

MEMÓRIA DESCRITIVA

DA

PATENTE DE INVENÇÃO

Nº 84.880

NOME: EMORY UNIVERSITY, americana (Estado da Geórgia),
com sede em 1380, South Oxford Road, Atlanta, Georgia
30 322, Estados Unidos da América,

EPIGRAFE: "Processo para a preparação de composições
com acção fibrinolítica melhorada contendo um
agente tensoactivo co-polinérico"

INVENTORES: Robert L. Hunter
Alexander Duncan

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do
artigo 4º da Convenção da União de Paris de 20 de
Março de 1883.

US, em 15 de Maio de 1986	sob o Nº 863582
US, em 07 de Maio de 1987	sob o Nº 045459

P. 2. 2084.880

EMORY UNIVERSITY

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÕES COM ACÇÃO FIBRINOLÍ
TICA MELHORADA CONTENDO UM AGENTE TENSIOACTIVO COPOLIMÉRICO"

ASPECTO TÉCNICO

A presente invenção refere-se a uma composição e método para a lise de coágulos de fibrina, dissolução de trombos e reestabelecimento e manutenção de perfusão dos tecidos isquémico. Mais particularmente, a presente invenção refere-se a uma composição que compreende certos produtos de condensação de óxido de etileno-óxido de propileno, que são copolímeros tensio-activos em associação com enzimas fibrinolíticas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A designação "enzima fibrinolítica" significa uma enzima que é capaz de dissolver a fibrina. As enzimas capazes de dissolver a fibrina incluem mas não estão limitadas à estreptoquinase, uroquinase, activador do plasminogénio tecidular (T - PA) produzido por culturas de células, activador do plasminogénio tecidular produzido por meio de engenharia genética de recombinação de DNA (rt - PA) e activador do plasminogénio produzido por pro-uroquinase (k - PA). As designações "solução isotónica" e "solução iso-osmótica" definem as soluções que possuem a mesma ou semelhante pressão

osmótica que o sangue. Os termos coágulo, coágulo de fibrina e trombo são utilizados indiferentemente.

Cada ano cerca de 550.000 americanos morrem por ataques cardíacos. Além disso, perto de 700.000 têm ataques cardíacos e vivem. Enquanto que, uma vítima de ataque cardíaco pode sobreviver, parte do coração dele ou dela, certamente que ficará morta. A morte do músculo cardíaco, designado por enfarte do miocárdio, é devida a uma trombose da artéria coronária em 70% a 90% dos casos. Quando uma trombose, ou coágulo de sangue, provoca a oclusão de uma das artérias do coração, compromete a circulação do sangue em volta do músculo. Esta circunstância priva o músculo de oxigénio e de outros nutrientes. No passado, nada era possível fazer para inverter este processo. Os instrumentos da alta tecnologia nas unidades de cuidados intensivos suportam, a maior parte das vezes, doentes que poderão sobreviver enquanto que uma porção do seu coração está morta.

Situações semelhantes ocorrem em muitos outros tecidos quando o fluxo sanguíneo ao tecido é afectado por um trombo ou uma embolia. Ataque, trombose de veia profunda e embolia pulmonar constituem exemplo dessas situações.

Uma outra área em que a fibrina/fibrinogénio desempenha uma função é a área dos tumores. Existe presente-mente uma forte evidência de que as proteínas relacionadas com o fibrinogénio estão localizadas em tumores sólidos. A distribuição anatómica da fibrina nos tumores depende do tipo do tumor. Nos carcinomas, a fibrina está depositada no estroma do tumor e aloja-se em volta do tumor e pode ser particularmente abundante na periferia deste e na inter-fase hospedeira do tumor. Em contraste, a fibrina é muitas vezes menos

evidente no estroma do tumor mais central dos idosos caracterizado por depósitos de colagénio esclerosado. A fibrina também pode ser encontrada entre as células de carcinoma individuais. Em alguns, mas não em todos os casos, os depósitos de fibrina inter-epitelial estão relacionados com zonas de necrose tumoral; contudo, as zonas de necrose tumoral não são necessariamente sítios de deposição de fibrina. A deposição da fibrina nos sarcomas foi estudada de uma maneira menos cuidadosa do que nos carcinomas. Nos linfomas, os depósitos de fibrina podem ser observados entre as células de tumor malignas individuais, assim como adjacentes aos elementos linfóides benignos reactivos de um modo evidente. A fibrina foi referida como aparecendo em zonas de esclorose tumoral, como a doença de Hodgkin. As investigações têm indicado que o modelo e extensão de deposição da fibrina são características para um dado tumor. (Vêr Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Clinical Practice, "Abnormalities of Hemostasis in Malignancy", pp. 1145 - 1157, ed. by R.W. Colman, et al., J.B. Lippincott Company, 1987).

A falta de um fornecimento vascular uniforme para tumores pode impedir o diagnóstico e os processos terapêuticos. Por exemplo, tumores hipóxicos são menos susceptíveis a vários fármacos e à radiação. Os medicamentos convencionais e os novos medicamentos, tais como conjugados de anti-corpos monoclonais não são eficazes a menos que sejam libertados junto das células tumorais. Os depósitos de fibrina que circundam alguns tipos de tumores inibem a distribuição dos fármacos junto do tumor. O abastecimento aos tumores de sangue é ainda comprometido por outros factores. Os

vasos sanguíneos nos tumores são frequentemente pequenos e tortuosos. A resistência hidrodinâmica de tais canais também impede a circulação sanguínea junto dos tumores.

Uma situação semelhante ocorre por diferentes razões durante a crise de anemia falsiforme. As células vermelhas falsiformes do sangue provocam a oclusão parcial de pequenos vasos que produz hipoxia e acidose local. O que induz ao aparecimento de células vermelhas do sangue que tomam o formato de foice. O resultado consiste num círculo vicioso conhecido como "crisis". A terapêutica envolve um aumento de fluxo e oxigenação às áreas infectadas. Uma outra terapêutica abrange a associação de bloqueadores do transporte do cálcio. A formação de fibrina frequentemente complica a crise das células falsiformes.

Verificou-se que certas enzimas são capazes de actuar sobre os depósitos de fibrina para abrirem as artérias obstruídas. As enzimas que têm sido utilizadas com sucesso são a estreptoquinase, uroquinase, prouroquinase, activadoras do plasminogénio produzidas por cultura de células e activadoras do plasminogénio produzidas por meio de engenharia genética de recombinação de DNA. Estas enzimas obtêm maior êxito se forem administradas imediatamente após a oclusão dos vasos sanguíneos antes que o tecido cardíaco tenha sofrido um dano irreversível. Um estudo em 11 806 doentes tratados com estreptoquinase por via endovenosa ou intra-coronária, verificou-se uma melhoria de sobrevivência de 18%.

