

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2003.06.06	(73) Titular(es): DYAX CORP. 300 TECHNOLOGY SQUARE, 8TH FLOOR 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
(43) Data de publicação do pedido: 2011.04.20	(74) Mandatário: ÁLVARO ALBANO DUARTE CATANA AVENIDA MARQUÊS DE TOMAR, Nº 44, 6º 1069-229 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2014.12.24 027/2015	

(54) Epígrafe: **POLIPEPTÍDEOS DE DOMÍNIO KUNITZ MODIFICADO E SUA UTILIZAÇÃO PARA A REDUÇÃO DE ISQUEMIA OU APARECIMENTO DE UMA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA ASSOCIADA A UM PROCEDIMENTO CIRÚRGICO**

(57) Resumo:

UM POLIPEPTÍDEO COMPREENDENDO A SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS: 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 GIN ASN ARG PHE GLU SER LEU GLU GLU CYS LYS LYS MET CYS THR ARG ASP (AMINOÁCIDOS 3-60 DA SEQ ID NO:2), EM QUE O POLIPEPTÍDEO INIBE A CALICREÍNA.

DESCRIÇÃO

"POLIPEPTÍDEOS DE DOMÍNIO KUNITZ MODIFICADO E SUA UTILIZAÇÃO PARA A REDUÇÃO DE ISQUEMIA OU APARECIMENTO DE UMA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA ASSOCIADA A UM PROCEDIMENTO CIRÚRGICO"

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

As proteases estão envolvidas numa ampla variedade de vias biológicas. Em particular as proteases de serina, como calicreína, plasmina, elastase, ativador de plasminogénio uroquinase, trombina, inibidor de coagulação humana associada à lipoproteína, e fatores de coagulação como os fatores VIIa, IXa, Xa, XIa e XIIa têm sido implicados em vias que afetam o fluxo sanguíneo, por exemplo, isquemia geral e focal, invasão tumoral, fibrinólise, perda de sangue perioperatória e inflamação. Os inibidores de proteases de serina específicos têm, portanto, recebido atenção como alvos potenciais dos fármacos para diversas doenças isquémicas.

Um tal inibidor, a aprotinina (também chamado de inibidor de tripsina pancreática bovina ou BPTI), obtido a partir do pulmão bovino, foi aprovado nos Estados Unidos para uso profilático na redução da perda de sangue perioperatória e a necessidade de transfusão em pacientes submetidos a bypass cardiopulmonar (CPB), por exemplo, no decurso de uma cirurgia de revascularização miocárdica. A aprotinina está disponível comercialmente sob o nome comercial de TRASYLOL® (Bayer Corporation Pharmaceutical Division, West Haven, Connecticut) e foi previamente aprovada para uso no tratamento da pancreatite. A eficácia da aprotinina está associada às suas capacidades relativamente não específicas para inibir uma variedade de proteases de serina, incluindo

calicreína plasmática e plasmina. Essas proteases são importantes num número de vias do sistema de ativação de contacto (CAS).

O CAS é inicialmente ativado quando o sangue total contacta com a superfície de substratos externos (por exemplo, caulino, vidro, sulfato de dextrano ou superfícies ósseas danificadas). A calicreína, uma protease serina, é uma enzima do plasma que inicia a cascata do CAS levando à ativação dos neutrófilos, plasmina, coagulação, e diversas cininas. A calicreína é segregada como uma proenzima (pré-calicreína) que circula como uma molécula inativa até ser ativada por um evento proteolítico no início da cascata de ativação de contacto. Claramente, a inibição específica da calicreína seria uma abordagem muito atraente para controlar a perda de sangue associada à CPB e o aparecimento da resposta inflamatória sistémica (SIR), como seria encontrado durante, por exemplo, vários procedimentos cirúrgicos invasivos.

Apesar de ser o único composto licenciado para a prevenção da perda sanguínea perioperatória na CPB para procedimentos de revascularização do miocárdio (CABG), a aprotinina não é tão amplamente utilizada como seria de esperar. Existem preocupações sérias quanto ao uso deste polipeptídeo bovino em pacientes que necessitam de CPB, e em particular o uso deste composto em procedimentos de CABG. A aprotinina não é específica para a calicreína, mas interage com enzimas adicionais (por exemplo, plasmina) em múltiplas vias. Assim, o mecanismo de ação da aprotinina é em grande parte especulativo, e a falta de compreensão precisa do que é afetado durante o tratamento com a aprotinina produz o risco de complicações durante o tratamento. Uma complicação frequentemente citada é a trombose descontrolada, devido às

ações da aprotinina sobre a via fibrinolítica. Há uma preocupação não só sobre tais eventos hiperagudos como a trombose dos vasos maiores no período perioperatória, mas também sobre a patência do enxerto após o procedimento de CABG. Além disso, como uma proteína natural obtida a partir do pulmão bovino, a administração de aprotinina em seres humanos pode provocar reações graves de hipersensibilidade ou anafiláticas ou anafilactoides após o primeiro e, mais frequentemente, após a administração repetida aos pacientes. Isto é particularmente preocupante num grande número de pacientes que têm de repetir os procedimentos de CABG. Além disso, há uma crescente preocupação do público a respeito do uso de material derivado de fontes bovinas como um vetor potencial para a transmissão da encefalopatia espongiforme bovina aos seres humanos.

Estas preocupações deixam claro que continua a ser uma necessidade a existência de meios mais eficazes e mais específicos e métodos para prevenir ou reduzir a perda de sangue perioperatória e o aparecimento da SIR num paciente submetido à cirurgia, resultando em ativação do CAS, tais como procedimentos CABG em pacientes de CPB, ou substituição da anca.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção é definida pelas reivindicações.

Esta descrição, incluindo a invenção, é baseada na descoberta de peptídeos que inibem as 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 perioperatória e o aparecimento da resposta inflamatória sistémica. Inibidores de peptídeos de calicreína preferidos incluem aqueles

descritos nas Patentes nos EUA 6,333,402 e 6,057,287 de Markland *et al.* É dirigida, em parte, ao uso dos peptídeos em métodos terapêuticos e composições adequadas para o uso na eliminação ou redução de isquemias variadas, incluindo, mas não limitado a, perda de sangue perioperatória, e o aparecimento da resposta inflamatória sistémica. A perda de sangue perioperatória resulta de procedimentos cirúrgicos invasivos que levam ao contacto com a ativação de componentes do complemento e sistemas de coagulação/fibrinólise. Mais especificamente, a invenção fornece métodos de utilização de inibidores da calicreína para reduzir ou evitar a perda de sangue perioperatória e uma resposta inflamatória sistémica em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos invasivos, especialmente cirurgias cardiotorácicas.

Numa situação, a presente descrição compreendendo a invenção é direcionada para um método para prevenir ou reduzir a isquemia num paciente compreendendo a 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 ou Xaa58 são cada um aminoácido ou estão ausentes; Xaa10 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Asp e Glu; Xaa11 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala e Thr; Xaa13 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys e Gln; Xaa15 é um aminoácido

selecionado do grupo consistindo de: Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn e Gln; Xaa16 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Ala, Gly, Ser, Asp e Asn; Xaa17 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln e Thr; Xaa18 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: His, Leu, Gln e Ala; Xaa19 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Pro, Gln, Leu, Asn e Ile; Xaa21 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Trp, Phe, Tyr, His e Ile; Xaa22 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Tyr e Phe; Xaa23 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Tyr e Phe; Xaa31 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile e Thr; Xaa32 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly e Val; Xaa34 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly e Leu; Xaa35 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Tyr, Trp e Phe; Xaa39 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Glu, Gly, Ala, Ser e Asp; Xaa40 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Gly e Ala; Xaa43 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Asn e Gly; Xaa45 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Phe e Tyr; e em que o polipeptídeo inibe a calicreína.

Numa situação particular, a isquemia é a perda de sangue perioperatória devida a um procedimento cirúrgico realizado no paciente. O procedimento cirúrgico pode ser uma cirurgia cardiotorácica, como, por exemplo, a circulação extracorpórea ou cirurgia de revascularização miocárdica.

Numa forma de realização particular, as posições de aminoácidos individuais da SEQ ID N°: 1 são: 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.

Numa outra situação, a presente descrição compreendendo a invenção é direcionada para um método para prevenir ou reduzir o aparecimento da resposta inflamatória sistêmica associada a um procedimento cirúrgico num paciente compreendendo a 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 ou Xaa58 são cada um aminoácido ou estão ausentes; Xaa10 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Asp e Glu; Xaa11 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala e Thr; Xaa13 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys e Gln; Xaa15 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn e Gln; Xaa16 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Ala, Gly, Ser, Asp e Asn; Xaa17 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln e Thr; Xaa18 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: His, Leu, Gln e Ala; Xaa19 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Pro, Gln, Leu, Asn e Ile; Xaa21 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Trp, Phe, Tyr, His e Ile; Xaa22 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Tyr e Phe; Xaa23 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo

de: Tyr e Phe; Xaa31 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile e Thr; Xaa32 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly e Val; Xaa34 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly e Leu; Xaa35 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Tyr, Trp e Phe; Xaa39 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Glu, Gly, Ala, Ser e Asp; Xaa40 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Gly e Ala; Xaa43 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Asn e Gly, Xaa45 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de: Phe e Tyr; e em que o polipeptídeo inibe a calicreína. Num caso particular, o procedimento cirúrgico pode ser uma cirurgia cardiotorácica, como, por exemplo, a circulação extracorpórea ou cirurgia de revascularização miocárdica. Numa forma de realização particular, as posições de aminoácidos individuais da SEQ ID N°: 1 são: 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.

