas.

Os anticorpos de acordo com a presente invenção são preferencialmente anticorpos monoclonais específicos, notoriamente de origem murina, quiméricos ou humanizados que poderiam ser obtidos de acordo com métodos padrões bem conhecidos para a pessoa versada na técnica.

Em geral, as técnicas para a preparação de anticorpos monoclonais ou os seus fragmentos funcionais, notoriamente de origem murina, podem ser selecionadas dentre aquelas descritas em particular no manual de Anticorpos (Harlow e Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, p. 726, 1988) ou a técnica de preparação à base de hibridoma bem conhecida pela pessoa versada na técnica. "Anticorpo" significa também anticorpos quiméricos ou humanizados.

A invenção também se refere aos cassetes de expressão que compreendem na direção de transcrição:

- um promotor funcional em um organismo hospedeiro,
- um polinucleotídeo de acordo com a invenção,
- uma seqüência de terminação funcional no mesmo organismo hospedeiro.

De acordo com uma modalidade da presente invenção, um

polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de acordo com a invenção é inserido em um cassete de expressão usando técnicas de clonagem bem conhecidas pela pessoa versada na técnica. Este cassete de expressão compreende os elementos
5 necessários para a transcrição e tradução das sequências que codificam os polipeptídeos de acordo com a invenção.

Vantajosamente, este cassete de expressão compreende, ao mesmo tempo, elementos que fazem com que uma célula hospedeira produza um polipeptídeo e elementos necessários
10 à regulação desta expressão.

Qualquer tipo de sequência promotora pode ser usada nos cassetes de expressão, de acordo com a invenção. A escolha do promotor vai depender notoriamente do organismo hospedeiro escolhido para a expressão do gene de interesse.
15 Certos promotores permitem expressão constitutiva, enquanto que outros promotores são, ao contrário, induzíveis. Entre os promotores funcionais em bactérias, aquele da RNA polimerase do bacteriófago T7 pode ser citado em particular. Entre os promotores funcionais em leveduras, o
20 promotor do gene GAL1 ou os promotores GAL4 e ADH de *S. cerevisiae* podem ser citados. Dentre os promotores funcionais em células eucarióticas superiores e notoriamente em células de mamíferos, CMV (citomegalovírus), SV40, o RSV (vírus do sarcoma de Rous),

beta-actina humana ou de galinha, beta-globina, PGK (fosfogliceratoquinase), EFlalfa, timidina quinase e MMTV (vírus do tumor mamário de camundongo) podem ser citados. Todos estes promotores são descritos na literatura e são bem conhecidos para a pessoa versada na técnica.

Cassetes de expressão, de acordo com a presente invenção, podem ainda incluir qualquer outra sequência necessária para a expressão de polipeptídeos ou polinucleotídeos como, por exemplo, elementos de regulação ou sequências de sinais que permitem a secreção de polipeptídeos produzidos pelo organismo hospedeiro. Qualquer sequência de regulação que aumente o nível de expressão da sequência codificadora inserida no cassete de expressão pode ser nomeadamente utilizada. De acordo com a invenção, outras sequências de regulação, que estão localizadas entre o promotor e a sequência de codificação, tais como ativadores de transcrição ("intensificadores"), podem notoriamente ser utilizadas em combinação com a sequência reguladora do promotor.

Uma grande variedade de sequências de terminação pode ser usada nos cassetes de expressão, de acordo com a invenção; estas sequências permitem o término da transcrição e poliadenilação do RNAm. Qualquer sequência de terminação funcional no organismo hospedeiro selecionado

pode ser utilizada.

A presente invenção também se refere a um polinucleotídeo compreendendo um cassete de expressão de acordo com a invenção, vantajosamente os cassetes de
5 expressão de acordo com a presente invenção são inseridos em um vetor.

A presente invenção, assim, também se refere aos vetores de replicação ou expressão para a transformação de um organismo hospedeiro que compreende pelo menos um
10 polinucleotídeo ou cassete de expressão de acordo com a presente invenção. Este vetor pode notoriamente corresponder a um plasmídeo, um cosmídeo, um bacteriófago ou um vírus no qual está inserido um polinucleotídeo ou um cassete de expressão de acordo com a invenção. As técnicas
15 para a construção desses vetores e para a inserção nesses vetores de um polinucleotídeo da invenção são bem conhecidas pelas pessoas versadas na técnica. Geralmente, qualquer vetor capaz de ser mantido, capaz de se auto-replicar ou capaz de se propagar em uma célula hospedeira
20 para induzir notoriamente a expressão de um polinucleotídeo ou um polipeptídeo pode ser usado. A pessoa versada na técnica irá escolher vetores adequados de acordo com o organismo hospedeiro a ser transformado, e de acordo com a técnica de transformação utilizada.

Os vetores da presente invenção são notoriamente usados para transformar um organismo hospedeiro, com vista à replicação do vetor e/ou a expressão de um polipeptídeo de acordo com a invenção no organismo hospedeiro.

5 A presente invenção também se refere a um método para preparar um polipeptídeo de acordo com a invenção compreendendo as seguintes etapas:

- um organismo hospedeiro é transformado com um vetor de expressão compreendendo um cassete de expressão de
10 acordo com a invenção e/ou com um polinucleotídeo de acordo com a invenção,

- os polipeptídeos produzidos pelo organismo hospedeiro são isolados.

A presente invenção também se refere a um método para
15 transformar um organismo hospedeiro através da integração no organismo hospedeiro anteriormente referido de pelo menos um polinucleotídeo ou cassete de expressão ou vetor de acordo com a invenção. O polinucleotídeo pode ser integrado no genoma do organismo hospedeiro ou replicado,
20 de forma estável, no organismo hospedeiro. Métodos para transformação de organismos hospedeiros são bem conhecidos para a pessoa versada na técnica e são amplamente descritos na literatura.