Se o tratamento se iniciou dentro de uma hora após a dôr inicial do aparecimento do ataque cardíaco, a mortalidade hospitalar foi reduzida em cerca de 47% (vêr

the Lancet, Vol. 8478, p. 397 - 401, 22 de Fevereiro de 1986). Demonstrou-se que a lise precoce do trombo resultava no salvamento de uma porção do tecido cardíaco que de outro modo teria morrido. Em estudos que utilizaram a angiografia para avaliarem a desobstrução dos vasos sanguíneos verificou-se que o activador do plasminogénio podia abrir completamente os vasos em 61% de 109 doentes versus 29% dos controlos que não tinham sido tratados com a enzima. (vêr Verstraete, et al., The Lancet, Vol. 8462, p. 965 - 969), 2 de Novembro de 1985). A enzima activadora do plasminogénio requiere a adição de aproximadamente 100 μ l de Tween 80 por litro de solução para promover a dispersão da enzima. (vêr Korninger, et al., Thrombus, Haemostas (Stuttgart) Vol. 46 (2), p. 561 - 565 (1981)).

As enzimas utilizadas para a lise dos trombos nos vasos também o fazem relativamente à activação da fibrinolise. A fibrina é a proteína produzida pela polimerização do fibrinogénio. Ela forma um gel que suporta o trombo. As moléculas de fibrina que formam os coágulos adquirem gradualmente ligações cruzadas para produzirem um coágulo mais estável. Todas as quatro enzimas pro-uroquina, uroquinase, estreptoquinase e activadora do plasminogénio, possuem efeitos semelhantes na fibrina; contudo possuem toxicidades diferentes. Se os mecanismos da fibrinolise são activados na vizinhança de um coágulo o coágulo é lisado. Se, no entanto, são activados sistemicamente através da circulação, a capacidade do organismo para deter a perda de sangue ou a hemorragia é reduzida de um modo acentuado. A estreptoquinase e a uroquinase tendem para activar a fibrinolise sistémica. Con-

sequentemente elas são mais eficazes quando injectadas directamente no vaso sanguíneo atingido. A activadora do plasminogénio, em contraste, torna-se efectiva apenas quando é ligada de um modo efectivo à fibrina. Isto significa que a sua actividade é localizada grandemente na área imediata ao coágulo e que não produz fibrinolise sistémica. Se doses elevadas são utilizadas para tentar aumentar a taxa de lise do coágulo, ou para lisar coágulos resistentes, então a quantidade de fibrinolise sistémica e o risco de hemorragia tornam-se significativos. Aquela pode ser injectada por via endovenosa na circulação geral. Ela circula de um modo inofensivo até que contacta a fibrina num coágulo de sangue onde se torna activada e lisa o coágulo. A enzima activadora do plasminogénio é capaz de lisar um coágulo que está em estrutura de ligação cruzada extensivamente. Isto significa que é possível lisar coágulos que estão presentes há várias horas. A enzima activadora do plasminogénio também produz menor risco de hemorragia do que outras enzimas. Têm vindo a ser desenvolvida uma enzima ainda mais eficaz baseada em fármacos trombolíticos.

Ainda que a terapêutica com novas enzimas seja notável, estas estão sujeitas a complicações graves e não são eficazes em todos os doentes. Os coágulos no ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda são lisados muito mais facilmente do que os de outras artérias. Se a enzima não é distribuída pela corrente sanguínea directamente ao trombo, esta não actua. Por várias razões passa mais sangue ou escoia através e à volta do trombo na artéria coronária descendente anterior esquerda do que nas outras artérias maiores. Em adição a presença de uma circulação colateral que se

forma em resposta ao fluxo sanguíneo comprometido nas artérias principais actua de um modo adverso na taxa de reabertura e recanalização das artérias principais trombosadas. Pensa-se que a presença de vários vasos colaterais que permitem o desvio da circulação sanguínea do coágulo reduzem a pressão através do coágulo. Por seu lado isto reduz o fluxo sanguíneo através das aberturas estreitas, que podem persistir no coágulo e impede o acesso das enzimas ao coágulo e evita que a lise se processe.

Quando o coágulo é lisado, os factores que conduziram à formação do trombo persistem. Assim, isto produz uma elevada incidência de novas trombooses e de posterior enfarte nas horas e dias a seguir à lise do coágulo. Uma nova trombose tem sido relatada entre 3% a 30% dos casos em que um tratamento inicial foi bem sucedido na lise do coágulo. Correntemente são utilizados anticoagulantes para prevenir a formação de novos trombos, mas estes tendem a induzir uma hemorragia. Existe um equilíbrio delicado entre a quantidade de anti-coagulante necessário para impedir uma nova trombose dos vasos e a quantidade que produzirá uma hemorragia grave.

Finalmente, a dissolução do coágulo após um dano irreversível se ter instalado é de pouco efeito. O dano irreversível poderá ser quer no músculo cardíaco ou no leito vascular do tecido fornecido pelo vaso sanguíneo. O maior problema na implementação, muito comum, desta nova terapêutica enzimática consiste em se encontrarem precocemente as vias de identificação e tratamento de doenças e os caminhos para instalar o tratamento eficaz durante um período maior de tempo após a iniciação da trombose.

Os estudos em animais forneceram uma forma para melhor se compreender estes factos que controlam o fluxo sanguíneo e a morte dos tecidos a seguir à trombose da artéria coronária. O coração possui diversos vasos sanguíneos, portanto o músculo recebe sangue de mais do que um vaso. Por esta e outras razões, os tecidos alterados a seguir a uma trombose coronária estão divididos em duas zonas distintas. A zona central de tecido torna-se na sua maior parte completamente necrótica. Esta é rodeada por uma área de isquémia grave. No exterior existe uma área de isquémia menor designada por zona marginal. Finalmente, existe uma zona comprometida que circula a área por inteiro. Nos estudos em macacos, verificou-se que a área necrótica central não é afectada pela recanalização do vaso após várias horas. Contudo, o músculo, noutras zonas, que está sob um dano menos grave durante o período isquémico pode ser recuperado. Uma descoberta surpreendente consistiu em que a lise de um trombo que produz uma artériografia perfeita era insuficiente para restaurar a circulação normal na maior parte dos animais (vêr Flameng et al., J. Clin. Invest., Vol. 75, p. 84 - 90, 1985).

Vários outros impedimentos para a circulação desenvolvem-se na área abastecida pelo vaso durante o tempo em que este se encontra obstruído. Em estudos posteriores, foi demonstrado que imediatamente após a eliminação da obstrução do vaso, a circulação através do tecido danificado, se inicia com uma taxa elevada. Contudo, rapidamente o fluxo sanguíneo através da zona isquémia diminui e o tecido morre. Consequentemente uma circulação sanguínea na região imediatamente após reperfusão constitui um mau prognóstico de sal-

vamento do tecido do miocárdio. Se a circulação sanguínea através do tecido danificado permanece perto dos níveis normais o sucesso de recuperação do tecido é muito maior. A hemorragia ocorre quase exclusivamente na zona de isquémia mais grave que reflete o dano dos vasos sanguíneos pequenos. A hemorragia, contudo, permanece limitada aos tecidos de isquémia grave e não origina a extensão do enfarto ou outras complicações graves. Poderá esperar-se que a terapêutica que poderá perservar a circulação sanguínea através dos pequenos vasos sanguíneos distais até à área principal do trombo após reperusão, aumente de um modo acentuado a recuperação do tecido do miocárdio.