Ainda na outra situação, a presente descrição é direcionada para um método para prevenir ou reduzir o aparecimento da resposta inflamatória sistêmica associada a um procedimento cirúrgico num paciente compreendendo a administração ao paciente de uma composição que compreende um polipeptídeo que consiste da sequência de aminoácidos: 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 (aminoácidos 3-60 da SEQ ID NO:2), em que o polipeptídeo inibe a calicreína.

Numa situação, o procedimento cirúrgico é uma cirurgia cardiotorácica, como, por exemplo, a circulação extracorpórea ou cirurgia de revascularização miocárdica.

Numa outra situação, a presente descrição é direcionada para um método para prevenir ou reduzir a isquemia num paciente compreendendo a administração ao paciente de uma composição que compreende um polipeptídeo que consiste da sequência de aminoácidos: 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 (aminoácidos 3-60 da SEQ ID NO:2), em que o polipeptídeo inibe a calicreína. Num caso particular, a isquemia pode ser a perda de sangue perioperatória devida a um procedimento cirúrgico realizado no paciente. Numa situação, o procedimento cirúrgico é uma cirurgia cardiotorácica, como, por exemplo, a circulação extracorpórea ou cirurgia de revascularização miocárdica.

Ainda numa outra forma de realização, a invenção é direcionada para um método para prevenir ou reduzir o aparecimento da resposta inflamatória sistêmica associada a um procedimento cirúrgico num paciente compreendendo a administração ao paciente de uma composição que compreende um polipeptídeo que consiste da sequência de aminoácidos: 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 (aminoácidos 5-60 da SEQ ID NO:2), em que o polipeptídeo inibe a calicreína. Numa forma de realização, o procedimento cirúrgico é uma cirurgia cardiotorácica, como, por exemplo,

a circulação extracorpórea ou cirurgia de revascularização miocárdica.

Numa outra forma de realização, a invenção é direcionada para um método para prevenir ou reduzir a isquemia num paciente compreendendo a administração ao paciente de uma composição que compreende um polipeptídeo que consiste da sequência de aminoácidos: 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 (aminoácidos 5-60 da SEQ ID NO:2), em que o polipeptídeo inibe a calicreína. Numa forma de realização particular, a isquemia pode ser a perda de sangue perioperatória devida a um procedimento cirúrgico realizado no paciente. Numa forma de realização, o procedimento cirúrgico é uma cirurgia cardiotorácica, como, por exemplo, a circulação extracorpórea ou cirurgia de revascularização miocárdica.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A FIG. 1 é um diagrama simplificado das principais vias múltiplas e eventos relacionados envolvidos no sistema de ativação de contacto e resposta inflamatória sistémica (SIR) que podem surgir num paciente submetido a traumatismo de tecidos moles e ósseos, como o associado a uma cirurgia de revascularização miocárdica (CABG), especialmente quando o procedimento CABG envolve a circulação extracorpórea do sangue, tais como o bypass cardiopulmonar (Dispositivo de bypass). As setas indicam a ativação de um componente ou um evento para outro componente ou evento na cascata. As setas em ambas as direções indicam efeitos de ativação de componentes ou eventos em ambas as direções. As setas a tracejado indicam a participação provável de um componente

ou evento na ativação de outro componente ou evento. As abreviaturas são as seguintes: "tPA" = ativador do plasminogénio tecidual; "C5a" = componente de uma proteína do sistema de complemento; "fXIIa" = proteína ativadora da pré-caliceína para formar a caliceína ativa; "extrínseco" = sistema de coagulação extrínseca; "intrínseco" = sistema de coagulação intrínseca.

A FIG. 2 mostra uma parte de um ADN e a correspondente sequência de aminoácidos deduzida para um KI de polipeptídeo da presente descrição no plasmídeo pPIC-K503. O ADN inserido codifica o peptídeo de sinal mat α prepro de *Saccharomyces cerevisiae* (sublinhado) fundida em moldura ao terminal amino do polipeptídeo PEP-1 KI tendo a sequência de aminoácidos delimitada pela área do retângulo. A sequência de aminoácidos do polipeptídeo PEP-1 KI mostrada na região do retângulo é a SEQ ID N°: 2, e a correspondente sequência de codificação de nucleotídeos do polipeptídeo KI é a SEQ ID N°: 3. As setas tracejadas indicam a localização e a direção de duas sequências de iniciadores PCR em regiões AOX que foram usados para produzir modelos de sequenciamento. A sequência de ADN para toda a sequência de nucleotídeos da figura compreende a sequência de codificação estrutural para a proteína de fusão e é designada por SEQ ID N°: 27. A dupla porção sublinhada da sequência indica uma sequência de sonda de diagnóstico. *Bst*BI *Eco*RI indicam locais dos seus respetivos sítios palindrómicos, hexaméricos, de restrição de endonuclease na sequência. Os asteriscos denotam codões de paragem de translação.

As FIGs. 3A e 3B mostram um alinhamento das sequências de aminoácidos de situações preferidas da presente descrição, a sequência LACI nativa a partir da qual estas variantes foram derivadas (SEQ ID N°: 32), e outros domínios Kunitz

conhecidos (SEQ ID N°s: 29-31 e 33-53). Os resíduos de cisteína estão realçados.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção é definida nas reivindicações.

A presente descrição, 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 isquemia, como, por exemplo, perda de sangue perioperatória e/ou uma resposta inflamatória sistêmica (SIR) induzida pela calicreína, especialmente, por exemplo, em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos e, particularmente, envolvendo procedimentos cirúrgicos de cirurgia cardiotorácica, por exemplo, a circulação extracorpórea (CPB), como revascularização do miocárdio (CABG). Os Kis podem ser usados especificamente para, por exemplo, cirurgia cardíaca pediátrica, transplante pulmonar, artroplastia total da anca e transplante de fígado, e para reduzir ou prevenir o AVC perioperatória durante o CABG, oxigenação por membrana extracorpórea (ECMO) e acidentes vasculares cerebrais (AVC) durante esses procedimentos.

A cirurgia cardiotorácica é a cirurgia da área do peito, mais comumente do coração e pulmões. As doenças típicas tratadas por cirurgia cardiotorácica incluem doença arterial coronária, tumores e cânceros do esôfago, pulmão e da parede do peito, anormalidades da válvula e veias cardíacas, e defeitos de nascimento envolvendo o peito ou o coração. Quando a cirurgia cardiotorácica é utilizada para tratamento, incorre-se no risco de perda de sangue (por exemplo, isquemia induzida pela cirurgia) e o aparecimento

de uma resposta inflamatória sistêmica (SIR). A SIR induzida pela cirurgia pode resultar em disfunção de órgãos grave (síndrome da resposta inflamatória sistêmica; SIRS).

Polipeptídeos úteis na invenção

Os polipeptídeos KI úteis na presente descrição compreendendo a invenção compreendem polipeptídeos de domínio Kunitz. Numa forma de realização, esses domínios Kunitz são formas variantes da estrutura em anel compreendendo domínio Kunitz 1 da proteína inibidora da coagulação humana associada à lipoproteína (LACI). A LACI contém três estruturas em anel internas de peptídeo, bem definidas, que são paradigma dos domínios Kunitz (Girard, T. et al., 1989. Nature, 338:518-520). Os três domínios Kunitz de LACI conferem a capacidade de se ligar e inibir a calicreína, embora não com afinidade excepcional. Variantes do domínio Kunitz 1 de LACI aqui descritas foram rastreadas, isoladas e ligam-se à calicreína com maior afinidade e especificidade (ver, por exemplo, Patentes nos EUA 5,795,865 e 6,057,287). Um exemplo de um polipeptídeo preferido útil de acordo com a presente invenção tem a sequência de aminoácidos definida pelos aminoácidos 3-60 da SEQ ID N°: 2.

Cada polipeptídeo útil de acordo com a presente invenção liga-se à calicreína, e polipeptídeos preferidos também são inibidores da calicreína (KI), como determinado por ensaios de ligação e inibição da calicreína conhecidos na técnica. A maior afinidade e especificidade para com a calicreína dos polipeptídeos da variante de domínio Kunitz aqui descrita fornece a base para a sua utilização em cirurgia cardiotorácica, por exemplo, CPB e especialmente procedimentos cirúrgicos CABG, para prevenir ou reduzir a perda sanguínea perioperatória e/ou o aparecimento da SIR

em pacientes submetidos a tais procedimentos. Os polipeptídeos KI usados de acordo com a presente invenção têm ou compreendem a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo da variante do domínio Kunitz isolada originalmente por rastreio de bibliotecas de exibição de fagos quanto à capacidade de ligação à calicreína.

