



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

(21) BR 112018071701-0 A2



(22) Data do Depósito: 21/03/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 27/09/2018

(54) **Título:** PROTEÍNA RECOMBINANTE E SEUS FRAGMENTOS, PROCESSO DE OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE, GENE SINTÉTICO E USO DA ESCULPTINA OU PROTEÍNA RECOMBINANTE PARA PREPARAR UM MEDICAMENTO OU COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA PROFILAXIA E/OU TRATAMENTO DE DOENÇAS TROMBOEMBÓLICAS OU COMO INIBIDOR DIRETO E ESPECÍFICO DA TROMBINA

(51) **Int. Cl.:** C07K 14/81; C12N 15/15; A61K 38/55; A61P 7/02.

(30) **Prioridade Unionista:** 21/03/2017 BR 102017005783-6.

(71) **Depositante(es):** FUNDAÇÃO BUTANTAN.

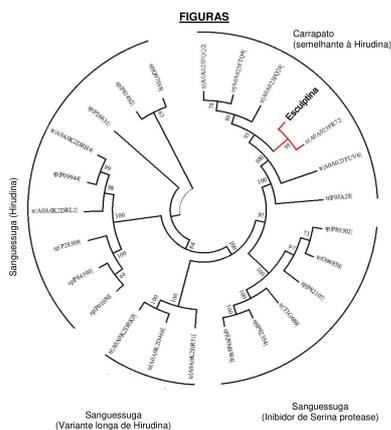
(72) **Inventor(es):** ANA MARISA CHUDZINSKI-TAVASSI; MAURICIO BARBUGIANI GOLDFEDER; ASIF IQBAL.

(86) **Pedido PCT:** PCT BR2018050076 de 21/03/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2018/170568 de 27/09/2018

(85) **Data da Fase Nacional:** 22/10/2018

(57) **Resumo:** A criação industrial ora descrita compreende uma invenção passível de proteção patentária. Referida invenção situa-se nos campos de bioquímica, biologia molecular, genética, farmácia, química medicinal, sendo relacionada à processos Bioquímicos e Metabólicos. Mais especificamente, a presente invenção proporciona uma nova classe de proteínas inibidoras da trombina, particularmente inibidores diretos da trombina modificados a partir da esculptina, identificada na análise transcriptômica das glândulas salivares de carrapatos, assim como seus fragmentos e proteína recombinante, úteis para uso como agentes anticoagulantes e para profilaxia e/ou tratamento de doenças tromboembólicas



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

PROTEÍNA RECOMBINANTE E SEUS FRAGMENTOS, PROCESSO DE OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE, GENE SINTÉTICO E USO DA ESCULPTINA OU PROTEÍNA RECOMBINANTE PARA PREPARAR UM MEDICAMENTO OU COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA PROFILAXIA E/OU TRATAMENTO DE DOENÇAS TROMBOEMBÓLICAS OU COMO INIBIDOR DIRETO E ESPECÍFICO DA TROMBINA

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção descreve uma nova classe de proteínas inibidoras da trombina, particularmente inibidores diretos da trombina, assim como seus fragmentos e proteína recombinante, úteis para uso como agentes anticoagulantes. A presente invenção se situa nos campos da bioquímica, biologia molecular, genética, farmácia, química medicinal, sendo relacionada a processos Bioquímicos e Metabólicos.

Antecedentes da Invenção

[0002] Trombina é uma enzima multifuncional com uma função principal na cascata de coagulação. Sua modulação funcional pode culminar em uma coagulação sanguínea normal ou em distúrbios, como trombose. Assim, a identificação de novos inibidores potentes e específicos de trombina são de imensa importância.

[0003] A coagulação sanguínea é um processo dinâmico que envolve uma cascata de proenzimas levando à ativação de enzimas à jusante. Em condições normais, resulta em hemostase. O equilíbrio trombo-hemorrágico é crucialmente mantido no corpo por um mecanismo complexo e delicado. Entretanto, seu distúrbio pode resultar possivelmente em hemorragia ou trombose. Trombina, um heterodímero de 37kDa, é uma enzima central na cascata de coagulação. Trombina é uma enzima multifuncional, que funciona

como um pró-coagulante por clivagem de fibrinogênio, ativando fatores de coagulação (V, VIII, XI e XIII) e induzindo agregação de plaquetas. Por outro lado, a trombina pode funcionar como um anticoagulante pela ligação à trombomodulina e ativando a proteína C. Além disso, desempenha uma função vital em trombose arterial e venosa, coagulação intravascular disseminada (DIC), câncer, doenças cerebrais inflamatórias, cicatrização de feridas e aterosclerose. Para superar seus efeitos prejudiciais, a trombina pode ser inibida direta ou indiretamente ao bloquear um ou dois de seus três domínios, isto é, sítio ativo e exossítio 1 e 2. Tradicionalmente, heparina não fracionada (UFH) e heparina de baixo peso molecular (LMWH) foram utilizadas como anticoagulantes para inibir a trombina de maneira indireta ao se ligar simultaneamente a anti-trombina e exossítio 2 de trombina. Entretanto, a heparina (UFH e LMWH) produz uma ponte de fibrina-trombina e aumenta a formação de trombos, e pode causar trombocitopenia induzida por heparina. Inibidores diretos de trombina (DTIs) são um grupo de anticoagulantes que não precisam de co-fator, que se liga diretamente ao sítio ativo de trombina e obstrui sua atividade. DTIs têm uma vantagem sobre inibidores indiretos, pois DTIs são anticoagulantes mais previsíveis, uma vez que não possuem efeito anti-plaquetas e não levam à trombocitopenia imunomediada. Diversos DTIs, incluindo hirudina recombinante e seus hirulogs são aprovados para uso como anticoagulantes. Hirudina, um peptídeo de 65 aminoácidos (7 kDa), é um inibidor de trombina direto que foi, primeiro, isolada da saliva da sanguessuga medicinal *Hirudo medicinalis*. Depois, uma forma recombinante de hirudina foi produzida, que diferia da hirudina natural pelo resíduo de Tyr, que não é sulfatado. Essa diferença reduziu ligeiramente a atividade da hirudina recombinante. Entretanto, a inibição de trombina por hirudina recombinante é irreversível e gera anticorpos anti-hirudina, o que culmina no acúmulo da droga. Atualmente, não está disponível antídoto para reverter as consequências de hirudina recombinante. Além disso, diversos hirulogs sintéticos foram desenvolvidos e testados em relação à sua atividade inibidora de trombina,

mas eram inibidores quase 800 vezes mais fracos do que a hirudina recombinante. Entre todos hirulogs, bivalirudina é um anticoagulante aprovado pela FDA, que é um inibidor de trombina direto, mas com meia-vida curta. Quase todos estes anticoagulantes são associados a efeitos colaterais, como a formação de complexo de hirudina-trombina irreversível, meia-vida curta dos hirulogs e sua dosagem precisa ser estritamente monitorada. A maioria destes inibidores de trombina são de sanguessugas e são investigados extensivamente. Por outro lado, inibidores específicos de trombina de carrapatos foram totalmente esquecidos, embora inibidores do tipo Kunitz tenham sido investigados em detalhes.

[0004] Devido a esses fatos, se faz interessante o desenvolvimento de uma nova classe de inibidores diretos da trombina, , assim como seus fragmentos e proteína recombinante, úteis para uso como agentes anticoagulantes.

[0005] Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

1. Pasma, J. J. N., Posthuma, J. J. & Spronk, H. M. H. Coagulation and non-coagulation effects of thrombin. *J. Thromb. Haemost.* **14**, 1908–1916 (2016).
2. Lee, C. J. & Ansell, J. E. Direct thrombin inhibitors: Parenteral and oral inhibitors of thrombin activity. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **72**, 581–592 (2011).
3. Crawley, J. T. B., Zanardelli, S., Chion, C. K. N. K. & Lane, D. A. The central role of thrombin in hemostasis: Central role of thrombin in hemostasis. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 95–101 (2007).
4. Siller-Matula, J. M., Schwameis, M., Blann, A., Mannhalter, C. & Jilma, B. Thrombin as a multi-functional enzyme: Focus on *in vitro* and *in vivo* effects. *Thromb. Haemost.* **106**, 1020–1033 (2011).
5. Coppens, M., Eikelboom, J. W., Gustafsson, D., Weitz, J. I. & Hirsh, J. Translational Success Stories: Development of Direct Thrombin Inhibitors. *Circ. Res.* **111**, 920–929 (2012).

6. Weitz, J. I., Hudoba, M., Massel, D., Maraganore, J. & Hirsh, J. Clot-bound thrombin is protected from inhibition by heparin-antithrombin III but is susceptible to inactivation by antithrombin III-independent inhibitors. *J. Clin. Invest.* **86**, 385–391 (1990).
7. Nasief, N. N., Said, A. M. & Hangauer, D. Modulating hydrogen-bond basicity within the context of protein-ligand binding: A case study with thrombin inhibitors that reveals a dominating role for desolvation. *Eur. J. Med. Chem.* **125**, 975–991 (2017).
8. Song, X. *et al.* The NMR solution structure of recombinant RGD-hirudin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **360**, 103–108 (2007).
9. Tulinsky, A. Molecular Interactions of Thrombin. *Semin. Thromb. Hemost.* **22**, 117–124 (1996).
10. Weitz, J. I., Leslie, B. & Hudoba, M. Thrombin Binds to Soluble Fibrin Degradation Products Where it Is Protected From Inhibition by Heparin-Antithrombin but Susceptible to Inactivation by Antithrombin-Independent Inhibitors. *Circulation* **97**, 544–552 (1998).
11. Dodt, J., Köhler, S. & Baici, A. Interaction of site specific hirudin variants with α -thrombin. *FEBS Lett.* **229**, 87–90 (1988).
12. Zavyalova, E. & Kopylov, A. Multiple inhibitory kinetics reveal an allosteric interplay among thrombin functional sites. *Thromb. Res.* **135**, 212–216 (2015).
13. Maraganore, J. M., Bourdon, P., Jablonski, J., Ramachandran, K. L. & Fenton, J. W. Design and characterization of hirulogs: a novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin. *Biochemistry (Mosc.)* **29**, 7095–7101 (1990).
14. Branco, V. G. *et al.* Amblyomin-X having a Kunitz-type homologous domain, is a noncompetitive inhibitor of FXa and induces anticoagulation *in vitro* and *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1864**, 1428–1435 (2016).
15. Macedo-Ribeiro, S. *et al.* Isolation, Cloning and Structural

Characterisation of Boophilin, a Multifunctional Kunitz-Type Proteinase Inhibitor from the Cattle Tick. *PLoS ONE* **3**, e1624 (2008).

16. Narasimhan, S. *et al.* Characterization of Ixophilin, A Thrombin Inhibitor from the Gut of *Ixodes scapularis*. *PLoS ONE* **8**, e68012 (2013).

17. Liao, M. *et al.* Hemalin, a thrombin inhibitor isolated from a midgut cDNA library from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *J. Insect Physiol.* **55**, 165–174 (2009).

18. Nava, S. *et al.* Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* () with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). *Ticks Tick-Borne Dis.* **5**, 252–276 (2014).

19. Batista, I. F. C. *et al.* Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Toxicon* **51**, 823–834 (2008).

20. Kelly, L. M. FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood* **99**, 310–318 (2002).

21. Usón, I. *et al.* The 1.2 Å crystal structure of hirustasin reveals the intrinsic flexibility of a family of highly disulphide-bridged inhibitors. *Structure* **7**, 55–63 (1999).

22. Tan, S. *et al.* Efficient expression and secretion of recombinant hirudin III in *E. coli* using the I-asparaginase II signal sequence. *Protein Expr. Purif.* **25**, 430–436 (2002).

23. Kikumoto, R. *et al.* Selective inhibition of thrombin by (2R,4R)-4-methyl-1-[N²-[1,2,3,4-tetrahydro-8-quinoliny]sulfonyl]-L-arginyl]-2-piperidinecarboxylic acid. *Biochemistry (Mosc.)* **23**, 85–90 (1984).

24. Tew, D. J. & Bottomley, S. P. Intrinsic fluorescence changes and rapid kinetics of proteinase deformation during serpin inhibition. *FEBS Lett.* **494**, 30–33 (2001).