Deve-se o dano nas células do músculo cardíaco que ocorre após a lise do trombo a outros factores tanto quanto à isquémia. O contacto de sangue recente com as células mortas ou danificadas induz o influxo de neutrofilos ou de células de pús que matam as células do coração que de outro modo poderiam ser recuperadas. Uma grande parte do dano causado pelos neutrofilos tem sido atribuído a iões de super-óxido. O anião de super-óxido pode danificar o tecido de várias maneiras. A interacção do anião super-óxido com o peróxido de hidrogénio conduz à produção de radicais hidroxilo que são potencialmente tóxicos e reagem rapidamente com a maior parte das moléculas orgânicas. O manitol é um eliminador selectivo dos radicais de hidroxilo. A enzima super-óxido dismutase catalisa a decomposição do anião super-óxido. Tais enzimas, como a superóxido dismutase eliminadoras de radicais livres ou agentes que impedem o influxo de neutrofilos são capazes de aumentar a recuperação de células do

músculo cardíaco.

Baixas concentrações de copolímeros possuem um efeito diminuto nas proteínas plasmáticas. Concentrações elevadas acima da concentração micelar crítica activam via complemento o caminho alternativo. Este facto fornece um benefício posterior para o tratamento dos ataques cardíacos porque a activação sistémica de complemento torna os neutrófilos indiferentes à quimiotactismo de complemento. Este facto evita a sua migração para o tecido cardíaco.

A continuação da terapêutica é necessária mesmo após a restauração do fluxo sanguíneo e salvamento do tecido danificado. A arterioesclorose que provoca o ataque de coração original permanece. Investigações americanas e europeias verificaram que a arterioesclorose estreita ainda as artérias em 70% a 80% de doentes cujos coágulos foram lisados por meio de aplicação de terapêutica trombolítica. Muitos médicos acreditam que esta obstrução deve ser aberta para proporcionar benefícios a longo prazo. A angioplastia de balão consiste num processo pelo qual um cateter com um pequeno balão é inserido numa artéria diminuída. O balão é dilatado, comprime a placa aterosclerótica contra a parede do vaso e dilata a artéria. A eficácia deste processo é limitada pelos efeitos de isquémia produzidos pelo balão, pela embolização do material ateromatoso que permanece nos vasos distais e por um aumento na tendência para imediata ou posterior trombose na área danificada pelo balão. O balão rasga o tecido, expondo o colagénio subjacente e as substâncias lipídicas que induzem à formação de trombos. O trombo pode obstruir o vaso imediatamente ou estabelecer uma sequência de factos que conduzem à obstrução vários dias

ou semanas mais tarde. O que se necessita é de um meio de tornar a superfície do vaso dilatado menos trombogénica, melhorando o débito sanguíneo através do tecido distal e desfazer o material embolizado em pequenos bocados que são menos propícios a produzir um dano embólico.

Finalmente, o material de lípidos na parede aterosclerótica contribui para a formação da placa que estreita o lúmen da artéria e produz uma superfície altamente trombogénica. O que se necessita é de um processo de extracção ou envolvimento dos lípidos das placas ateroscleróticas que deixe as suas superfícies menos trombogénicas e que reduza o seu volume.

Está descrita a utilização de copolímeros preparados pela condensação de óxido de etileno e óxido de propileno para tratar um êmbolo ou um trombo (vêr patente de invenção norte-americana Nº 3 641 240).

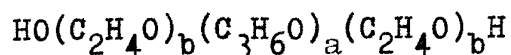
Contudo, o efeito foi limitado a trombos pequenos, formados recentemente (de preferência microscópicos) que são compostos principalmente por plaquetas. A utilização de um copolímero de óxido de etileno e óxido de propileno possui pequeno ou nenhum efeito sob um coágulo num doente que sofreu um enfarto coronário grave. Os coágulos que se formam nestes pacientes são coágulos grandes e estáveis. Os coágulos estáveis são coágulos em que a fibrina que se formou a partir do fibrinogénio possui uma ligação cruzada. A fibrina que possui uma ligação cruzada não é afectada pela presença de copolímeros de óxido de etileno - óxido de propileno. Os copolímeros apenas actuam nos coágulos recentes em que a fibrina recentemente formada não possui ligação cruzada.

Assim, é necessária uma composição que seja

capaz de lisar um coágulo e, simultaneamente, impedir uma segunda formação após a eliminação de um coágulo inicial. Idealmente, tal composição também poderá, tanto quanto possível, reduzir qualquer dano causado pelo bloqueio do afluxo sanguíneo ao tecido. Tal composição deverá, portanto, proteger o doente de qualquer dano causado pela formação de um novo coágulo. Adicionalmente, tal composição deverá ser útil na eliminação de coágulos de tumores sólidos, aumentando o fluxo através dos canais tortuosos e, portanto, permitindo o acesso de fármacos ao tumor.

RESUMO DA INVENÇÃO

De acordo com a presente invenção fornece-se uma composição que é eficaz para a dissolução de coágulos sanguíneos e restabelecimento e manutenção do fluxo sanguíneo através de vasos coronários trombosados ou de outros vasos sanguíneos. A composição fibrinolítica da presente invenção consiste numa enzima tal como a estreptoquinase, uroquinase, pro-uroquinase, uma enzima activadora do plasminogénio, ou outra enzima fibrinolítica, e um copolímero tensioactivo. O copolímero tensioactivo pode ser um óxido de etileno condensado com óxido de propileno, o qual possui a seguinte fórmula geral:



na qual a representa um número inteiro de tal forma que o grupo hidrofóbico representado por $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ possui um peso molecular aproximadamente compreendido entre 950 e 4000, de preferência entre cerca de 1750 e 3500, e b representa um número

inteiro tal como uma porção hidrófila representada por (C_2H_4O) que constitui aproximadamente entre 50% e 90% do composto.

A composição fibrinolítica da presente invenção é administrada usualmente por injeção endovenosa a um doente.

A presente invenção fornece uma composição que pode ser administrada a doentes que são portadores de uma obliteração por um coágulo de um vaso sanguíneo. A associação de uma enzima fibrinolítica e um copolímero tensioactivo de acordo com a presente invenção, aumenta o fluxo sanguíneo à volta do coágulo, lisa o coágulo rapidamente e proporciona maior protecção para o doente por meio de impedimento da formação de um novo coágulo e reduzindo o dano da reperusão.

Um outro aspecto da presente invenção é uma associação de um copolímero como agente tensioactivo e um expurgador de radicais de oxigénio tal como a superóxido dismutase e manitol. A presente invenção inclui a associação de um copolímero como um agente tensioactivo, uma enzima que lisa os coágulos e um expurgador de radicais livres e também a associação de um copolímero como agente tensioactivo com um expurgador de radicais livres isoladamente.