A presente invenção também se refere a um organismo

hospedeiro transformado com um polinucleotídeo, cassete de expressão ou vetor de acordo com a invenção. "Organismo hospedeiro" significa, em particular de acordo com a invenção, qualquer organismo unicelular ou multicelular, inferior ou superior, em particular selecionado a partir de bactérias, leveduras e células de eucariotos superiores, em particular as células de mamíferos, tais como CHO (células de ovário de hamster chinês), BHK (rim de hamster jovem), HEK-293 (linhagem celular de rim embrionária humana), NSO (linhagem de células de mieloma de camundongo), Per.C6 (Crucell), e YB2/0 (ATCC No. CRL 1662). "Organismo hospedeiro" significa um organismo não-humano.

A invenção também se refere às composições para uso como um fármaco que compreende um polipeptídeo de acordo com a invenção, um polinucleotídeo de acordo com a invenção, um cassete de expressão de acordo com a invenção, um vetor de acordo com a invenção e/ou um organismo hospedeiro de acordo com a invenção. A presente invenção, assim, também se refere com as composições farmacêuticas compreendendo um polipeptídeo de acordo com a invenção, um polinucleotídeo de acordo com a invenção, um cassete de expressão de acordo com a invenção, um vetor de acordo com a invenção e/ou um organismo hospedeiro de acordo com a invenção.

Em uma modalidade preferida, a presente invenção se refere às composições para a prevenção e/ou tratamento de trombooses.

Em outra modalidade, a presente invenção se refere às
5 composições para a prevenção ou o tratamento de distúrbios da hemostasia.

A invenção também se refere às ditas composições para o uso como um agente de cicatrização.

Em outra modalidade, as composições da invenção podem
10 também ser usadas como:

- reagentes de diagnóstico para detectar:

- certas disfunções plaquetárias
- doenças hematológicas

- componentes ativos de bandagens hemostáticas e adesivos
15 na composição de cremes dermatológicos e cosméticos.

A presente invenção também se refere aos métodos terapêuticos para o tratamento de trombooses compreendendo a administração a um indivíduo de uma quantidade efetiva de um polipeptídeo de acordo com a invenção, um
20 polinucleotídeo de acordo com a invenção, um cassete de expressão de acordo com a invenção, um vetor de acordo com a invenção e/ou um organismo hospedeiro de acordo com a invenção.

A presente invenção se refere, por fim, ao uso dos

polipeptídeos, polinucleotídeos e organismos hospedeiros transformados da presente invenção para a fabricação de fármacos.

A invenção refere-se às composições farmacêuticas compreendendo um polipeptídeo, polinucleotídeo ou organismo hospedeiro transformado, tal como definido na presente invenção, e um excipiente farmacêutico adequado.

As ditas composições podem ser formuladas para a administração aos mamíferos, incluindo seres humanos. O regime de dosagem varia de acordo com o tratamento e a doença em questão. As ditas composições são preparadas de tal forma a poder ser administradas por via digestiva ou parenteral.

Nas composições farmacêuticas da presente invenção para a administração oral, sublingual, subcutânea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local ou retal, o ingrediente ativo pode ser administrado na forma de unidades de administração, em mistura com os veículos farmacêuticos clássicos, aos animais ou aos seres humanos. Formas de unidade adequadas de administração compreendem formas por via oral, como comprimidos, cápsulas de gelatina, pós, grânulos e soluções orais ou suspensões; formas sublingual e bucal de administração; formas subcutânea, intramuscular, intravenosa, intranasal ou

intraocular de administração; e as formas retais de administração.

Quando uma composição sólida na forma de comprimido é preparada, o principal ingrediente ativo é misturado com um
5 excipiente farmacêutico, tal como gelatina, amido, lactose, estearato de magnésio, talco, goma arábica ou análogos. Os comprimidos podem ser revestidos com sacarose ou outros materiais adequados ou podem ser tratados de tal forma que eles tenham atividade prolongada ou retardada e que
10 continuamente liberem uma quantidade predeterminada de ingrediente ativo.

Uma preparação em cápsulas de gelatina é obtida pela mistura do ingrediente ativo com um diluente e vertendo a mistura obtida em cápsulas de gelatina moles ou duras.

15 Uma preparação em forma de xarope ou elixir pode conter o ingrediente ativo junto com um adoçante, um antisséptico, assim como um agente flavorizante e um corante adequado.

Pós ou grânulos dispersíveis em água podem conter o
20 ingrediente ativo em mistura com agentes de dispersão ou umectantes, ou agentes de suspensão, bem como os corretores de aroma ou adoçantes.

A invenção também se refere às composições cosméticas que compreendem um polipeptídeo como descrito acima.

Essas composições podem ainda incluir ingredientes ativos classicamente utilizados na dermatologia como emolientes, ingredientes ativos de hidratantes, agentes de reestruturação da barreira cutânea, anti-irritantes e agentes suavizantes. As composições cosméticas de acordo com a invenção podem ser formuladas na forma de várias preparações adequadas para aplicação tópica. De acordo com uma modalidade preferida, as diversas preparações são adequadas para aplicação tópica e incluem cremes, emulsões, leites, pomadas, loções, óleos, soluções aquosas ou de hidroálcool ou glicólicas, pós, sprays, geleias, géis, hidrogéis ou qualquer outro produto para aplicação externa. Estas composições cosméticas também podem conter antioxidantes, conservantes, etc. A invenção ainda refere-se a um método de tratamento cosmético, de cuidados de higiene ou embelezamento e/ou a um método para perfumar a mucosa e/ou pele que é normal, seca, oleosa, mista, desidratada, envelhecida, sensível, irritada, desconfortável, intolerante, com um desequilíbrio relacionado com o envelhecimento intrínseco, extrínseco ou hormonal, ou relacionado ao ataque exogênico (de poluentes, UV, estresse, etc.), com tendência alérgica, ou com distúrbios de pigmentação, caracterizado pelo fato de que consiste na aplicação de uma composição de acordo com a

invenção.

