

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

(22) Data de pedido: 2003.06.06	(73) Titular(es): DYAX CORP. 300 TECHNOLOGY SQUARE CAMBRIDGE, MA 02139 US
(30) Prioridade(s): 2002.06.07 US 387239 P 2002.08.28 US 407003 P	(72) Inventor(es): ROBERT CHARLES LADNER US ARTHUR C. LEY US SHIRISH HIRANI US ANTHONY WILLIAMS US
(43) Data de publicação do pedido: 2005.05.25	(74) Mandatário: LUÍSA MARIA FERREIRA GUERREIRO PRACETA FERNANDO NAMORA, Nº 7, 3º ESQ. 2820-598 CHARNECA DA CAPARICA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2010.08.11 241/2010	

(54) Epígrafe: **PREVENÇÃO E REDUÇÃO DA ISQUÊMIA**

(57) Resumo:

SÃO DESCRITOS MÉTODOS PARA IMPEDIR OU REDUZIR A ISQUÊMIA E/OU A RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA NUM PACIENTE, BEM COMO A PERDA SANGUÍNEA PERI-OPERATÓRIA E/OU A RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA NUM PACIENTE SUBMETIDO A CIRURGIA CARDIO-TORÁCICA, POR EXEMPLO, A REVASCULARIZAÇÃO DO MIOCÁRDIO E OUTROS PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS, ESPECIALMENTE QUANDO TAIS PROCEDIMENTOS ENVOLVEM A CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA, TAIS COMO O BYPASS CARDIOPULMONAR.

RESUMO

PREVENÇÃO E REDUÇÃO DA ISQUÊMIA

São descritos métodos para impedir ou reduzir a isquemia e/ou a resposta inflamatória sistêmica num paciente, bem como a perda sanguínea peri-operatória e/ou a resposta inflamatória sistêmica num paciente submetido a cirurgia cardio-torácica, por exemplo, a revascularização do miocárdio e outros procedimentos cirúrgicos, especialmente quando tais procedimentos envolvem a circulação extra-corpórea, tais como o bypass cardiopulmonar.

DESCRIÇÃO

PREVENÇÃO E REDUÇÃO DA ISQUÉMIA

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

As proteases estão envolvidas numa ampla variedade de vias biológicas. Em particular, as proteases de serina tais como calicreína, plasmídeo, elastase, activador de plasminogénio uroquinase, trombina, inibidores da coagulação humana associada à lipoproteína, e os factores de coagulação como os factores VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa foram implicados em vias de afectarem o fluxo sanguíneo, por exemplo. a isquémia geral e focal, invasão tumoral, fibrinólise, perda sanguínea peri-operatória e inflamação. Os inibidores de proteases de serina específica, portanto, têm recebido atenção como medicamentos alvos potenciais para diversas doenças isquémicas.

Um tal inibidor, a aprotinina (também chamada de inibidor de tripsina pancreática bovina ou BPTI), obtida a partir de pulmão bovino, foi aprovado nos Estados Unidos para o uso profilático na redução da perda sanguínea peri-operatória e a necessidade de transfusão em pacientes submetidos à circulação extracorpórea (CEC), por exemplo, no curso de um procedimento de revascularização coronária do miocárdio. A aprotinina está disponível comercialmente sob o nome comercial Trasylol® (Bayer Corporation Pharmaceutical Division, West Haven, Connecticut) e foi previamente aprovada para uso no tratamento da pancreatite. A eficácia da aprotinina está associada com as suas capacidades relativamente não-específicas para inibir uma variedade de proteases de serina, incluindo calicreína plasmática e plasmídeo. Essas proteases são importantes em várias vias do sistema de activação de contacto (CAS).

O CAS é inicialmente activado quando os contactos de sangue totais da superfície dos substratos estranhos (por ex., caulino, vidro, sulfato de dextrano, ou superfícies ósseas danificadas). A calicreína, uma protease de serina, é uma enzima do plasma que inicia a cascada CAS levando à activação de neutrofilia, plasmina, coagulação e diversas cininas. A calicreína é segregada como um zimogénio (pré-calicreína), que circula como uma molécula inactiva até ser ativada por um evento proteolítico no início da cascada de activação de contacto. Claramente, a inibição específica da calicreína seria uma abordagem muito atractiva para controlar a perda de sangue associada à CEC e o início da resposta inflamatória sistémica (SIR), como seria encontrado durante, por exemplo, vários procedimentos cirúrgicos invasivos.

Apesar de ser o único composto licenciado para impedir a perda sanguínea peri-operatória em CEC para revascularização do miocárdio (RVM), a aprotinina não é tão amplamente usada como seria de esperar. Existem sérias preocupações quanto ao uso deste polipeptídeo bovino em pacientes que necessitam de CEC, e em particular o uso deste composto em procedimentos de revascularização miocárdica. A aprotinina não é específica para a calicreína, mas interage com outras enzimas (por ex, plasmina) em múltiplos caminhos. Assim, o mecanismo de acção da aprotinina é largamente especulativa e a falta de compreensão precisa do que é afectado durante o tratamento com aprotinina produz o risco de complicações durante o tratamento. Uma complicação citada é a trombose descontrolada, devido a acções da aprotinina sobre a via fibrinolítica. Há uma preocupação não só sobre tais eventos hiper-agudos como trombose de grandes vasos no período perioperatório, mas também sobre a permeabilidade do enxerto após o procedimento de revascularização do miocárdio. Além disso, como uma proteína natural obtida a partir de pulmão bovino, a administração de aprotinina em seres humanos pode provocar graves reacções de hipersensibilidade ou anafilácticas ou anafilactóides após a primeira e, mais frequentemente, após a administração repetida aos pacientes. Isto é particularmente preocupante no grande número de pacientes que têm procedimentos repetidos de revascularização miocárdica. Além disso, há

uma crescente preocupação pública sobre o uso de materiais derivados de origem bovina como um potencial vector para a transmissão da encefalopatia espongiforme bovina ao homem.

Estas preocupações tornam claro que continua a ser uma necessidade mais eficazes e mais específicos meios e métodos para prevenir ou reduzir a perda sanguínea peri-operatória e o início da SIR num paciente submetido a cirurgia, resultando na activação do CAS, tais como procedimentos RVM em pacientes de CEC, ou substituição da anca. A WO 95/21601 refere-se a domínios Kunitz homólogos BPTI, que inibem a calicreína, e para o uso terapêutico e diagnóstico destas proteínas.

RESUMO DA INVENÇÃO

A presente divulgação, incluindo a invenção, é baseada na descoberta de peptídeos que inibem proteases de serina. As proteases de serina, tais como, por exemplo, a calicreína, estão envolvidas em, por exemplo, vias que levam à perda excessiva de sangue peri-operatório e o início da resposta inflamatória sistémica. Inibidores de peptídeos da calicreína preferidos incluem aqueles descritos nas Patentes US 6,333,402 e 6.057.287 de Markland et al. A divulgação actual é dirigida em parte, à utilização dos peptídeos em métodos terapêuticos e composições adequadas para uso em eliminar ou reduzir isquémias variadas, mas não limitada à perda sanguínea peri-operatória, e o início da resposta inflamatória sistémica. Os resultados da perda sanguínea peri-operatória por procedimentos cirúrgicos invasivos que levam à activação de contacto dos componentes do complemento e dos sistemas de coagulação/fibrinólise. Mais especificamente, a presente divulgação fornece métodos de utilização de inibidores da calicreína para reduzir ou evitar a perda sanguínea peri-operatória e uma resposta inflamatória sistémica em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos invasivos, especialmente a cirurgia cardio-torácica.

Num exemplo, a divulgação actual é dirigida a um método para prevenir ou reduzir a isquémia num paciente compreendendo administração ao paciente de uma composição que compreende um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos: Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa10 Xaa9 Xaa8 Xaa11 Cys Gly Xaa13 Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys Cys Xaa52 Xaa53 Xaa54 Xaa56 Xaa57 Xaa58 (SEQ ID NO: 1), em que Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa56, Xaa57 Xaa58 são, individualmente, um aminoácido ou ausente; Xaa10 é um aminoácido seleccionado do grupo que consiste em Asp e Gln; Xaa11 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala e Thr; Xaa13 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys e Gln; Xaa15 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn e Gln; Xaa16 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Ala, Gly, Ser, Asp e Asn; Xaa17 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln e Thr; Xaa18 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: His, Leu, Gln e Ala; Xaa19 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Pro, Gln, Leu, Asn e Ile; Xaa21 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Trp, Phe, Tyr, Ile e Seus; Xaa22 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo por: Tyr e Phe; Xaa23 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em Tyr e Phe; Xaa31 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile e Thr; Xaa32 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Glu, Gln, Asp Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly e Val; Xaa34 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly e Leu; Xaa35 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Tyr, Trp e Phe; Xaa39 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Glu, Gly, Ala, Ser, Asp; Xaa40 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Gly e Ala; Xaa43 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Asn e Gly; Xaa45 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Phe e Tyr, e no qual o polipeptídeo inibe a calicreína.

Num caso específico, a isquémia é a perda sanguínea peri-operatória, devido a um procedimento cirúrgico no paciente. O procedimento cirúrgico pode ser uma cirurgia cardio-torácica, como, por exemplo, a circulação extracorpórea ou cirurgia de revascularização miocárdica.

Num caso particular, posições de aminoácidos individuais de SEQ ID NO: 1 podem ser uma ou mais das seguintes: Xaa10 é Asp, Xaa11 é Asp, Xaa13 é Pro, Xaa15 é Arg, Xaa16 é Ala, Xaa17 é Ala, Xaa18 é His, Xaa19 é Pro, Xaa21 é Trp, Xaa31 é Glu, Xaa32 é Glu, Xaa34 é Ile, Xaa35 é Tyr, Xaa39 é Glu.

Em outro exemplo, a divulgação actual é dirigida a um método para prevenir ou reduzir o aparecimento da resposta inflamatória sistémica associada a um procedimento cirúrgico num paciente compreendendo administração ao paciente de uma composição que compreende um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos: Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys Xaa56 Xaa57 Xaa58 (SEQ ID NO: 1), em que Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa56, Xaa57 Xaa58 ou, individualmente, sejam um aminoácido ou ausente; Xaa10 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Asp e Glu; Xaa11 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala e Thr; Xaa13 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys e Gln; Xaa15 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn e Gln; Xaa16 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Ala, Gly, Ser, Asp e Asn; Xaa17 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln e Thr; Xaa18 é um aminoácido seleccionado do grupo constituído por: His, Leu, Gln e Ala; Xaa19 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Pro, Glu, Leu, Asn e Ile; Xaa21 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Trp, Phe, Tyr, His e Ile; Xaa22 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Tyr e Phe;

Xaa23 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Tyr e Phe; Xaa31 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile e Thr; Xaa32 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly e Val; Xaa34 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly e Leu; Xaa35 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Tyr, Trp e Phe; Xaa39 é um aminoácido ácido seleccionado do grupo consistindo em: Glu, Gly, Ala, Ser, Asp; Xaa40 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Gly e Ala; Xaa43 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Asn e Gly; Xaa45 é um aminoácido seleccionado do grupo consistindo em: Phe e Tyr; e no qual o polipeptídeo inibe a calicreína. Num caso específico, o procedimento cirúrgico pode ser uma cirurgia cardio.torácica, como, por exemplo, a circulação extracorpórea ou cirurgia de revascularização miocárdica. Num caso particular, posições de aminoácidos individuais de SEQ ID NO: 1 podem ser uma ou mais das seguintes: Xaa10 é Asp, Xaa11 é Asp, Xaa13 é Pro, Xaa15 é Arg, Xaa16 é Ala, Xaa17 é Ala, Xaa18 é His, Xaa19 é Pro, Xaa21 é Trp, Xaa31 é Glu, Xaa32 é Glu, Xaa34 é Ile, Xaa35 é Tyr, Xaa39 é Glu.