25. Witting, J. I., Bourdon, P., Brezniak, D. V., Maraganore, J. M. & Fenton, J. W. Thrombin-specific inhibition by and slow cleavage of hirulog-1. *Biochem. J.* **283**, 737–743 (1992).
26. Parry, M. A. A., Maraganore, J. M. & Stone, S. R. Kinetic Mechanism for the Interaction of Hirulog with Thrombin. *Biochemistry (Mosc.)* **33**, 14807–14814 (1994).
27. Hsu, H.-J. *et al.* Factor Xa Active Site Substrate Specificity with Substrate Phage Display and Computational Molecular Modeling. *J. Biol. Chem.* **283**, 12343–12353 (2008).
28. Borensztajn, K., Peppelenbosch, M. P. & Spek, C. A. Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease. *Trends Mol. Med.* **14**, 429–440 (2008).
29. Borensztajn, K. S. *et al.* Coagulation factor Xa drives tumor cells into apoptosis through BH3-only protein Bim up-regulation. *Exp. Cell Res.* **313**, 2622–2633 (2007).
30. Borensztajn, K., Peppelenbosch, M. P. & Spek, C. A. Coagulation Factor Xa inhibits cancer cell migration via LIMK1-mediated cofilin inactivation. *Thromb. Res.* **125**, e323–e328 (2010).
31. Gleeson, E. M. *et al.* Activated factor X signaling via protease-activated receptor 2 suppresses pro-inflammatory cytokine production from lipopolysaccharide-stimulated myeloid cells. *Haematologica* **99**, 185–193 (2014).
32. Sierko, E. *et al.* Co-localization of Protein Z, Protein Z-Dependent protease inhibitor and coagulation factor X in human colon cancer tissue: Implications for coagulation regulation on tumor cells. *Thromb. Res.* **129**, e112–e118 (2012).
33. Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J. & Barton, G. J. JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* **43**, W389–W394 (2015).
34. Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary

Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 1870–1874 (2016).

35. Asif, H. *et al.* The chloroplast genome sequence of *Syzygium cumini* (L.) and its relationship with other angiosperms. *Tree Genet. Genomes* **9**, 867–877 (2013).

36. Iqbal, A. & Azim, M. K. Molecular characterization of hemolysin gene from a Pakistani clinical isolate of *Vibrio cholerae*. *J. Chem. Soc. Pak.* **33**, 935–938 (2011).

37. Martins-Pinheiro, M., Lima, W. C., Asif, H., Oller, C. A. & Menck, C. F. M. Evolutionary and Functional Relationships of the *dha* Regulon by Genomic Context Analysis. *PLOS ONE* **11**, e0150772 (2016).

38. Francischetti, I. M. B., Valenzuela, J. G. & Ribeiro, J. M. C. Anophelin: Kinetics and Mechanism of Thrombin Inhibition. *Biochemistry (Mosc.)* **38**, 16678–16685 (1999).

39. Iqbal, A., Azim, M. K., Hashmi, N., Ali, S. A. & Musharaf, S. G. Structural characterization of metalloprotease vibriolysin of cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Protein Pept. Lett.* **18**, 287–294 (2011).

40. Šali, A. & Blundell, T. L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *J. Mol. Biol.* **234**, 779–815 (1993).

41. Iqbal, A. & Azim, M. K. Structural Bioinformatics of Enol Pyruvyl Shikimate Phosphate Synthase from *Vibrio cholerae*. *J. Chem. Soc. Pak.* **34**, 120–126 (2012).

42. Tao, C., Jin, X., Zhu, L. & Li, H. Two-Dimensional Gel Electrophoresis-Based Proteomic Analysis Reveals N-terminal Truncation of the Hsc70 Protein in Cotton Fibers *In vivo*. *Sci. Rep.* **6**, 36961 (2016).

43. Stone, S. R. & Hofsteenge, J. Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin. *Biochemistry (Mosc.)* **25**, 4622–4628 (1986).

[0006] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e

atividade inventiva frente ao estado da técnica.

[0007] Sendo que a solução aqui proposta resolve o problema de falta de alternativas para contornar as limitações das terapias antitrombóticas ou para o tratamento ou profilaxia de doenças tromboembólicas.

Sumário da Invenção

[0008] Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir do desenvolvimento de novas proteínas com propriedades antitrombóticas ou para o tratamento ou profilaxia de doenças tromboembólicas e/ou seus fragmentos, que atuam na inibição direta e específica da trombina.

[0009] A sequência de nucleotídeos utilizada no vetor de expressão não é igual a sequência encontrada na natureza. A sequência de aminoácidos foi identificada pela análise da biblioteca de cDNA da glândula salivar do carrapato, porém, foi realizada a otimização de códons, adição de sítios de restrição e cauda de histidina para purificação na sequência de nucleotídeos utilizada no vetor de expressão, o que possibilitou o desenvolvimento do processo de obtenção da proteína recombinante (modificação da esculptina originalmente presente na glândula salivar do carrapato) em grande escala utilizando a bactéria *E. coli*, sendo que esta e somente esta proteína recombinante foi utilizada em todos os estudos.

[0010] Esta molécula obtida inibiu seletivamente a trombina de maneira competitiva. Foi lentamente clivada por trombina e fator Xa. Com base em espectrometria de massa e análise de Edman, foi proposto o peptídeo de ligação de sítio ativo de trombina, que tem somente poucos resíduos conservados comparado à hirudina clássica de sanguessuga medicinal, mas apresenta mesma potência. Os dados obtidos permitiram concluir que esta molécula tem o potencial de se tornar uma droga anti-trombótica e poderia potencialmente competir com hirudina clássica e seus análogos.

[0011] A presente invenção tem como primeiro objeto uma proteína

recombinante que compreende uma sequência com pelo menos 60% de identidade com a Seq ID Nº 1, Seq ID Nº 2, Seq ID Nº 3, Seq ID Nº 4, Seq ID Nº 5, Seq ID Nº 6, Seq ID Nº 7, Seq ID Nº 8, Seq ID Nº 9, Seq ID Nº 10, Seq ID Nº 11, Seq ID Nº 12, Seq ID Nº 13, Seq ID Nº 14, Seq ID Nº 15, Seq ID Nº 16 ou combinações das mesmas. Sendo que a Seq ID NO 1 se refere a proteína recombinante, enquanto que as Seq ID No 2 a 16 se refere aos seus fragmentos. Em uma concretização, a proteína recombinante compreende uma sequência com a Seq ID Nº1 ou Seq ID Nº 2, Seq ID Nº 3, Seq ID Nº 4, Seq ID Nº 5, Seq ID Nº 6, Seq ID Nº 7, Seq ID Nº 8, Seq ID Nº 9, Seq ID Nº 10, Seq ID Nº 11, Seq ID Nº 12, Seq ID Nº 13, Seq ID Nº 14, Seq ID Nº 15, Seq ID Nº 16 ou combinações das mesmas.

[0012] A presente invenção tem como segundo objeto, um processo de obtenção da dita proteína recombinante e/ou seus fragmentos a partir de cDNA da glândula salivar do carrapato *Amblyoma cajennense*.

[0013] A presente invenção tem como terceiro objeto um gene sintético que compreende uma sequência com pelo menos 60% de identidade com a Seq ID Nº 17. Em uma concretização, o gene sintético compreende uma sequência com a Seq ID Nº 17.

[0014] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta o uso da esculptina ou proteína recombinante para preparar um medicamento ou composição farmacêutica para profilaxia e/ou tratamento de doenças tromboembólicas.

[0015] Em um quinto objeto, a presente invenção apresenta o uso da esculptina ou proteína recombinante para profilaxia ou tratamento de doenças tromboembólicas ou como Inibidor direto e específico da trombina.

[0016] Em um sexto objeto, a presente invenção apresenta um vetor de expressão, construção gênica ou plasmídeo que compreende o gene sintético descrito na presente invenção.

[0017] Em um sétimo objeto, a presente invenção apresenta um método de tratamento ou profilaxia de doenças tromboembólicas compreendendo a

administração de uma dose efetiva da esculptina ou proteína recombinante da presente invenção e/ou seus fragmentos.

[0018] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0019] A Figura 1 apresenta a análise filogenética da Esculptina. Sequências de proteínas de inibidores de trombina de carrapatos e sanguessugas foram recuperadas do banco de dados Swiss-Prot/TrEMBL (www.uniprot.org) e o perfil filogenético foi determinado utilizando o método de *Neighbor-Joining* integrado em MEGA 7.0. O consenso bootstrap foi 100 e valor limite para a árvore condensada foi 60% de replicação de bootstrap corrompido (vide, procedimentos experimentais). O número de acesso de cada sequência é dado e a posição de consulta é destacada em vermelho. Um único domínio de esculptina foi levado em consideração durante a construção de filogenia.

[0020] A Figura 2 apresenta a especificidade da proteína recombinante para trombina e sua dependência de dose e IC₅₀ para inibição de trombina. (A) A inibição de serina proteases pela proteína recombinante. Serina protease (100 pM; trombina, plasmina, tripsina ou fator Xa) foi incubada com a proteína recombinante (1, 100 e 200 nM) em 50 mM de tampão de fosfato contendo 150 mM de NaCl e 0,1% de PEG 6000, pH 7,4 por 6 h a 37 °C. Após a adição do substrato cromogênico correspondente à mistura de reação, sua hidrólise foi monitorada a 405 nm. Para a atividade de fator Xa, o tampão continha 50 µM de fosfatidilserina e fosfatidilcolina. A gravura inserida em (A) apresenta o SDS-PAGE de proteína recombinante purificada (SEQ ID N° 1), que foi utilizada nos experimentos. (B) Curvas típicas para a hidrólise de substrato cromogênico S-2238 (15 µM) por 0,1 nM de trombina na ausência (traço a) ou presença da proteína recombinante (traço b, 15 pM; traço c, 30 pM; traço d, 60 pM e traço e,

100 pM) em 50 mM de tampão de fosfato contendo 150 mM de NaCl e 0,1% de PEG 6000, pH 7,4 a 37 °C. (C) Atividade residual de trombina na presença de concentração crescente da proteína recombinante. (D) Curvas de dose-resposta para inibição de trombina pela proteína recombinante. A porcentagem de inibição de trombina foi traçada versus o registro de concentração de proteína recombinante. A condição experimental de (C) e (D) é a mesma que em (B).

[0021] A Figura 3 apresenta a cinética de inibição da trombina pela proteína recombinante. (A) Curvas de progresso típicas para hidrólise de substrato cromogênico S-2238 por 0,1 nM de trombina na ausência (traço a) e presença de proteína recombinante (traço b, 20 pM; traço c, 40 pM; traço d, 60 pM e traço e, 80 pM) em 50 mM de tampão de fosfato contendo 150 mM de NaCl e 0,1% de PEG 6000, pH 7,4 a 37 °C. As reações foram iniciadas com a adição de trombina à mistura contendo proteína recombinante e S-2238. (B) Um gráfico de Lineweaver–Burk para a inibição de trombina pela proteína recombinante utilizando a Eq. (1). A reciprocidade da velocidade inicial de inibição de trombina na ausência (traço a) e presença de proteína recombinante (traço b, 20 pM; traço c, 40 pM e traço d, 60 pM) em diferentes concentrações de substrato. (C) O K_m aparente obtido de (B) foi traçado versus a respectiva concentração para obter K_i . (D) A regressão não linear para a inibição competitiva utilizando Eq. (2). A velocidade inicial da inibição de trombina na ausência (traço a) e presença de proteína recombinante (traço b, 20 pM; traço c, 40 pM; traço d, 60 pM e traço e, 80 pM) em diferentes concentrações de substrato. A condição experimental de (B), (C) e (D) é a mesma que (A).

[0022] A Figura 4 apresenta a relação entre a taxa de primeira ordem aparente e a concentração de inibidor de ligação estreita de proteína recombinante. (A) Curvas de progresso típicas para hidrólise de 15 μ M de substrato cromogênico S-2238 por 0,1 nM de trombina na ausência (traço a) e presença de proteína recombinante (traço b, 10 pM; traço c, 30 pM; traço d, 70

pM; traço e, 100 pM; traço f, 200 pM e traço g, 500 pM) em 50 mM de tampão de fosfato contendo 150 mM de NaCl e 0,1% de PEG 6000, pH 7,4 a 37 °C. As reações foram iniciadas com a adição de trombina à mistura contendo proteína recombinante e S-2238. (B) Velocidade de equilíbrio de trombina em relação à concentração de proteína recombinante (C) Cálculo da constante de dissociação de kobs. A constante de taxa de primeira ordem aparente foi calculada utilizando um ajuste de regressão não linear, onde o cruzamento e a inclinação é k_{on} e k_{off} respectivamente. A condição experimental de (B) e (C) é a mesma que (A).