Breve Descrição das Figuras

A Figura 1 é a Expressão de RNA mensageiro que codifica a proteína em células CHO-S aderentes transfectadas de forma transitória.

A Figura 2 representa a agregação plaquetária induzida pelo meio condicionado (CM) de células CHO-S aderentes, transfectadas de maneira transitória, na presença ou ausência de epinefrina.

10 A Figura 3 representa a expressão do RNA mensageiro que codifica a proteína em um clone de célula estável.

A Figura 4 apresenta a detecção por Western blotting da presença da proteína-6X-histidina em várias frações bacterianas obtidas após a purificação.

15 A Figura 5 mostra a agregação plaquetária induzida pela proteína produzida em bactérias.

A Figura 6 mostra a validação por Western blotting da especificidade do soro de coelho obtido após 89 dias da imunização.

20 EXEMPLOS

A. Produção transitória pelas células de mamíferos

1. Construção do vetor

Plasmídeo 1 (NVH001-A)

Plasmídeo NVH001-A contém os seguintes elementos:

- um íntron do plasmídeo pCIneo (Promega: vetor de expressão de mamífero pCIneo)

- a proteína da invenção NVH001 do vetor pUC57-NVH001 (encomendado de GeneCust) e possuindo o peptídeo de sinal
5 de colágeno tipo III (NP_000081)

- uma cauda poli-A de RNAm de hGH (NM_000515)

- um promotor CMV de pCDF1-MCS1-EF1-copGFP (System Biosciences: Lentivetores de clonagem e expressão de DNAc pCDF).

10 *Plasmídeo 2 (NVH001-B1), 3 (NVH001-B2), 4 (NVH001-C1) e 5 (NVH001-C2)*

Plasmídeos *NVH001-B1* e *C1-NVH001* contêm os seguintes elementos:

- uma origem SV40 do plasmídeo derivado pSV2-Neo (ori
15 SV40:1-989 no vetor ATCC 37149)

- um promotor/intensificador que pode ser um daqueles descritos em *Molecular Cloning: A Laboratory Manual: 3ª edição*, Sambrook e Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press

20 - um cassete de higromicina de pMono-hygro-mcs (Invivogen)

- as proteínas da invenção NVH001 do vetor pUC57-NVH001 (encomendadas de GeneCust) e possuindo o peptídeo de sinal de colágeno tipo III (NP_000081)

- um C-propeptídeo do plasmídeo pUC57-proC (encomendada do GeneCust)

- uma cauda polyA de RNAm de hGH (NM_000515).

Plasmídeos NVH001-B2 e NVH001-C2 contêm os mesmos
5 elementos que os plasmídeos NVH001-B1 e C1, exceto o propeptídeo-C.

Todos os plasmídeos finais são sequenciados para verificar que nenhuma mutação foi introduzida no DNA da proteína de interesse e nos elementos fornecidos.

10 2. Transfecção de células de mamíferos

Plasmídeo 1 (NVH001-A)

1. Vetor NVH001-A é transfectado, de forma transitória, em células CHO-S tornadas aderentes e cultivadas em meio RPMI contendo 5% de soro de bezerro fetal utilizando o kit Lipofectamine 2000 da Invitrogen.
15

2. Os sobrenadantes de cultura são coletados nos dias 3 e 4, as proteínas produzidas são purificadas e, depois, suas atividades de ligação plaquetárias são testadas usando um agregômetro.

20 *Plasmídeo 2 (NVH001-B1), 3 (NVH001-B2), 4 (NVH001-C1) e 5 (NVH001-C2)*

1. Vetores NVH001-B1, NVH001-B2, NVH001-C1 e NVH001-C2 são transfectados de forma transitória em células CHO-S tornadas aderentes e cultivadas em meio RPMI contendo 5% de

soro de bezerro fetal, utilizando o kit Lipofectamine 2000 da Invitrogen.

O RNA das células transfectadas são extraídos nos dias 1, 2, 3, 4 e 5, pela adição de 800 μ L de TRIZOL (Invitrogen). Os DNACs correspondentes são obtidos por transcrição reversa a partir de 1 μ g de RNA total. A amplificação por PCR foi realizada no DNAC. Os amplicons são a seguir detectados após a migração em um gel de agarose a 2% durante 30 minutos a 125 V. Um controle positivo (plasmídeo transfectado) e um controle negativo também foram realizados. O marcador de peso molecular (à esquerda) é usado para verificar o tamanho do amplicon.

Expressão nas células transfectadas com RNAm que codifica a proteína da invenção é observada a partir do dia 1. Esta expressão aumenta ligeiramente ao longo do tempo e é mantida após 5 dias. O progresso da expressão do RNAm é representado na Figura 1.

2. Os sobrenadantes de cultura são coletados nos dias 3 e 4, as proteínas produzidas são purificadas e, a seguir, suas atividades de ligação plaquetária são testadas usando um agregômetro.

3. Atividade biológica da proteína da invenção: agregação plaquetária

A atividade de ligação plaquetária da proteína da

invenção é avaliada por agregometria. As amostras de sangue em tubos de citrato, coletadas a partir de doadores voluntários saudáveis após consentimento por escrito, são centrifugadas a 150 g por 15 minutos para a obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP). A concentração é ajustada para 300 giga/L. Os testes de agregação são realizados usando um agregômetro de plaquetas Regulest®, com agitação (1000 rpm) a 37 °C. Esta técnica se baseia na leitura fotométrica de acordo com o método Born, que consiste na medição da evolução da transmissão de luz de um meio turvo, PRP, em resposta a um ativador de função plaquetária. Se agregados plaquetários são formados, o meio é limpo e um aumento na transmissão de luz é observado. Uma molécula é considerada como tendo um efeito pró-agregante quando um aumento de mais de 30% é observado nesta transmissão associada com uma interrupção na inclinação correspondente a esta depuração.