Em ainda outro exemplo, a divulgação actual é dirigida a um método para prevenir ou reduzir o aparecimento da resposta inflamatória sistémica associada a um procedimento cirúrgico num paciente compreendendo a administração ao paciente de uma composição que compreende um polipeptídeo consistindo na sequência de aminoácidos: Met His Ser Cys Phe Phe Lys Ala Ala Asp Asp Cys Gly Pro Arg Ala Ala Arg Pro Seu Trp Phe Phe Phe Asn Thr Ile Arg Gln Cys Glu Glu Tyr Phe Ile Gly Gly Gln Cys Gly Glu Asn Asn Arg Phe Glu Glu Ser Leu Cys Lys Glu Lys Thr Met Cys Arg Asp (aminoácidos 3-60 de SEQ ID NO: 2), no qual o polipeptídeo inibe a calicreína. Num exemplo, o procedimento cirúrgico é uma cirurgia cardio-torácica, como, por exemplo, o desvio da artéria de circulação extracorpórea ou do miocárdio.

Em outro exemplo, a divulgação actual é dirigida a um método para prevenir ou reduzir a isquémia num paciente

compreendendo a administração ao paciente de uma composição que compreende um polipeptídeo consistindo na sequência de aminoácidos: Met His Ser Cys Phe Phe Lys Ala Ala Asp Asp Gly Pro Cys Ala Ala Arg Pro Seu Arg Trp Phe Phe Phe Asn Ile Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Gly Glu Asn Asn Gln Arg Phe Glu Glu Glu Leu Ser Cys Cys Lys Lys Thr Met Arg Asp (aminoácidos 3-60 de SEQ ID NO: 2), no qual o polipeptídeo inibe a calicreína. Num caso específico, a isquémia pode ser a perda sanguínea peri-operatória devido a um procedimento cirúrgico no paciente. Num exemplo, o procedimento cirúrgico é uma cirurgia cardio-torácica, como, por exemplo, o desvio de artéria de circulação extracorpórea ou do miocárdio.

Em ainda outro exemplo, a divulgação actual é dirigida a um método para prevenir ou reduzir o aparecimento da resposta inflamatória sistémica associada a um procedimento cirúrgico num paciente compreendendo a administração ao paciente de uma composição que compreende um polipeptídeo consistindo na sequência de aminoácidos: Ser Phe Cys Phe Ala Ala Lys Asp Asp Cys Gly Pro Arg Ala Ala Arg Pro Seu Trp Phe Phe Phe Asn Thr Ile Arg Gln Cys Glu Glu Tyr Phe Ile Gly Gly Gln Cys Gly Glu Asn Asn Arg Phe Glu Glu Ser Leu Cys Lys Lys Glu Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 5-60 de SEQ ID NO: 2), no qual o polipeptídeo inibe a calicreína. Num exemplo, o procedimento cirúrgico é uma cirurgia cardio-torácica, como, por exemplo, o desvio da artéria de circulação extracorpórea ou do miocárdio.

Em outro exemplo, a divulgação actual é dirigida a um método para prevenir ou reduzir a isquémia num paciente compreendendo administração ao paciente de uma composição que compreende um polipeptídeo consistindo na sequência de aminoácidos: Ser Cys Phe Phe Lys Ala Ala Asp Asp Cys Gly Pro Arg Ala Ala Arg Pro Seu Trp Phe Phe Phe Asn Ele Thr Arg Gin Cys Glu Glu Phe Ele Tyr Gly Gly Cys Gly Glu Asn Asn Gln Arg Phe Glu Glu Glu Leu Ser Cys Cys Lys Lys Thr Met Arg Asp (aminoácidos 50-60 da SEQ ID NO: 2), no qual o polipeptídeo inibe a calicreína. Num caso específico, a isquémia pode ser a perda sanguínea peri-operatória devido a um procedimento cirúrgico no paciente. Num exemplo, o

procedimento cirúrgico é uma cirurgia cardio-torácica, como, por exemplo, o desvio da artéria de circulação extracorpórea ou do miocárdio.

Com base na divulgação contida neste documento, a presente invenção fornece

Um polipeptídeo consistindo na sequência de aminoácidos:

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro
Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg
Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn
Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
(SEQ ID NO: 2), no qual o polipeptídeo inibe a calicreína plasmática,

para uso na prevenção ou redução de isquemia ou o início da resposta inflamatória sistêmica associada a um procedimento cirúrgico num paciente.

e

O uso de um polipeptídeo consistindo na sequência de aminoácidos:

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro
Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg
Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn
Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
(SEQ ID NO: 2), no qual o polipeptídeo inibe a calicreína plasmática,

na preparação de um medicamento para prevenir ou reduzir a isquemia ou o início da resposta inflamatória sistêmica associada a um procedimento cirúrgico num paciente.

Esses aspectos da presente invenção, e suas modalidades preferidas, são definidos nas reivindicações anexas.

DESCRIÇÃO SUMÁRIA DAS DESENHOS

A FIG. 1 é um diagrama simplificado das principais vias múltiplas e eventos relacionados envolvidos no sistema de activação de contacto e de resposta inflamatória sistémica (SIR) que podem surgir num paciente sujeito ao traumatismo dos tecidos moles e osso, como o que se relaciona com uma cirurgia de revascularização miocárdica (procedimento RM), especialmente quando o procedimento envolve a circulação de extra-corpórea de sangue, tais como a circulação extracorpórea (Aparelho de Bypass). As setas indicam a activação de um componente ou evento para outro componente ou de evento em cascada. As setas em ambos os sentidos indicam os efeitos de activação de componentes ou de eventos em ambos os sentidos. As setas pontilhadas indicam a provável participação de um componente ou evento na activação de outro componente ou evento. As abreviaturas são as seguintes: "tPA"= activador de plasminogénio de tecido; "C5a" = componente de uma proteína do sistema de complemento; "fXIIa" = proteína activadora da pré-caliceína em caliceína de forma activa; "extrínseco"= sistema de coagulação extrínseco; "intrínseco" = sistema de coagulação intrínseco.

A FIG. 2 mostra uma parte do ADN e a sequência correspondente de aminoácido deduzida para um polipeptídeo KI da presente divulgação no plasmídeo pPIC-K503. O ADN inserido codifica o peptídeo de sinal mata prepro de *Saccharomyces cerevisiae* (sublinhado) fundido em moldura para o amino-terminal de um polipeptídeo KI PEP-1 tendo a sequência de aminoácidos delimitada pela área da caixa. A sequência de aminoácidos do polipeptídeo KI PEP-1 mostra que a região em caixa é SEQ ID NO: 2, e a sequência de codificação do nucleotídeo correspondente do polipeptídeo KI é SEQ ID NO: 3. As setas tracejadas indicam a localização e a direcção de duas sequências de iniciadores de PCR em regiões AOX que foram usadas para produzir modelos de sequenciamento. As sequências de ADN para a sequência de nucleotídeos total da figura compreende a sequência estrutural que codifica a proteína de fusão e é designada por SEQ ID NO: 27. A parte da sequência com duplo sublinhado indica uma sequência de sonda de diagnóstico. BstBI e EcoRI indicam os locais dos

respectivos sítios de endonuclease, palíndromos, hexaméricos, de restrição na sequência. Os asteriscos denotam códons de parada de translação.

As FIGS. 3A e 3B mostram um alinhamento das sequências de aminoácidos de instâncias preferenciais da presente divulgação, a sequência LACI nativa a partir da qual essas variantes foram derivadas (SEQ ID NO: 32), e outros domínios Kunitz conhecidos (SEQ ID NOS: 29-31 e 33-53). Os resíduos de cisteína são realçados.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Uma descrição de instâncias preferenciais da divulgação actual, segue.

A presente divulgação, incluindo a invenção, é baseada na descoberta de um grupo de polipeptídeos inibidores da calicreína (KI) que inibem a calicreína plasmática com uma especificidade que permite a sua utilização na melhoria dos métodos de prevenção ou redução de isquémia, como, por exemplo, perda de sangue no perioperatório e/ou uma resposta inflamatória sistémica (SIR) induzida pela calicreína, especialmente, por exemplo, em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos e, em particular procedimentos cirúrgicos que envolvem a cirurgia cardio-torácica, por exemplo, a circulação extracorpórea (CEC), como os procedimentos de desvio de artéria coronária (CABG). Os KIs podem ser usados especificamente para, por exemplo, cirurgia cardíaca pediátrica, transplante de pulmão, substituição total da anca e transplante hepático, e para reduzir ou prevenir o AVC durante a revascularização do miocárdio perioperatório, oxigenação por membrana extracorpórea (ECMO) e acidentes vasculares cerebrais (AVC) durante estes procedimentos.

A cirurgia cardio-torácica é a cirurgia do tórax, mais comumente do coração e pulmões. As doenças típicas tratadas por cirurgia cardiotorácica incluem a doença arterial coronária, tumores e cancros do pulmão, esófago e parede torácica, vasos do coração e anormalidades na válvula, e defeitos congénitos envolvendo o peito ou o coração. Quando a cirurgia cardio-torácica é utilizada para o tratamento, o risco de perda de sangue (por ex., isquémia induzida por cirurgia) e o início de uma resposta inflamatória sistémica (SIR) constituída pela cirurgia induzida por SIR pode resultar em disfunção orgânica grave (síndrome de resposta inflamatória sistémica; SIRS).

Polipeptídeos úteis de acordo com a presente divulgação

Os polipeptídeos KI úteis, de acordo com a presente divulgação incluem polipeptídeos de domínio Kunitz. Num exemplo destes domínios Kunitz são formas variantes da estrutura em espiral que compreende um domínio Kunitz de proteína inibidora da coagulação humana associada à lipoproteína (LACI). A LACI contém três estruturas de peptídeo em espiral, internas, bem definidas, que são paradigma de domínios Kunitz (Girard, T. et al. 1989. Nature, 338:518-520). Os três domínios Kunitz da LACI conferem a capacidade de ligar e inibir a calicreína, embora não com afinidade excepcional. Variantes de um domínio Kunitz de LACI aqui descritos foram seleccionados, isolados e ligados à calicreína com maior afinidade e especificidade (ver, por exemplo, Patentes US 5,795,865 e 6,057,287). Um exemplo de um polipeptídeo preferido útil de acordo com a divulgação actual tem a sequência de aminoácidos definida pelos aminoácidos 30-60 da SEQ ID NO: 2.

Cada polipeptídeo útil, de acordo com a presente divulgação liga calicreína e os polipeptídeos preferenciais também são inibidores da calicreína (KI), como determinado através de teste de ligação e inibição da calicreína conhecido na técnica. A maior afinidade e especificidade para a

calicreína da variante de polipeptídeos de domínio Kunitz aqui descrita fornece a base para a sua utilização em cirurgia cardio-torácica, por exemplo. A CEC e, especialmente, procedimentos cirúrgicos RM, para prevenir ou reduzir a perda sanguínea peri-operatória e/ou o aparecimento da SIR em pacientes submetidos a esses procedimentos. Os polipeptídeos KI utilizados de acordo com presente divulgação têm ou compreendem a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo de domínio Kunitz variante originalmente isolados pela triagem de bibliotecas de macrófagos para a capacidade de ligar a calicreína.