Porque a composição fibrinolítica da presente invenção permite uma estabilização muito maior do doente do que os tratamentos anteriormente aplicados a administração de processos mais invasivos, tais como, a angio-plastia de balão podem ser prolongados, permitindo uma selecção de condições para tratamento invasivo que é muito mais favorável para o doente.

Um outro aspecto da presente invenção é a utilização de copolímeros como agente tensioactivo para tratar a anemia falsiforme. Um outro aspecto da presente invenção é também a utilização de copolímero como agente tensioactivo para conservar os órgãos para transplantação.

De acordo com este facto é um objectivo da presente invenção fornecer uma associação de enzimas fibrinolíticas com um copolímero como agente tensioactivo para produzir uma acção sinérgica na lise dos coágulos sanguíneos. Esta associação pode ser uma composição com doses padrão de enzima para aumentar a taxa da lise de um coágulo, ou como que da cobertura de um coágulo, ou em doses mais baixas de enzima para reduzir os efeitos secundários, ainda que mantendo a eficácia para lisar os coágulos.

É também um outro objectivo da presente invenção fornecer uma composição que reduzirá a necessidade de anti-coagulantes durante a terapêutica cardíaca e deste modo o perigo de hemorragia.

Noutro objectivo da presente invenção fornece-se uma composição que acelera a dissolução de coágulos por meio de libertação das plaquetas aglutinadas e bloqueio da formação de aglutinados de plaquetas ao coágulo.

É ainda um outro objectivo da presente invenção proporcionar uma composição que pode reduzir a dose de enzima fibrinolítica requerida para lisar um coágulo e deste modo reduzir a incidência de complicações.

Um outro objectivo da presente invenção fornece uma composição que contém um copolímero como agente tensioactivo e um expurgador de radicais livres ou oxigénio, tal como a superóxido dismutase ou manitol.

Num outro objectivo da presente invenção, fornece-se uma composição que pode promover o fluxo sanguíneo através dos canais micro-vasculares do tecido danificado pela isquémia e reduzir a quantidade de tecido que iria ficar necrosado.

É ainda um objectivo da presente invenção fornecer uma composição que reduzirá de um modo significativo o risco de nova trombose após tratamento com as enzimas fibrinolíticas.

Um outro objectivo da presente invenção é fornecer uma composição que proporcionará a remoção de lípidos das paredes de um vaso aterosclerótico e deste modo, reduzir a incidência de nova trombose.

É também objectivo da presente invenção fornecer uma composição fibrinolítica melhorada capaz de lisar a fibrina e os depósitos de fibrina associados com tumores.

Um outro objectivo da presente invenção é fornecer uma composição que aumentará o fluxo sanguíneo através dos canais tortuosos, tal como aparecem nos tumores e durante a crise da anemia falsiforme.

É ainda um objectivo da presente invenção fornecer uma composição melhorada e um método para a preservação de órgãos ex vivo.

É ainda um outro objectivo da presente invenção fornecer uma composição que reduzirá o risco de recidiva de trombose e deste modo permite prolongar uma administração de angio-plastia de balão ou de outro processo invasivo para o tratamento dos vasos comprometidos.

É um outro objectivo da presente invenção for

necer uma composição que reduzirá o risco de trombose imediatamente ou ao mesmo tempo após processos invasíveis tais como a angio-plastia de balão que danifica as células endoteliais do tecido vascular.

É ainda um objectivo da presente invenção fornecer uma composição para impedir a aglutinação de plaquetas nos vasos sanguíneos distais à trombose e, portanto, limitar a extensão de tecido danificado.

É ainda um outro objectivo da presente invenção fornecer uma composição para melhorar o fluxo sanguíneo através e à volta do tecido com necrose extensa de células do miocárdio ou de outras células, portanto, retardando a necrose de tecido de miocárdio adicional.

Um outro objectivo da presente invenção é fornecer uma composição que reduzirá o influxo de neutrófilos no tecido danificado e deste modo reduzirá a extensão do dano causado por produtos tóxicos dos neutrófilos.

É ainda um outro objectivo da presente invenção fornecer uma composição que diminuirá a quantidade de isquémia provocada por um bloqueio por um trombo do fluxo sanguíneo.

É ainda um outro objectivo da presente invenção fornecer uma associação de uma enzima trombolítica, a angio-plastia de balão ou outros processos operativos com um copolímero como agente tensioactivo para produzir um método melhorado para a remoção de trombos ou de obliterações trombogénicas e reduzir as condições obstrutivas que promovem a ocorrência de novas trombozes.

Num outro objectivo da presente invenção fornece-se uma composição e um processo para o tratamento da

crise da anemia falsiforme.

Este e outros objectivos, aspectos e vantagens da presente invenção tornar-se-ão evidentes após uma consulta da descrição detalhada seguinte, dos aspectos descritos e das reivindicações apensas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DOS ASPECTOS DIVULGADOS

A presente invenção compreende uma composição que fornece uma acção sinérgica na lise de coágulos sanguíneos e que restabelece e mantém o fluxo sanguíneo através de um vaso coronário trombosado. A composição fibrinolítica da presente invenção consiste numa solução que contém uma concentração eficaz de uma enzima fibrinolítica e uma concentração eficaz de um copolímero como agente tensioactivo. A associação de dois componentes é eficaz para dissolver os coágulos sanguíneos que bloqueiam os vasos. Em adição a composição fibrinolítica da presente invenção é altamente eficaz na prevenção de coágulos sanguíneos, evitando de novo a sua formação e para manter o fluxo sanguíneo através dos vasos sanguíneos e do tecido afectado pela isquémia.

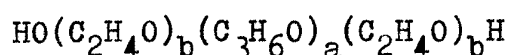
A composição fibrinolítica da presente invenção melhora a circulação sanguínea através dos canais estreitos em volta dos coágulos e aumenta a distribuição da enzima fibrinolítica junto do coágulo. A presente invenção também acelera a taxa de dissolução do coágulo pela enzima e aumenta a proporção de coágulos lisados promovendo a libertação da enzima junto dos coágulos que de outro modo não estariam expostos a suficiente enzima para a sua composição. Adicionalmente, a composição fibrinolítica da presente invenção reduz a dose de enzima requerida para aplicações particula-

res e assim reduz a incidência de complicações atribuídas a efeitos secundários causados pelas enzimas.

A composição fibrinolítica da presente invenção reduz o risco imediato de trombose recidivante por meio da aceleração da dissolução de coágulos, libertação das plaquetas aglutinadas e bloqueamento da formação de novos agregados plaquetários junto do coágulo ou no sítio do coágulo. Por redução do risco de incidência imediata de trombose a composição fibrinolítica da presente invenção, permitirá prolongar a angio-plastia de balão ou outros processos evasivos para o tratamento dos vasos comprometidos que começaram a ficar trombosados. O prolongamento permitirá a selecção de condições para o tratamento invasivo mais favorável ao doente.