A Figura 2 representa a agregação plaquetária induzida pelo meio condicionado de células CHO-S aderentes, transfectadas de maneira transitória, na presença ou ausência de epinefrina.

A mistura reacional é composta de 290 µL de PRP ao qual é adicionado 30 µL de meio condicionado na presença ou ausência de 0,1 µM de epinefrina. A resposta plaquetária é

medida por 10 minutos. A auto-agregação (-o-) define a linha de base. Adição de 0,1 μ M de epinefrina induz um leve deslocamento da linha de base, estável por 10 minutos (-●-). A adição de 30 μ L meio condicionado induziu uma resposta limitada (18%) após 2 minutos (-▽-). Esse deslocamento é estável durante os 10 minutos de observação. A adição de epinefrina por 2 minutos, seguido pela adição de 30 μ L de meio condicionado induziu a agregação plaquetária total em 5 minutos (-▼-). Esta agregação não é reversível, sugerindo que os agregados formados são estáveis.

Adicionando 30 μ L de meio condicionado de células CHO-S aderentes não-transfectadas não induz a agregação (resultado não apresentado).

B. Produção estável de células de mamíferos

15 1. Construção de vetor

Plasmídeo 1 (NVH001-A)

1. A unidade íntron-NVH001-hGHpA é removida do vetor construído para a expressão transitória e é clonada em um vetor de produção contendo um cassete de higromicina de pMono-higro-mcs (Invivogen).

2. O vetor final é sequenciado para verificar que nenhuma mutação foi introduzida no DNA da proteína de interesse e nos elementos fornecidos.

3. O vetor linearizado é transferido de forma estável em células CHO tornadas aderentes utilizando o kit de Lipofectamina 2000 de Invitrogen. As células transfectadas são selecionadas por níveis progressivos de higromicina B.

5 A Figura 3 representa a expressão do RNA mensageiro que codifica a proteína em um clone de célula estável.

RNA celulares são extraídos nos dias 1, 2, 3 e 4 pela adição de 800 µL de TRIZOL (Invitrogen). Os DNAC correspondentes são obtidos por transcrição reversa a partir de 1 µg de RNA total. A amplificação por PCR foi realizada em DNAC utilizando os iniciadores 5'-AGCTGGCGCGCCGCCACCATG-3' (S) e 5'-GCTTCCGGGAGGCCCTGGCTTCCCATC-3' (AS). Os amplicons são a seguir detectados após a migração em um gel de agarose 2% durante 30 minutos a 125 V. Um controle positivo, correspondente ao DNA do plasmídeo, é usado. O marcador de peso molecular (à direita) é usado para verificar o tamanho do amplicon. A expressão estável é observada no clone celular.

20 C. Produção em bactérias

1. Construção

O DNA da molécula de interesse (NVH001) é amplificado por PCR no vetor pUC57-NVH001 usando o iniciador tagNVH001-sentido:

GCTGCCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACGGTCCGCGGGGAGCTCCTGGAGA
GAGAGGATTG e o iniciador tagNVH001-anti-sentido:
GCACGGATCCTATTAGCCAGGGCAAGGTCCAGGGGCTC, que torna possível
a adição de uma etiqueta de 6X-histidina no lado N-terminal
5 da proteína NVH001. Os produtos de PCR são clonados no
vetor pET3d (pET3d-NVH001) permitindo a produção da
molécula em bactérias (New England Biolab).

A presença e a sequência correta do DNA são
verificadas pelo sequenciamento.

10 2. Produção

1. O vetor pET3d-NVH001 é transfectado em bactérias
BL21 que permitem a produção em massa de proteínas.

2. As bactérias são inoculadas em 1 L de meio
nutritivo e são incubadas a 37 °C até OD_{600nm} ser obtida em
15 que as bactérias estejam em fase exponencial.

3. Produção de proteína é induzida por IPTG durante 5
horas a 30 °C.

4. As bactérias são peletizadas, lisadas e a proteína
da invenção é purificada na fração solúvel (sobrenadante) e
20 insolúvel (corpo de inclusão) das bactérias em colunas de
etiqueta anti-6X-histidina de Macherey-Nagel.

A Figura 4 mostra a detecção por Western blotting da
presença da proteína-6X-histidina em várias frações
bacterianas obtidas após a purificação.

40 μ L de cada fração obtida após eluição da coluna de etiqueta anti-6X-histidina é depositado em gel de poliacrilamida 16%. A eletroforese é realizada em tampão de migração (glicina 192 mM, Tris-HCl 25 mM pH 6,8 e 0,1% de SDS) a 18 mA, com a presença de marcadores de peso molecular (Amersham) utilizando o sistema de migração Mini-Protean 3 (Biorad). As proteínas separadas no gel são transferidas em uma membrana PVDF (BioRad) por 60 min a 70 V. A ligação não-específica é bloqueada pela incubação da membrana por 120 min a 37 °C e com agitação, em uma solução salina de Tris + 0,1% de Tween-20 (TBS-T) contendo 5% de leite desnatado. A membrana é, a seguir, incubada de um dia para o outro a 4 °C com um anticorpo monoclonal de etiqueta anti-6X-histidina (Sinalização Celular) diluída a 1/1000 em TBS-T. Após 3 lavagens de 5 minutos em TBS-T, a membrana é incubada por 60 minutos em temperatura ambiente em um anticorpo anti-camundongo conjugado com peroxidase (Jackson Laboratories) diluída a 1/10.000. A membrana é novamente lavada três vezes por 5 minutos em TBS. O resultado é visualizado pela técnica de quimiluminescência com o kit ECL (Amersham).

A presença de proteínas é observada em várias frações. A banda principal obtida com um peso molecular de aproximadamente 19 KDa corresponde à forma monomérica da

proteína. Bandas também podem ser observadas em certas fracções correspondentes às proteínas com pesos moleculares de 26 KDa, 43 KDa e 60 KDa.