Os polipeptídeos KI úteis nos métodos e composições da presente divulgação compreendendo a invenção compreendem um polipeptídeo de domínio Kunitz 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)**

"Xaa" refere-se a uma posição numa cadeia de peptídeos que pode ser qualquer uma 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 dos últimos três aminoácidos da SEQ ID N°: 1 pode, opcionalmente, estar presente ou ausente e pode ser qualquer aminoácido, se presente.

Os peptídeos definidos de acordo com a SEQ ID N°: 1 formam um conjunto de polipeptídeos que se ligam à calicreína. Por exemplo, numa forma de realização preferida da presente divulgação, um polipeptídeo KI útil nos métodos e composições da presente invenção tem as seguintes posições variáveis: 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, Gln ou Leu; Xaa21 pode ser Trp ou Phe; Xaa31 is Glu; Xaa32 pode ser Glu ou Gln; Xaa34 pode ser Ile, Thr ou Ser; Xaa35 is Tyr; e Xaa39 pode ser Glu, Gly ou Ala.

Numa situação mais específica da presente divulgação que compreende a invenção reivindicada, é definida pelos 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 abrangidos pelo âmbito da presente invenção estão peptídeos que compreendem partes dos polipeptídeos aqui descritos. Por exemplo, os polipeptídeos que 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 descritos aqui compreendem um domínio Kunitz. Um subconjunto das sequências abrangidas pela SEQ ID N°: 1 é descrito pelo seguinte (quando não indicado, "Xaa" refere-se ao mesmo conjunto de aminoácidos que são permitidos para a SEQ ID N°: 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 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 fornecem um alinhamento de sequências de aminoácidos destas sequências, a sequência LACI nativa a partir da qual estas variantes foram derivadas (SEQ ID N°: 32), e outros domínios Kunitz conhecidos (SEQ ID N°s: 29-31 e 33-53).

Os polipeptídeos KI úteis nos métodos e composições descritos neste documento, podem ser feitos de forma sintética, usando qualquer protocolo e equipamentos padrão de síntese de polipeptídeos. Por exemplo, a síntese progressiva de um polipeptídeo KI descrito aqui pode ser realizada através da remoção de um grupo protetor terminal amino (N), a partir de um aminoácido inicial (i.e., carboxi-terminal), e o acoplamento ao mesmo da extremidade carboxilo do próximo aminoácido na sequência do polipeptídeo. Este aminoácido é também adequadamente protegido. O grupo carboxilo do aminoácido de entrada pode ser ativado para reagir com o N-terminal do aminoácido ligado pela formação num grupo reativo como a formação numa carbodiimida, um anidrido ácido simétrico, ou um grupo de "éster ativo" como o hidroxibenzotriazol ou ésteres de pentafluorofenilo. Métodos de síntese de peptídeos em fase sólida preferidos incluem o método BOC, que utiliza terc-butiloxicarbonilo como grupo de proteção de α -amino, e o método FMOC, que utiliza 9-fluorenilmetloxycarbonilo para proteger resíduos de aminoácidos α -amino. Ambos os métodos são bem conhecidos dos peritos na técnica (Stewart, J. e Young, J., Solid-Phase Peptide Synthesis (W. H. Freeman

Co.; San Francisco 1989); Merrifield, J., 1963. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154; Bodanszky, M. e Bodanszky, A., The Practice of Peptide Synthesis (Springer-Verlag, New York 1984). Se desejado, aminoácidos adicionais e/ou aminoácidos com terminal carboxi podem ser concebidos 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 da presente divulgação compreendendo a presente invenção podem ser produzidos por métodos recombinantes utilizando qualquer de um número de células e vetores de expressão correspondentes, incluindo mas não limitado a vetores de expressão bacteriana, vetores de expressão de levedura, vetores de expressão de baculovírus, vetores de expressão viral de mamíferos, e semelhantes. Os polipeptídeos de domínio Kunitz e polipeptídeos KI úteis nas composições e métodos da presente invenção também podem ser produzidos transgenicamente usando moléculas de ácido nucleico compreendendo uma sequência de codificação para um polipeptídeo de domínio Kunitz ou KI aqui descrito, em que 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 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 vetor de expressão para formar um polipeptídeo de fusão que é facilmente expresso numa célula hospedeira. De preferência, a célula hospedeira que expressa tal polipeptídeo de fusão também processa o polipeptídeo de fusão para produzir um polipeptídeo de domínio Kunitz ou KI útil na presente invenção, que contém

apenas a sequência de aminoácidos desejada. Obviamente, se qualquer outro aminoácido, continuar ligado ao polipeptídeo de domínio Kunitz ou KI expresso, tal aminoácido adicional não deve diminuir a ligação de calicreína e/ou a atividade inibitória da calicreína do expresso de domínio Kunitz ou KI de modo a impedir o uso do polipeptídeo nos métodos ou composições da presente invenção.

Um sistema de expressão recombinante preferido para a produção de polipeptídeos KI úteis nos métodos e composições aqui descritos é um vetor de expressão de levedura, que permite que uma sequência de ácido nucleico codificando a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo KI ou polipeptídeo de domínio Kunitz seja ligado no mesmo quadro de leitura com uma sequência de nucleotídeos que codifica a sequência de 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 de levedura recombinante resultante pode então ser transformado por métodos padrão nas células de um hospedeiro de levedura apropriado e compatível, cujas células são capazes de expressar a proteína recombinante a partir do vetor de expressão de levedura recombinante. De preferência, uma célula de levedura hospedeira transformada com tal vetor de expressão recombinante também é capaz de processar a proteína de fusão para fornecer um polipeptídeo KI ativo útil nos métodos e composições da presente invenção. Uma levedura hospedeira preferida para a produção de polipeptídeos recombinantes de domínio Kunitz 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 de flanqueamento adicional, de preferência de 1-6 aminoácidos de comprimento, na extremidade amino e/ou na extremidade do terminal carboxi, desde que esses aminoácidos adicionais não diminuam significativamente a afinidade de ligação a calicreína ou atividade de inibição da calicreína, de modo a impedir o uso nos métodos e composições descritos neste documento. Tais aminoácidos adicionais podem ser deliberadamente adicionados para expressar um polipeptídeo KI numa célula hospedeira recombinante especial ou podem ser adicionados para fornecer uma função adicional, por exemplo, para fornecer um peptídeo para ligar o polipeptídeo KI a outra molécula ou para fornecer uma porção de afinidade que facilita a purificação do polipeptídeo. De preferência, o(s) aminoácido(s) adicional(ais) não inclui(em) cisteína, o que poderia interferir com as pontes dissulfeto do domínio Kunitz.

Um exemplo de um polipeptídeo de domínio Kunitz preferido útil nos métodos e composições da presente invenção tem a sequência de resíduos de aminoácidos 5-60 da SEQ ID N°: 2. Quando expressos e processados num sistema de expressão de levedura de proteína de fusão (por exemplo, com base na expressão integrante do plasmídeo pHIL-D2), um tal polipeptídeo de domínio Kunitz retém um terminal amino adicional de dipeptídeo Glu-Ala a partir da fusão com a sequência de peptídeo líder α prepro de *S. cerevisiae*. Quando segregado da célula de levedura hospedeira, a maioria do peptídeo líder é processada a partir da proteína de fusão para produzir um polipeptídeo KI funcional (aqui referido como "PEP-1") com a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 2 (ver região retangular na FIG. 2).

Polipeptídeos KI particularmente preferidos úteis nos métodos e composições descritos neste documento têm uma afinidade de ligação para a calicreína que é da ordem de 1000 vezes maior do que a aprotinina, que está atualmente aprovada para uso em procedimentos CABG para reduzir a perda de sangue. As afinidades de ligação de polipeptídeos KI surpreendentemente elevadas como aqui descritas indicam que tais polipeptídeos KI apresentam um alto grau de especificidade para a calicreína com a exclusão de outros alvos moleculares (ver Tabela 1, abaixo). Assim, a utilização de tais polipeptídeos de acordo com a presente divulgação compreendendo a invenção reduz grande parte da especulação sobre os possíveis alvos terapêuticos num paciente. O menor grau de especificidade exibida, por exemplo, pela aprotinina, leva a possíveis efeitos colaterais pleiotrópicos e ambiguidade quanto ao seu mecanismo terapêutico.