Os polipeptídeos KI úteis nos métodos e composições da presente divulgação incluem um polipeptídeo de domínio Kunitz compreendendo a sequência de aminoácidos:

**Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys
Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26
Xaa27 Xaa28 Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39
Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys
Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys Xaa56 Xaa57 Xaa58 (SEQ ID NO:1)**

"Xaa" refere-se a uma posição numa cadeia peptídica, que pode ser qualquer um de uma série de diferentes aminoácidos. Por exemplo, para os peptídeos KI aqui descritos, Xaa10 pode ser Asp ou Glu; Xaa11 pode ser Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala ou Thr; Xaa13 pode ser Pro, Arg, His, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys ou Gln; Xaa15 pode ser Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn, ou Gln; Xaa16 pode ser Ala, Gly, Ser, Asp ou Asn; Xaa17 pode ser Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln ou Thr; Xaa18 pode ser His, Leu, Gln ou Ala; Xaa19 pode ser Pro, Gln, Leu, Asn ou Ile; Xaa21 pode ser Trp, Phe, Tyr, His ou Ile; Xaa31 pode ser Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile, ou Thr; Xaa32 pode ser Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly, ou Val; Xaa34 pode ser Ile, Thr, Ser, Val, Ala, Asn, Gly ou Leu; Xaa35 pode ser Tyr, Trp ou Phe; Xaa39 pode ser Glu, Gly, Ala, Ser ou Asp. Os aminoácidos Xaa6, Xaa7, Xaa8, Xaa9, Xaa20, Xaa24, Xaa25, Xaa26, Xaa27, Xaa28, Xaa29,

Xaa41, Xaa42, Xaa44, Xaa46, Xaa47, Xaa48, Xaa49, Xaa50, Xaa52, Xaa53 e Xaa54 podem ser qualquer aminoácido. Além disso, cada um dos quatro primeiros e últimos três aminoácidos da SEQ ID NO: 1, podem, opcionalmente, estar presentes ou ausentes e podem ser qualquer aminoácido, se presente.

Os peptídeos definidos de acordo com a SEQ ID NO: 1 formam um conjunto de polipeptídeos que se ligam à calicreína. Por exemplo, numa instância preferencial da presente divulgação, um polipeptídeo KI útil nos métodos e composições da divulgação actual tem as posições variáveis seguintes: Xaa11 pode ser Asp, Gly, Ser ou Val; Xaa13 pode ser Pro, Arg, His ou Asn; Xaa15 pode ser Arg ou Lys; Xaa16 pode ser Ala ou Gly; Xaa17 pode ser Ala, Asn, Ser ou Ile; Xaa18 pode ser His, Leu, ou Gln; Xaa19 pode ser Pro, Gin ou Leu; Xaa21 pode ser Trp ou Phe; Xaa31 é Glu; Xaa32 pode ser Glu ou Gln; Xaa34 pode ser Ile, Thr ou Ser; Xaa35 é Ty; e Xaa39 pode ser Glu, Gly ou Ala

Um exemplo mais concreto da divulgação actual é definido pelas seguintes aminoácidos em posições variáveis: Xaa10 é Asp; Xaa11 é Asp; Xaa13 pode ser Pro ou Arg; Xaa15 é Arg; Xaa16 pode ser Ala ou Gly; Xaa17 é Ala; Xaa18 é His; Xaa19 é Pro; Xaa21 é Trp; Xaa31 é Glu; Xaa32 é Glu; Xaa34 pode ser Ile ou Ser; Xaa35 é Tyr; e Xaa39 é Gly.

Também englobado também no âmbito da presente divulgação são os peptídeos que compreendem porções dos polipeptídeos descritos aqui, por exemplo, os polipeptídeos poderiam incluir domínios de ligação de epítomos de calicreína específicos. Tais fragmentos dos polipeptídeos aqui descritos também seriam abrangidos.

Os polipeptídeos KI úteis nos métodos e composições descritas a seguir compreendem um domínio Kunitz. Um subconjunto das sequências abrangidas pela SEQ ID NO: 1 são

descritos pela seguinte (onde não é indicado "Xaa" refere-se ao mesmo conjunto de aminoácidos que são permitidos pela SEQ ID NO: 1):

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16
Xaa17 Xaa18 Xaa19 Arg Xaa21 Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Xaa31
Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 54):

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu
Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
(amino acids 3-60 of SEQ ID NO:2),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala Asn His Leu
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEQ ID NO:4),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Thr Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEQ ID NO:5),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Gln Phe Thr Tyr Gly Gly Cys
Ala Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEQ ID NO:6),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Ser Leu Pro
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Gly
Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
(SEQ ID NO:7),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEQ ID NO:8),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Gly Ala His Leu
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu
Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
(SEQ ID NO:9),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Arg Cys Lys Gly Ala His Leu
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu
Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
(SEQ ID NO:10),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Gly Arg Cys Arg Gly Ala His Pro
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEQ ID NO:11),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEQ ID NO:12),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Val Gly Arg Cys Arg Gly Ala His Pro
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEQ ID NO:13),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Val Gly Arg Cys Arg Gly Ala Gln Pro
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEQ ID NO:14),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Ser Cys Arg Ala Ala His Leu
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEQ ID NO:15),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Glu Gly Gly Ser Cys Arg Ala Ala His Gln
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEQ ID NO:16),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Gly Ala His Leu
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEQ ID NO:17),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Arg Gly Ala Leu Pro
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEQ ID NO:18),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Ser Gly Asn Cys Arg Gly Asn Leu Pro
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEQ ID NO:19),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Ser Gly Arg Cys Arg Gly Asn His Gln
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEQ ID NO:20),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Gly Gly Arg Cys Arg Ala Ile Gln Pro
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEQ ID NO:21),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Arg Cys Arg Gly Ala His Pro
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEQ ID NO:22).

As FIGS. 3A e 3B oferecem um alinhamento da sequência de aminoácidos dessas sequências, a sequência LACI nativa a partir da qual essas variantes foram derivadas (SEQ ID NO: 32), e outros domínios Kunitz conhecidos (SEQ ID NOS: 29-31 e 33-53).

O polipeptídeo possuindo a sequência da SEQ ID NO: 2 é o polipeptídeo que está a ser utilizado de acordo com a presente invenção.

Os polipeptídeos KI úteis nos métodos e composições descritos neste documento, incluindo o polipeptídeo KI que está a ser utilizado de acordo com a presente invenção, podem ser feitos de forma sintética, usando qualquer protocolo padrão de síntese de polipeptídeos e equipamentos. Por exemplo, a síntese progressiva de um polipeptídeo KI aqui descrito pode ser realizada através da remoção de um amino (N) terminal de protecção de um grupo inicial (i.é. carboxi-terminal) de aminoácidos, e seu acoplamento da extremidade carboxila do ácido aminado na próxima sequência do polipeptídeo. Este aminoácido é também devidamente protegido. O grupo carboxila do aminoácido de entrada pode ser activado para reagir com o N-terminal do aminoácido ligado pela formação num grupo reactivo, como a formação numa carbodiimida, um anidrido de ácido simétrico, ou um grupo "éster activo" como ésteres hidroxibenzotriazole ou pentafluorofenil. Métodos de síntese peptídica em fase sólida preferidos incluem o método BOC, que utiliza terc-butiloxicarbonil como o grupo α -amino protector, e o método FMOC, que utiliza 9-fluorenilmetloxycarbonil para proteger o α -amino dos resíduos de aminoácidos. Ambos os métodos são bem conhecidos dos peritos na técnica (Stewart, J. and Young, J., Solid-Phase Peptide Synthesis (W.H. Freeman, São Francisco 1989); Merrifield, J., 1963. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154; Bodanszky M., e Bodanszky, A., The Practice of Peptide Synthesis (Springer-Verlag, Nova Iorque 1984)). Se desejado, aminoácidos amino-e/ou carboxi-terminal adicionais de podem ser projectados para a sequência de aminoácidos e acrescentados durante a síntese de polipeptídeos.

Alternativamente, os polipeptídeos de domínio Kunitz e polipeptídeos KI úteis nas composições e métodos de presente divulgação, incluindo o polipeptídeo KI que está a ser utilizado de acordo com a presente invenção, podem ser produzido por métodos recombinantes, utilizando qualquer

uma de uma série de células e correspondentes vectores de expressão, incluindo mas não limitado a vectores de expressão bacterianos, vectores de expressão de levedura, vectores de expressão em baculovírus, vectores de expressão viral em mamíferos, e assim por diante. Os polipeptídeos de domínio Kunitz e polipeptídeos KI úteis nas composições e métodos da presente divulgação, incluindo o polipeptídeo KI que está a ser utilizado de acordo com a presente invenção, também podem ser produzidos transgenicamente usando moléculas de ácido nucleico compreendendo uma sequência de codificação para um domínio Kunitz ou polipeptídeo KI aqui descritos, no qual a molécula de ácido nucleico pode ser integrada e expressa a partir do genoma de um animal hospedeiro através de métodos transgênicos disponíveis na técnica. Em alguns casos, pode ser necessário ou vantajoso para fundir a sequência de codificação para um polipeptídeo de domínio Kunitz ou um polipeptídeo KI compreendendo o domínio Kunitz para outra sequência de codificação num vector de expressão para formar um polipeptídeo de fusão que está facilmente expresso numa célula hospedeira. Preferencialmente, a célula hospedeira que expressa tais polipeptídeos uma fusão também processa tais polipeptídeo de fusão para produzir um domínio Kunitz ou polipeptídeo KI úteis, de acordo com a presente divulgação que contenha somente a sequência de aminoácido desejada. Obviamente, se qualquer outro aminoácido (s) continuar a ser ligado ao domínio Kunitz expresso ou polipeptídeo KI, tal aminoácido (s) adicional não deve diminuir a ligação de calicreína e/ou actividade inibitória da calicreína do domínio Kunitz ou polipeptídeo KI, de modo a impedir o uso do polipeptídeo nos métodos ou composições da presente divulgação.

Um sistema de expressão recombinante preferido para a produção de polipeptídeos KI úteis nos métodos e composições aqui descritos é um vector de expressão de levedura, que permite a uma sequência de ácido nucleico a codificação da sequência de aminoácidos de um polipeptídeo KI ou polipeptídeo de domínio Kunitz a ser ligado no quadro mesma leitura com uma sequência de nucleotídeos codificando a sequência do peptídeo líder α prepro de *Saccharomyces cerevisiae*, que por sua vez está sob o controlo de um promotor de levedura operacional. O plasmídeo de expressão

recombinante de levedura resultante pode então ser transformado por métodos padrão nas células de acolhimento de leveduras adequadas compatíveis, cujas células são capazes de expressar a proteína recombinante a partir do vector de expressão de levedura recombinante. De preferência, uma célula de levedura hospedeira transformada com um vector de expressão recombinante também é capaz de processar a proteína de fusão para fornecer um polipeptídeo KI activo útil nos métodos e composições da presente divulgação, por exemplo, o polipeptídeo KI que está a ser utilizado de acordo com a presente invenção. Um hospedeiro de levedura preferido para a produção de polipeptídeos de domínio Kunitz recombinante e polipeptídeos KI compreendendo tais domínios Kunitz é a *Pichia pastoris*.