3. Demonstração de sua atividade biológica: agregação
5 plaquetária

A atividade de ligação plaquetária da proteína da invenção é avaliada por agregometria. As amostras de sangue em tubos de citrato, coletados de doadores voluntários saudáveis após consentimento por escrito, são centrifugadas a 150 g por 15 minutos para a obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP). A concentração é ajustada para 300 giga/L. Os testes de agregação são realizados usando um agregômetro de plaquetas Regulest®, com agitação (1000 rpm) a 37 °C. Esta técnica se baseia na leitura fotométrica de acordo com o método Born, que consiste em medir a evolução da transmissão de luz através do PRP, que começa como um meio turvo, em resposta a um ativador plaquetário. Se agregados plaquetários são formados, o meio fica mais límpido e um aumento na transmissão da luz é observado. Uma molécula é considerada como tendo um efeito pró-agregador quando um aumento de mais de 30% é observado nesta transmissão associada com uma quebra na inclinação correspondente a esta depuração.

A Figura 5 mostra a agregação plaquetária induzida

pela proteína produzida em bactérias.

As diversas frações eluídas da coluna de etiqueta anti-6X-histidina que contêm a proteína detectada por Western blotting são recolhidas e um liofilizado é obtido
5 por centrifugação. Parte deste liofilizado é incubado na presença de glutaraldeído 0,25% por 3 horas a 4 °C e, a seguir, dialisado de um dia para o outro contra 1X PBS a 4 °C antes de sua utilização em agregometria.

A mistura reacional é composta de 290 µL de PRP ao
10 qual é adicionado 30 µL de PBS contendo a proteína. A resposta plaquetária é medida por 25 minutos. As linhas marcadas com -o- e -∇- apresentam a resposta obtida após a adição de uma solução de PBS e de PBS-glutaraldeído dialisado, respectivamente: nenhuma agregação é observada.
15 A adição de PBS contendo a proteína não agregada por glutaraldeído (-∇-) ou agregado por glutaraldeído e dialisado (-●-) mostra agregação significativa 10 minutos após eles terem sido adicionados. Esta agregação atinge 90% (-∇-) e 100% (-●-), respectivamente, após 20 minutos.

20 D. Produção de anti-proteína do anticorpo de interesse em coelhos

1. A proteína é produzida em grande quantidade nas bactérias BL21, como descrito anteriormente.

2. Dois coelhos são imunizados 4 vezes em intervalos de 3 semanas, isto é, em D0, D21, D42 e D63, com a proteína purificada suplementada (v/v) com o adjuvante de Freund.

3. Os coelhos são sacrificados ao final do protocolo em D89 e os soros são recuperados por centrifugação após a sangria dos animais.

4. As IgGs são purificadas por cromatografia de afinidade em coluna específica a fim de eliminar as proteínas plasmáticas.

10 A Figura 6 mostra a validação por Western blotting da especificidade do soro de coelho obtido após 89 dias da imunização.

15 10 μ L de duas preparações de proteínas produzidas em bactérias, cuja atividade agregadora foi validada pela agregometria, é depositado em gel de poliacrilamida 16%. A eletroforese é realizada em tampão de migração (glicina 192 mM, Tris-HCl 25 mM pH 6,8 e SDS a 0,1%) a 18 mA, com a presença de marcadores de peso molecular (Amersham) utilizando o sistema de migração Mini-Protean 3 (Biorad).
20 As proteínas separadas no gel são transferidas em uma membrana PVDF (BioRad) por 60 min a 70 V. A ligação não-específica é bloqueada pela incubação da membrana por 120 min a 37 °C e com agitação, em uma solução salina de Tris + Tween-20 0,1% (TBS-T) contendo 5% de leite desnatado. A

membrana é, então, incubada de um dia para o outro a 4 °C ou com soro de coelho, retirado no D89 do protocolo de imunização e diluído a 1/100, ou com um anticorpo monoclonal de etiqueta anti-6X-histidina (Cell Signaling) diluído a 1/1000 em TBS-T. Após 3 lavagens de 5 minutos em TBS-T, a membrana é incubada por 60 minutos em temperatura ambiente, em um anticorpo anti-camundongo ou anti-coelho conjugado com peroxidase (Jackson Laboratories) diluído a 1/10.000. A membrana é novamente lavada três vezes por 5 minutos em TBS. O resultado é visualizado pela técnica de quimiluminescência com o kit ECL (Amersham).

A visualização mostra a presença de uma banda dupla, presente nas duas preparações de proteínas (A, poços 1 e 2), com um peso molecular de 60 KDa. Esta banda também é detectada pelo anticorpo de etiqueta anti-6X-histidina, mostrando que é realmente a proteína da invenção (B, poços 1 e 2). Deve-se observar que nós não mais observamos as outras bandas detectadas pelo anticorpo de etiqueta anti-6X-histidina nas frações purificadas de bactérias. Este resultado sugere que a imunização foi eficaz apenas para a forma multimérica da proteína da invenção ou que a proteína da invenção é montada em um multímero, uma vez purificada.