Soluções que podem ser utilizadas na preparação de composições fibrinolíticas da presente invenção incluem, mas não estão limitadas, a solução de cloreto de sódio contendo 8.5 a 9.5 gramas por 100 ml de água purificada, solução de Ringer, solução de Ringer lactado, solução de Krebs-Ringer, e várias soluções de açúcares. Todas estas soluções são conhecidas dos técnicos. Contudo, compreende-se que a composição fibrinolítica da presente invenção pode ser administrada sob a forma de uma solução não isotónica.

O copolímero como agente tensioactivo é de preferência um condensado de óxido de etileno-óxido de propileno, com a seguinte fórmula geral:



em que a representa um número inteiro tal que a fracção hidrófoba representada pelos grupos $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ apresenta um peso

molecular compreendido aproximadamente entre 950 a 4000, de preferência entre 1750 e 3500, e b representa um número inteiro tal que a fração hidrófila representada pelos grupos (C_2H_4O) constitui aproximadamente 50% a 90% em peso do composto. Estes copolímeros são comercializados sob a marca comercial registrada de Pluronic[®] que são poliois e vendidos pela BASF Corporation (Parsippany, NJ).

Os copolímeros como agentes tensioactivos da presente invenção não são metabolizados no organismo e são eliminados rapidamente pelo sangue. A vida média do copolímero no sangue é de aproximadamente de duas horas. Compreende-se que o copolímero como agente tensioactivo na composição fibrinolítica melhorada da presente invenção não possui uma ligação covalente com qualquer dos outros ingredientes da composição.

Os blocos poliméricos são formados mediante condensação do óxido de etileno e do óxido de propileno a uma temperatura e pressão elevadas na presença de um agente catalisador básico. Existe alguma variação estatística no número de unidades monoméricas que se combinam para formar uma cadeia polimérica em cada copolímero. Os pesos moleculares referidos são aproximações do peso médio da molécula copolimérica em cada preparação. Compreende-se que os blocos de óxido de propileno e óxido de etileno não têm de ser puros. Pequenas quantidades de outros materiais podem estar misturados tanto quanto as propriedades químico-físicas não sejam substancialmente alteradas. Uma discussão mais detalhada da preparação destes produtos está descrita na petente de invenção norte-americana número 2 674 619 que aqui é incorporada como referência.

Produtos de condensação do óxido de propileno - óxido de etileno ilustrativos que podem ser utilizados na preparação das composições fibrinolíticas da presente invenção, incluem mas não se limitam aos seguintes copolímeros:

1. Um poliol com um peso molecular médio de 4700 que contém aproximadamente 80% em peso de óxido de etileno.

2. Um poliol com um peso molecular médio de 3400 que contém aproximadamente 50% em peso de óxido de etileno.

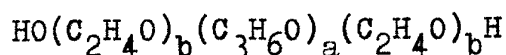
3. Um poliol com um peso molecular médio de 7700 que contém aproximadamente 70% em peso de óxido de etileno.

4. Um poliol com um peso molecular médio de 14.600 que contém aproximadamente 80% em peso de óxido de etileno.

5. Um poliol com um peso molecular médio de 12600 que contém aproximadamente 70% em peso de óxido de etileno.

6. Um poliol com um peso molecular médio de 9500 que contém aproximadamente 90% em peso de óxido de etileno.

O copolímero de óxido de etileno - óxido de propileno preferido para a utilização na composição fibrinolítica da presente invenção é um copolímero com a fórmula geral seguinte:



na qual o peso molecular da fracção hidrófoba representada

por (C_3H_6O) é aproximadamente 1750 e o peso molecular total do composto é aproximadamente 8400.

A concentração do copolímero na composição que dissolve o coágulo da presente invenção pode variar dependendo do volume total da solução necessárias nas circunstâncias particulares. A quantidade total de bloco copolimérico utilizado na presente invenção também variará dependendo da dimensão e tipo do trombo ou êmbolo do copolímero particularmente utilizado, da enzima fibrinolítica empregada e da dimensão e peso do doente.

O copolímero pode ser utilizado numa proporção larga de concentrações com ausência de efeitos secundários. O copolímero é excretado intacto rapidamente, tanto quanto 90% do copolímero administrado é excretado num período tão pequeno como três horas. Devido à sua fraca toxicidade e rápida eliminação do organismo, o copolímero pode ser administrado durante um largo período.

As composições fibrinolíticas da presente invenção podem ser utilizadas misturadas com sangue ou de qualquer outra forma habitual, de preferência, contudo, as soluções são injectadas por via endovenosa na corrente sanguínea sob a forma de uma solução de grande volume, gota a gota ou ambos. As soluções são geralmente misturadas com sangue de modo a manter uma pressão venosa estacionária de forma substancial.

Compreende-se que a administração separada de uma solução de um copolímero como agente tensioactivo e uma enzima fibrinolítica também é abrangida pela presente invenção. Por exemplo, uma solução de um copolímero como agente

de superfície e uma solução de uma enzima fibrinolítica, podem ser preparadas separadamente e administradas simultânea ou sequencialmente a um doente atingido por um trombo que bloqueia uma artéria coronária. A administração simultânea ou sequencial dos dois componentes (copolímero e enzima fibrinolítica) da composição fibrinolítica da presente invenção, provoca o mesmo efeito do que a administração dos componentes reunidos e, portanto, são abrangidos pela presente invenção.

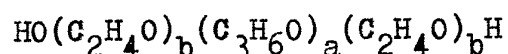
As enzimas fibrinolíticas que podem ser utilizadas nas composições fibrinolíticas da presente invenção, incluem mas não estão limitadas, a estreptoquinase (que se pode obter da Hoechst-Roussel com o nome de marca comercial Streptase[®]), uroquinase (comercializada pelos laboratórios Abbot, de North Chicago, IL sob o nome comercial de Abbokinase[®]) e um activador do plasminogénio (Biopool AB, Umeå, Sweden). A enzima activadora do plasminogénio pode ser derivada de células eucariotas, tais como células de melanoma humano ou pode ser produzido por tecnologia genética, tal como recombinação de DNA. Algumas das enzimas fibrinolíticas são apenas escassamente solúveis em água e têm que ser portanto emulsionadas com o copolímero tensioactivo antes da administração ao doente.

De um modo ideal, uma injeção de uma solução de copolímeros de grande volume, isento de enzima é administrado antes da administração da presente invenção. Por exemplo, uma solução a 3% do copolímero numa solução de dextrose isotónica a 5% é injectada no espaço de dois minutos de tal forma que a concentração sanguínea do copolímero é aproximadamente de 0,6 mg/ml. Adicionalmente pode ser vantajoso

administrar uma solução de copolímero por via endovenosa, gota a gota a uma taxa de cerca de 25 mg/kg de peso do corpo por hora, para se obter uma concentração sanguínea de copolímero de aproximadamente 0,6 mg/ml até quatro dias ou mais seguidos da administração da composição fibrinolítica da presente invenção. Este tratamento ajudará a evitar a formação de um novo coágulo.