Como mencionado acima, os polipeptídeos KI que são úteis em métodos e composições descritos neste documento podem incluir um polipeptídeo de domínio Kunitz aqui descrito. Alguns polipeptídeos KI podem incluir uma sequência adicional de acompanhamento, de preferência de um a seis aminoácidos de comprimento, na extremidade amino e/ou carboxi-terminal, desde que esse adicional de aminoácidos não diminua significativamente a afinidade de ligação da calicreína ou a actividade de inibição da calicreína, de modo a impedir o uso dos métodos e composições descritas a seguir. Esses aminoácidos adicionais podem ser deliberadamente adicionados ao expressar um polipeptídeo KI numa célula hospedeira recombinante em particular ou podem ser adicionados para fornecer uma função adicional, por exemplo, para fornecer um peptídeo de ligação do polipeptídeo KI a outra molécula ou para fornecer uma porção de afinidade que facilita a purificação do polipeptídeo. Preferencialmente, o aminoácido adicional (s) não inclui a cisteína, o que poderia interferir com as ligações dissulfeto do domínio Kunitz.

Um exemplo de um polipeptídeo de domínio Kunitz preferido útil nos métodos e composições da presente divulgação tem a sequência de aminoácidos de resíduos 3-60 da SEQ ID NO: 2. Quando expressos e processados num sistema de expressão de proteína de fusão de levedura (por ex, com base na

expressão da integração do plasmídeo pHIL-D2), como um polipeptídeo de domínio Kunitz que retém um amino-terminal adicional de dipeptídeo Glu-Ala da fusão com a sequência do peptídeo líder α prepro de *S. Cerevisiae*. Quando segregado da célula hospedeira de levedura, a maior parte do peptídeo líder é processado a partir da proteína de fusão para produzir um polipeptídeo KI funcional (aqui referido como "PEP-1"), tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 (ver região na caixa na FIG. 2).

Particularmente preferidos polipeptídeos KI úteis nos métodos e composições descritos aqui têm uma afinidade de ligação para a calicreína que é da ordem de 1000 vezes maior do que a aprotinina, que está actualmente aprovada para uso em procedimentos cirúrgicos para reduzir a perda de sangue. As afinidades de ligação surpreendentemente elevadas de tais polipeptídeos KI aqui descritos indicam que tais polipeptídeos KI exibem um alto grau de especificidade para a calicreína, com exclusão de outros alvos moleculares (ver Tabela 1, abaixo). Assim, a utilização de tais polipeptídeos de acordo com a presente divulgação, por exemplo, o uso do polipeptídeo KI em conformidade com a presente invenção, reduz muito da especulação sobre os possíveis alvos terapêuticos num paciente. Quanto menor o grau de especificidade exibida, por exemplo, pela aprotinina, leva a possíveis efeitos colaterais pleiotrópicos e ambiguidades quanto ao seu mecanismo terapêutico.

Os polipeptídeos definidos, por exemplo, pela SEQ ID NO: 1 contêm posições invariantes, por exemplo, as posições 5, 14, 30, 51 e 55 podem ser apenas Cys. Outras posições, como, por exemplo, as posições 6, 7, 8, 9, 20, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 41, 42, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 53 e 54 podem ser qualquer aminoácido (incluindo aminoácidos de ocorrência não natural). Num exemplo particularmente preferido, um ou mais aminoácidos correspondem ao de uma sequência nativa (ex, SEQ ID NO 32, ver FIG. 3). Num exemplo preferido, pelo menos uma posição variável é diferente do que a da sequência nativa. Em ainda outro exemplo preferido, os aminoácidos podem cada um ser

individual ou colectivamente substituídos por um aminoácido de substituição conservador ou não conservador. Substituições de aminoácidos conservadores substituem um aminoácido por um outro aminoácido de estrutura química semelhante e pode não ter efeito sobre a função da proteína. Substituições de aminoácidos não conservadores substituem um aminoácido com um outro aminoácido da estrutura química diferente. Exemplos de substituições de aminoácidos conservadores incluem, por exemplo, Asn-> Asp, Arg-> Lys e Ser-> Thr. Num exemplo preferido, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,12, 13,14, 15, 16,17,18, 19, 20 e/ou 21 destes aminoácidos podem ser independente ou colectivamente, em qualquer combinação, seleccionados para corresponder à posição correspondente da SEQ ID NO: 2.

Outras posições, por exemplo, as posições 10,11, 13,15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 31, 32, 34, 35, 39, 40, 43 e 45, podem ser qualquer um de um conjunto seleccionado de aminoácidos. Assim, a SEQ ID NO: 1 define um conjunto de sequências possíveis. Cada membro desse conjunto contém, por exemplo, uma cisteína nas posições 5,14, 30, 51 e 55, e qualquer um de um conjunto específico de aminoácidos nas posições 10, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 31, 32, 34, 35, 39, 40, 43 e 45. Num exemplo preferido, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,13, 14,15, 16, 17,18 e/ou 19 destes aminoácidos podem ser independentemente ou em conjunto, em qualquer combinação, seleccionados para corresponder à posição correspondente da SEQ ID NO: 2. O peptídeo tem de preferência pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos, 90% ou pelo menos 95% de identidade dq SEQ ID NO: 2.

Métodos e composições

A presente divulgação é também dirigida a métodos para prevenir ou reduzir a isquémia. Preferidos são os métodos para prevenir ou reduzir a perda sanguínea peri-operatória e/ou uma resposta inflamatória sistémica (SIR) num paciente, especialmente associados com a cirurgia cardio-

torácica. Um método para o tratamento envolve a administração de um polipeptídeo KI compreendendo um domínio Kunitz. Um exemplo do método envolve o uso de um peptídeo contendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 que tem uma afinidade para a calicreína que é aproximadamente 1000 vezes ou mais superior ao de uma ampla protease de serina, por exemplo, a aprotinina, que é isolada do pulmão bovino e actualmente aprovada para o uso em procedimentos de revascularização miocárdica (Trasylol®, da Bayer Corporation Pharmaceutical Division, West Haven, Connecticut).

Pacientes submetidos a qualquer um de uma série de procedimentos cirúrgicos, especialmente os de circulação extra-corpórea envolvendo, por exemplo, cirurgia cardio-torácica, como, por exemplo, a CEC, e/ou trauma ósseo, tais como separação do esterno e substituição da anca, são um risco para a perda sanguínea peri-operatória e inflamação. O contacto do sangue de um paciente com a superfície de corte do osso ou dos equipamentos de CEC é suficiente para activar uma ou várias respostas em cascada indesejáveis, incluindo um sistema de activação de contacto (CAS), que pode levar à extensa perda de sangue perioperatória necessitando de transfusão de sangue imediata, bem como uma resposta inflamatória sistémica (SIR), que, por sua vez, pode resultar em danos permanentes nos tecidos e órgãos. Embora não desejando ser limitada a um mecanismo particular ou teoria, parece que a perda de sangue que ocorre associada a cirurgia cardio-torácica, por exemplo, CEC, como num procedimento de revascularização do miocárdio, provavelmente resulta de extravasamento capilar extenso, que pode resultar em perda significativa de sangue que deve ser substituído por transfusão de sangue imediata.

Os métodos descritos aqui são úteis para prevenir ou reduzir isquémias diversas, incluindo, por exemplo, perda sanguínea peri-operatória, e SIR num paciente submetido a um procedimento cirúrgico e, especialmente, onde o procedimento cirúrgico requer circulação extra-corpórea, por exemplo, cirurgia cardio-torácica, tais como, por exemplo, a CEC. Os métodos da presente divulgação são

particularmente úteis para prevenir ou reduzir a perda sanguínea peri-operatória e/ou SIR num paciente submetido a um procedimento de revascularização do miocárdio exigindo CEC ou outras cirurgias cardíacas.

As composições preferidas para uso médico compreendem um polipeptídeo KI aqui descrito. Estas composições úteis podem ainda compreender um ou mais tampões farmacologicamente aceitáveis, transportadores e excipientes, que podem proporcionar uma característica desejável para a composição, incluindo mas não limitado a, administração melhorada da composição a um paciente, reforço da circulação meia-vida do polipeptídeo KI da composição, compatibilidade aprimorada com a composição química do sangue do paciente, maior armazenamento da composição, e/ou eficácia melhorada da composição com a administração a um paciente. Além de um polipeptídeo KI aqui descrito, as composições podem ainda compreender um ou mais outros compostos farmacologicamente activos que proporcionam uma profilática adicional ou benefício terapêutico para um paciente de um procedimento cirúrgico invasivo.

Composições úteis nos métodos da presente divulgação incluem quaisquer dos polipeptídeos de domínio Kunitz ou polipeptídeos KI compreendendo tais polipeptídeos de domínio Kunitz aqui descritos. Particularmente preferidos são os polipeptídeos KI compreendendo um polipeptídeo de domínio Kunitz tendo uma sequência 58 de aminoácido de aminoácidos 30-60 da SEQ ID NO: 2. Um exemplo de um polipeptídeo KI particularmente preferido útil nos métodos e composições da divulgação actual é o polipeptídeo KI PEP-1 possuindo a sequência 60 de aminoácido da SEQ ID NO: 2. Uma sequência de nucleotídeos codificando a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 é fornecida em SEQ ID NO: 3 (por exemplo, ver nucleotídeos 309-488 na FIG 2.). Entende-se que com base no código genético conhecido, a presente divulgação também oferece formas degeneradas da sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 3 simplesmente substituindo um ou mais dos códons degenerados conhecidos para cada um dos aminoácidos codificados pela sequência de

nucleotídeos. Os nucleotídeos 7-180 da SEQ ID NO: 3, e as suas formas degeneradas, codificam o polipeptídeo de domínio Kunitz de ocorrência não natural tendo a sequência 58 de aminoácido de aminoácidos 30-60 da SEQ ID NO: 2.

Qualquer uma de uma variedade de moléculas de ácido nucleico pode incluir a sequência de nucleotídeos de nucleotídeos 7-180 da SEQ ID NO: 3, formas degeneradas, e partes delas, incluindo mas não limitado ao genoma do fago recombinante, vectores recombinantes virais em mamíferos, vectores virais recombinantes de insectos, mini-cromossomas de levedura, e vários plasmídeos. Tais plasmídeos incluem aqueles usados para clonar e/ou expressar tais sequências de nucleotídeos de codificação. Os vectores de expressão fornecem um promotor, que pode ser operacionalmente ligado a uma sequência de nucleotídeos específica e de uma célula hospedeira apropriada, que é capaz de transcrever o código especial da sequência de nucleotídeo num mensageiro funcional do RNA (mRNA) e também traduzir o mRNA no polipeptídeo correspondente. Um polipeptídeo assim obtido pode então ser isolado das células do hospedeiro. Moléculas de ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificando um domínio Kunitz ou um polipeptídeo KI aqui descritos podem ser feitos por métodos padrão de síntese de ácidos nucleicos, metodologias de ADN recombinante, métodos de reacção em cadeia da polimerase (PCR), e suas combinações.