[0023] A Figura 5 apresenta a degradação de proteína recombinante por serina proteases e sua atividade de inibição de trombina. A proteína recombinante (10 μ M) foi incubada sem ou com 1 μ M de serina protease (trombina, plasmina, tripsina ou fator Xa) em 50 mM de tampão de fosfato contendo 150 mM de NaCl e 0,1% de PEG 6000, pH 7,4 por 4, 6, 7 ou 18 h a 37 °C. As misturas de reação (20 μ l) foram separadas por SDS-PAGE. (A) SDS-PAGE (15 %) de hidrólise de proteína recombinante por serina proteases após 6 h de incubação. (B) Porcentagem de inibição de trombina pela proteína recombinante após 6 h de incubação com serina protease (vide procedimentos experimentais). (C) SDS-PAGE (15 %) de hidrólise da proteína recombinante por serina proteases após 18 h de incubação. (D) Porcentagem de inibição de trombina pela proteína recombinante após 18 h de incubação com serina protease (vide procedimentos experimentais). A numeração de (B) e (D) correspondem à numeração de (A) e (C), respectivamente, e controle de proteína recombinante é representado por CTRL. A proteína recombinante (faixa 1); trombina (faixa 2) e trombina com proteína recombinante (faixa 3); plasmina (faixa 4) e plasmina com proteína recombinante (faixa 5); tripsina (faixa 6) e tripsina com proteína recombinante (faixa 7); fator Xa (faixa 8) e fator Xa com proteína recombinante (faixa 9) e marcador de proteína (faixa 10; em A). (E) Identificação de sítios de clivagem de trombina na proteína recombinante após 7 h de incubação. (F) Identificação de sítios de clivagem de

fator Xa na proteína recombinante após 4 h de incubação. Sítios de clivagem de trombina e fator Xa na sequência de proteína recombinante estão apresentados na figura S1 e S2, respectivamente. O procedimento experimental para (C), (D), (E) e (F) foi o mesmo que para (A) e (B), exceto o tempo de incubação e o tipo de serina protease utilizada.

[0024] A Figura 6 apresenta a atividade de inibição de trombina de fragmentos de proteína recombinante gerados pelo fator Xa. A proteína recombinante (10 μ M) foi incubada sem ou com 1 μ M de fator Xa em 50 mM de tampão de fosfato contendo 150 mM de NaCl, e 50 μ M de fosfatidilserina e fosfatidilcolina, pH 7,4 por 18 h a 37 °C. (A) As misturas de reação foram separada por coluna de HPLC C-18 de fase reserva. (B) Os picos (H1 - H5) coletados foram sujeitos a MALDI-TOF MS e teste de inibição de trombina (vide tabela 1, para a sequência dos peptídeos correspondentes). (C) Curvas de progresso típicas para hidrólise de 15 μ M de substrato cromogênico S-2238 por 0,1 nM de trombina na ausência (traço Ctrl) e presença de 100 pM de fragmento de proteína recombinante (traços H1 e H3) ou proteína recombinante intacta (traço Scpt) em 50 mM de tampão de fosfato contendo 150 mM de NaCl e 0,1% de PEG 6000, pH 7,4 a 37 °C. (D) A porcentagem de inibição de trombina pela proteína recombinante e seus fragmentos. As condições de reação da porcentagem de inibição de trombina foram obtidas de (C).

[0025] A Figura 7 apresenta uma representação de desenho (Faixa sólida) da proteína recombinante e hirudina ligada à trombina. As cores marrom e ciano representam cadeia pesada e leve de trombina respectivamente. (A) A proteína recombinante em verde ligada à trombina (B) Hirudina em azul ligada à trombina. Resíduo lys dos inibidores é apresentado em amarelo e resíduo de Ser195 de sítio ativo de trombina é apresentado em vermelho.

[0026] A Figura 8 apresenta uma análise de sequência da proteína. (A) A sequência da proteína recombinante modificada a partir da esculptina, a qual foi identificada na análise transcriptômica da glândula salivar de carrapato. O

sinal previsto do peptídeo está sublinhado. Quatro repetições de peptídeo dentro da proteína recombinante estão apresentadas pela cor cinza e amarelo alternadas. (B) Alinhamento múltiplo da proteína recombinante com hirudina de *Amblyomma cajennense*, *Rhipicephalus appendiculatus* e *Hirudo medicinalis*. Os resíduos conservados são destacados em cinza. O sítio ativo ligado a PKP da hirudina de *Hirudo medicinalis* é alterado para PKM na esculptina. Sítios de clivagem de fator Xa e trombina são identificados por asterisco e jogo da velha, respectivamente.

[0027] A Figura 9 apresenta a expressão e purificação da proteína recombinante. Gene sintético da proteína recombinante foi clonado ao vetor de expressão pET28a e a proteína recombinante foi expressa em *E. coli* BL21 (DE3) no meio líquido a 37 °C. Lisados celulares inteiros de culturas não induzidas ou induzidas (IPTG 0,5 mM) foram analisadas por SDS-PAGE (15%). (A) SDS-PAGE de indução de proteína recombinante. Faixa M, NI e I representa marcador de proteína, não induzido com IPTG, respectivamente. (B) SDS-PAGE de lisado celular de *E. coli* após a expressão da proteína recombinante. Faixa M, TE, IN, SO corresponde ao marcador de proteína, extrato total, frações insolúveis e solúveis, respectivamente. (C) Purificação por cromatografia de afinidade da proteína recombinante. A fração solúvel foi filtrada através de uma membrana de 0,45µm e aplicada em uma coluna de afinidade de quelante Ni de identificador His. A proteína ligada foi eluída com imidazol e 15µl de cada fração foi analisado por SDS-PAGE. (D) SDS-PAGE de frações de cromatografia de afinidade. As faixas TE, E, M e U representa o extrato total, frações de proteína eluída, marcador de proteína e fração de proteína não ligada respectivamente. (E) Purificação de proteína recombinante por Cromatograma de troca iônica. Imagem inserida apresentando SDS-PAGE da faixa de proteína recombinante purificada.

[0028] A Figura 10 apresenta a purificação de proteína recombinante, um inibidor específico de trombina. (A) SDS-PAGE de proteína recombinante purificada utilizando métodos cromatográficos convencionais (vide

procedimentos experimentais e figura S2). (B) Espectro MALDI-TOF MS de proteína recombinante purificada.

[0029] A Figura 11 apresenta avaliação de APTT, PT e TT *in vitro* em plasma humano isolado incubado com diferentes concentrações de proteína recombinante. O plasma foi obtido do sangue de voluntário humano saudável e incubado com diferentes concentrações de proteína recombinante. APTT, PT e TT foram determinados como no procedimento experimental. (A) Tempo de tromboplastina parcial ativada (B) tempo de protrombina e (C) tempo de trombina. Ctrl se refere a plasma e Sal se refere a plasma mais solução fisiológica.

Descrição Detalhada da Invenção

[0030] Aqui, será relatado uma nova classe de inibidores de trombina, particularmente inibidores diretos e específicos de trombina, os quais foram modificados a partir da esculptina que foi identificada na análise transcriptômica das glândulas salivares de carrapato. Consiste em 168 resíduos tendo quatro repetições exatamente semelhantes e com divergência evolutiva de hirudina clássica. A proteína recombinante é um inibidor de trombina competitiva, específica e reversível com K de $18,5 \pm 2.2$ pM. É consumida lentamente pela trombina e perde sua atividade de inibição. Da mesma forma, a proteína recombinante é hidrolisada por fator Xa e cada fragmento de polipeptídeo é capaz de inibir a trombina independentemente. Um único domínio de proteína recombinante isoladamente retém ~45% da atividade inibidora, que foi proposto se ligar à trombina de maneira bivalente. A formação de uma estrutura semelhante à hélice/de volta pequena por resíduos de ligação de sítio ativo de domínio de proteína recombinante poderia torná-la um inibidor de trombina mais potente do que hirulogs. Além disso, a proteína recombinante prolonga a coagulação por meio de suas vias metabólicas extrínsecas e intrínsecas. Foi considerado juntamente, dados que permitiram concluir que a proteína recombinante e seu(s) domínio(s) independente(s) têm forte potencial

de se tornar um composto terapêutico antitrombótico ou para tratamento de doenças tromboembólicas inovador.

[0031] A presente invenção tem como conceito inventivo comum aos seus diversos objetos os inibidores de trombina, particularmente inibidores diretos da trombina e seus fragmentos.

[0032] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta uma proteína recombinante compreendendo uma sequência com pelo menos 60% de identidade com a Seq ID N° 1, Seq ID N° 2, Seq ID N° 3, Seq ID N° 4, Seq ID N° 5, Seq ID N° 6, Seq ID N° 7, Seq ID N° 8, Seq ID N° 9, Seq ID N° 10, Seq ID N° 11, Seq ID N° 12, Seq ID N° 13, Seq ID N° 14, Seq ID N° 15, Seq ID N° 16 ou combinações das mesmas. Em uma concretização, a proteína recombinante compreende uma sequência com pelo menos 70%, mais preferencialmente pelo menos 90%, mais preferencialmente pelo menos 95%, ainda mais preferencialmente pelo menos 99% de identidade com a Seq ID N° 1, Seq ID N° 2, Seq ID N° 3, Seq ID N° 4, Seq ID N° 5, Seq ID N° 6, Seq ID N° 7, Seq ID N° 8, Seq ID N° 9, Seq ID N° 10, Seq ID N° 11, Seq ID N° 12, Seq ID N° 13, Seq ID N° 14, Seq ID N° 15, Seq ID N° 16 ou combinações das mesmas.

[0033] Em uma concretização, a proteína recombinante consiste de uma sequência com pelo menos 60% de identidade com a Seq ID N° 1, Seq ID N° 2, Seq ID N° 3, Seq ID N° 4, Seq ID N° 5, Seq ID N° 6, Seq ID N° 7, Seq ID N° 8, Seq ID N° 9, Seq ID N° 10, Seq ID N° 11, Seq ID N° 12, Seq ID N° 13, Seq ID N° 14, Seq ID N° 15, Seq ID N° 16 ou combinações das mesmas. Em uma concretização, a proteína recombinante consiste de uma sequência com pelo menos 70%, mais preferencialmente pelo menos 90%, mais preferencialmente pelo menos 95%, ainda mais preferencialmente pelo menos 99% de identidade com a Seq ID N° 1, Seq ID N° 2, Seq ID N° 3, Seq ID N° 4, Seq ID N° 5, Seq ID N° 6, Seq ID N° 7, Seq ID N° 8, Seq ID N° 9, Seq ID N° 10, Seq ID N° 11, Seq ID N° 12, Seq ID N° 13, Seq ID N° 14, Seq ID N° 15, Seq ID N° 16 ou combinações das mesmas.

[0034] Em uma concretização, a proteína recombinante compreende uma

sequência com a Seq ID N°1 ou Seq ID N° 2, Seq ID N° 3, Seq ID N° 4, Seq ID N° 5, Seq ID N° 6, Seq ID N° 7, Seq ID N° 8, Seq ID N° 9, Seq ID N° 10, Seq ID N° 11, Seq ID N° 12, Seq ID N° 13, Seq ID N° 14, Seq ID N° 15, Seq ID N° 16 ou combinações das mesmas.

[0035] Em uma concretização, a proteína recombinante consiste da sequência com a Seq ID N°1, Seq ID N° 2, Seq ID N° 3, Seq ID N° 4, Seq ID N° 5, Seq ID N° 6, Seq ID N° 7, Seq ID N° 8, Seq ID N° 9, Seq ID N° 10, Seq ID N° 11, Seq ID N° 12, Seq ID N° 13, Seq ID N° 14, Seq ID N° 15, Seq ID N° 16 ou combinação das mesmas.

[0036] A presente invenção tem como segundo objeto, um processo de obtenção da dita proteína recombinante e/ou seus fragmentos a partir de cDNA da glândula salivar do carrapato *Amblyoma cajennense*.

[0037] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta um gene sintético que compreende uma sequência com pelo menos 60% de identidade com a Seq ID N° 17. Em uma concretização, o gene sintético compreende uma sequência com pelo menos 70%, mais preferencialmente pelo menos 90%, mais preferencialmente pelo menos 95%, ainda mais preferencialmente pelo menos 99% de identidade com a Seq ID N° 17.