Ainda que as descrições se relacionem principalmente com doença cardíaca, compreende-se que a composição fibrinolítica da presente invenção é igualmente aplicável à trombose em outras partes do corpo tal como cérebro, pernas, pulmões ou tracto gastrointestinal.

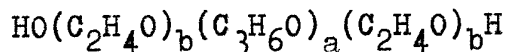
A presente invenção inclui um processo para a dissolução de coágulos sanguíneos nos vasos sanguíneos que compreende as fases de injeção no interior de um organismo de uma solução com uma concentração eficaz de um copolímero como agente tensioactivo com a fórmula geral seguinte:



na qual a representa um número inteiro tal que a fracção hidrófoba representada pelos grupos $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ apresenta um peso molecular compreendido aproximadamente entre 950 a 4000, de preferência entre 1750 e 4000, e b representa um número inteiro tal que a fracção hidrófila representada pelos grupos $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})$ constitui aproximadamente 50% a 90% de peso do composto. A concentração sanguínea do copolímero tensioactivo está compreendida aproximadamente entre 0,1 mg/ml e 6 mg/ml, de preferência entre 0,5 mg/ml e 2 mg/ml. Uma solução com uma concentração eficaz de uma enzima fibrinolítica e uma

quantidade eficaz de um copolímero tensioactivo é em seguida injectado no organismo. Logo após o coágulo ser dissolvido ou lisado, uma solução com uma concentração eficaz de copolímero tensioactivo é injectado no corpo. A concentração do copolímero é mantida entre aproximadamente 0,4 e 2 mg/ml de sangue durante aproximadamente um período compreendido entre 4 e 144 horas.

A presente invenção também inclui um processo para a remoção de fibrina de um tumor que compreende uma fase de injeção no organismo de uma solução com uma composição que dissolve o coágulo, compreendendo a referida composição uma quantidade eficaz de uma enzima fibrinolítica e uma quantidade eficaz de um copolímero como agente tensioactivo com a seguinte fórmula geral:

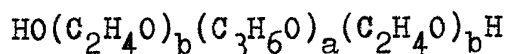


na qual a representa um número inteiro de tal modo que a fracção hidrófoba representada pelo grupo $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ possui um peso molecular de aproximadamente 950 a 4000, de preferência de cerca de 1750 a 4000, e b representa um número inteiro de tal modo que a fracção hidrófila representada por $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})$ constitui aproximadamente entre 50% e 90% em peso do composto. A composição fibrinolítica da presente invenção pode ser administrada directamente no tumor.

A eliminação da fibrina do tumor aumenta o acesso aos reagentes de diagnóstico dos tumores. O método também aumenta o acesso e a sensibilidade do tumor à quimioterapia.

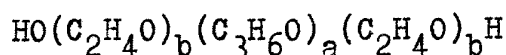
A presente invenção inclui um processo para

melhorar a circulação sanguínea e a oxigenação de um tumor que compreende uma fase de injeção num organismo de uma solução que incorpora uma concentração eficaz de um copolímero como agente tensioactivo com a seguinte fórmula geral:



na qual a representa um número inteiro de tal maneira que a fracção hidrófoba representada por $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ possui um peso molecular de aproximadamente 950 a 4000, de preferência de 1750 a 4000, e b representa um número inteiro de tal modo que a fracção hidrófila representada por $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})$ constitui aproximadamente cerca de 50% a 90% em peso do composto.

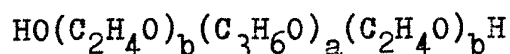
A presente invenção também inclui uma composição para perfusão de um tecido ex vivo melhorada que compreende sangue, uma solução com uma quantidade eficaz de um anti-coagulante, e uma quantidade eficaz de um copolímero como agente de superfície com a seguinte fórmula:



na qual a representa um número inteiro de tal modo que a fracção hidrófoba representada por $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ possui um peso molecular de aproximadamente 950 a 4000, de preferência de 1750 a 4000, e b representa um número inteiro de tal modo que a fracção hidrófila representada por $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})$ constitui aproximadamente cerca de 50% a 90% em peso do composto. A composição para perfusão de um tecido ex vivo pode ser diluída com uma solução coloidal ou com uma solução de um sal. De preferência o anti-coagulante é a hepazina. Este aspecto da presente invenção é útil para prolongar a vida de órgãos

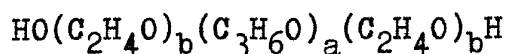
humanos ou animais que vão ser utilizados em transplantações.

A presente invenção também inclui um processo para o tratamento da doença das células falsiformes que compreende uma fase de injeção num corpo de uma solução com uma composição fibrinolítica, e a composição incorpora uma concentração eficaz de uma enzima fibrinolítica e uma quantidade eficaz de um copolímero como agente tensioactivo com a seguinte fórmula geral:



na qual a representa um número inteiro de tal modo que a fracção hidrófoba representada por $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ que possui um peso molecular de aproximadamente entre 950 a 4000, de preferência entre 1750 a 4000, e b representa um número inteiro de tal modo que a fracção hidrófila representada por $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})$ constitui aproximadamente 50% a 90% em peso do composto.

A presente invenção inclui um método para o tratamento da doença das células falsiformes que compreende a injeção num organismo de uma solução que incorpora uma concentração eficaz de um copolímero tensioactivo com a seguinte fórmula:



na qual a representa um número inteiro de tal modo que a fracção hidrófoba representada por $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ possui um peso molecular de aproximadamente 950 a 4000, de preferência entre 1750 a 4000, e b representa um número inteiro de tal modo que a fracção hidrófila representada por $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})$ constitui aproximadamente 50% a 90% do composto.

Os exemplos específicos que se seguem ilustrarao a presente invenção como se aplica em particular para dissolver coágulos dos vasos sanguíneos e impedir a formação de novos coágulos. Será apreciado que outros exemplos se tornem perceptíveis aos técnicos nesta matéria e que a presente invenção não seja limitada a estes exemplos ilustrativos específicos.

EXEMPLO I

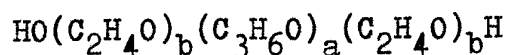
A adição do copolímero a uma enzima que dissolve um coágulo resulta num efeito sinérgico na actividade de dissolução do coágulo da enzima como se mostra neste exemplo.

Seringas de 1 ml para tuberculina são embaladas com 0,6 ml de pérolas de vidro de 500 a 750 micra (Polyscience Inc., Warrington, PA). As extremidades das seringas são protegidas com filtros de nitex e válvulas de plástico de uma única via. O plasma citrado pobre em plaquetas, congelado recentemente é bloqueado com 15 μ Ci/ml de fibrinogénio humano ^{125}I (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). O plasma radioactivo é diluído a 1 : 2 com solução normal de cloreto de sódio, e recalcificado com cálcio (American Dade, Aquada, Puerto Rico) com um volume de cálcio para quatro volumes de plasma diluído.