Perda sanguínea peri-operatória e a redução do fluxo sanguíneo do coração

Devido aos muitos avanços na medicina, são realizados em cada dia um número de procedimentos cirúrgicos altamente invasivos que resultam em perda de sangue, ou colocam os pacientes em alto risco de perda de sangue. Tais pacientes devem ser cuidadosamente monitorizados para restaurar e manter o suprimento normal de sangue e hemostasia, e podem precisar de transfusões de sangue. Os procedimentos cirúrgicos que envolvem a perda de sangue incluem os que

envolvem métodos de circulação extra-corpórea tais como a cirurgia cardio-torácica, por exemplo, a CEC. Em tais métodos, o coração de um paciente é interrompido e a circulação, oxigenação e manutenção do volume de sangue são realizadas artificialmente através de um circuito extra-corpóreo e um oxigenador de membrana sintética. Estas técnicas são comumente usadas durante a cirurgia cardíaca. Além disso, é evidente que a cirurgia envolve extenso trauma do osso, como a divisão do esterno necessária na revascularização do miocárdio ou procedimentos de substituição da anca, também está associada com a activação do CAS, que pode resultar numa variedade de distúrbios no sangue e nos vasos.

A doença aterosclerótica coronária (DAC), causa um estreitamento do lúmen de uma ou várias das artérias coronárias, o que limita o fluxo de sangue para o miocárdio (ou seja, o músculo cardíaco) e pode causar angina, insuficiência cardíaca e enfarte do miocárdio. Na fase final da aterosclerose coronária, a circulação coronária pode ser quase completamente obstruída, causando risco de vida, angina ou insuficiência cardíaca, com uma mortalidade muito elevada. Os procedimentos de revascularização do miocárdio podem requer fazer uma ponte do vaso sanguíneo obstruído e restabelecer o sangue ao coração, o que é potencialmente salvador da vida. Os procedimentos de revascularização miocárdica estão entre as cirurgias mais invasivas em que uma ou mais veias ou artérias saudáveis são implantados para fornecer um "bypass" em torno da área fechada do vaso doente. Os procedimentos de revascularização miocárdica carregam consigo um risco perioperatório pequeno, mas importante, mas são muito bem sucedidos em fornecer aos pacientes um alívio imediato da mortalidade e morbidade da doença cardiovascular aterosclerótica. Apesar destes resultados muito encorajadores, Os procedimentos de revascularização miocárdica repetidos são frequentemente necessários, como indicado por um claro aumento do número de pacientes que eventualmente passam por segundos procedimentos ou mesmo terceiros; a mortalidade e morbidade peri-operatória vistas nos procedimentos de revascularização miocárdica primária são é aumentadas nesses procedimentos repetitivos.

Houve melhorias em técnicas cirúrgicas minimamente invasivas para DAC menos complicada. No entanto, quase todos os procedimentos de revascularização miocárdica realizados para a doença cardíaca valvular e/ou congénitas, transplante cardíaco, e os principais procedimentos da aorta, ainda são realizados em pacientes assistidos pela CEC. Na CEC, grandes cânulas são inseridas em grandes vasos de um paciente para permitir o bombeamento mecânico e oxigenação do sangue através de um oxigenador de membrana. O sangue é devolvido ao paciente sem fluir através dos pulmões, que são hipoperfundidos durante este procedimento. O coração é parado usando uma solução cardioplégica, o paciente é arrefecido para evitar danos cerebrais, e o volume de circulação periférica aumentada num circuito extracorpóreo, i.e. o circuito de CEC, o que exige ir "ajeitando" com o sangue do doador e misturas salinas que são usadas para o preenchimento do circuito extracorpóreo. A CEC tem sido amplamente utilizada numa variedade de procedimentos realizados durante quase meio século, com resultados bem sucedidos. A interacção entre superfícies artificiais, células do sangue, proteínas do sangue, endotélio vascular danificado e tecidos extravasculares, como ossos, distúrbios da hemostasia que frequentemente activam o CAS, que, como mencionado acima, pode resultar numa variedade de distúrbios no sangue e vasculatura. Essas perturbações levam ao sangramento peri-operatório em excesso, o que requer uma imediata transfusão de sangue. Uma consequência da circulação do sangue total através de um circuito extracorpóreo em CEC também pode incluir a resposta inflamatória sistémica (SIR), que é iniciada pela activação de contacto da coagulação e sistemas complementares. De facto, grande parte da morbidade e mortalidade associadas a procedimentos cirúrgicos de CEC aparentemente bem sucedidos é o resultado dos efeitos da activação da coagulação, fibrinólise, ou sistemas complementares. Essa activação pode danificar o sistema pulmonar, levando à síndrome respiratória aguda do adulto (SRAA), insuficiência renal e da circulação esplâncnica, e a indução de uma coagulopatia geral que conduz à perda de sangue e à necessidade de transfusões. Além dos perigos da perda sanguínea peri-operatória, patologias adicionais associados com SIR incluem deficiências cognitivas, acidente vascular cerebral, insuficiência renal, infarte agudo do miocárdio e lesões do tecido cardíaco.

As transfusões de sangue também apresentam um risco significativo de infecção e elevam o custo da revascularização miocárdica ou outros processos semelhantes que exigem a CEC. Na ausência de qualquer intervenção farmacológica, três a sete unidades de sangue devem normalmente ser gastas num paciente, mesmo com excelentes técnicas cirúrgicas. Assim, existe incentivo considerável para o desenvolvimento de novos e melhores compostos farmacologicamente eficazes para reduzir ou prevenir o sangramento intra-operatório e SIR em pacientes submetidos a procedimentos de circulação extracorpórea e revascularização do miocárdio.

Considerações de Administração e Dosagem para polipeptídeos KI

Os polipeptídeos KI aqui descritos podem ser administrados a um paciente antes, durante e/ou após um procedimento cirúrgico numa composição farmacologicamente aceitável. O termo composição "farmacologicamente aceitável" refere-se a um transportador atóxico ou excipiente, que pode ser administrado a um paciente, juntamente com um composto da presente divulgação, por exemplo com o polipeptídeo KI que está a ser utilizado de acordo com a presente invenção, e em que o transportador ou o excipiente não destroem a actividade biológica ou farmacológica da composição de polipeptídeos KI aqui descritos e que podem ser administrados localmente ou sistemicamente por qualquer meio adequado para a entrega de uma quantidade inibidora da calicreína dos polipeptídeos KI a um paciente, incluindo mas não limitado a administrações sistémicas, tais como, por exemplo, por via intravenosa e inalação. A administração parenteral é particularmente preferida.

Para a administração parenteral, os polipeptídeos podem ser administrado por via intravenosa, intramuscular, intraperitoneal ou subcutânea. A administração intravenosa é preferível. Normalmente, as composições para a administração intravenosa são soluções em tampão isotónico

estéril aquoso. Outros transportadores farmacologicamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados a, água estéril, solução salina e tampão salino (incluindo os tampões como o fosfato ou acetato), álcool, óleos vegetais, glicóis de polietileno, gelatina, lactose, amilose, estearato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina, etc. Sempre que necessário, a composição também pode incluir um agente solubilizante e um anestésico local como a lidocaína para aliviar a dor no local da injeção, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sais, lubrificantes, etc., desde que não reagem deletoriamente com os compostos activos. Da mesma forma, a composição pode compreender excipientes convencionais, por exemplo, substâncias transportadoras farmacologicamente aceitáveis, orgânicas ou inorgânicas, apropriadas para aplicação por via parenteral, enteral ou intranasal que não reajam deletoriamente com os compostos activos. Geralmente, os ingredientes serão fornecidos separadamente ou misturados em forma de dosagem unitária, por exemplo, na forma de pó liofilizado ou concentrado livre de água num recipiente hermeticamente fechado, como uma ampola ou saqueta indicando a quantidade de agente activo em unidades de actividade. Quando a composição é administrada por infusão, pode ser dispensada com uma garrafa de infusão estéril contendo grau de "água para injeção" farmacêutica estéril ou salina. Quando a composição é administrada por injeção, uma ampola de água esterilizada para injeção ou solução salina pode ser fornecida para que os ingredientes possam ser misturados antes da administração.

Preferencialmente, os métodos da presente divulgação incluem a administração de um polipeptídeo KI a um paciente como uma infusão intravenosa de acordo com qualquer procedimento aprovado. Assim, um polipeptídeo KI aqui descrito pode ser administrado a um paciente submetido a um procedimento de revascularização do miocárdio em momentos semelhantes aos actualmente utilizados em protocolos aprovados para a administração de aprotinina e em quantidade necessária para fornecer a um paciente um número exigido ou concentração de unidades inibidoras da calicreína (KIU). De acordo com a presente divulgação, um polipeptídeo KI aqui descrito também pode ser administrado

a um paciente no pós-operatório imediato, quando anomalias de sangramento podem ocorrer como consequência de efeitos a jusante da SIR. Por exemplo, num processo envolvendo CEC, um polipeptídeo KI descrito aqui pode ser administrado a um paciente como uma dose inicial, por exemplo, uma quantidade eficaz ao longo de um tempo conveniente, tal como 10 minutos, antes da indução da anestesia. Então, na indução da anestesia, uma segunda dose de polipeptídeo KI pode ser injectada no líquido iniciador de CEC ("bomba de volume iniciador"). O paciente pode então ser colocado numa dose de infusão contínua e controlada por via intravenosa para a duração do procedimento cirúrgico, e após o procedimento, se indicado.

Actualmente, existem dois regimes aprovados nos Estados Unidos para administrar aprotinina num paciente submetido a um procedimento de revascularização do miocárdio (ver, no rótulo do produto e inserção para o Trasylol[®], Bayer Corporation Pharmaceutical Division, West Haven, Connecticut). Um desses regimes aprovados usa uma dose intravenosa de 2 milhões de KIU na dose de carga, 2 milhões de KIU no volume da bomba iniciadora, e 500.000 KIU por hora de cirurgia. Outro regime aprovado usa uma dose intravenosa de um milhão de KIU na dose de carga, 1 milhão de KIU no volume da bomba iniciadora e 250.000 KIU por hora de cirurgia. Como esses regimes se baseiam em KIU, os regimes são facilmente adaptados a qualquer polipeptídeo KI aqui descrito uma vez que a actividade específica e KIU de um polipeptídeo KI particular, tem sido determinada por ensaios padrão. Devido à maior afinidade de ligação e actividade inibitória de polipeptídeos KI representativos aqui descritos em relação a aprotinina, espera-se que tais composições e métodos da presente divulgação sejam susceptíveis de exigir menos miligramas (mg) por paciente para fornecer um paciente o número necessário ou a concentração de KIU.

Várias considerações a respeito da dose com um polipeptídeo KI nos métodos da presente divulgação podem ser ilustradas a título de exemplo, com o polipeptídeo KI PEP-1 representativo tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID

NO: 2 (peso molecular de 7.054 Daltons), que é o polipeptídeo que está a ser utilizado de acordo com a presente invenção.

A Tabela 1, abaixo, apresenta uma comparação da afinidade ($K_{i,app}$) do polipeptídeo KI PEP-1 para a calicreína e onze outras proteases plasmáticas conhecidas.