Os polipeptídeos definidos, por exemplo, na SEQ ID N°: 1 contêm posições invariantes, por exemplo, as posições 5, 14, 30, 51 e 55 pode 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). Numa forma de realização particularmente preferida, um ou mais aminoácidos correspondem a uma sequência nativa (por exemplo, SEQ ID N°: 32, ver Fig. 3). Numa forma de realização preferida, pelo menos uma posição variável é diferente daquela da sequência nativa. Ainda noutra forma de realização preferida, os aminoácidos podem ser cada um individual ou coletivamente substituídos por uma substituição do aminoácido conservadora ou não conservadora. Substituições de aminoácidos conservadoras substituem um aminoácido por

outro aminoácido de estrutura química semelhante e podem não ter nenhum efeito sobre a função da proteína. Substituições de aminoácidos não conservadoras substituem um aminoácido por outro aminoácido de estrutura química diferente. Exemplos de substituições conservadoras de aminoácidos incluem, por exemplo, Asn->Asp, Arg->Lys e Ser->Thr. Numa forma de realização preferida, 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 coletivamente, em qualquer combinação, selecionados para corresponder à posição correspondente da SEQ ID N°: 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 selecionado de aminoácidos. Assim, a SEQ ID N°: 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. Numa forma de realização preferida, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e/ou 19 destes aminoácidos pode ser independentemente ou coletivamente, em qualquer combinação, selecionado para corresponder à posição correspondente da SEQ ID N°: 2. O peptídeo da presente invenção tem pelo menos 95% de identidade da SEQ ID N°: 2.

Métodos e composições

A presente invenção é também dirigida a métodos para prevenir ou reduzir a isquemia. Preferidos na invenção são os métodos para prevenir ou reduzir a isquemia ou o aparecimento de uma resposta inflamatória sistêmica (SIR) num paciente, especialmente associada com a cirurgia

cardiotorácica. Um método para o tratamento envolve a administração de um polipeptídeo KI compreendendo um domínio Kunitz. Uma forma de realização do método envolve o uso de um peptídeo contendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 1, tal como definido nas reivindicações que tem uma afinidade para calicreína que é aproximadamente 1000 vezes ou mais superior à de uma ampla gama de serina protease, por exemplo, a aprotinina, que é isolada do pulmão bovino e atualmente aprovada para uso em procedimentos CABG (TRASYLOL®, Bayer Corporation Pharmaceutical Division, West Haven, Connecticut).

Os pacientes submetidos a qualquer de uma série de procedimentos cirúrgicos, especialmente aqueles envolvendo circulação extracorpórea, por exemplo cirurgia cardiotorácica, como, por exemplo, a CPB e/ou trauma ósseo, como a divisão do esterno ou substituição da anca, estão em risco de perda de sangue perioperatória e inflamação. O contacto do sangue de um paciente com as superfícies de corte do osso ou equipamentos de CPB é suficiente para ativar uma ou várias respostas em cascata indesejáveis, incluindo um sistema de ativação de contacto (CAS), que pode levar à perda de sangue perioperatória extensa 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 limitado a qualquer mecanismo específico ou teoria, parece que a perda de sangue que ocorre associada à cirurgia cardiotorácica, por exemplo, a CPB, como num procedimento CABG, 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 aqui descritos são úteis para prevenir ou reduzir isquemias diversas, incluindo, por exemplo, perda de sangue perioperatória e SIR num paciente submetido a um procedimento cirúrgico, e, especialmente, em que o procedimento cirúrgico requer circulação extracorpórea, por exemplo, cirurgia cardiotorácica, como, por exemplo, CPB. Os métodos da presente invenção são particularmente úteis para prevenir ou reduzir a perda de sangue perioperatória e/ou SIR num paciente submetido a um procedimento CABG exigindo CPB, ou outras cirurgias cardíacas.

Composições preferidas para uso médico compreendem um polipeptídeo KI aqui descrito. Tais composições úteis podem ainda compreender um ou mais tampões farmacologicamente aceitáveis, transportadores e excipientes, que podem proporcionar uma característica desejável à composição, incluindo, mas não limitado a, administração melhorada da composição a um paciente, reforço da semivida de circulação do polipeptídeo KI da composição, compatibilidade melhorada da composição com a química do sangue do paciente, melhor armazenamento da composição, e/ou eficácia melhorada da composição na administração a um paciente. Além de um polipeptídeo KI descrito aqui, as composições podem ainda compreender um ou mais outros compostos farmacologicamente ativos que proporcionam um benefício profilático ou terapêutico adicional a um paciente sujeito a um procedimento cirúrgico invasivo.

Composições úteis nos métodos da presente invenção compreendem qualquer um 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 de aminoácidos 58 de

aminoácidos 3-60 da SEQ ID N°: 2. Um exemplo de um tal polipeptídeo KI particularmente preferido útil nos métodos e composições da presente invenção, e que é um polipeptídeo KI PEP-1 tendo a sequência de aminoácido 60 da SEQ ID N°: 2. A sequência de nucleotídeos codificando a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 2 é fornecida na SEQ ID N°: 3 (ver, por exemplo, nucleotídeos 309-488 na FIG 2). Entende-se que, com base no código genético conhecido, a presente invenção também fornece formas degeneradas da sequência de nucleotídeos da SEQ ID N°: 3 simplesmente substituindo um ou mais dos códons degenerados conhecidos para cada aminoácido codificado pela sequência de nucleotídeos. Os nucleotídeos 7-180 da SEQ ID N°: 3, e suas formas degeneradas, codificam polipeptídeo de domínio Kunitz de ocorrência não-natural tendo a sequência de aminoácido 58 de aminoácidos 3-60 da SEQ ID N°: 2.

Qualquer de uma variedade de moléculas de ácido nucleico pode compreender a sequência de nucleotídeos de nucleotídeos 7-180 da SEQ ID N°: 3, formas degeneradas, e partes delas, incluindo mas não limitado a, genomas de fago recombinantes, vetores mamíferos virais recombinantes, vetores de insetos virais recombinantes, mini-cromossomas de levedura, e vários plasmídeos. Tais plasmídeos incluem aqueles usados para clonar e/ou expressar tais sequências de codificação de nucleotídeos. Vetores de expressão fornecem um promotor, que pode ser operacionalmente ligado a uma determinada sequência de nucleotídeos e uma célula hospedeira apropriada, que é capaz de transcrever a sequência de codificação de nucleotídeos específica num ARN mensageiro funcional (mARN) e também traduzir o mARN no polipeptídeo correspondente. Um polipeptídeo assim produzido pode ser isolado da célula hospedeira. Moléculas de ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido

nucleico codificando um domínio Kunitz ou um polipeptídeo KI descrito aqui podem ser feitas por métodos padrão de síntese de ácido nucleico, metodologias de ADN recombinante, métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR), e suas combinações.

Perda de sangue perioperatória e redução do fluxo sanguíneo do coração

Devido aos muitos avanços na medicina, uma série de procedimentos cirúrgicos altamente invasivos são realizados a cada dia e 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 fornecimento de sangue normal e a hemostasia, podendo precisar de transfusões de sangue. Procedimentos cirúrgicos que envolvem perda de sangue incluem os que envolvem métodos de circulação extracorpórea, como a cirurgia cardiotorácica, por exemplo, a CPB. Em tais métodos, o coração de um paciente é interrompido e a circulação, oxigenação e manutenção do volume de sangue são realizadas artificialmente usando 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 envolvendo trauma extenso do osso, como a divisão esternal necessária em CABG ou procedimentos de substituição da anca, também está associada com a ativação do CAS, que pode resultar numa variedade de distúrbios no sangue e vasculatura.

A doença coronária aterosclerótica (CAD) causa um estreitamento do lúmen de uma ou várias das artérias coronárias; isto limita o fluxo de sangue para o miocárdio (ou seja, o músculo do coração) e pode causar angina, insuficiência cardíaca, e enfartes do miocárdio. Na fase

final da aterosclerose da artéria coronária, a circulação coronária pode ser quase completamente obstruída, causando angina com risco de vida ou insuficiência cardíaca, com uma mortalidade muito alta. Os procedimentos CABG podem ser necessários para fazer a ponte com o vaso sanguíneo obstruído e restaurar sangue para o coração; estes são potencialmente salvadores da vida. Os procedimentos CABG estão entre as cirurgias mais invasivas em que uma ou mais veias ou artérias saudáveis são implantadas para fornecer um "bypass" em torno da área obstruída do vaso doente. Os procedimentos CABG 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 animadores, a repetição dos procedimentos CABG é frequentemente necessária, como indicado por um claro aumento do número de pacientes que são acabam por ser submetidos a um segundo e até mesmo terceiro procedimentos; a mortalidade perioperatória e morbidade observadas em procedimentos de CABG primários aumentam nesses procedimentos repetidos.