O fibrinogénio radioactivo é ligado com as co-lunas de pérolas de vidro como se segue: volumes iguais de plasma recalcificado marcado radioactivamente, são adicionados às colunas de pérolas paralelas e deixados a desenvolver nas pérolas sem excesso de plasma acima destas. Todos os procedimentos e manipulações das "bead clots" (coágulos de pérolas), são realizados à temperatura de 37°C. As pérolas/coágu-

los de plasma são deixados a incubar durante 30 minutos, e em seguida lavados durante 30 minutos com solução normal de cloreto de sódio. Durante os últimos cinco minutos da lavagem com a solução de cloreto de sódio, os débitos são controlados e as colunas em que os débitos são rápidos ou lentos anormalmente são excluídas da experiência. Débitos normais são de uma média de 0,2 ml/minuto.

O copolímero que é utilizado neste exemplo tem a fórmula seguinte:



na qual o peso molecular da fracção hidrófoba representada por $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ é aproximadamente 1750 e o peso molecular total do composto é aproximadamente de 8400. O copolímero é preparado sob a forma de uma solução de copolímero a 1% em peso em solução normal de cloreto de sódio.

O sangue que contém t-PA, com ou isento de copolímero é passado através das colunas do seguinte modo: 10 ml de sangue total heparinizado é recolhido recentemente e misturado com t-PA (10 mg em 1 ml de solução de cloreto de sódio normal; cadeia simples; Sigma Chemical Corp. St. Louis, MO). Um volume de 5,5 ml de sangue é misturado ou com 0,5 ml de solução normal de cloreto de sódio, ou com 0,5 ml de solução de copolímero. Uma aliquota da preparação de sangue total ou de sangue total diluído a 1 : 3 com solução de cloreto de sódio normal é ensaiada em cada coluna. Três ml de cada preparação de sangue é adicionado a um reservatório ligado com cada coluna. As fracções são recolhidas minuto a minuto até que o fluxo cesse. O volume de cada tubo é medido e a radio-

actividade contada num contador gama analítico Tracor (TmAnalitic, Inc., Elk Grove Village, IL). O aparecimento de radioactividade nos tubos de colheita indica a lise do coágulo.

Os dados são resumidos no Quadro A e Figura 1.

A Figura 1 mostra o fibrinogénio ^{125}I acumulado (contagens por minuto) libertado das colunas colocadas como uma função do tempo.

QUADRO A

Perfun- dido*	Tempo (Minutos)	Volume Recolhido	Conta- gens Minuto (Volume)	Conta- gens Minuto (ml)	Conta- gens Minuto Acumulado
Sangue, t-PA Copolímero	1	0,3	2031	6770	2031
	2	0,25	3042	12168	5073
	3	0,3	13051	43503	18124
	4	0,2	40190	200950	58314
	5	0,25	40260	161040	98574
	6	0,25	40009	160036	138583
Sangue, t-PA	1	0,15	885	5900	885
	2	0,2	1330	6650	2215
	3	0,2	3681	18405	5896
	4	0,3	16333	54443	22229
	5	0,4	24932	62330	47161
	6	0,45	30545	67878	77706
	7	0,6	40365	67275	118071
Sangue Copolímero	2	0,8	340	425	340
	3	0,7	351	501	691
	4	0,6	270	450	961
	5	0,6	226	377	1187
	6	0,5	204	408	1391
	7	0,4	178	445	1569

* O trombo simulado que continha fibrina marcada com iodo 125 é preparado como se descreveu antes no texto. A capacidade das preparações em ensaios para dissolver a fibrina é determinada mediante a avaliação da taxa de eluição de radioactividade da coluna. O copolímero não é um enzima e não possui grupos reactivos, deste modo é incapaz de lisar a fibrina em ligação cruzada mas ele aumenta a actividade fibrinolítica de t-PA neste modelo que é designado para estimular as condições da estrutura e circulação de um trombo coronário.

Como se pode ver no Quadro A e Figura 1, o tratamento do coágulo radioactivo com um copolímero como agente tensioactivo liberta pouca actividade o que indica a não existência de lise do coágulo. A administração de t-PA para o coágulo provoca uma libertação de radioactividade que indica a lise do coágulo na coluna. Contudo, quando o copolímero tensioactivo é adicionado à solução, a taxa de lise do coágulo na coluna é aumentada de um modo dramático. Assim, a associação de um copolímero tensioactivo e t-PA lisou o coágulo na coluna com uma taxa significativamente mais rápida do que o fez com o t-PA isoladamente.

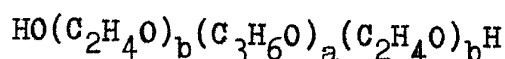
Noutras experiências, o modelo é modificado por alteração da dimensão das pérolas, a concentração do plasma utilizado para preparar o coágulo, a diluição de sangue, ou a concentração de enzima ou copolímero. Em várias circunstâncias as colunas são produzidas de forma a que o sangue total falhe a situação enquanto que todo o sangue adicionado com copolímero circula numa taxa de cerca de 0,05 ml/minuto. A presença de t-PA no sangue não é capaz de dissolver qualquer quantidade da fibrina em tais coágulos tal como

se mede pela libertação de iodo 125 marcado porque não ocorre circulação de sangue através do coágulo. A utilização do copolímero com o sangue e t-PA em tais situações, provoca uma lise rápida do coágulo.

EXEMPLO II

A composição fibrinolítica foi ensaiada num modelo de experiência de coração de rato ex vivo. O desenho detalhado do sistema, está descrito (vêr Paulson et al., Basic, Res. Cardiol. Vol. 81, pp. 180 - 187, 1986 que aqui se incorpora pela sua referência). Este modelo permite avaliar a capacidade do coração isolado para recuperar de um período de isquemia compreendido entre 30 e 90 minutos em que a circulação de nutrientes está reduzida para 1% do valor normal ou completamente detida e em seguida circula durante um período de 10 minutos de reperfusão. Três parâmetros são avaliados: (1) batimento cardíaco (CO); (2) pressão sistólica ventricular esquerda (LVSP); e (3) contração ventricular esquerda (dp/dt). A avaliação da recuperação do coração e a extensão do dano estão em discussão em Paulson, D.J. et al. Basic Res. Cardiol., Vol. 79, pp. 551 - 561, 1984.

Nesta experiência, os corações foram perfundidos com sangue humano total lavado sem qualquer adição de heparina. A circulação foi completamente parada durante 30 minutos, seguida de 10 minutos de reperfusão com sangue humano total lavado isento de heparina mas com o aditivo ou os aditivos indicados no Quadro B. O copolímero utilizado neste exemplo tem a seguinte fórmula:



na qual o peso molecular da fração hidrófoba representada por (C_3H_6O) é aproximadamente de 1750 e o peso molecular total do composto é aproximadamente 8400. O copolímero foi preparado sob a forma de uma solução concentrada a 1% em peso em solução de cloreto de sódio normal.

Os resultados do ensaio estão representados em seguida. A concentração final do copolímero tensioactivo utilizado no exemplo era de 0,68 mg/ml. A estreptoquinase utilizada neste exemplo pode ser obtida da Sigma Chemical Company, St. Louis, MO. A estreptoquinase foi administrada numa concentração de 100 unidades/coração. Os resultados obtidos mostram-se no Quadro B.