Tabela 1

Substrato de Protease	PEP-1 $K_{i,app}$ (pM)	Aprotina $K_{i,app}$ (pM)
calicreína plasmática humana	44	3.0×10^4
calicreína da urina humana	$>1 \times 10^8$	4.0×10^3
calicreína pancreática suína	2.7×10^7	550
Clr humana, activada	$>2.0 \times 10^8$	$>1.0 \times 10^7$
Cls humana, activada	$>2.0 \times 10^7$	$>1.0 \times 10^8$
factor XIa do plasma humano	1.0×10^4	ND
factor XIIa do plasma humano	$>2.0 \times 10^7$	$>1.0 \times 10^8$
plasmina humana	1.4×10^5	894
tripsina pancreática humana	$>2 \times 10^7$	ND
quimotripsina pancreática humana	$>2.0 \times 10^7$	7.3×10^5
elastase de neutrófilos humanos	$>2.0 \times 10^7$	1.7×10^6

ND = não determinado

Claramente, o polipeptídeo KI PEP-1 é altamente específico para a calicreína plasmática humana. Além disso, a afinidade ($K_{i,app}$) do PEP-1 para a calicreína é 1000 vezes maior do que a afinidade da aprotinina para calicreína: o $K_{i,app}$ do PEP-1 para a calicreína é cerca de 44 pM (Tabela 1), enquanto o $K_{i,app}$ da aprotinina para a calicreína é de 30000 pM. Assim, uma dose de PEP-1 poderia ser aproximadamente 1000 vezes menor que a utilizada para a aprotinina numa base por mole. No entanto, a consideração de vários outros factores podem fornecer uma estimativa mais precisa da dose de PEP-1 necessária na prática. Tais factores incluem a quantidade de calicreína activada durante a CEC num paciente em particular, a concentração de calicreína necessária para provocar uma SIR e a biodisponibilidade e distribuição farmacológica do PEP-1 num paciente. No entanto, o uso de um polipeptídeo KI nos métodos de acordo com a presente divulgação e fornecido em doses actualmente aprovadas para o uso da aprotinina ainda

é esperado fornecer melhorias significativas sobre o uso actual da aprotinina bovina, menos específica e com menor afinidade.

Por exemplo, o montante total da pré-caliceína em circulação no plasma é estimada em cerca de 500 nM (Silverberg, M. et al, "The Contact System and its Disorders", in Blood: Principles and Practice of Hematology, Handin, R. et al, eds, JB Lippincott Co. Philadelphia, 1995.). Se todas as pré-caliceínas forem activadas, então, pelo menos 500 nM de PEP-1 seria necessário para uma inibição estequiométrica da caliceína. Um indivíduo com 5 litros de plasma exigiria, portanto, cerca de 18 mg de PEP-1 para alcançar uma concentração plasmática de 500 M.

Outro fator a considerar é a concentração limite de caliceína necessária para induzir a SIR num paciente. Se a concentração de caliceína activa deve ser mantida abaixo, por exemplo, de 1 nM, em seguida, devido à sua elevada afinidade para a caliceína, o PEP-1 oferece uma vantagem significativa sobre a aprotinina na quantidade de proteína que seria necessária para inibir a SIR. Em particular, uma concentração de PEP-1 de 1nM inibiria 99,6% da caliceína presente no 1 nM (i.e., apenas 0,4 pM da caliceína livre restante no sangue), enquanto uma concentração de 1 nM de aprotinina só inibe 24,5% da caliceína presente no 1 nm. Para a aprotinina para inibir 99% da caliceína em 1 nM, é necessário uma concentração de aprotinina no plasma de pelo menos 3 µM (ou seja, 3000 vezes mais concentração do que para PEP-1).

Para um paciente submetido à CEC, uma dose clínica inicial de PEP-1 pode ser estimada a partir de uma dose recomendada de aprotinina (1×10^6 KIU), mencionada acima. A aprotinina é relatada num folheto como tendo uma actividade inibitória específica de 7143 KIU/mg determinado usando um ensaio da pressão arterial no cão. Portanto, 1×10^6 KIU da aprotinina é equivalente a 140 mg de aprotinina (i.e., 1

$\times 10^6$ KIU/7143 KIU/mg = 140 mg de aprotinina). Num paciente com um volume de plasma de 5 litros, 140 mg correspondem a cerca de 4,3 μ M de aprotinina (peso molecular da aprotinina é 6512 Daltons). A actividade específica da aprotinina no ensaio padrão inibitório usado para o PEP-1 é de 0,4 KIU/mg de polipeptídeo. Uma dose de 140 mg corresponderia a uma dose de aprotinina de 56 KIU (140 mg \times 0,4 KIU/mg = 56 KIU). Em contraste, uma vez que a actividade específica do polipeptídeo PEP KI-1 é de 10 KIU/mg, no ensaio de inibição padrão, uma dose de apenas 5,6 mg de PEP-1 seria obrigada a fornecer o número de KIUs equivalente a 140 mg de aprotinina. Num paciente com um volume de plasma de 5 litros, isto corresponde a cerca de 160 nM de PEP-1 (peso molecular de PEP-1 é 7054 Daltons), apesar de uma dose mais elevada do polipeptídeo PEP KI-1 poder ser necessária se toda a calicreína plasmática (500 nm) é activada e/ou se este polipeptídeo KI é mal distribuído num paciente.

Além disso, os polipeptídeos KI pode ser de ocorrência não-natural, e podem ser produzidos sinteticamente ou de forma recombinante, como indicado acima, evitando assim possível contaminação de doenças transmissíveis que podem surgir durante o isolamento de uma proteína de uma fonte animal natural, como no caso da aprotinina, que é isolada do pulmão bovino. Cada vez mais importante para a aceitação administrativa e pública de uma composição de tratamento ou farmacêutica compreendendo um polipeptídeo é a prevenção de possível contaminação com e transmissão para pacientes humanos de vários agentes patológicos. De particular interesse para a segurança das proteínas isoladas de um tecido bovino é a eliminação dos possíveis riscos de exposição a doenças mediadas virais, doenças mediadas bacterianas, e, especialmente, as encefalopatias espongiformes bovinas.

Como variantes do domínio Kunitz 1 da proteína LACI humana, menos efeitos colaterais são esperados de administrar os polipeptídeos KI aos pacientes do que para a aprotinina, que é uma proteína bovina que está documentado causar reacções anafilácticas e anafilactóides em pacientes, especialmente nas administrações repetidas, tais como em

segundos procedimentos de revascularização do miocárdio. Além disso, a alta especificidade de ligação dos polipeptídeos KI descritos aqui para a calicreína limitarão ou eliminarão efectivamente a tendência trombótica observada com a aprotinina, e diminuirão os problemas observados com a permeabilidade do enxerto após procedimentos de revascularização do miocárdio.

A invenção ainda será descrita com referência aos exemplos não limitativos a seguir.

EXEMPLIFICAÇÃO

Exemplo 1: Um polipeptídeo KI representativo

Um polipeptídeo KI (PEP-1), de ocorrência não-natural, útil nas composições e métodos da presente divulgação foi identificado como um polipeptídeo de ligação da calicreína exibida num fago recombinante a partir de uma biblioteca de macrófago. O PEP-1 tem a seguinte sequência de aminoácido: Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe He Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 2). O peso molecular do PEP-1 é 7.054 Daltons.

A sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 3) do ADN recombinante do fago codificando a sequência de aminoácidos PEP-1 (SEQ ID NO: 2) foi isolada e sequenciada por métodos padrão determinados a partir do ADN do fago recombinante. O PEP-1 foi produzido em quantidades úteis para a caracterização de uma proteína recombinante no fenótipo *His4* de células hospedeiras de levedura da estirpe *Pichia pastoris*.

Exemplo 2: Construção de um plasmídeo recombinante para expressar polipeptídeos KI.

O plasmídeo inicial, pHIL-D2 é resistente à ampicilina e contém um alelo do tipo selvagem de *His4* de *P. pastoris*. A sequência de ADN final compreendendo a sequência de codificação para a proteína de fusão mata prepro-PEP-1 na expressão do plasmídeo recombinante pPIC-K503 é mostrada na FIG. 2. A sequência de ADN de pHIL-D2 foi modificada para produzir pPIC-K503, como segue:

1. O sítio *Bst*BI na região 3' AOX1 do pHIL-D2, localizado a jusante do gene *His4*, foi removido por digestão da limitação parcial, enchimento, e ligadura, alterando a sequência de TTCGAA (SEQ ID NO: 23) para TTCGCGAA (SEQ ID NO: 24). Esta modificação foi feita para facilitar e direccionar a clonagem da cassette de expressão no plasmídeo.

2. O sítio *Aat*II tendo o gene *bla* localizado a jusante de *His4* foi removido por digestão de restrição, enchimento, e ligadura alterando a sequência de GACGTC (SEQ ID NO: 25) para GACGTACGTC (SEQ ID NO: 26). Esta modificação foi feita para facilitar a clonagem da cassette de expressão tendo sítios *Aat*II no plasmídeo. O ADN codificando PEP-1 foi sintetizado com base na sequência de nucleotídeos a partir da ligação da calicreína original do macrófago e consistiu em 450 pares de base (pb). A sequência de ADN final da inserção no plasmídeo pHIL-D2 é ladeado por uma sequência 5' AOX1 e uma sequência 3' AOX1 (partes das quais são mostrados na FIG. 2) e codifica uma proteína de fusão compreendendo o peptídeo sinal mata prepro de *S. cerevisiae* fundido à sequência de codificação estrutural para o polipeptídeo KI PEP-1. O peptídeo de sinal foi adicionado para facilitar a secreção do PEP a partir das células hospedeiras de levedura. Os oligonucleotídeos para formar a inserção foram sintetizados e obtidos comercialmente (Genesis Labs, The Woodlands, TX), e a inserção foi gerada pela reacção em cadeia da polimerase (PCR). O ADN de codificação sintética ligado à proteína de fusão mata prepro/PEP-1 foi incorporado pela ligadura no plasmídeo pHIL-D2 modificado entre os sítios *Bst*BI e *Eco*RI.

Os produtos de ligação foram usados para transformar a estirpe de *Escherichia coli* XL1 Blue. A técnica de PCR foi utilizada para a triagem de tela transformantes *E. Coli* para a construção do plasmídeo desejado. O ADN a partir de extractos celulares foi amplificado por PCR usando iniciadores contendo as sequências 5' AOX1 e 3' AOX1 (ver acima a FIG. 2). Os produtos PCR do número correcto de pares de base foram sequenciados. Além disso, cerca de 20-50 pb em cada lado dos sítios de clonagem foram sequenciados e a sequências predita foi obtida. A sequência de ADN final da inserção no plasmídeo pHIL-D2 (para produção do plasmídeo pPIG-K503) é mostrada na FIG. 2 juntamente com porções de sequências acompanhamento 5'e 3' AOX1 e sequência de aminoácidos correspondente da proteína de fusão compreendendo o peptídeo de sinal mata prepro de *S. Cerevisiae* fundido com a sequência de codificação estrutural para o polipeptídeo KI PEP-1. Um transformante com a construção do plasmídeo de expressão desejado, plasmídeo pPIC-K503, foi seleccionado para a preparação de linhas celulares de leveduras para a produção de rotina do PEP-1.

Exemplo 3: Fabricação de PEP-1 a partir da linha celular de leveduras recombinantes.

Esferoplastos de *P. Pastoris* GS 115 com o fenótipo *His4'* foram transformados com o plasmídeo de expressão pPIC-K503 (acima), seguido por linearização do plasmídeo no sítio *SacI* e recombinação homóloga do plasmídeo de ADN no hospedeiro locus 5' AOX1. O fenótipo da estirpe de produção é *His4⁺*. O plasmídeo inteiro foi inserido na sequência genómica da levedura 5' AOX1.