Referências

Asselin et al., Biochem J. 15 Abr 1999; 339(Pt 2):

413-8

Born *et al.*, *Nature* Junho 1962, 194: 927-9

Boudko e Engel, *J Mol Biol.* 30 Jan 2004; 335(5): 1289-97

5 Bulleid *et al.*, *EMBO J.* 17 Nov 1997; 16(22): 6694-701

Bulleid *et al.*, *Biochem J.* 1º Jul 1996; 317 (Pt 1):195-202

Farndale *et al.*, *Biochem Soc Trans.* Abril 2008; 36 (Pt 2): 241-50

10 Hulmes DJ, *J Struct Biol.* Janeiro-Fevereiro 2002; 137(1-2): 2-10

Jarvis *et al.*, *Blood.* 15 Mai 2008; 111(10): 4986-96

Kim *et al.*, *J Biol Chem.* 16 Set 2005; 280(37): 32512-20

15 Lisman T *et al.*, *Blood.* 1º Dez 2006; 108(12): 3753-6

McAlinden *et al.*, *J Biol Chem.* 24 Out 2003; 278(43): 42200-7

Monnet E *et al.*, *J Biol Chem.* 14 Abr 2000; 275(15): 10912-7

20 Morton *et al.*, *Biochem J.* 1º Mar 1995; 306(Pt 2): 337-44

Olsen *et al.*, *Adv Drug Deliv Rev.* 28 Nov 2003; 55(12): 1547-67

Pires *et al.*, *Eur J Med Chem.* Maio de 2007; 42(5):

694-701

Raynal *et al.*, J Biol Chem. 17 Fev 2006; 281(7): 3821-

31

Ruggiero e Koch, Methods. Maio de 2008; 45(1): 75-85

5

Smethurst *et al.*, J Biol Chem. 12 Jan 2007; 282(2):

1296-304

Verkleij *et al.*, Blood. 15 Mai 1998; 91(10): 3808-16.

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo isolado **caracterizado pelo** fato de que consiste da sequência do polipeptídeo da SEQ ID NO: 1 ou o polipeptídeo da posição 25 até a posição 152 da SEQ ID NO: 1.

2. Polipeptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que ele é capaz de induzir uma agregação de plaquetas do sangue humano superior a 30% em um agregômetro de plaquetas a 37 °C com agitação de 1000 rpm.

3. Polipeptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** fato de que ele compreende pelo menos as seguintes partes do peptídeo:

- GX_1X_2GER , em que X_1 e X_2 representam, independentemente, um aminoácido selecionado de A, R, N, D, Q, E, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V e O;

- $(GPX_3)_n$ com n entre 4 e 10 e X_3 representando P ou O;

- $GPRGQX_4GVMGFX_5$, em que X_4 e X_5 representam independentemente P ou O.

4. Polipeptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** fato de que ele compreende pelo menos as seguintes partes do peptídeo:

- GAPGER,

- KPGEPPGPK,

- $(GPP)_n$ com n entre 4 e 10,

- RGD.

5. Polinucleotídeo isolado **caracterizado pelo** fato de que consiste da sequência do polinucleotídeo da SEQ ID

No. 2 que codifica um polipeptídeo conforme definido pelas reivindicações 1 a 4.

6. Cassete de expressão **caracterizado pelo** fato de compreender na direção de transcrição:

- um promotor funcional em um organismo hospedeiro,
- o polinucleotídeo, conforme definido pela reivindicação 5;

- uma sequência de terminação funcional no mesmo organismo hospedeiro.

7. Vetor **caracterizado pelo** fato de que ele compreende o polinucleotídeo, conforme definido pela reivindicação 5 e/ou o cassete de expressão conforme definido pela reivindicação 6.

8. Organismo hospedeiro microbiano **caracterizado pelo** fato de ser transformado com o polinucleotídeo conforme definido pela reivindicação 5, o cassete de expressão conforme definido pela reivindicação 6 e/ou o vetor conforme definido pela reivindicação 7.

9. Composição cosmética **caracterizada pelo** fato de que ela compreende o polipeptídeo conforme definido pelas reivindicações 1 a 4 e um veículo cosmeticamente aceitável.