[0038] Em uma concretização, o gene sintético consiste de uma sequência com pelo menos 60% de identidade com a Seq ID N° 17. Em uma concretização, o gene sintético consiste de uma sequência com pelo menos 70%, mais preferencialmente pelo menos 90%, mais preferencialmente pelo menos 95%, ainda mais preferencialmente pelo menos 99% de identidade com a Seq ID N° 17.

[0039] Em uma concretização, o gene sintético compreende uma sequência com a Seq ID N° 17.

[0040] Em uma concretização, o gene sintético consiste de uma sequência com a Seq ID N° 17.

[0041] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta o uso da esculptina ou proteína recombinante para preparar um medicamento ou

composição farmacêutica para profilaxia e/ou tratamento de doenças tromboembólicas.

[0042] Em um quinto objeto, a presente invenção apresenta o uso da esculptina ou proteína recombinante para profilaxia e/ou tratamento de doenças tromboembólicas e/ou como Inibidor direto e específico da trombina.

[0043] Em um sexto objeto, a presente invenção apresenta um vetor de expressão, construção gênica ou plasmídeo que compreende o gene sintético descrito na presente invenção.

[0044] Em um sétimo objeto, a presente invenção apresenta um método de tratamento e/ou profilaxia de doenças tromboembólicas compreendendo a administração de uma dose efetiva da esculptina ou proteína recombinante da presente invenção e/ou seus fragmentos.

[0045] No contexto da presente invenção, “doenças tromboembólicas” podem ser entendidas como distúrbios relacionados à coagulação ou obstrução de vasos sanguíneos, artérias ou veias por coágulos formados localmente ou por trombos liberados na circulação sistêmica, como por exemplo, trombose, infarto cardíaco, apoplexia, Angina pectoris (incluindo angina instável), reoclusões e restenoses após uma angioplastia ou by-pass aortocoronário, doenças de oclusão arterial periférica, ataques isquêmicos transitórios, embolias pulmonares, trombozes venosas profundas ou coagulação intravascular disseminada (DIC).

[0046] A invenção contribui, portanto, com as áreas de saúde, sendo revelado novos inibidores da trombina, particularmente inibidores diretos e específicos da trombina, altamente específicos, útil em tratamento ou profilaxia de doenças tromboembólicas.

Exemplos - concretizações

[0047] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

[0048] A sequência de aminoácidos da esculptina foi identificada a partir da análise de uma biblioteca de cDNA da glândula salivar do carrapato *Amblyoma cajennense* (atualmente *Amblyoma sculptum*).

[0049] A partir da sequência de aminoácidos identificada na biblioteca, foi realizada tradução reversa, através do software BLAST-X (NCBI) utilizando a tabela de uso de códons de *Escherichia coli*, chegando assim em uma sequência de DNA codificadora para a proteína recombinante, para expressão da proteína em sistema heterólogo (E. coli BL21(DE3)).

[0050] A partir da sequência de nucleotídeos codificadora da esculptina, foi desenhado um gene sintético (descrito na SEQ ID NO: 17), incorporando na extremidade 5' um sítio de clivagem da enzima de restrição NcoI e na extremidade 3' a sequência codificadora para cauda de histidina (HIS6) e um sítio de clivagem da enzima de restrição XhoI. Em seguida a sequência do gene sintético foi enviada à empresa GenOne Soluções em Biotecnologia (Rio de Janeiro, Brasil) para otimização de códons com um algoritmo proprietário, síntese do gene e clonagem no vetor de expressão para E. coli, pET-28a (Novagen, Merck Biosciences, Dramstadt, Alemanha).

[0051] O plasmídeo sintetizado e fornecido pela empresa GenOne foi utilizado para transformar a cepa de E. coli One Shot BL21(DE3) (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) através de método com cloreto de cálcio.

[0052] 10ng do plasmídeo pET28a-Esculptina foram incubados com 50µL de suspensão de células competentes BL21(DE3) por 30 minutos em gelo. Em seguida as células foram submetidas a choque térmico por incubação a 42°C por 30 minutos, seguidos de incubação em gelo por 10 minutos. Em seguida foi adicionado 1 mL de meio LB e a suspensão foi incubada por uma hora a 37°C.

[0053] Em seguida as células foram plaqueadas em meio de cultura LB sólido contendo 100µg/mL de ampicilina e a placa foi incubada durante a noite a 37°C. No dia seguinte, uma colônia foi isolada e utilizada para inocular 10mL de meio LB contendo 100µg/mL de ampicilina durante a noite, a 37°C. No dia seguinte foi adicionado 50% de glicerol à cultura, a suspensão foi alíquota da

em tubos contendo 1 mL de suspensão e os mesmos foram congelados a -80°C, dando origem ao lote semente mestre.

[0054] Os experimentos para expressão da proteína recombinante em *E. coli* foram sempre iniciados a partir de um frasco do lote semente, inoculado em meio LB contendo 100µg/mL de ampicilina e mantido a 37°C com agitação de 240rpm durante a noite, o que constitui o pré-inóculo.

[0055] No dia seguinte, uma quantidade suficiente do pré-inóculo foi utilizada para a inoculação do meio de cultura LB contendo 100µg/mL de ampicilina, na proporção de 1 volume de pré-inóculo para 100 volumes de meio de cultura. A cultura foi mantida a 37°C, com agitação a 240rpm, durante cerca de duas horas, até atingir a densidade ótica (OD600) entre 0,5-0,6. Atingida esta densidade ótica, foi adicionado o indutor IPTG em uma concentração final de 1mM e a cultura foi incubada novamente a 37°C por 4 horas.

[0056] Após a incubação, as células foram coletadas por centrifugação a 6000rpm por 30 minutos, sendo descartado o sobrenadante no final da centrifugação. As células foram ressuspensas em solução salina (150mM) NaCl na proporção de 1mL de solução para cada 8g de massa celular úmida (deste passo em diante a proporção de 1mL de solução gelada para cada 8g de massa úmida foi utilizada em todos os processos). As células foram novamente centrifugadas conforme acima e ressuspensas em tampão de lise. À suspensão foi adicionada lisozima na concentração final de 0,25mg/mL para rompimento da parede celular, mantendo-se incubação por 30 minutos a 37°C com agitação a 80rpm. Em seguida a suspensão foi submetida a 4 ciclos de sonicação em potência de 70% para rompimento celular e fragmentação do DNA genômico.

[0057] A suspensão foi centrifugada a 16000rpm (4°C) por uma hora para separação do material insolúvel do material solúvel.

[0058] A proteína recombinante (SEQ ID N° 1) foi expressa no citoplasma da bactéria, portanto a fração solúvel foi utilizada para purificação da proteína, que contém cauda de histidina através de cromatografia de afinidade, utilizando

o sistema de cromatografia AKTA AVANT (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA) e coluna HisTrap FF. O material solúvel foi aplicado na coluna, imobilizando a proteína recombinante. Em seguida foi realizada lavagem com 10 VC (volumes de coluna) de tampão de lise. A eluição da proteína foi realizada através de gradiente linear (10CV) de zero a 100% de tampão B. As frações coletadas contendo a proteína parcialmente purificada foram submetidas à troca de tampão em coluna de desalting (HiPrep 26/10) e uma segunda etapa de purificação de proteína recombinante foi realizada por cromatografia de troca iônica em coluna CptoQ, utilizando os mesmos passos de lavagem e eluição por gradiente linear descritos acima. As frações contendo a proteína purificada foram combinadas em um pool e foi realizada troca de tampão para tampão PBS através de coluna de desalting (HiPrep 26/10).

[0059] A proteína recombinante (SEQ ID Nº 1) na forma pura obtida através deste processo foi utilizada em todos os experimentos aqui descritos.

Análise de sequência e filogenia de esculptina

[0060] A sequência de esculptina foi identificada no perfil transcriptômico das glândulas salivares de *Amblyomma cajennense*. Esculptina, um polipeptídeo de 168 aminoácidos consiste em um único peptídeo, e quatro repetições exatamente semelhantes de 34 aminoácidos (Figura 8A). O alinhamento múltiplo de hirudina clássica de sanguessuga medicinal apresentou somente poucas semelhanças e, até os resíduos que se ligam ao sítio ativo de trombina não foram conservados. A análise filogenética de um domínio de única repetição de esculptina com outros inibidores de serina protease sugeriu que ela compartilha de um antecessor comum com variantes de hirudina de sanguessugas, mas difere em tempo de evolução. Na verdade, na árvore de evolução, a esculptina era mais próxima aos inibidores de serina protease da família antistasina, isto é, hirustasina, guamerina, bdellastasina, teromina e terostasina, do que a hirudina clássica de sanguessuga. Conforme esperado, a esculptina pertencia à mesma família de sequências semelhantes à hirudina de carrapato (Figura 1).

Purificação de proteína recombinante

[0061] A construção sintética de proteína recombinante sem o peptídeo sinal e com uma cauda de polihistidina C-terminal foi clonada em vetor de expressão pET28a. A proteína recombinante foi bem expressa e estava principalmente presente na fração solúvel (Figura 9). A proteína recombinante foi purificada por afinidade convencional e cromatografia de troca de íon (Figura 9). Análise de espectrometria de massa indicou uma massa de 16990,90 Da para a proteína recombinante (SEQ ID Nº 1) na forma purificada, mas em SDS-PAGE, executa-se logo acima da faixa marcadora de 20 kDa (Figura 10A e 10B). A proteína recombinante purificada foi utilizada para experimentos adicionais (imagem inserida na Figura 2A).

A proteína recombinante é um inibidor específico de trombina

[0062] O primeiro experimento que foi conduzido foi o teste de inibição de serina proteases pela proteína recombinante. Para este fim, foi selecionada a trombina, tripsina, plasmina e fator Xa. A hidrólise de um substrato cromogênico por serina proteases na presença e ausência de proteína recombinante foi monitorada de maneira espectrofotométrica. A proteína recombinante em 1 nM de concentração diminuiu a atividade residual de trombina em aproximadamente 97% (Figura 2A). Por outro lado, a proteína recombinante (1, 100, 200 nM) não inibiu o fator Xa, tripsina e plasmina (Figura 2A).

Inibição de atividade residual de trombina pela proteína recombinante e cálculo de valor de IC₅₀

[0063] A trombina era a única enzima inibida pela proteína recombinante. Foi analisado adicionalmente a inibição de trombina com concentrações crescentes da proteína recombinante. Os dados apresentaram que o aumento de uma concentração de proteína recombinante diminuiu a atividade residual da trombina (Figura 2B-D). O gráfico de porcentagem de inibição versus o log da concentração foi ajustado em função da função dose-resposta da equação 1 e o valor de IC₅₀ de $86,6 \pm 1,9$ pM foi calculado (Figura 3D).

Cinética de inibição de trombina pela proteína recombinante

[0064] A fim de avaliar o tipo de inibição exercido pela proteína recombinante em trombina, foi determinado os parâmetros cinéticos de hidrólise do substrato cromogênico S-2238 por trombina na presença de proteína recombinante. Para este fim, diversos testes foram conduzidos utilizando (i) uma concentração de substrato fixa e concentrações crescentes de proteína recombinante; e (ii) uma concentração de proteína recombinante fixa e concentrações crescentes de S-2238. Curvas de hidrólise típicas de S-2238 por trombina são dadas na figura 3A. As velocidades iniciais de hidrólise de substrato cromogênico S-2238 por trombina na presença de proteína recombinante foram ajustadas ao gráfico de Lineweaver–Burks utilizando a equação 2. O gráfico de Lineweaver–Burks sugere uma V_{max} constante e alterações em K_m comparado à reação na ausência de proteína recombinante, que é a característica da inibição competitiva (Figura 3B). A K_m aparente para cada concentração de inibidor foi traçada versus a respectiva concentração de inibidor e K_i foi calculada utilizando a equação 3. O valor de K_i obtido foi $18,5 \pm 2,2$ pM de proteína recombinante para a inibição de trombina (Figura 3C) e foi ainda confirmado pelo ajuste de dados à regressão não linear para a inibição de enzima competitiva utilizando as equações 3 e 4 (Figura 3D). O valor de K_i de $18,1 \pm 1,7$ pM obtido por este método foi semelhante ao calculado anteriormente (Figura 4D).