Isolados a partir da transformação foram seleccionados para o crescimento na ausência de histidina exógena com metanol como única fonte de carbono. Mais de 95% dos transformantes mantinham a capacidade de tipo selvagem para crescer com metanol como única fonte de carbono, demonstrando assim que o plasmídeo foi inserido no genoma do hospedeiro por

recombinação homóloga, em vez de transplacement. Estes transformantes não requerem histidina exógena para o crescimento, demonstrando que o plasmídeo tinha-se integrado no genoma do hospedeiro. As colónias seleccionadas foram clonadas. Pequenos estudos de expressão de cultura foram realizados para identificar clones secretores dos mais altos níveis de PEP-1 activo no meio de cultura. Os níveis de secreção PEP-1 nas soluções de sobrenadantes na cultura foram quantificados para os níveis PEP-1 através de eletroforese em gel de poliacrilamida de sódio (SDS-PAGE) e avaliados quanto à inibição da calicreína. Um clone de levedura foi seleccionado para a produção de PEP-1 com base no seu alto nível de expressão de PEP-1 entre as amostras de culturas.

Bancos de células de trabalho e mestres de *P. pastoris*. produtores de PEP foram preparados comercialmente (MDS Pharma Services, Bothell, Washington). Um padrão de produção do PEP-1 na levedura compreendeu três etapas da seguinte forma: (1) preparação da cultura de sementes, (2) fermentação, e (3) recuperação da cultura.

A etapa de sementes da cultura consistiu na inoculação de seis frascos (300 mL) contendo caldo de inóculo estéril (base de nitrogénio de levedura, fosfato de potássio e glicerol, pH = 5) com o conteúdo de um único frasco de um banco de células de trabalho de *P. pastoris* produzindo Pep-1. Os frascos foram inoculados num agitador orbital (300 rpm) por aproximadamente 13 horas a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

As fermentações foram realizadas num fermentador fechado Braun de 100 litros cheio de caldo estéril. Cada fermentação foi iniciada com a transferência do conteúdo dos seis frascos de sementes de cultura para o fermentador. Após aproximadamente 24 horas, o glicerol no fermentador esgotou-se e glicerol adicional foi acrescentado por aproximadamente 8 horas adicionais.

Uma fase de alimentação mista, que durou cerca de 83 horas, foi iniciada pela adição de uma alimentação de glicerol e metanol. No final deste tempo, a fermentação foi encerrada, e os conteúdos do fermentador foram diluídos com água purificada. A purificação e tratamento de PEP-1 consiste em cinco etapas como se segue: (1) a cromatografia de leito expandido, (2) cromatografia de troca catiónica, (3) cromatografia de interacção hidrofóbica (HIC), (4) ultrafiltração e diafiltração, e (5) filtração final e embalagem.

O passo inicial de purificação consistiu na cromatografia de leito expandido. A cultura do fermentador diluída foi aplicada à coluna equilibrada embalada com resina Streamline SP (coluna cromatográfica Amersham Pharmacia Streamline 200, Amersham Pharmacia, Piscataway, Nova Jersey). A coluna foi lavada (50 mM de ácido acético, pH = 3,0 - 3,5) num modo de fluxo ascendente para libertar as células de levedura do leito expandido. A placa superior foi levantada acima do leito expandido para melhorar a lavagem. O fluxo foi interrompido e foi permitido ao leito assentar. O adaptador foi movido para baixo para que ficasse ligeiramente acima do leito assente. A direcção do fluxo foi invertida. O efluente foi recolhido. A lavagem continuou num modo de baixo usando 50 mM de acetato de sódio, pH 4,0. O efluente foi recolhido. O PEP-1 foi eluído da coluna utilizando 50 mM de acetato de sódio, pH 6,0. O eluato foi recolhido num recipiente de 50 litros. O eluato foi filtrado através de um filtro de 0,22 μ num recipiente limpo localizado no sítio de purificação. Amostras adicionais foram recolhidas para a determinação da concentração de PEP-1. A etapa de cromatografia de troca catiónica foi feita usando o eluato filtrado da coluna de leito expandido. O PEP-1 foi eluído da coluna com 15 mM de citrato trissódico, pH 6,2.

As proteínas adicionais foram removidas da preparação de PEP-1 por cromatografia de interacção hidrofóbica (HIC). Antes da HIC, o eluato da coluna de troca catiónica foi diluído com sulfato de amónio. O eluato foi aplicado à coluna, e o PEP-1 foi eluído com sulfato de amónio (0,572

M) em fosfato de potássio (100 mM), pH.7.0. O eluato foi recolhido em fracções com base nos valores A280. Todas as fracções foram recolhidas em garrafas de PETG estéreis, pré-pesadas.

As fracções seleccionadas foram agrupadas num recipiente limpo. Os lotes foram concentrados por ultrafiltração. A preparação PEP-1 concentrada foi imediatamente difiltrada contra dez volumes de PBS, pH 7,0.

A etapa de filtração final foi realizada antes da embalagem a fim de minimizar a carga microbiana no volume PEP-1. A solução da amostra foi filtrada através de um filtro de 0,22 μ e recolhida numa garrafa PETG, estéril, pré-pesada. Uma amostra foi retirada para libertação de lotes de teste. O restante do volume foi dispensado assepticamente em garrafas de PETG estéreis e armazenadas a -20°C .

Exemplo 4: Ensaio de Inibição de Calicreína

Um ensaio cinético foi usado para medir a actividade inibitória de polipeptídeos de KI, como o PEP-1. O ensaio cinético mede a fluorescência seguida da clivagem da calicreína mediada de um substrato, a cumarina, metil prolilfenilalanilarginil amino. Uma quantidade conhecida de calicreína foi incubada com um padrão de referência de série de polipeptídeo ou amostras de teste de série de polipeptídeo KI diluído, num tampão de reacção adequado numa placa de microtitulação. Cada amostra foi executada em triplicado. A solução de substrato foi adicionado, e a placa lida imediatamente, usando um comprimento de onda de excitação de 360 nm e um comprimento de onda de emissão de 460 nm. Pelo menos dois de cada um dos padrões de referência e as curvas da amostra foram obrigadas a ter um valor de R-quadrado de 0,95 para ser considerado válido.

Embora esta invenção tenha sido particularmente apresentada e descrita com referências a modalidades preferidas, será entendido por os peritos na técnica que várias mudanças na forma e detalhes podem ser feitos, sem se afastar do âmbito de aplicação da invenção integrado pelas reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo consistindo na sequência de aminoácido:

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn
Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu
Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 2),

no qual o polipeptídeo inibe a calicreína plasmática, para uso na prevenção ou redução de isquemia ou prevenir ou reduzir o aparecimento de uma resposta inflamatória sistemática associada com um procedimento cirúrgico num paciente.

2. Polípeptídeo de acordo com a reivindicação 1, para o uso em prevenir e reduzir a isquemia associada com perda de sangue peri-operatória devido a procedimento cirúrgico realizado num paciente.

3. Polípeptídeo de acordo com a reivindicação 1, para o uso como referido na reivindicação 2, em que o procedimento cirúrgico é uma cirurgia cardio-torácica.

4. Polípeptídeo de acordo com a reivindicação 1, para o uso como referido na reivindicação 3, em que a cirurgia cardio-torácica é um bypass cardiopulmonar ou uma cirurgia de revascularização miocárdica.

5. Polípeptídeo de acordo com a reivindicação 1, para o uso na prevenção e redução da resposta inflamatória sistêmica associada com a cirurgia cardio-torácica.

6. Polípeptídeo de acordo com a reivindicação 1, para o uso como referido na reivindicação 5, em que a cirurgia cardio-torácica é um bypass cardiopulmonar ou uma cirurgia de revascularização miocárdica.

7. Polípeptídeo de acordo com a reivindicação 1, para o uso como referido em qualquer das reivindicações anteriores, em que o procedimento cirúrgico é uma cirurgia cardíaca pediátrica.

8. Polípeptídeo de acordo com a reivindicação 1, para o uso como referido na reivindicação 1 ou 2, em que o procedimento cirúrgico é um transplante de pulmão ou um transplante ortotópico do fígado.

9. Polípeptídeo de acordo com a reivindicação 1, para o uso como referido em qualquer das reivindicações anteriores, em que o procedimento cirúrgico incluem a utilização de circulação extracorpórea.

10. Polípeptídeo de acordo com a reivindicação 1, para o uso como referido em qualquer das reivindicações anteriores, em que o procedimento cirúrgico inclui traumatismo do osso.

11. Polípeptídeo de acordo com a reivindicação 1, para o uso como referido na reivindicação 1 ou 2, em que o procedimento cirúrgico incluem substituição da anca ou separação do esterno.

12. Uso de um polipeptídeo consistindo na sequência de aminoácido:

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn
His Phe Thr Arg Gin Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gin Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu
Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 2)

em que o polipeptídeo inibe a calicreína plasmática, na preparação de um medicamento para prevenir ou reduzir a isquemia ou impedir ou reduzir o aparecimento de uma

resposta inflamatória sistémica associada a um procedimento cirúrgico num paciente.