Têm havido melhorias em técnicas cirúrgicas minimamente invasivas para CAD não complicada. No entanto, quase todos os procedimentos CABG realizados para doença cardíaca valvular e/ou congênita, transplante cardíaco, e grandes procedimentos aórticos, ainda são realizadas em pacientes apoiados por CPB. Na CPB, cânulas grandes são inseridas nos grandes vasos de um paciente para permitir o bombeamento mecânico e a oxigenação do sangue através de um oxigenador de membrana. O sangue é devolvido ao paciente sem fluir através dos pulmões, que são hipo-perfundidos durante este procedimento. O coração é parado usando uma solução cardioplégica, o paciente é arrefecido para ajudar a

prevenir danos cerebrais, e o volume de circulação periférica aumentado por um circuito extracorpóreo, ou seja, o circuito CPB, o que requer "priming" com o sangue do doador e misturas salinas usadas para preencher o circuito extracorpóreo. A CPB tem sido amplamente utilizada numa variedade de procedimentos realizados durante quase meio século, com resultados de sucesso. A interação entre superfícies artificiais, células do sangue, proteínas do sangue, endotélio vascular danificado, e tecidos extravasculares, tais como os ossos, perturba a hemostasia e frequentemente ativa o CAS, que, como mencionado acima, pode resultar numa variedade de distúrbios no sangue e vasculatura. Esses distúrbios levam ao excesso de sangramento perioperatória, que então exige transfusão de sangue imediata. Uma consequência da circulação de sangue total por meio de um circuito extracorpóreo em CPB pode também incluir a resposta inflamatória sistémica (SIR), que é iniciada pela ativação de contacto de sistemas de coagulação e do complemento. De facto, grande parte da morbidade e mortalidade associadas a procedimentos cirúrgicos de CPB aparentemente mecanicamente bem-sucedidos é o resultado dos efeitos da ativação da coagulação, fibrinólise, ou sistemas de complemento. Esta ativação pode danificar o sistema pulmonar, levando à síndrome da angústia respiratória do adulto (ARDS), insuficiência renal e da circulação esplâncnica e a indução de uma coagulopatia geral levando à perda de sangue e à necessidade de transfusões. Além dos perigos de perda de sangue perioperatória, patologias adicionais associadas com SIR incluem défices neurocognitivos, acidente vascular cerebral, insuficiência renal, enfarte agudo do miocárdio, e danos no tecido cardíaco.

As transfusões de sangue também apresentam um risco significativo de infecção e elevam o custo de CABG ou outros processos semelhantes que exigem CPB. Na ausência de qualquer intervenção farmacológica, três a sete unidades de sangue devem normalmente ser gastas num paciente, mesmo com excelentes técnicas cirúrgicas. Assim, há um incentivo considerável face ao desenvolvimento de novos e melhorados compostos farmacologicamente eficazes para reduzir ou prevenir o sangramento perioperatória e SIR em pacientes submetidos a procedimentos de CPB e CABG.

Considerações sobre 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 farmacêuticamente aceitável. O termo "composição farmacêuticamente aceitável" refere-se a um transportador ou excipiente não tóxico que pode ser administrado a um paciente, juntamente com um composto desta descrição. e.g. compostos desta invenção, e em que o transportador ou excipiente não destrói a atividade biológica ou farmacológica da composição. Os polipeptídeos KI aqui descritos podem ser administrados localmente ou sistemicamente por qualquer meio adequado para a entrega de uma quantidade de polipeptídeos KI inibidores da calicreína a um paciente, incluindo mas não limitado a administrações sistémicas, como, por exemplo, por via intravenosa e inalação. A administração parenteral é particularmente preferida.

Para a administração parenteral, os polipeptídeos podem ser injetados por via intravenosa, via intramuscular, intraperitoneal ou subcutânea. A administração intravenosa é preferida. Tipicamente, as composições para administração

intravenosa são soluções em tampão isotônico estéril aquoso. Outros transportadores farmacologicamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados a, água estéril, solução salina e solução salina tamponada (incluindo tampões como o fosfato ou o acetato), álcool, óleos vegetais, glicóis de polietileno, gelatina, lactose, amilose, estearato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina, etc.. Sempre que necessário, a composição pode também incluir um agente de solubilização 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 reajam deletoriamente com os compostos ativos. Da mesma forma, a composição pode compreender excipientes convencionais, por exemplo, substâncias transportadoras orgânicas ou inorgânicas farmacologicamente aceitáveis adequadas para a aplicação parenteral, enteral ou intranasal que não reajam deletoriamente com os compostos ativos. Geralmente, os ingredientes serão fornecidos separadamente ou misturados em forma de unidade de dosagem, por exemplo, como um pó seco liofilizado ou água livre concentrada num recipiente hermeticamente fechado, como uma ampola ou embalagem indicando a quantidade de agente ativo em unidades de atividade. Quando a composição é para ser administrada por infusão, pode ser dispensada com uma garrafa de infusão contendo "água para injeção" farmacêutica estéril ou salina. Quando a composição é para ser administrada por injeção, pode ser fornecida uma ampola de água estéril para injeção ou solução salina para que os ingredientes possam ser misturados antes da administração.

De preferência, os métodos da presente invenção compreendem a administração de um polipeptídeo KI a um paciente como uma perfusão intravenosa de acordo com qualquer

procedimento aprovado. Assim, um polipeptídeo KI aqui descrito pode ser administrado a um paciente submetido a um procedimento CABG nos momentos semelhantes aos usados atualmente em protocolos aprovados para administrar aprotinina e numa quantidade necessária para fornecer ao paciente um número necessário ou uma concentração de unidades inibidoras da calicreína (KIU). De acordo com a invenção, um polipeptídeo KI aqui descrito também pode ser administrado a um paciente no período pós-operatório imediato, quando as anormalidades de sangramento podem ocorrer como consequência de efeitos a jusante do SIR. Por exemplo, num procedimento que envolve CPB, um polipeptídeo KI aqui descrito pode ser administrado a um paciente como uma dose de carga inicial, por exemplo, uma quantidade eficaz ao longo de um tempo conveniente, tais como 10 minutos, antes da indução da anestesia. Então, na indução da anestesia, pode ser injetada uma segunda dose de polipeptídeo KI no fluido "priming" CPB ("volume de bomba primário"). O paciente pode então ser colocado numa dose de infusão contínua e controlada por via intravenosa durante a duração do procedimento cirúrgico, e após o procedimento, se indicado.

Atualmente, existem dois regimes aprovados nos Estados Unidos para administrar a aprotinina num paciente submetido a um procedimento CABG (ver, rótulo do produto e literatura inclusa do TRASYLOL®, Bayer Corporation Pharmaceutical Division, West Haven, Connecticut). Em tal regime aprovado é usada uma dose intravenosa de 2 milhões KIU, 2 milhões KIU no volume da bomba principal, e 500 mil KIU por hora de cirurgia. Outro regime aprovado usa uma dose intravenosa de 1 milhão KIU, 1 milhão de KIU no volume da bomba principal, e 250 mil KIU por hora de cirurgia. Como estes regimes são baseados em KIU, os regimes são facilmente adaptados a

qualquer polipeptídeo KI aqui descrito uma vez que a atividade específica e KIU de um polipeptídeo KI em particular tenha sido determinada por ensaios padrão. Devido à afinidade de ligação melhorada e à atividade inibitória em polipeptídeos KI representativos aqui descritos em relação à aprotinina, espera-se que tais composições e métodos da presente invenção sejam suscetíveis de exigir menos miligramas (mg) por paciente para fornecer a um paciente o número exigido ou concentração de KIU.

Várias considerações a respeito da dosagem com um polipeptídeo KI em métodos da invenção podem ser ilustradas por meio de exemplo com o polipeptídeo KI PEP-1 representativo da invenção tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID N°: 2 (peso molecular de 7.054 Daltons).

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)	Aprotinina $K_{i,app}$ (pM)
Calicreína no plasma humano	44	$3,0 \times 10^4$
Calicreína na urina humana	$>1 \times 10^8$	$4,0 \times 10^3$
calicreína pancreática porcina	$2,7 \times 10^7$	550
Clr humana, ativada	$>2,0 \times 10^8$	$>1,0 \times 10^7$
Cls humana, ativada	$>2,0 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^8$
Fator XIa do plasma humano	$1,0 \times 10^4$	ND
fator XIIa do plasma humano	$>2,0 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^8$
Plasmina humana	$1,4 \times 10^5$	894
tripsina pancreática humana	$>2 \times 10^7$	ND
quimotripsina pancreática humana	$>2,0 \times 10^7$	$7,3 \times 10^5$
elastase de neutrófilos humanos	$>2,0 \times 10^7$	$1,7 \times 10^6$
Trombina do plasma humano	$>2,0 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^8$
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 a 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 30.000 pM. Assim, uma dose de PEP-1 poderia ser aproximadamente 1000 vezes menor do que a utilizada para a aprotinina numa base molar. No entanto, a consideração de vários outros fatores pode fornecer uma estimativa mais precisa da dose de PEP-1 necessária na prática. Tais fatores incluem a quantidade de calicreína ativada durante a CPB num paciente em particular, a concentração de calicreína necessária para obter uma SIR, e a biodisponibilidade e distribuição farmacológica do PEP-1 num paciente. No entanto, o uso de um polipeptídeo KI em métodos de acordo com a presente invenção e fornecidos em doses atualmente aprovadas para o uso da aprotinina ainda é esperado fornecer melhorias significativas sobre o uso atual da afinidade menor e menos específica, a aprotinina bovina.