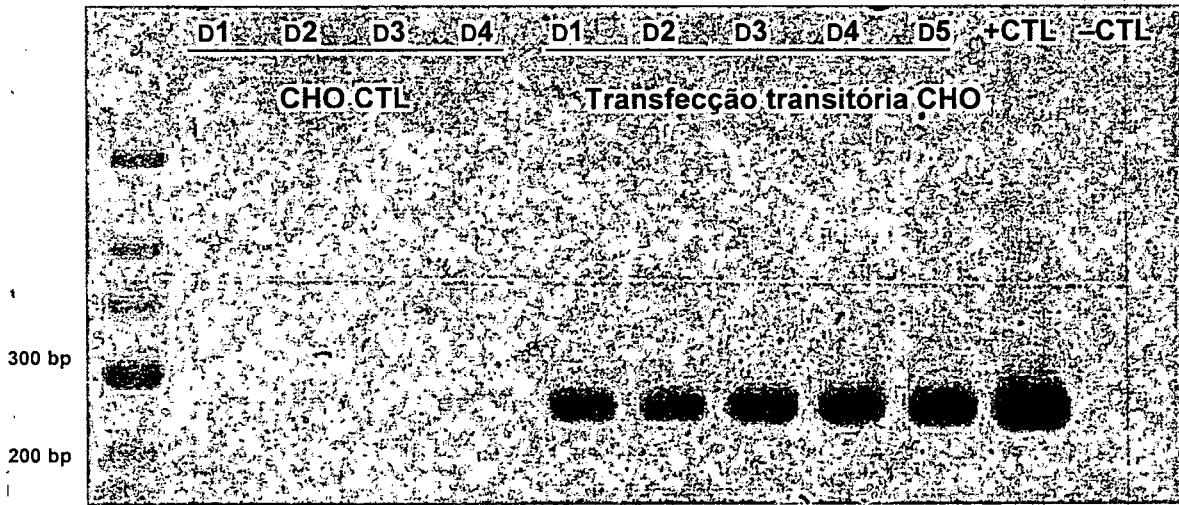


FIG. 1

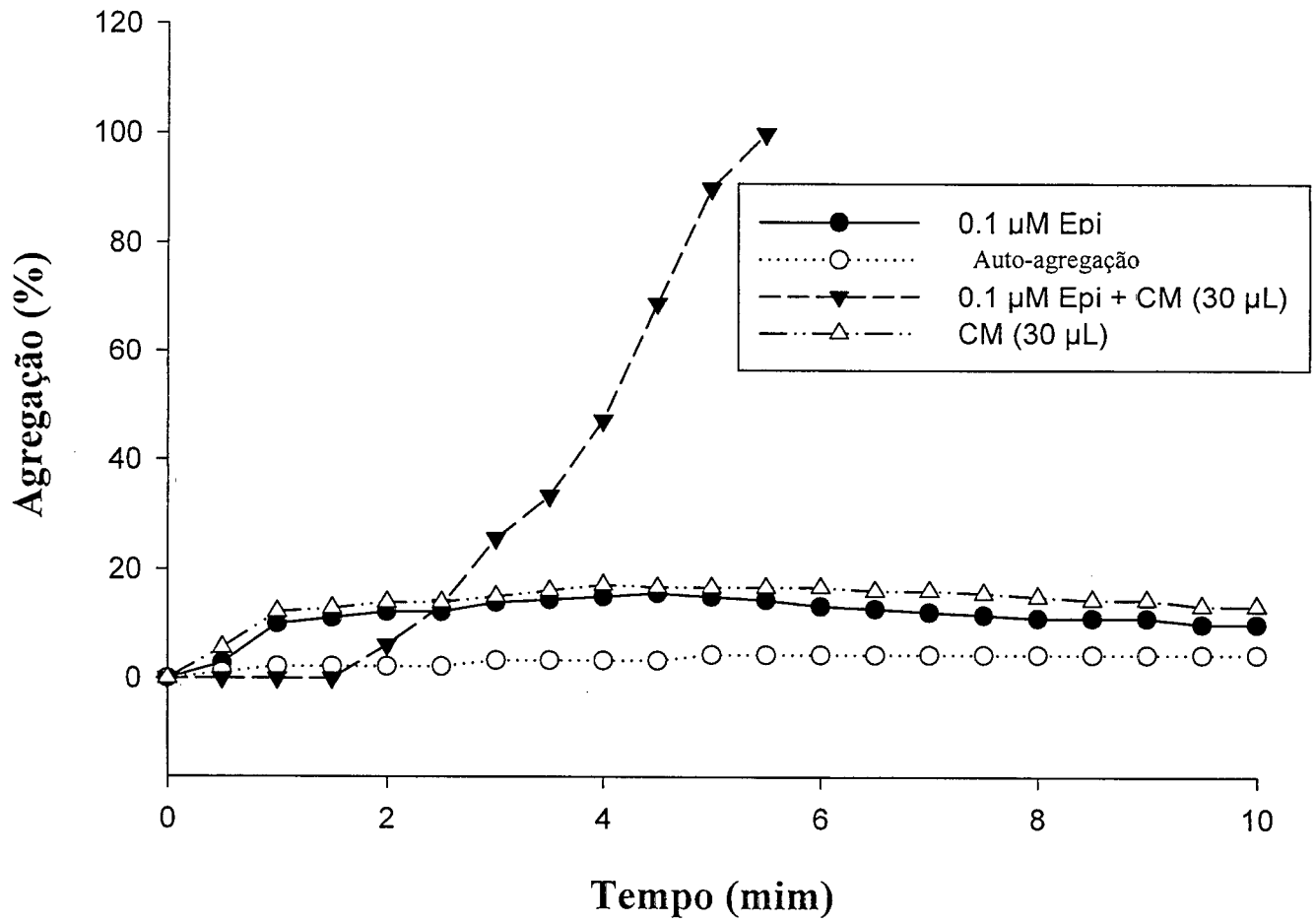


FIG. 2

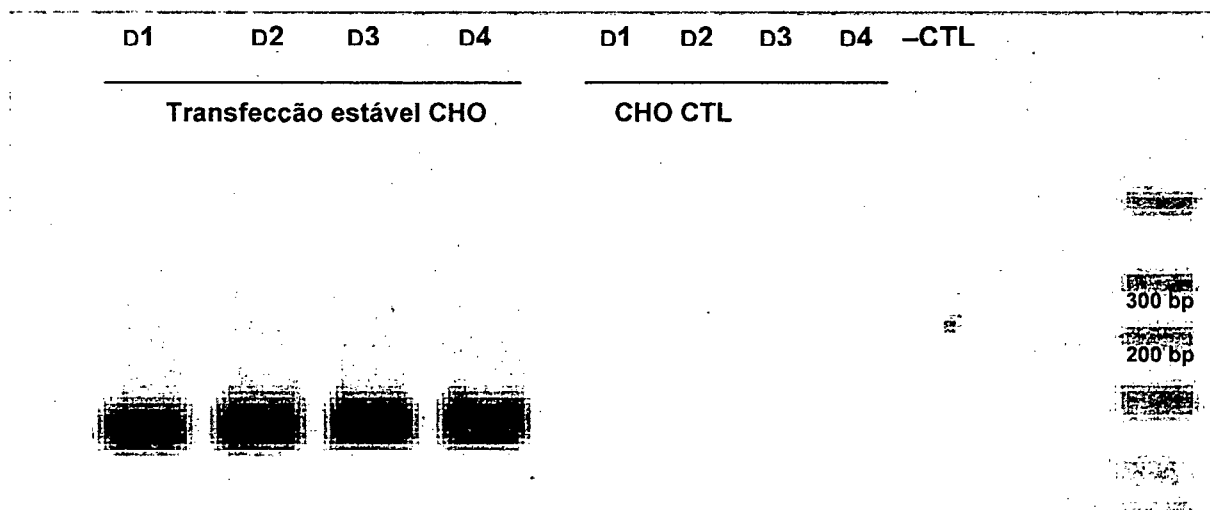


FIG. 3