Cinética de ligação da proteína recombinante à trombina

[0065] Para cinética de ligação, o substrato pré-misturado e concentrações de proteína recombinante foram adicionados às misturas de reação já contendo trombina (vide procedimento experimental). Os traços de inibição são linhas retas e separadas logo do início da reação, sugerindo, assim, a ligação rápida e estreita entre a proteína recombinante à trombina (Figura 4A). Além disso, velocidades fracionais foram traçadas versus as concentrações do inibidor utilizando a equação 5 de ligação estreita de Morrison e os dados se ajustam melhor na equação (Figura 4B). K_i de $19,5 \pm 3,5$ pM foi calculada por equação

de ligação estreita de Morrison, que foi semelhante à determinada por regressão não linear para inibição de enzima competitiva. Além disso, k_{obs} calculado utilizando a equação 6 foi traçado versus a concentração de proteína recombinante. Do gráfico, foi calculado o k_{on} e k_{off} , que resultaram em $4,04 \pm 0,03 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $0,65 \pm 0,04 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ respectivamente (Figura 4C). A constante de inibição (K_i) de $16,1 \pm 1,4 \text{ pM}$ foi calculada utilizando a equação 7.

Degradação da proteína recombinante por serina proteases

[0066] Depois, foi determinado se as serina proteases, como trombina, plasmina, fator Xa e tripsina hidrolisam a proteína recombinante. Para este fim, a proteína recombinante ($10 \text{ }\mu\text{M}$) foi incubada sem ou com $1 \text{ }\mu\text{M}$ de serina protease (trombina, plasmina, tripsina ou fator Xa) em 50 mM de tampão de fosfato contendo 150 mM de NaCl e $0,1\%$ de PEG, pH 7,4 por 6 h ou 18 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. SDS-PAGE da mistura de reação após 6 h de incubação apresentou que, comparado à faixa de controle de proteína recombinante, a intensidade da faixa de 20-kDa (correspondente à proteína recombinante não digerida) diminuiu e faixas de peso molecular menor apareceram na proteína recombinante incubada por trombina (Figura 5A). Por outro lado, após 6 h de incubação, a faixa de 20-kDa desapareceu completamente na proteína recombinante incubada por plasmina e na tripsina (Figura 5A). Da mesma forma, após o mesmo tempo de incubação, fator Xa também converteu a proteína recombinante em fragmentos (Figura 5A). Para o teste de inibição de trombina, as mesmas amostras foram diluídas 100 mil vezes para uma concentração final de proteína recombinante de 100 pM e as misturas de reação foram adicionalmente suplementadas com 100 pM de trombina. Mediante a adição do substrato cromogênico S-2238, sua hidrólise por trombina foi monitorada de maneira espectrofotométrica. Os dados revelaram que a proteína recombinante incubada sem serina protease por 6 h inibiu a trombina semelhante ao controle (controle é 100 pM de proteína recombinante fresca; Figura 5B). Por outro lado, proteína recombinante incubada com trombina teve sua atividade inibidora diminuída em 20% e a proteína recombinante incubada por 6 h com plasmina

ou tripsina teve sua atividade inibidora diminuída em 80% (Figura 5B). De maneira interessante, proteína recombinante digerida com fator Xa reteve sua atividade de inibição de trombina (Figura 5B). Depois, foi examinada a proteína recombinante incubada com serina proteases por 18 h. A faixa de 20-kDa, que corresponde ao monômero de proteína recombinante, desapareceu completamente das misturas de reação de proteína recombinante incubada com serina protease (Figura 5C). Da mesma forma, para o teste de inibição de trombina, as amostras foram diluídas 100 mil vezes e foram adicionalmente suplementadas com 100 pM de trombina. Conforme esperado, a proteína recombinante incubada sem serina protease por 18 h inibiu a trombina semelhante ao controle de proteína recombinante fresca (Figura 5D). Entretanto, a proteína recombinante incubada com trombina, plasmina e tripsina não inibiu trombina (Figura 5D). De maneira interessante, proteína recombinante incubada por fator Xa ainda inibiu a atividade de trombina (Figura 5D).

Sequenciamento N-terminal de proteína recombinante hidrolisada por trombina

[0067] Conforme discutido acima, a trombina degrada a proteína recombinante. Doravante, nossa etapa seguinte foi determinar os sítios de clivagem de trombina na sequência de proteína recombinante. Para este fim, foi incubada a proteína recombinante com trombina por 7 h e os peptídeos gerados durante a hidrólise foram separados por cromatografia de fase reversa. Os picos individuais foram coletados e foram sujeitos a sequenciamento de N-terminal de Edman. Os resíduos sequenciados para o primeiro pico foram GKPQG, que foram os primeiros cinco resíduos de proteína recombinante (Figura 5E). Os resíduos sequenciados para os próximos três picos (2^o, 3^o, e 4^o) foram MPKGG, que são basicamente os resíduos de N-terminal de peptídeos de proteína recombinante gerados por trombina (Figura 5E). O último pico (5^o) com um tempo de retenção igual ao controle foi sequenciado para ter resíduos de MPKGG e GKPQG no N-terminal sugerindo que este pico abriga proteína recombinante intacta e parcialmente degradada

(Figura 5E). As frações também foram sujeitas à espectrometria de massa, que estavam de acordo com os dados de sequenciamento de Edman (Tabela 1). Massas teórica e experimental dos peptídeos estão listadas na tabela 1.

Tabela 1. Os fragmentos de proteína recombinante gerados por trombina.

Número de pico ^a	Fragmento de proteína recombinante ^b	Massa teórica [MH] ⁺	Massa Calculada ^c [MH] ⁺
H1	GKPQGHPHDALEARSDAVHTAVPK (SEQ ID N° 2)	2518,77	2521,74
	GKPQGHPHDALEARSDAVHTAVPKMPKGGHGGFEP IPIDYDERALEARSDAVHTAVPK (SEQ ID N° 3)	6162,85	6169,56
H2	MPKGGHGGFEPIDYDERALEARSDAVHTAVPK (SEQ ID N° 4)	3663,09	3663,90
H3	MPKGGHGGFEPIDYDERALHALEHHHHHH (SEQ ID N° 5)	3572,92	3572,70
H5	MPKGGHGGFEPIDYDERALEARSDAVHTAVPKMP KGGHGGFEPIDYDERALHALEHHHHHH (SEQ ID N° 6)	7217,00	7202,66
H6	MPKGGHGGFEPIDYDERALEARSDAVHTAVPKMP KGGHGGFEPIDYDERALEARSDAVHTAVPK (SEQ ID N° 7)	7282,19	7261,19
	MPKGGHGGFEPIDYDERALEARSDAVHTAVPKMP KGGHGGFEPIDYDERALEARSDAVHTAVPKMPK GHGGFEPIDYDERALHALEHHHHHH (SEQ ID N° 8)	10837,10	10807,97
	MPKGGHGGFEPIDYDERALEARSDAVHTAVPKMP KGGHGGFEPIDYDERALEARSDAVHTAVPKMPK GGHGGFEPIDYDERALEARSDAVHTAVPKMPKGGH GGFEPIDYDERALHALEHHHHHH (SEQ ID N° 9)	14481,18	14431,37
	GKPQGHPHDALEARSDAVHTAVPKMPKGGHGGFEP IPIDYDERALEARSDAVHTAVPKMPKGGHGGFEPID YDERALEARSDAVHTAVPKMPKGGHGGFEPIDYD ERALEARSDAVHTAVPKMPKGGHGGFEPIDYDER ALHALEHHHHHH (SEQ ID N° 1)	16981,94	16990,90

A proteína recombinante (10 µM) foi incubada com 1 µM de trombina em 50 mM de tampão de fosfato contendo 150 mM de NaCl e 0,1% de PEG 6000 pH 7,4 por 4 h a 37 °C. As misturas de reação foram separadas por coluna de HPLC C-18 de fase reversa. As frações foram sujeitas a sequenciamento de Edman ou espectrometria de massa MALDI-TOF.

Sequenciamento de N-terminal de proteína recombinante hidrolisada por fator

Xa

[0068] Também foi determinado os sítios de clivagem de fator Xa na proteína recombinante. Os peptídeos gerados pela incubação de proteína recombinante com fator Xa por 4 h foram separados por cromatografia de fase

reversa. Sequenciamento de Edman apresentou que os resíduos de N-terminal para o primeiro pico foram GKPQG, que são os primeiros cinco resíduos de proteína recombinante (Figura 5F). Os resíduos sequenciados para os próximos dois picos (2^o e 3^o) foram SDAVH, que são, de fato, os resíduos N-terminal de peptídeos de proteína recombinante gerados pelo fator Xa (Figura 5F). O último pico (4^o) com tempo de retenção igual ao controle foi sequenciado para ter resíduos de N-terminal MPKGG e SDAVH sugerindo que este pico abriga proteína recombinante intacta e parcialmente degradada (Figura 5F). Depois, os picos coletados foram sujeitos à espectrometria de massa, que estava de acordo com os dados de sequenciamento de Edman (Tabela 2). As massas teórica e experimental dos peptídeos estão listadas na tabela 2.

Tabela 2. Os fragmentos de proteína recombinante gerados pelo fator Xa.

Número de pico	Fragmentação de proteína recombinante	Massa Teórica	Massa Calculada
H1	GKPQGHPhDALEARSDAVHTAVPKMPKGGHGGFE PIPIDYDERALEAR (SEQ ID N° 10)	5156,74	5153,57
H2	SDAVHTAVPKMPKGGHGGFEPIDYDERALEAR (SEQ ID N° 11)	3663,10	3667,50
	SDAVHTAVPKMPKGGHGGFEPIDYDERALHALE HHHHHH (SEQ ID N° 12)	4579,05	4582,40
H3	SDAVHTAVPKMPKGGHGGFEPIDYDERALEARS DAVHTAVPKMPKGGHGGFEPIDYDERALHALEH HHHHH (SEQ ID N° 13)	8223,13	8220,55
	SDAVHTAVPKMPKGGHGGFEPIDYDERALEARS DAVHTAVPKMPKGGHGGFEPIDYDER (SEQ ID N° 14)	6765,55	6770,60
H4	SDAVHTAVPKMPKGGHGGFEPIDYDERALEARS DAVHTAVPKMPKGGHGGFEPIDYDERALEAR (SEQ ID N° 15)	7306,17	7299,61
	GKPQGHPhDALEARSDAVHTAVPKMPKGGHGGFE PIPIDYDERALEARSDAVHTAVPKMPKGGHGGFEPIDYDERALEARS DAVHTAVPKMPKGGHGGFEPIDYDERALEAR (SEQ ID N° 16)	12420,90	12427,54
	GKPQGHPhDALEARSDAVHTAVPKMPKGGHGGFE PIPIDYDERALEARSDAVHTAVPKMPKGGHGGFEPIDYDERALEARS DAVHTAVPKMPKGGHGGFEPIDYDERALHALEHHHHHH (SEQ ID N° 1)	16981,94	16990,90

A proteína recombinante (10 µM) foi incubada com 1 µM de fator Xa em 50 mM de tampão de fosfato contendo 150 mM de NaCl e 50 µM de PS/PC pH 7,4 por

4 h a 37 °C. As misturas de reação foram separadas por coluna de HPLC C-18 de fase reversa. As frações foram sujeitas a sequenciamento de Edman ou espectrometria de massa MALDI-TOF.

Fragmentos de proteína recombinante gerados por Fator Xa retêm a atividade de inibição de trombina

[0069] Além disso, a proteína recombinante foi incubada com fator Xa por 18 h e os peptídeos resultantes foram separados por cromatografia de fase reversa (Figura 6A). Os picos (nomeados como H1, H2, H3 H4 e H5) foram coletados e foram sujeitos à espectrometria de massa MALDI-TOF (Figura 6B). De acordo com a análise de espectrometria de massa, H1 corresponde à massa média de 5153,57 Da, H2 corresponde à massa média de 3667,50 Da e 4582,40 Da e H3 corresponde à massa média de 8220,55 Da e 6770,60 Da. De maneira semelhante, H4 corresponde à massa média de 7299,61 Da e 12427,54 Da e H5 corresponde a 16990,90, 12427,54 Da e 11843,17 Da (Figura 6B, Tabela 1). Além disso, as frações (H1, H2, H3 e H4) foram sujeitas a teste de inibição de trombina (Figura 6C). As frações H1, H2, H3 e H4 retiveram a atividade de inibição de trombina de aproximadamente 50%, 45%, 70% e 80% respectivamente, da proteína recombinante não hidrolisada intacta (Figura 6D). O pico H5 teve principalmente proteína recombinante intacta, assim, não foi considerado para o teste de inibição de trombina.