13. Uso de acordo com a reivindicação 12 como definido em qualquer das reivindicações 2-11.

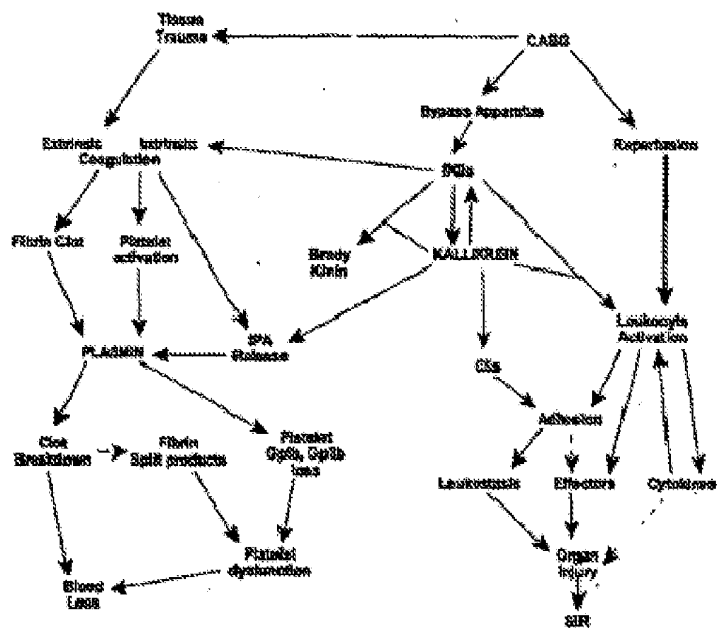


Figura 1

5.82X1

EcoR I

CG ACT TTT AAC GAC AAC TTG AGA AGA TCA AAA AAC AAC TAA TTA TTC GAA

ACG ATG AGA TTC CCA TCT ATC TTC ACT GCT GGT TTG TTC GCT GCT
N R F P S I F T A V L F A A

TCC TCT GCT TTG GCT GCT CCA GTT AAC ACC ACT ACT GAA GAC GAG ACT
S S A L A R P V N T F F E D E T

GCT CAA ATT OCT GCT GAG GCT GTC ATC GGT TAC TCT GAC TTG GAA GGT
A Q I P A E A V I G Y S D L E G

GAC TTC GAC GTC GGT GTT TTG CCA TTC TCT AAC TCT ACT AAC AAC GGT
D F D V A V L P F S H S F N N G

TTG TTG TTC ATC AAC ACT ACC ATC GCT TCT ATC GCT GCT AAG GAG GAA
E L F I N T T I A S I A A K E E

GCT GTT TCC CTC GAG AAG AGA GAG GCT ATG CAC TCT TTC TGT GCT TTC
G V E L E K R E A M H S F C A F

AGG GCT GAC GAC GGT CCG TGC AGR GCT GCT CAG CCA AGA TGG TTC TTC
K A D D G F C R A A H P R W F F

AAC ATC TTC ACG CGT CAA TGC GAG GAG TTC ATC TAC GGT GGT TGT GAG
N I F T R Q C E E F I Y G G C E

GGT AAC CAA AAC ACA TTC GAG TCT CTA GAG GAG TGT AAG AAG ATG TGT
G N Q N R F E S L E E C K K M C

EcoR I

ACT AGA GAC TAG TAA GAA TTC GCC TTA GAC ATG ACT GTT CCT CAG TTC
T R D * *

3.82X1

AAG TTG GGC ACT TAC GAG AAG
3.82X1

Figura 2


```

SEQ ID 2: (amino acids 1-60) ----MHSFCAPKA-DDGPCRAAHPRWFFNIPTQCCEPFIYGG
SEQ ID 4: ----MHSFCAPKA-DDGPCRANHLRFFFNIPTRQCEPFIYGG
SEQ ID 5: ----MHSFCAPKA-DDGCCKANHQRFFFNIPTQCCEPFIYGG
SEQ ID 6: ----MHSFCAPKA-DDGCCKANHQRFFFNIPTQCCEPFIYGG
SEQ ID 7: ----MHSFCAPKA-DDGCCKAALPRFFFNIPTRQCEPFIYGG
SEQ ID 8: ----MHSFCAPKA-DDGCCKANHQRFFFNIPTQCCEPFIYGG
SEQ ID 9: ----MHSFCAPKA-DDGCCKAALPRFFFNIPTRQCEPFIYGG
SEQ ID 10: ----MHSFCAPKA-DDGCCKGALPRFFFNIPTRQCEPFIYGG
SEQ ID 11: ----MHSFCAPKA-DDGCCKGALPRFFFNIPTRQCEPFIYGG
SEQ ID 12: ----MHSFCAPKA-DDGPCRAAHPRWFFNIPTQCCEPFIYGG
SEQ ID 13: ----MHSFCAPKA-DVGCCKGALPRFFFNIPTRQCEPFIYGG
SEQ ID 14: ----MHSFCAPKA-DVGCCKGALPRFFFNIPTRQCEPFIYGG
SEQ ID 15: ----MHSFCAPKA-DDGCCKAALPRFFFNIPTRQCEPFIYGG
SEQ ID 16: ----MHSFCAPKA-DDGCCKAALPRFFFNIPTRQCEPFIYGG
SEQ ID 17: ----MHSFCAPKA-DDGCCKGALPRFFFNIPTRQCEPFIYGG
SEQ ID 18: ----MHSFCAPKA-DDGCCKGALPRFFFNIPTRQCEPFIYGG
SEQ ID 19: ----MHSFCAPKA-DDGCCKGALPRFFFNIPTRQCEPFIYGG
SEQ ID 20: ----MHSFCAPKA-DDGCCKGALPRFFFNIPTRQCEPFIYGG
SEQ ID 21: ----MHSFCAPKA-DDGCCKGALPRFFFNIPTRQCEPFIYGG
SEQ ID 22: ----MHSFCAPKA-DDGCCKGALPRFFFNIPTRQCEPFIYGG
BPTI (SEQ ID 29): ----RPDPCLEPP-YTGPCVAMFFRYFYNGTSMACQTFVYGG
ITI-D1 (SEQ ID 30): ----KEDSCQLGY-SAGPCVAMFFRYFYNGTSMACQTFVYGG
ITI-D2 (SEQ ID 31): ----TVRACHLPI-VRGPCIAFFPRWAFDAVEGKCVLFPYGG
LACI-D1 (SEQ ID 32): ----MHSFCAPKA-DDGCCKAALPRFFFNIPTRQCEPFIYGG
LACI-D2 (SEQ ID 33): ----KPDPCLEPP-DGDCCKGALPRFFFNIPTRQCEPFIYGG
LACI-D3 (SEQ ID 34): ----GDSNCLTPA-DGDCCKGALPRFFFNIPTRQCEPFIYGG
HXI 89 (SEQ ID 35): ----LPSVCAFM-ENGPCVAMFFRYFYNGTSMACQTFVYGG
C-3 (SEQ ID 36): ----ETDICKLPK-DGDCCKGALPRFFFNIPTRQCEPFIYGG
TFPI-2 D1 (SEQ ID 37): ----EAEICLLPL-DYGCIAFFPRWAFDAVEGKCVLFPYGG
TFPI-2 D2 (SEQ ID 38): ----VFKVCRLOVSDQCSSTBKFFNLSHWTCCEPFIYGG
TFPI-2 D3 (SEQ ID 39): ----IPSPCYSPK-DGDCCKGALPRFFFNIPTRQCEPFIYGG
APP-I (SEQ ID 40): ----RMRVCSQA-ETGPCIAFFPRWAFDAVEGKCVLFPYGG
Epine7 (SEQ ID 41): ----RPDPCLEPP-YTGPCVAMFFRYFYNGTSMACQTFVYGG
BITI-87-161 (SEQ ID 42): ----RPDPCQLGY-SAGPCVAMFFRYFYNGTSMACQTFVYGG
MUT26A (SEQ ID 43): ----RPDPCQLGY-SAGPCVAMFFRYFYNGTSMACQTFVYGG
MUT8 (SEQ ID 44): ----RPDPCQLGY-SAGPCVAMFFRYFYNGTSMACQTFVYGG
MUT1519 (SEQ ID 45): ----RPDPCQLGY-SAGPCVAMFFRYFYNGTSMACQTFVYGG
EPI-HNE-1 (SEQ ID 46): ----EAEARPCLEPP-YTGPCIAFFPRWAFDAVEGKCVLFPYGG
EPI-HNE-2 (SEQ ID 47): ----AACHLPI-VRGPCIAFFPRWAFDAVEGKCVLFPYGG
EPI-HNE-3 (SEQ ID 48): ----AACHLPI-VRGPCIAFFPRWAFDAVEGKCVLFPYGG
EPI-HNE-4 (SEQ ID 49): ----EACHLPI-VRGPCIAFFPRWAFDAVEGKCVLFPYGG
DPI14 KR (SEQ ID 50): ----EAVREVCSEA-ETGPCIAFFPRWAFDAVEGKCVLFPYGG
DPI24 KR (SEQ ID 51): ----EAEARPCLEPP-YTGPCIAFFPRWAFDAVEGKCVLFPYGG
DPI68 KR (SEQ ID 52): ----EAEARPCLEPP-DGDCCKGALPRFFFNIPTRQCEPFIYGG
DPI84 KR (SEQ ID 53): ----EAEARPCLEPP-DGDCCKGALPRFFFNIPTRQCEPFIYGG

```

Figura 3A

SEQ ID 2:	{cont.}	CGGNQ--NRFSLEECKKMCTRD
SEQ ID 4:	{cont.}	CGGNQ--NRFSLEECKKMCTRD
SEQ ID 5:	{cont.}	CGGNQ--NRFSLEECKKMCTRD
SEQ ID 6:	{cont.}	CGGNQ--NRFSLEECKKMCTRD
SEQ ID 7:	{cont.}	CGGNQ--NRFSLEECKKMCTRD
SEQ ID 8:	{cont.}	CGGNQ--NRFSLEECKKMCTRD
SEQ ID 9:	{cont.}	CGGNQ--NRFSLEECKKMCTRD
SEQ ID 10:	{cont.}	CGGNQ--NRFSLEECKKMCTRD
SEQ ID 11:	{cont.}	CGGNQ--NRFSLEECKKMCTRD
SEQ ID 12:	{cont.}	CGGNQ--NRFSLEECKKMCTRD
SEQ ID 13:	{cont.}	CGGNQ--NRFSLEECKKMCTRD
SEQ ID 14:	{cont.}	CGGNQ--NRFSLEECKKMCTRD
SEQ ID 15:	{cont.}	CGGNQ--NRFSLEECKKMCTRD
SEQ ID 16:	{cont.}	CGGNQ--NRFSLEECKKMCTRD
SEQ ID 17:	{cont.}	CGGNQ--NRFSLEECKKMCTRD
SEQ ID 18:	{cont.}	CGGNQ--NRFSLEECKKMCTRD
SEQ ID 19:	{cont.}	CGGNQ--NRFSLEECKKMCTRD
SEQ ID 20:	{cont.}	CGGNQ--NRFSLEECKKMCTRD
SEQ ID 21:	{cont.}	CGGNQ--NRFSLEECKKMCTRD
SEQ ID 22:	{cont.}	CGGNQ--NRFSLEECKKMCTRD
BPTI (SEQ ID 29):	{cont.}	CHARR--NRFSLAECKKMCTRD
ITI-D1 (SEQ ID 30):	{cont.}	CGGNQ--NRFVTEKCLQTCRGA
ITI-D2 (SEQ ID 31):	{cont.}	CGGNQ--NRFVTEKCLQTCRGA
LACI-D1 (SEQ ID 32):	{cont.}	CGGNQ--NRFVTEKCLQTCRGA
LACI-D2 (SEQ ID 33):	{cont.}	CGGNQ--NRFVTEKCLQTCRGA
LACI-D3 (SEQ ID 34):	{cont.}	CGGNQ--NRFVTEKCLQTCRGA
HKI B9 (SEQ ID 35):	{cont.}	CGGNQ--NRFVTEKCLQTCRGA
C-3 (SEQ ID 36):	{cont.}	CGGNQ--NRFVTEKCLQTCRGA
TFPI-2 D1 (SEQ ID 37):	{cont.}	CGGNQ--NRFVTEKCLQTCRGA
TFPI-2 D2 (SEQ ID 38):	{cont.}	CGGNQ--NRFVTEKCLQTCRGA
TFPI-2 D3 (SEQ ID 39):	{cont.}	CGGNQ--NRFVTEKCLQTCRGA
APP-1 (SEQ ID 40):	{cont.}	CGGNQ--NRFVTEKCLQTCRGA
EpINB7 (SEQ ID 41):	{cont.}	CGGNQ--NRFVTEKCLQTCRGA
BITT-B7-141 (SEQ ID 42):	{cont.}	CGGNQ--NRFVTEKCLQTCRGA
MUTT26A (SEQ ID 43):	{cont.}	CGGNQ--NRFVTEKCLQTCRGA
MUTQ6 (SEQ ID 44):	{cont.}	CGGNQ--NRFVTEKCLQTCRGA
MUT1619 (SEQ ID 45):	{cont.}	CGGNQ--NRFVTEKCLQTCRGA
EPI-HNE-1 (SEQ ID 46):	{cont.}	CGGNQ--NRFVTEKCLQTCRGA
EPI-HNE-2 (SEQ ID 47):	{cont.}	CGGNQ--NRFVTEKCLQTCRGA
EPI-HNE-3 (SEQ ID 48):	{cont.}	CGGNQ--NRFVTEKCLQTCRGA
EPI-HNE-4 (SEQ ID 49):	{cont.}	CGGNQ--NRFVTEKCLQTCRGA
DFI14 KR (SEQ ID 50):	{cont.}	CGGNQ--NRFVTEKCLQTCRGA
DFI24 KR (SEQ ID 51):	{cont.}	CGGNQ--NRFVTEKCLQTCRGA
DFI68 KR (SEQ ID 52):	{cont.}	CGGNQ--NRFVTEKCLQTCRGA
DFI84 KR (SEQ ID 53):	{cont.}	CGGNQ--NRFVTEKCLQTCRGA

Figura 3B