Por exemplo, a quantidade total de circulação de pré-calicreína no plasma é estimada em cerca de 500 nM (Silverberg, M. *et al*, "The contact System and Its Disorders", em *Blood: Principles and Practice of Hematology*, Handin, R. *et al.*, eds., JB Lippincott Co., Filadélfia, 1995). Se toda a pré-calicreína for ativada, então seria necessário pelo menos 500 nM de PEP-1 para uma inibição estequiométrica da calicreína. Um indivíduo que tenha 5 litros de plasma exigiria, portanto, cerca de 18 mg de PEP-1 para atingir uma concentração plasmática de 500 nM.

Outro fator a considerar é o limiar de concentração de calicreína necessário para induzir uma SIR num paciente. Se

a concentração de calicreína ativa tiver de ser mantida abaixo, por exemplo, de 1 nM, em seguida, devido à sua elevada afinidade para a calicreína, 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 calicreína presente a 1 nM (ou seja, somente 0,4 pM de calicreína livre ficaria no sangue), enquanto uma concentração de 1 nM de aprotinina só inibiria 24,5% da calicreína presente a 1 nM. Para a aprotinina inibir 99% da calicreína a 1 nM, é necessária uma concentração de aprotinina no plasma de pelo menos 3 μ M (ou seja, uma concentração 3000 vezes superior ao PEP-1).

Para um paciente submetido a CPB, uma dose inicial clínica de PEP-1 pode ser estimada a partir de um regime de dose recomendado de aprotinina (1×10^6 KIU) mencionado acima. A aprotinina é relatada na literatura inclusa como tendo atividade inibitória específica de 7143 KIU/mg determinada usando um ensaio de pressão sanguínea num cão. Portanto, 1×10^6 KIU de aprotinina é equivalente a 140 mg de aprotinina (isto é, 1×10^6 KIU/7143 KIU/mg =140 mg de aprotinina). Num paciente tendo um volume de plasma sanguíneo de 5 litros, 140 mg corresponde a aproximadamente 4,3 μ M de aprotinina (o peso molecular da aprotinina é de 6512 Daltons). A atividade específica de aprotinina no ensaio padrão de inibição utilizado para PEP-1 é de 0,4 KIU/mg de polipeptídeo. Uma dose de 140 mg corresponderia a uma dose de carga de aprotinina de 56 KIU (140 mg x 0,4 KIU/mg = 56 KIU). Em contraste, uma vez que a atividade específica do polipeptídeo KI PEP-1 é de 10 KIU/mg no ensaio de inibição padrão, uma dose de apenas 5,6 mg de PEP-1 seria necessária para 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 do PEP-1 é de 7054 Daltons), apesar de uma dose mais elevada do polipeptídeo KI PEP-1 poder ser necessária se toda a calicreína plasmática (500 nM) for ativada e/ou se este polipeptídeo KI for mal distribuído num paciente.

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

Como variantes do domínio Kunitz 1 da proteína LACI humana, são esperados menos efeitos adversos ao administrar os polipeptídeos KI aos pacientes do que a aprotinina, que é uma proteína bovina que é documentada como causadora de reações anafiláticas e anafilactoides em pacientes, especialmente nas administrações repetidas, tal como nos procedimentos CABG repetidos. Além disso, a ligação altamente específica dos polipeptídeos KI descritos aqui à calicreína limitarão ou eliminarão efetivamente as tendências trombóticas observadas com a aprotinina, e

reduzirão os problemas observados com a patência do enxerto após procedimentos CABG.

A invenção será adicionalmente descrita, com referência aos exemplos, não limitativos que se seguem.

EXEMPLIFICAÇÃO

Exemplo 1: Um polipeptídeo KI representativo.

Um polipeptídeo KI de ocorrência não-natural (PEP-1) útil nas composições e métodos da presente invenção foi identificado como um polipeptídeo que se liga a calicreína exibido num fago recombinante de uma biblioteca de exibição de fagos. O PEP-1 tem a seguinte 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 Thr 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 de 7054 Daltons.

A sequência de nucleotídeos (SEQ ID N°: 3) do ADN do fago recombinante que codifica a sequência de aminoácidos PEP-1 (SEQ ID N°: 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 uma melhor caracterização como uma proteína recombinante em células de fenótipo hospedeiro *His4⁻* da estirpe de levedura *Pichia pastoris*.

Exemplo 2: Construção de um plasmídeo recombinante para expressar os 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 final de ADN final compreendendo a sequência de

codificação para a proteína de fusão α prepro-PEP-1 no plasmídeo de expressão recombinante pPIC-K503, é mostrada na FIG. 2. A sequência de ADN de pHIL-D2 foi modificada para produzir pPIC-K503, como se segue:

1. O sítio *Bst*BI na região 3'AOX1 de pHIL-D2, localizada a jusante do gene *His4*, foi removido por digestão de restrição parcial, preenchimento, e ligação, alterando a sequência de TTCGAA (SEQ ID N°: 23) para TTCGCGAA (SEQ ID N° 24). Esta modificação foi feita para facilitar e direcionar a clonagem da cassete de expressão para o plasmídeo.

2. O sítio *Aat*II tendo o gene *bla* localizado a jusante de *His4* foi removido por digestão de restrição, preenchimento, e ligação, modificando a sequência de GACGTC (SEQ ID N°: 25) para GACGTACGTC (SEQ ID N°: 26). Esta modificação foi feita para facilitar a clonagem de cassetes de expressão tendo sítios *Aat*II no plasmídeo. A codificação de ADN PEP-1 foi sintetizada com base na sequência de nucleotídeos do fago original de exibição da ligação a calicreína e consistiu em 450 pares de base (bp). A sequência final de ADN da inserção no plasmídeo pHIL-D2 é ladeada por uma sequência 5'AOX1 e uma sequência 3'AOX1 (partes das quais são mostradas na FIG. 2) e codificam uma proteína de fusão compreendendo peptídeo de sinal α prepro de *S. cerevisiae* fundido com a sequência de codificação estrutural para o polipeptídeo KI PEP-1. O peptídeo de sinal foi adicionado para facilitar a secreção de PEP-1 a partir de 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 reação em cadeia da polimerase (PCR). O ADN sintético ligado que codifica a proteína de fusão α prepro/PEP-1 foi em seguida incorporado por

ligação no plasmídeo pHIL-D2 modificado entre os sítios *Bst*BI e *Eco*RI.

Os produtos de ligação foram usados para transformar a estirpe *Escherichia coli* XL1 Blue. Um ensaio de PCR foi utilizado para rastrear os transformantes de *E. coli* para a construção de plasmídeo desejada. O ADN a partir de extratos de células foi amplificado por PCR usando iniciadores contendo as sequências 5'AOX1 e 3'AOX1 (ver acima e FIG. 2). Os produtos de PCR do número correto de pares de base foram sequenciados. Além disso, cerca de 20-50 pb em cada lado dos sítios de clonagem foram sequenciados, e foi obtida a sequência prevista. A sequência final de ADN da inserção no plasmídeo pHIL-D2 (para produzir o plasmídeo pPIC-K503) é mostrada na FIG. 2 juntamente com porções de flanqueamento das sequências 5' e 3' AOX1 e sequência de aminoácidos correspondente da proteína de fusão que compreende o peptídeo de sinal mat α prepro de *S. cerevisiae* fundido com a sequência de codificação estrutural para o polipeptídeo KI PEP-1. Um transformante com a construção de plasmídeo de expressão desejada, o plasmídeo pPIC-K503, foi selecionado para preparar linhas de células de levedura para a produção de rotina de PEP-1.

Exemplo 3: Fabrico de PEP-1 a partir da linha celular de levedura recombinante

Esferoplastos de *P. pastoris* GS 115 tendo o fenótipo *His*4⁻ foram transformados com o plasmídeo de expressão pPIC-K503 (acima) seguinte à linearização do plasmídeo no sítio SacI e recombinação homóloga do ADN plasmidial no hospedeiro locus 5' AOX1. O fenótipo da estirpe de produção é *His*4⁺. Todo o plasmídeo foi inserido na sequência genómica 5'AOX1 da levedura.

Os isolados da transformação foram selecionados para o crescimento na ausência de histidina exógena com metanol como única fonte de carbono. Mais do que 95% dos transformantes mantiveram a capacidade do 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 por transplantação. Estes transformantes não exigiam histidina exógena para o crescimento, demonstrando assim que o plasmídeo tinha-se integrado no genoma do hospedeiro. As colónias selecionadas foram clonadas. Foram realizados estudos de expressão de pequenas culturas para identificar clones que segregavam os mais altos níveis PRP-1 ativo no meio de cultura. Os níveis de secreção PEP-1 em soluções de cultura sobrenadante clarificadas foram quantificados para níveis de PEP-1 por eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) e avaliadas quanto à inibição da calicreína. Um clone de levedura foi selecionado para a produção de PEP-1 com base no seu alto nível de expressão de PEP-1 entre as culturas amostradas.

Os bancos de células principais e de trabalho de *P. pastoris* que produzem PEP-1 foram preparados comercialmente (MDS Pharma Services, Bothell, Washington). A produção padrão de PEP-1 na levedura compreende três passos como se segue: (1) preparação da cultura de sementes, (2) fermentação, e (3) recuperação da cultura.