O efeito de proteína recombinante em aPTT, PT e TT

[0070] Por fim, PT, aPTT e TT foram avaliados em plasma isolado de voluntários humanos saudáveis após incubação com proteína recombinante por 3 min. a 37 °C. Os dados apresentaram que aPTT e PT foram prolongadas por proteína recombinante de maneira dependente da concentração (Figura 11A e 11B). A leitura máxima do teste para aPTT foi alcançada após 12 nM, enquanto, para PT, foi alcançada após 6 nM de proteína recombinante (Figura 11A e 11B). Por outro lado, TT foi prolongado por proteína recombinante na variação pico-molar (Figura 11C).

Tabela 3. Comparação de propriedades bioquímicas de inibidores de trombina.

Inibidor ^a	Tipo de inibição	valor de K_i	Administração	Meia-vida ^b	Ref.
Hirudina recombinante ^d	Competitiva	19 ± 2 pM	Intravenosa	1,3 h	[^{11,12}]
Sulfo-hirudina ^d	Competitiva	$1,2 \pm 0,2$ pM	ND	ND	[^{26,43}]
Hirugen ^d	Não competitiva	$1,3 \pm 0,2$ μM	ND	ND	[²⁴]
Bivalirudina ^d	Não competitiva	$1,9 \pm 2,6$ nM	Intravenosa	25 min	[^{13,25,26}]
Argatrobana	Não competitiva	39 ± 2 nM	Intravenosa	50 min	[²³]
Proteína recombinante	Competitiva	$18,5 \pm 2,2$ pM	ND	ND 8 h ^c	Este estudo

^a Inibidores diretos de trombina

^b Meia-vida em plasma em voluntários humanos saudáveis.

^c Meia-vida em plasma ex-vivo e em 50 mM de tampão de fosfato contendo 1 μM de trombina, 10 μM de proteína recombinante e 150 mM de NaCl e 0,1% de PEG 6000 pH 7,4 por 4 h a 37 °C.

ND, não determinada

^d Inibidor de Trombina bivalente, que ocupa o sítio ativo e exosítio 1.

^e Proposta pode ser bivalente (único domínio) ou trivalente (molécula intacta)

[0071] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. Proteína recombinante, **caracterizada** por compreender uma das sequências representadas pela Seq ID Nº1, Seq ID Nº 2, Seq ID Nº 3, Seq ID Nº 4, Seq ID Nº 5, Seq ID Nº 6, Seq ID Nº 7, Seq ID Nº 8, Seq ID Nº 9, Seq ID Nº 10, Seq ID Nº 11, Seq ID Nº 12, Seq ID Nº 13, Seq ID Nº 14, Seq ID Nº 15 ou Seq ID Nº 16.

2. Proteína recombinante de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por consistir de uma das sequências representadas pela Seq ID Nº1, Seq ID Nº 2, Seq ID Nº 3, Seq ID Nº 4, Seq ID Nº 5, Seq ID Nº 6, Seq ID Nº 7, Seq ID Nº 8, Seq ID Nº 9, Seq ID Nº 10, Seq ID Nº 11, Seq ID Nº 12, Seq ID Nº 13, Seq ID Nº 14, Seq ID Nº 15 ou Seq ID Nº 16.

3. Processo de obtenção da proteína recombinante conforme definida na reivindicação 1 **caracterizado** por ser a partir de cDNA da glândula salivar do carrapato *Amblyoma cajennense*.

4. Gene sintético, **caracterizado** por compreender uma sequência representada pela Seq ID Nº 17.

5. Gene sintético de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** por consistir de uma sequência representada pela Seq ID Nº 17.

6. Uso da proteína recombinante conforme definida na reivindicação 1, **caracterizado** por ser para preparar um medicamento ou composição farmacêutica para profilaxia e/ou tratamento de doenças tromboembólicas.

7. Uso da proteína recombinante conforme definida na reivindicação 1, **caracterizado** por ser para profilaxia e/ou tratamento de doenças tromboembólicas e/ou como Inibidor direto e específico da trombina.