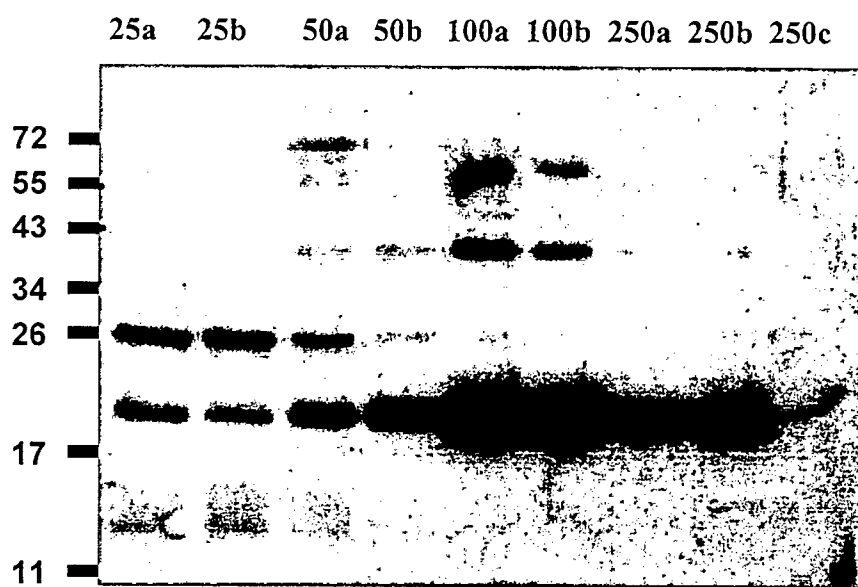


FIG. 4

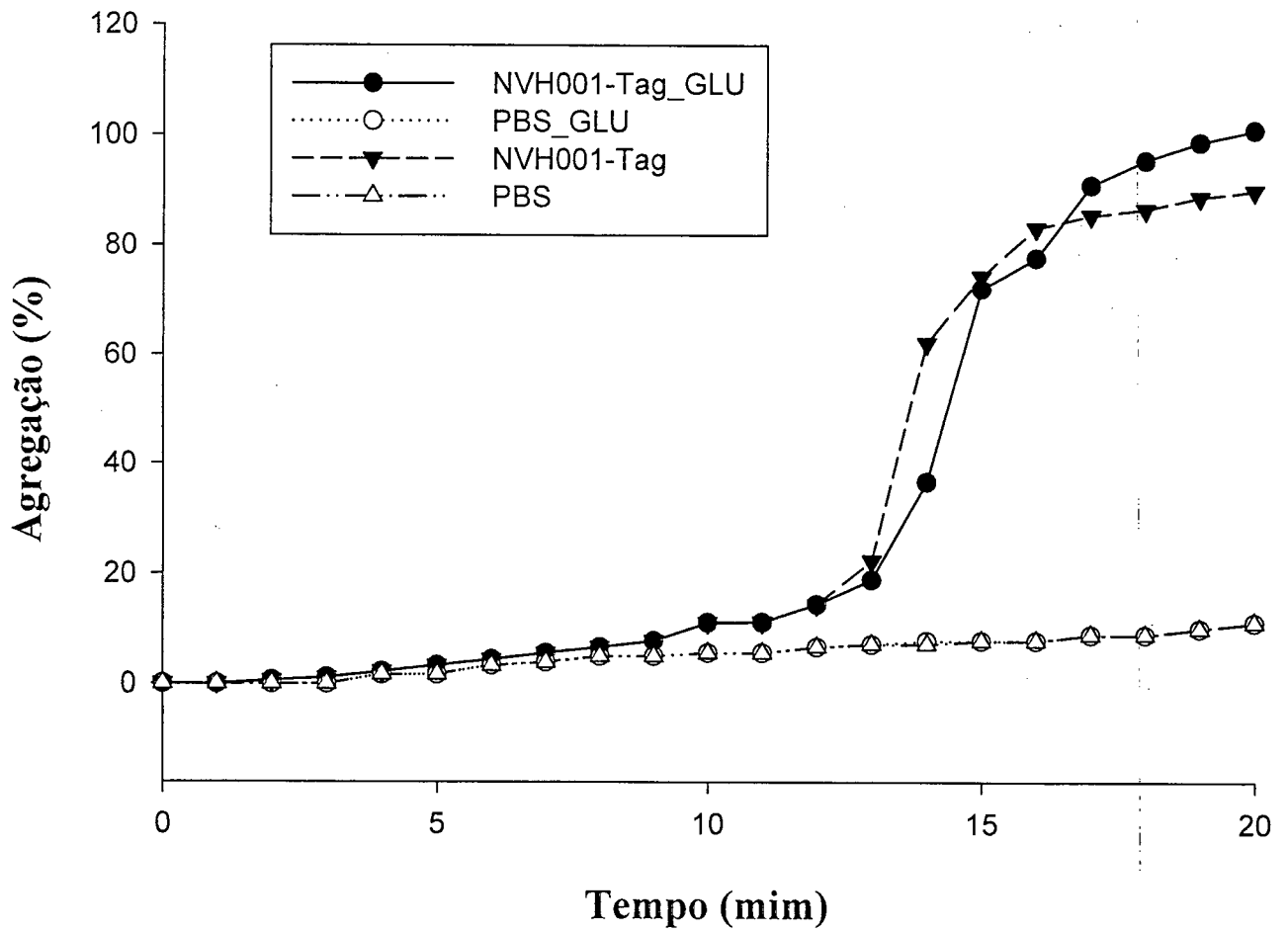


FIG. 5

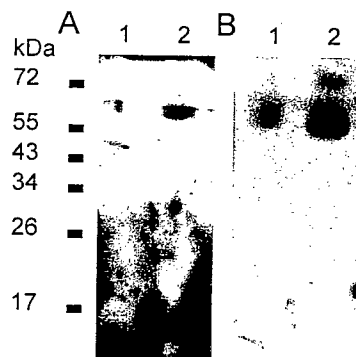


FIG. 6