O passo de cultura de sementes consistiu na inoculação de seis frascos (300 mL cada) contendo caldo de inóculo esterilizado (base de levedura de azoto, 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) durante cerca de 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 cultura de semente para o fermentador. Após aproximadamente 24 horas, o glicerol no fermentador ficou exausto e foi adicionado glicerol adicional durante aproximadamente 8 horas adicionais.

Uma fase de alimentação mista, que durou aproximadamente 83 horas, foi então iniciada pela adição de uma alimentação de glicerol e metanol. No final deste tempo, a fermentação terminou, e os conteúdos do fermentador foram diluídos com água purificada. A purificação e processamento de PEP-1 consistiram de cinco passos como se segue: (1) cromatografia de leito expandido (2), cromatografia de troca catiónica (3), cromatografia de interação 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 diluída no fermentador foi aplicada à coluna equilibrada embalada com resina Streamline SP (Amersham Pharmacia Streamline, coluna cromatográfica 200, Amersham Pharmacia, Piscataway, New Jersey). A coluna foi então lavada (50 mM de ácido acético, $\text{pH} = 3,0 - 3,5$) num modo de fluxo para lavar as células de levedura do leito expandido. O adaptador superior foi levantado acima do leito expandido para melhorar a lavagem. O fluxo foi interrompido e o leito foi deixado em repouso. O adaptador foi movido para baixo de modo a ficar um pouco acima do leito instalado. A direção do fluxo foi invertida.

O efluente foi recolhido. A lavagem foi continuada num modo a jusante 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 então filtrado por um filtro de 0,22 μ num recipiente limpo localizado no sítio de purificação. Amostras adicionais foram recolhidas para a determinação da concentração do PEP-1. Um passo de cromatografia de troca catiónica foi então realizado utilizando-se o eluato filtrado da coluna de leito expandido. 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 interação 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 utilizando sulfato de amónio (0,572 M) em fosfato de potássio (100 mM), pH 7.0. O eluato foi recolhido em frações com base nos valores A280. Todas as frações foram recolhidas em frascos PETG estéreis, pré pesados.

As frações selecionadas foram agrupadas num recipiente limpo. O agrupamento foi concentrado por ultrafiltração. A preparação de PEP-1 concentrado foi imediatamente diafiltrada contra dez volumes de PBS, pH 7.0.

Um passo final de filtração foi realizado antes da embalagem a fim de minimizar o número de organismos contaminantes no volume de PEP-1. A solução em bruto foi filtrada através de um filtro de 0,22 μ e recolhida num frasco PETG estéril, previamente pesado. Uma amostra foi retirada para testar a libertação dos lotes. O volume

restante foi dispensado de forma assética em garrafas PETG estéreis e armazenado a -20°C .

Exemplo 4: Ensaio de Inibição da calicreína.

Um teste de cinética foi utilizado para medir a atividade inibitória dos polipeptídeos KI, tal como PEP-1. O ensaio cinético mede a fluorescência a seguir à clivagem mediada pela calicreína de um substrato, a cumarina metil prolilfenilalanilarginil amino. Uma quantidade conhecida de calicreína foi incubada com uma diluição em série de polipeptídeo KI como padrão de referência ou amostras de polipeptídeo KI diluídas em série, num tampão de reação adequado numa placa de microtitulação. Cada amostra foi executada em triplicado. A solução de substrato foi adicionada, 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 duas de cada uma das curvas padrão de referência e amostra precisavam de ter um valor de R-quadrado de 0,95 para serem consideradas válidas.

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Um polipeptídeo 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), em que Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa56, Xaa57 ou Xaa58 são, cada, um aminoácido ou estão ausentes;

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;

Xaa22 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de Tyr e Phe;

Xaa23 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de Tyr e Phe;

Xaa31 é Glu;

Xaa32 é Glu;

Xaa34 é Ile;

Xaa35 é Tyr;

Xaa39 é Glu;

Xaa40 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de Gly e Ala;

Xaa43 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de Asn e Gly;

Xaa45 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de Phe e Tyr; e

em que o polipeptídeo inibe a calicreína.

2. O polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo consiste da sequência de aminoácidos:
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 (aminoácidos 5-60 da SEQ ID N°:2).
3. O polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, em que a referida sequência de aminoácidos tem pelo menos 95% de identidade com a SEQ. ID. N°: 2.
4. Um polipeptídeo compreendendo uma porção da sequência de aminoácidos de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a referida porção se liga à calicreína.
5. O polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, para utilização na prevenção ou redução de isquemia num paciente, ou para utilização na prevenção ou redução do aparecimento de uma resposta inflamatória sistêmica associada a um procedimento cirúrgico num paciente.
6. Uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácidos nucleicos que codifica o polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

7. Um vetor de expressão compreendendo o ácido nucleico de acordo com a reivindicação 6.
8. O polipeptídeo de acordo com a reivindicação 5, em que o procedimento cirúrgico é a cirurgia cardiotorácica.
9. O polipeptídeo de acordo com a reivindicação 5, em que o procedimento cirúrgico é a revascularização do miocárdio.
10. O polipeptídeo de acordo com a reivindicação 5, em que o procedimento cirúrgico é um bypass cardiopulmonar.
11. O polipeptídeo de acordo com a reivindicação 5, em que o procedimento cirúrgico é uma substituição da anca ou divisão do esterno.

Lisboa,

RESUMO

"POLIPEPTÍDEOS DE DOMÍNIO KUNITZ MODIFICADO E SUA UTILIZAÇÃO PARA A REDUÇÃO DE ISQUEMIA OU APARECIMENTO DE UMA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA ASSOCIADA A UM PROCEDIMENTO CIRÚRGICO"

Um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos:
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 Gin Asn Arg Phe
Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
(aminoácidos 3-60 da SEQ ID NO:2), em que o polipeptídeo inibe a calicreína.