FIGURAS

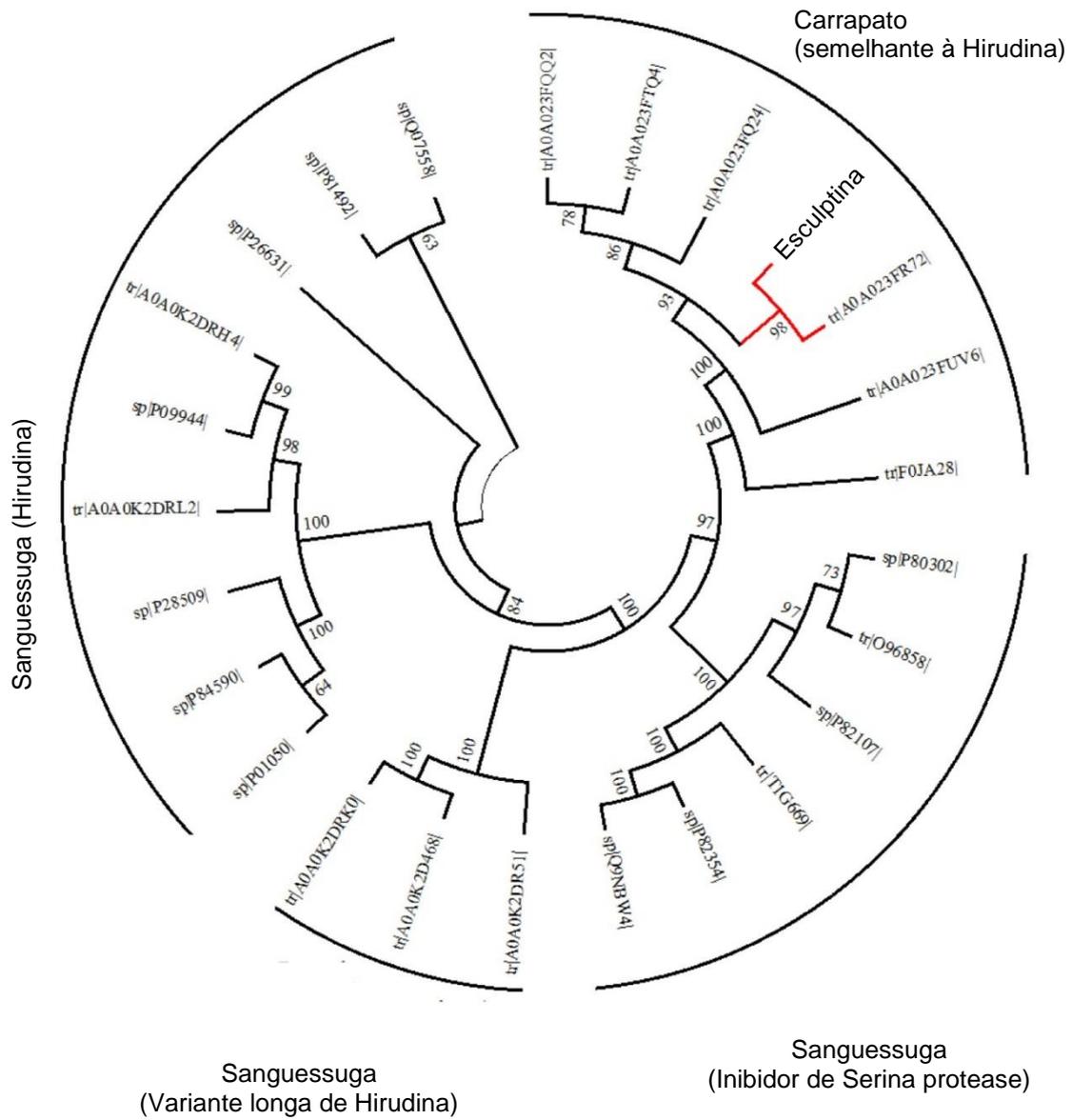


Figura 1

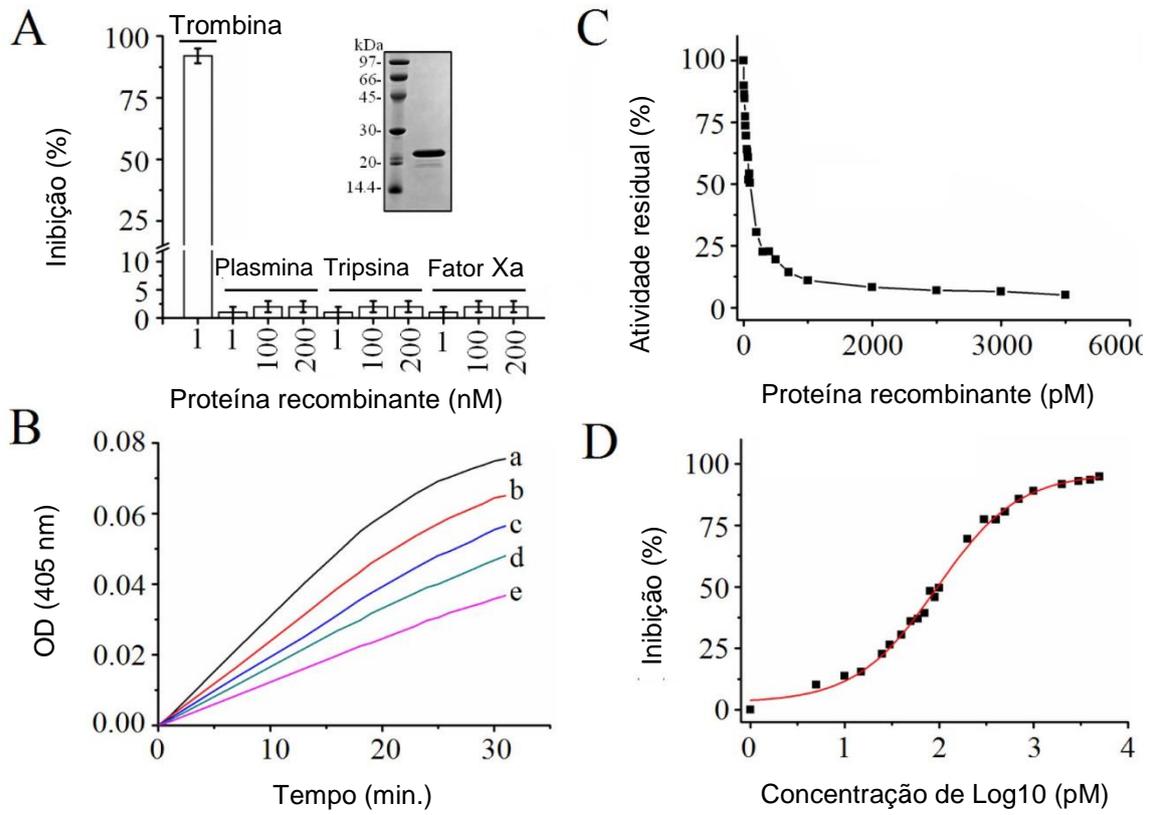


Figura 2

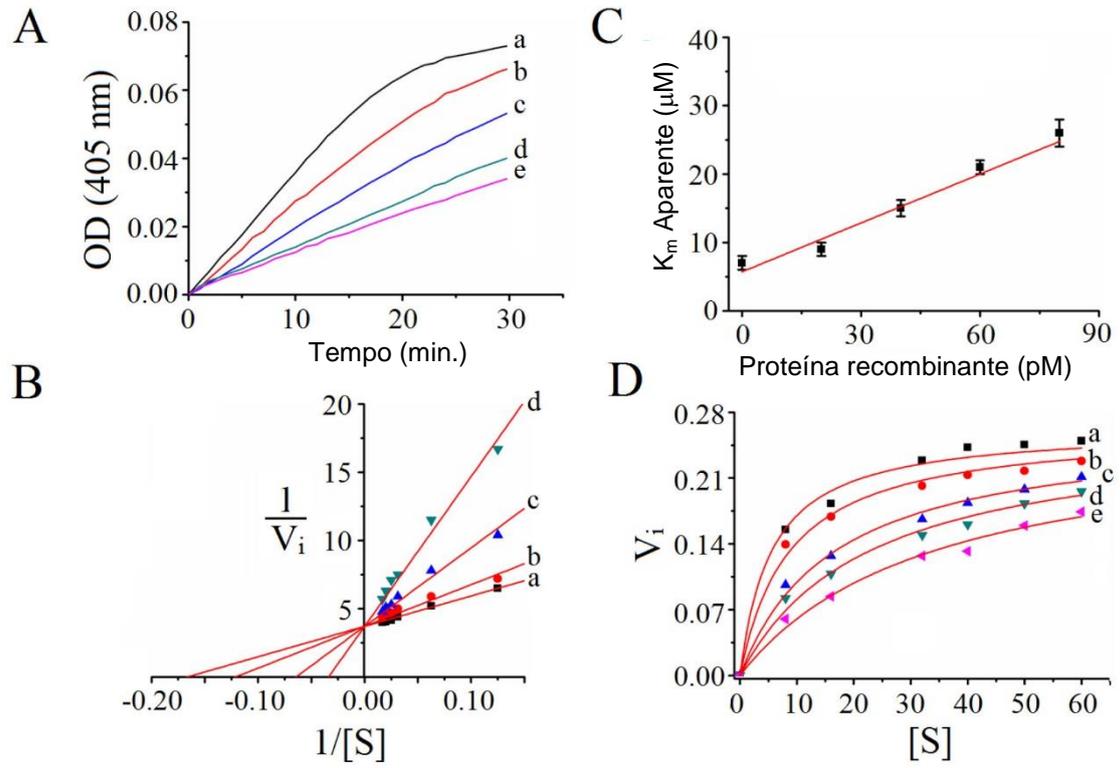


Figura 3

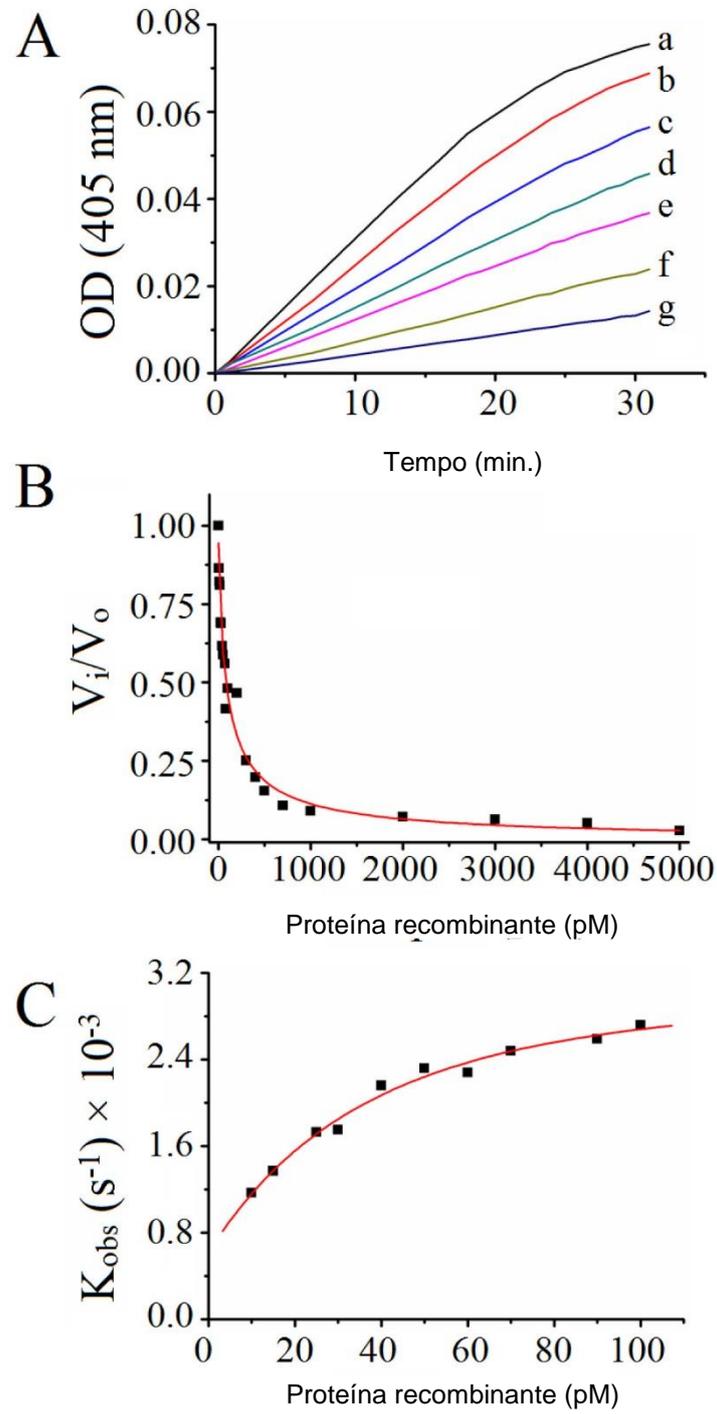


Figura 4

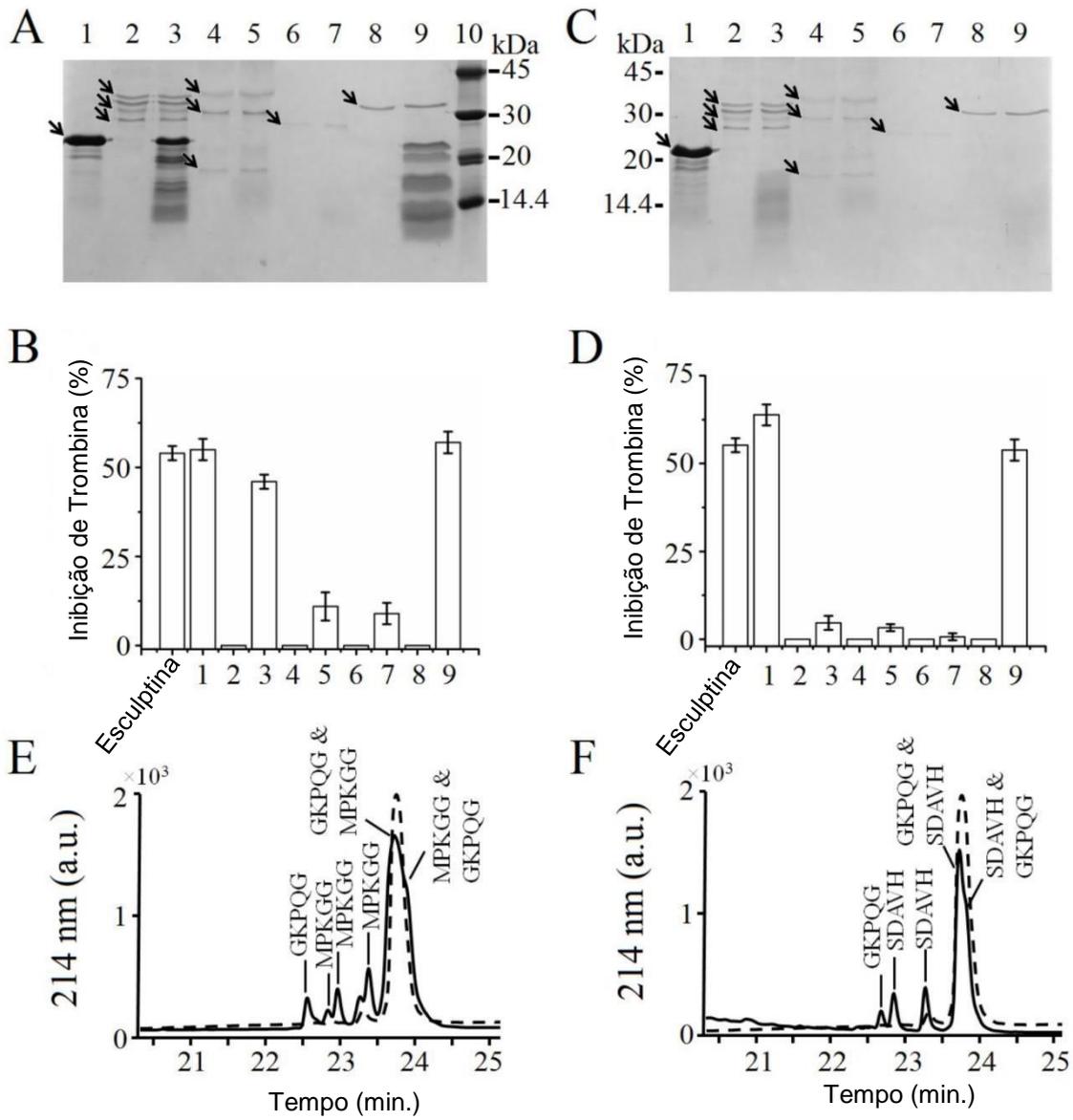


Figura 5

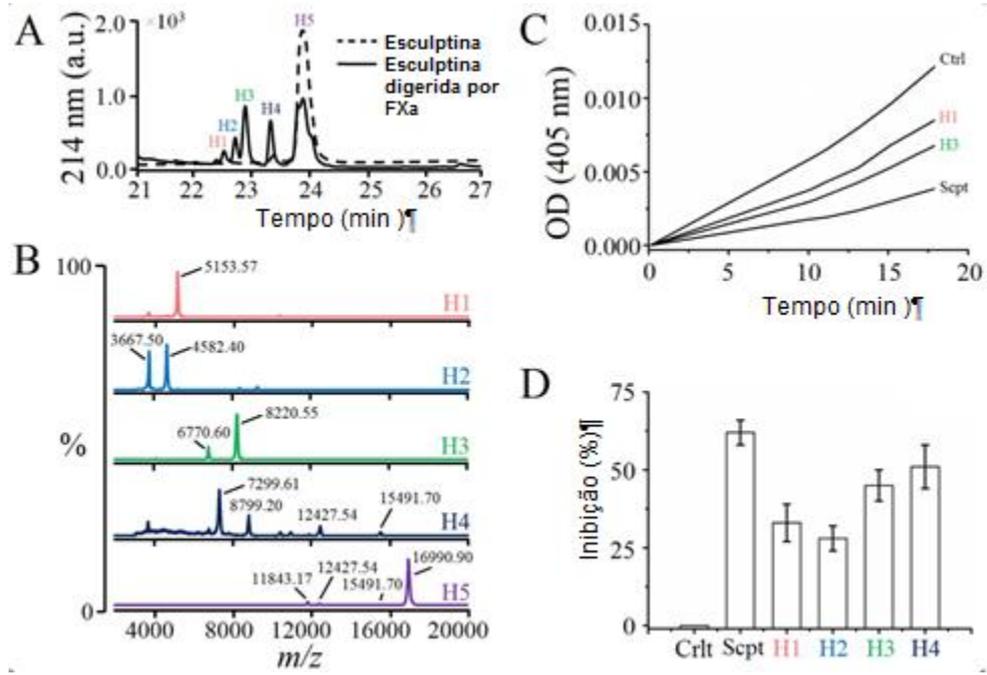


Figura 6

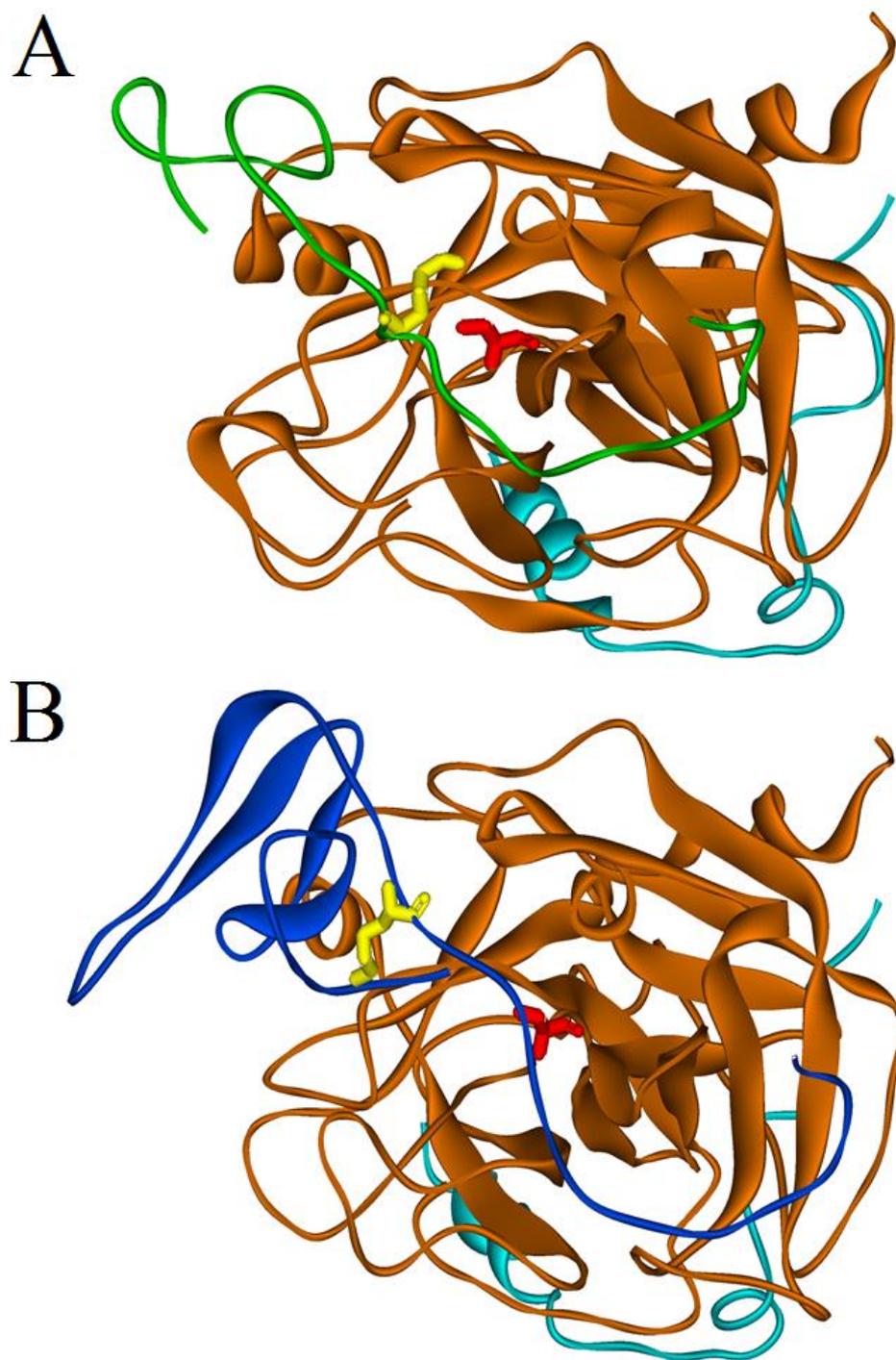


Figura 7

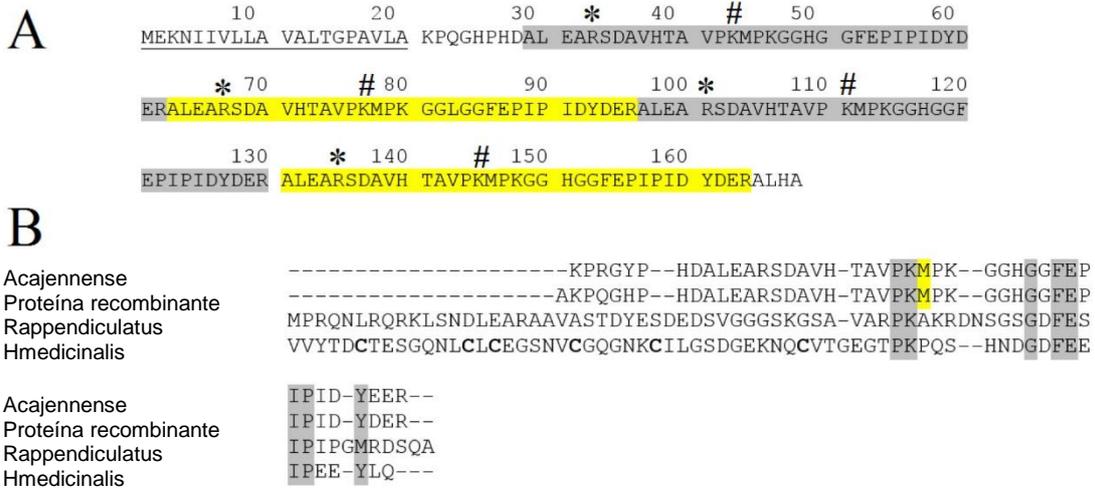


Figura 8

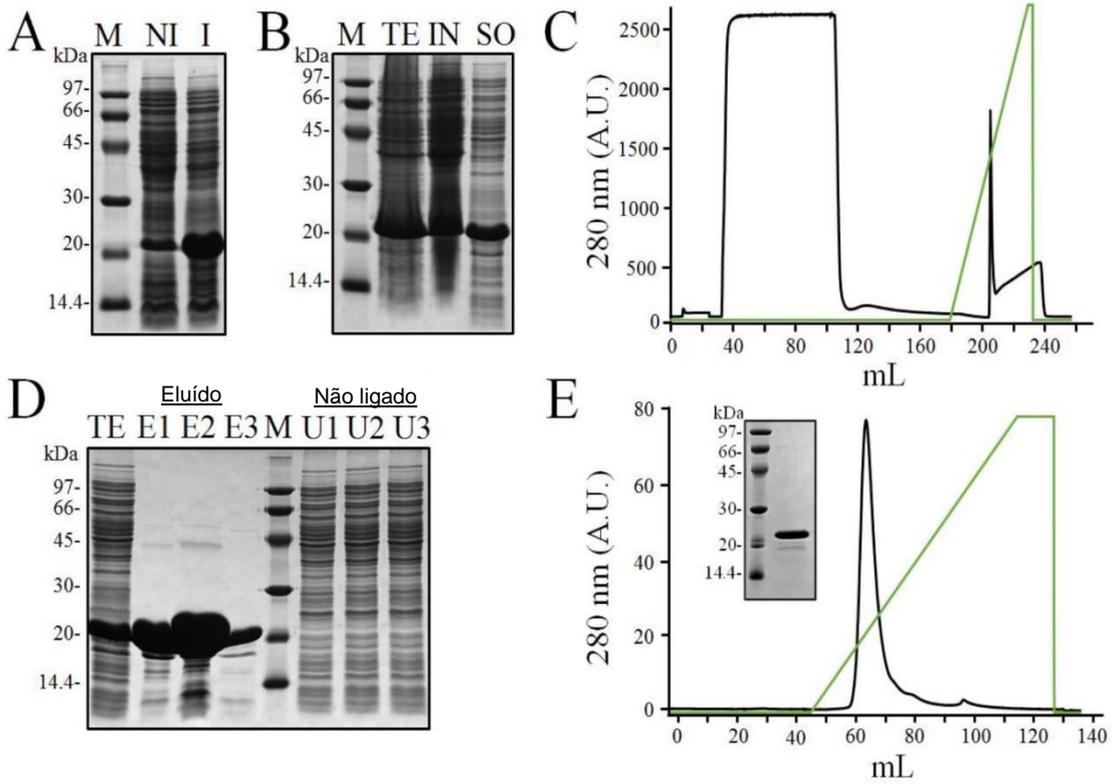


Figura 9

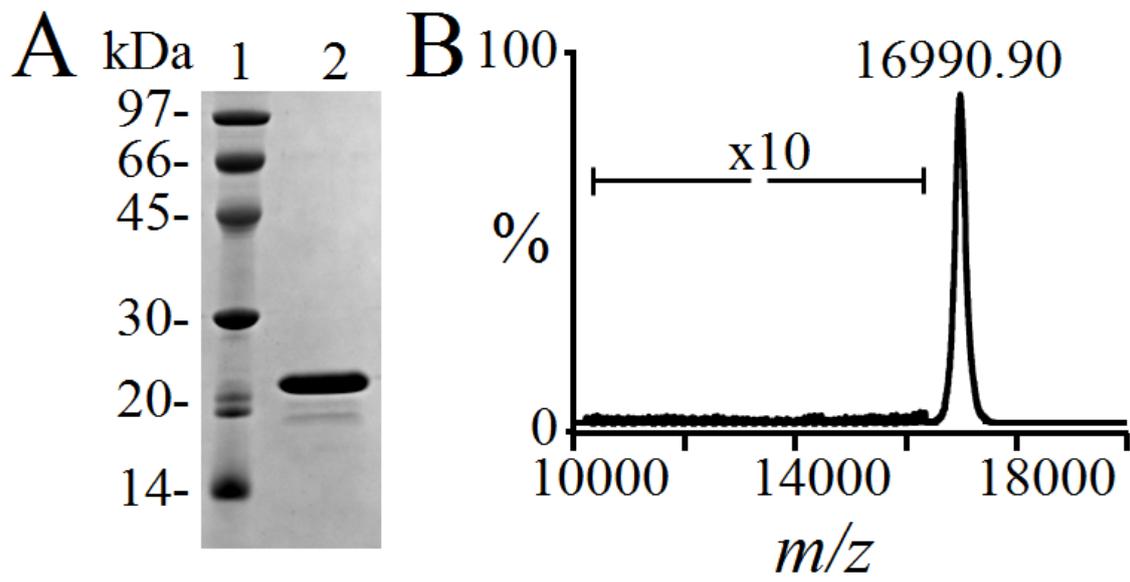
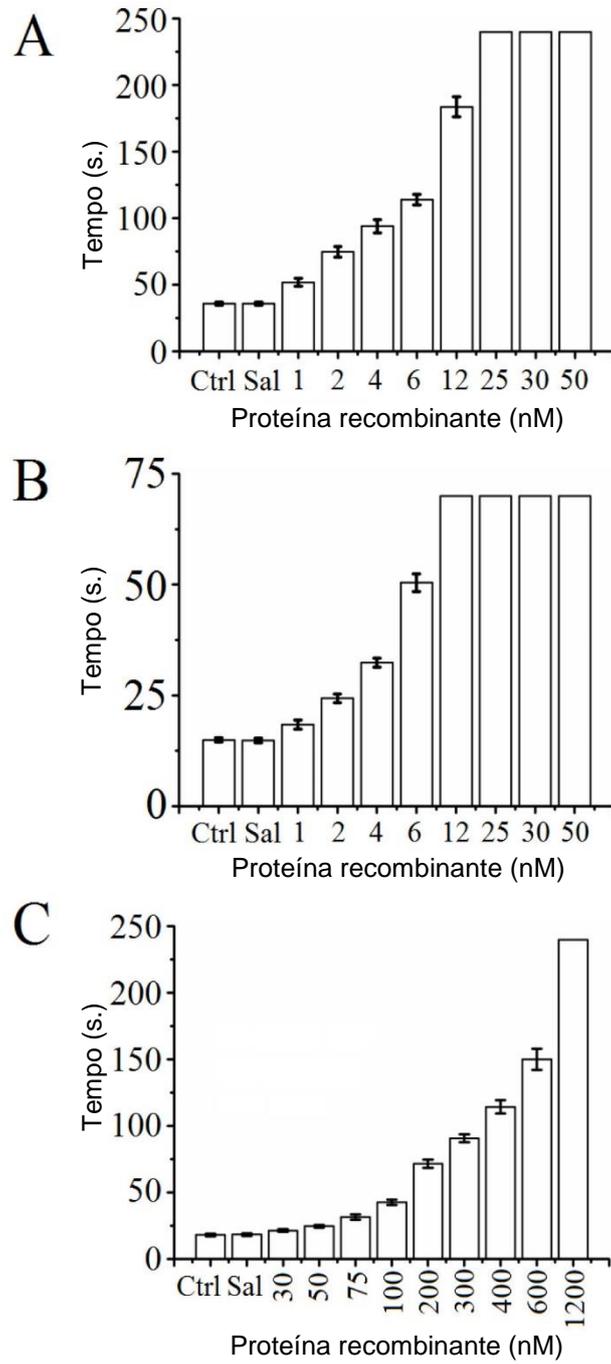


Figura 10

**Figura 11**

Resumo

PROTEÍNA RECOMBINANTE E SEUS FRAGMENTOS, PROCESSO DE OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE, GENE SINTÉTICO E USO DA ESCULPTINA OU PROTEÍNA RECOMBINANTE PARA PREPARAR UM MEDICAMENTO OU COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA PROFILAXIA E/OU TRATAMENTO DE DOENÇAS TROMBOEMBÓLICAS OU COMO INIBIDOR DIRETO E ESPECÍFICO DA TROMBINA

A criação industrial ora descrita compreende uma invenção passível de proteção patentária. Referida invenção situa-se nos campos de bioquímica, biologia molecular, genética, farmácia, química medicinal, sendo relacionada à processos Bioquímicos e Metabólicos. Mais especificamente, a presente invenção proporciona uma nova classe de proteínas inibidoras da trombina, particularmente inibidores diretos da trombina modificados a partir da esculptina, identificada na análise transcriptômica das glândulas salivares de carrapatos, assim como seus fragmentos e proteína recombinante, úteis para uso como agentes anticoagulantes e para profilaxia e/ou tratamento de doenças tromboembólicas.