Figura 1

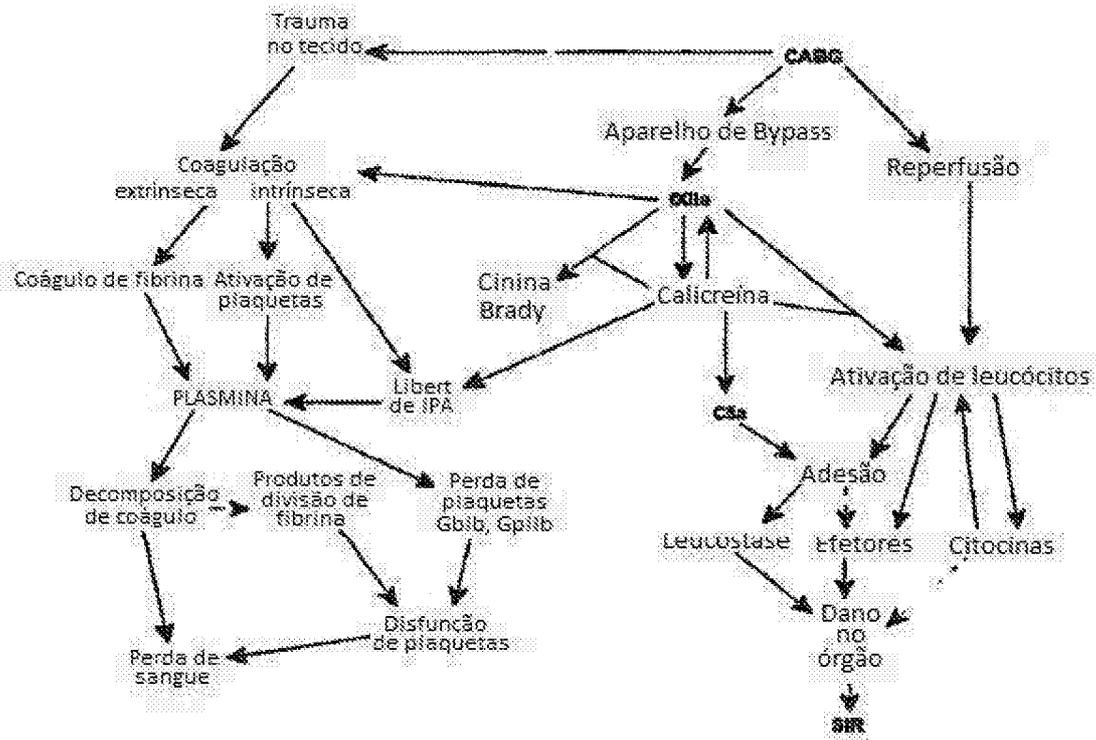


Figura 3A

```

SEQ ID 2: (aminoácidos 3-60) ---MHSFCAPKA-DDGPCRAAHPRWFFNIFTRQCEEFYGG
SEQ ID 4: ---MHSFCAPKA-DDGPKCANHLRFFNIFTRQCEEFYGG
SEQ ID 5: ---MHSFCAPKA-DDGHCKANHORFFNIFTRQCEEFYGG
SEQ ID 6: ---MHSFCAPKA-DDGHCKANHORFFNIFTRQCEQFYGG
SEQ ID 7: ---MHSFCAPKA-DDGHCKASLPRFFNIFTRQCEEFYGG
SEQ ID 8: ---MHSFCAPKA-DDGHCKANHORFFNIFTRQCEEFYGG
SEQ ID 9: ---MHSFCAPKA-DDGHCKGAHLRFFNIFTRQCEEFYGG
SEQ ID 10: ---MHSFCAPKA-DDGRCKGAHLRFFNIFTRQCEEFYGG
SEQ ID 11: ---MHSFCAPKA-DDGRCKGAHPRFFNIFTRQCEEFYGG
SEQ ID 12: ---MHSFCAPKA-DDGPCRAAHPRWFFNIFTRQCEEFYGG
SEQ ID 13: ---MHSFCAPKA-DVGRCKGAHPRWFFNIFTRQCEEFYGG
SEQ ID 14: ---MHSFCAPKA-DVGRCKGAQPRFFNIFTRQCEEFYGG
SEQ ID 15: ---MHSFCAPKA-DDGSCRAAHLRFFNIFTRQCEEFYGG
SEQ ID 16: ---MHSFCAPKA-EGGSCRAAQRWFFNIFTRQCEEFYGG
SEQ ID 17: ---MHSFCAPKA-DDGPCRGAKLRFFNIFTRQCEEFYGG
SEQ ID 18: ---MHSFCAPKA-DDGHCKGALPRWFFNIFTRQCEEFYGG
SEQ ID 19: ---MHSFCAPKA-DSGNCRCNLPRFFNIFTRQCEEFYGG
SEQ ID 20: ---MHSFCAPKA-DSGRCKGNHORFFNIFTRQCEEFYGG
SEQ ID 21: ---MHSFCAPKA-DSGRCKAIQPRWFFNIFTRQCEEFYGG
SEQ ID 22: ---MHSFCAPKA-DDGRCKGAHPRWFFNIFTRQCEEFYGG
SPTI (SEQ ID 29): ---RPDFCLEPP-YTGPCKARIIRYPYNAKAGLCQTFVYGG
ITI-D1 (SEQ ID 30): ---KEDSCQLGY-SAGPCMGMTSRYPYNGTSMACETFYGG
ITI-D2 (SEQ ID 31): ---TVAACHLPI-VRGPCIAFIQLWAFDAVKGKCVLFFYGG
LACI-D1 (SEQ ID 32): ---MHSFCAPKA-DDGPCIAMKRFFFNIFTRQCEEFYGG
LACI-D2 (SEQ ID 33): ---KPDFCFLEE-DPGICSGYITRYFYNNQTKQCFVYGG
LACI-D3 (SEQ ID 34): ---GPSWCLTPA-DRGLCEANENRFYNSVIGKCRPPKYSG
HKI B9 (SEQ ID 35): ---LPIVCAFFM-EKGPCQTYMTRWFFNFETGCELFAYGG
C-3 (SEQ ID 36): ---ETDICKLPK-DEGTCDPILKWIYDPTKSCARFVYGG
TFPI-2 D1 (SEQ ID 37): ---EAEICLLPL-DYGPCIALLLRYDYDRTQSCRQFLYGG
TFPI-2 D2 (SEQ ID 38): ---VPKVCRLOQSVDDQCEGSTEKYPYNNLSSMTCEKFFYGG
TFPI-2 D3 (SEQ ID 39): ---IPSFQYSPK-DEGLCSANVTRYFYFNRYRTCDAPTYTG
APP-1 (SEQ ID 40): ---RNREVCSEA-ETGPCIAMISRWFYDVTGKCAPFYGG
EpINE7 (SEQ ID 41): ---RPDFCLEPP-YTGPVAMFPRYPYNAKAGLCQTFVYGG
SITI-E7-141 (SEQ ID 42): ---RPDFCQLGY-SAGPCVAMFPRYPYNGTSMACQTFVYGG
MUT726A (SEQ ID 43): ---RPDFCQLGY-SAGPCVAMFPRYPYNGASMACQTFVYGG
MUT98 (SEQ ID 44): ---RPDFCQLGY-SAGPCVAMFPRYPYNGTSMACQTFVYGG
MUT1619 (SEQ ID 45): ---RPDFCQLGY-SAGPCVAMFPRYPYNGTSMACQTFVYGG
EPI-HNE-1 (SEQ ID 46): EAEARPDFCLEPP-YTGPVAMFPRYPYNAKAGLCQTFVYGG
EPI-HNE-2 (SEQ ID 47): -----AACNLPI-VRGPCIAFFPRWAFDAVKGKCVLFFYGG
EPI-HNE-3 (SEQ ID 48): -----AACNLPI-VRGPCIAFFPRWAFDAVKGKCVLFFYGG
EPI-HNE-4 (SEQ ID 49): -----EACNLPI-VRGPCIAFFPRWAFDAVKGKCVLFFYGG
DPI14 KR (SEQ ID 50): --EAVREVCSEA-ETGPCIAMISRWFYDVTGKCAPFYGG
DPI24 KR (SEQ ID 51): --EAEICLLPL-DYGPCIAFFPRYPYDYDRTQSCRQFLYGG
DPI68 KR (SEQ ID 52): --EAKPDFCFLEE-DPGICIOFFPRYPYNNQAKQCFVYGG
DPI84 KR (SEQ ID 53): --EATDICKLPK-DEGTCAFFPRWYDPTKSCARFVYGG

```

Figura 3B

SEQ ID 2:	(cont.)	CEGNG--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 4:	(cont.)	CGGNG--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 5:	(cont.)	CGGNG--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 6:	(cont.)	CAGNG--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 7:	(cont.)	CGGNG--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 8:	(cont.)	CGGNG--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 9:	(cont.)	CEGNG--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 10:	(cont.)	CEGNG--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 11:	(cont.)	CGGNG--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 12:	(cont.)	CGGNG--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 13:	(cont.)	CGGNG--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 14:	(cont.)	CGGNG--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 15:	(cont.)	CGGNG--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 16:	(cont.)	CGGNG--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 17:	(cont.)	CGGNG--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 18:	(cont.)	CGGNG--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 19:	(cont.)	CGGNG--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 20:	(cont.)	CGGNG--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 21:	(cont.)	CGGNG--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 22:	(cont.)	CGGNG--NRFESLEECKKMCTRD
RPTI (SEQ ID 29):	(cont.)	CRAKR--NRFKSAEDCMRTCGGA
ITI-D1 (SEQ ID 30):	(cont.)	CMGNG--NNFVTEKDCLOQTCRGA
ITI-D2 (SEQ ID 31):	(cont.)	CQNGG--NKFYSEKECREYCGVP
LACI-D1 (SEQ ID 32):	(cont.)	CEGNG--NRFESLEECKKMCTRD
LACI-D2 (SEQ ID 33):	(cont.)	CLGNM--NNFETLEECKKMCTRD
LACI-D3 (SEQ ID 34):	(cont.)	CGGNE--NKFYSQKECKKVCAPV
HKI B9 (SEQ ID 35):	(cont.)	CGGNS--NNFLAKECKKCKPCKPT
C-3 (SEQ ID 36):	(cont.)	CGGNE--NKFYSQKECKKVCAPV
TPPI-2 D1 (SEQ ID 37):	(cont.)	CEGNA--NNFYTWEACDDACWRI
TPPI-2 D2 (SEQ ID 38):	(cont.)	CHENRIENRFPDEATCHGFCAPK
TPPI-2 D3 (SEQ ID 39):	(cont.)	CGGND--NNFVSRDECKKACAKA
APP-1 (SEQ ID 40):	(cont.)	CGGNR--NNFDTEEYCHAVCGSA
SpLNB7 (SEQ ID 41):	(cont.)	CMGNG--NNFKSAEDCMRTCGGA
BITI-E7-141 (SEQ ID 42):	(cont.)	CMGNG--NNFVTEKDCLOQTCRGA
MUTT26A (SEQ ID 43):	(cont.)	CMGNG--NNFVTEKDCLOQTCRGA
MUTQE (SEQ ID 44):	(cont.)	CMGNG--NNFVTEKDCLOQTCRGA
MUT1619 (SEQ ID 45):	(cont.)	CMGNG--NNFVTEKDCLOQTCRGA
EPI-HNE-1 (SEQ ID 46):	(cont.)	CMGNG--NNFKSAEDCMRTCGGA
EPI-HNE-2 (SEQ ID 47):	(cont.)	CQNGG--NKFYSEKECREYCGVP
EPI-HNE-3 (SEQ ID 48):	(cont.)	CQNGG--NKFYSEKECREYCGVP
EPI-HNE-4 (SEQ ID 49):	(cont.)	CQNGG--NKFYSEKECREYCGVP
DPI14 KR (SEQ ID 50):	(cont.)	CGGNR--NNFDTEEYCHAVCGSA
DPI24 KR (SEQ ID 51):	(cont.)	CEGNA--NNFYTWEACDDACWRI
DPI68 KR (SEQ ID 52):	(cont.)	CLGNM--NNFETLEECKKMCTRD
DPI84 KR (SEQ ID 53):	(cont.)	CGGNE--NKFYSQKECKKVCAPV