QUADRO B

Aditivos	Percentagem Recuperação Cardíaca (Valores médios)		
	CO	LVSP	dp/dt
Sangue Total	5	24	10
com copolímero	38	82	65
com estreptoquinase	33	75	60
com copolímero e estreptoquinase	58*	88	78

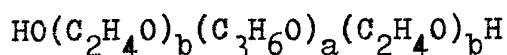
* $p < 0,05$ para o batimento cardíaco (CO) diferenças entre a associação de copolímero e estreptoquinase e (a) controle da isquémia de sangue total, (b) copolímero isolado e (c) apenas

com estreptoquinase. Utilizou-se para determinar as diferenças entre médias independentes o teste T de Student.

Como se pode verificar a partir do Quadro B, o copolímero e a estreptoquinase em associação protegem claramente melhor o coração do que o copolímero ou a estreptoquinase isolados.

EXEMPLO III

Para tratar um doente com cerca de 180 libras (180 x 0,454 kg) de peso com uma embolia pulmonar prepararam-se 500 mg de uroquinase (Abbokinase, Abbot Laboratories, North Chicago, IL), em 105 ml de água estéril. Adicionaram-se 90 ml de uma solução de cloreto de sódio a 0,9% à solução de uroquinase contendo 6 gramas de um copolímero de óxido de etileno - óxido de propileno com a seguinte fórmula:



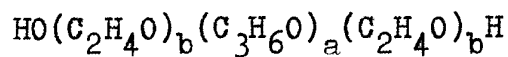
na qual o peso molecular da fracção hidrofoba representada por $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ é aproximadamente de 1750 e o peso molecular total do composto é aproximadamente 8400. A uroquinase e o copolímero foram misturados cuidadosamente para formar uma solução homogênea. O volume final da solução foi de 195 ml.

A composição fibrinolítica da presente invenção foi administrada por meio de uma bomba de perfusão constante capaz de libertar um volume total de 195 ml. Uma dose inicial da composição da presente invenção foi administrada com um débito de 90 ml/hora durante um período de 10 minutos. Isto representa uma circulação de perfusão contínua da presente invenção com um débito de 15 ml/hora durante 12 horas. Dado que alguma quantidade da composição fibrinolíti-

ca da presente invenção poderá permanecer no tubo no final do ciclo de distribuição de uma bomba de perfusão, a solução restante é empurrada do tubo por meio da administração de uma solução de cloreto de sódio a 0,9% com um débito de 15 ml/hora.

EXEMPLO IV

Para tratar um doente com um trombo de uma artéria coronária, trataram-se 75 mg de uroquinase (Abbokinase, Abbot Laboratories, North Chicago, IL) em 15,6 ml de água estéril. Adicionaram-se 300 ml de uma solução de dextrose a 5% à solução de uroquinase que continha 15 gramas de copolímero de óxido de etileno - óxido de propileno com a fórmula seguinte:



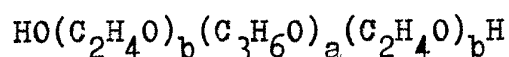
na qual o peso molecular da fracção hidrófoba representada por $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ é aproximadamente 1750 e o peso molecular total do composto é aproximadamente 8400. A uroquinase e o copolímero foram misturados cuidadosamente para formar uma solução homogénea. A solução é em seguida diluída com 5% de dextrose até um volume final de 500 ml.

A solução que constitui a presente invenção foi perfundida na artéria obstruída com um débito de 4 ml por minuto durante um período de até duas horas. Para determinar a resposta à solução da composição fibrinolítica da presente invenção, realizou-se uma angiografia periódica.

EXEMPLO V

Para tratar um doente que pese cerca de

180 libras (180 x 0,454 kg) com uma embolia pulmonar, trataram-se 500 mg de uroquinase (Abbokinase, Abbot Laboratories, North Chicago, IL) em 105 ml de água estéril. A solução de uroquinase adicionaram-se 90 ml de uma solução de cloreto de sódio a 0,9% que continha 6,0 gr de um copolímero de óxido de etileno - óxido de propileno com a seguinte fórmula:



na qual o peso molecular da fração hidrófoba representada por $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ era aproximadamente 1750 e o peso molecular total do composto é aproximadamente 8400. A uroquinase e o copolímero foram misturados cuidadosamente para formar uma solução homogênea. A solução foi em seguida diluída com cloreto de sódio a 0,9% para um volume final de 195 ml.

Administraram-se 137 ml de uma solução isotônica de dextrose com 3% p/v de copolímero de óxido de etileno - óxido de propileno para a lise do paciente durante um período de dois minutos. Deste modo, a concentração de copolímero no sangue foi aproximadamente de 0,6 mg/ml (considerando que o sangue é 8% do peso do corpo).

A composição fibrinolítica da presente invenção foi administrada imediatamente por meio de uma bomba de perfusão constante capaz de distribuir um volume total de 195 ml. Uma dose inicial da composição da presente invenção foi então administrada com um débito de 90 ml/hora durante um período de 10 minutos. Em seguida, procedeu-se a uma perfusão contínua da composição da presente invenção com um débito de 15 ml/hora durante 12 horas.

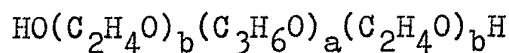
Para evitar que permanecesse alguma porção da

composição da presente invenção no tubo, no fim de um ciclo de distribuição de uma bomba de perfusão, a solução restante foi expulsa do tubo por meio de uma solução de cloreto de sódio a 0,9% que continha 3% de copolímero com um débito de 15 ml/hora.

Depois de o coágulo ser lisado, administrou-se uma solução de copolímero da presente invenção gota a gota por via endovenosa numa taxa de cerca de 25 mg/kg peso do corpo/hora para manter uma concentração no sangue do copolímero de aproximadamente 0,6 mg/ml. A administração da solução do copolímero, foi continuada durante 4 dias seguida de administração da composição fibrinolítica da presente invenção.

EXEMPLO VI

Para a conversão de um órgão ex vivo em preparação para uma transplantação trataram-se 1000 unidades de heparina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) em 200 ml de solução normal de cloreto de sódio (0,9%) e adicionou-se 1,36 gr de copolímero da presente invenção e fez-se de novo a suspensão de sangue humano total lavado para se obter um meio de perfusão. O copolímero tinha a seguinte fórmula:



na qual o peso molecular da fracção hidrófoba representada por $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ é de aproximadamente 1750 e o peso molecular total do composto é 8400.

Corações retirados de ratos Sprague-Dawley anestesiados foram perfundidos durante 10 minutos com (a) sangue e heparina ou (b) sangue, heparina e copolímero em seguida a uma isquemia de baixo fluxo de 90 minutos. A frequência cardíaca (CO), a pressão

sistólica ventricular esquerda (LVSP) e a contracção ventricular esquerda (dp/dt) foram determinados e expressos em percentagem de recuperação comparativamente com corações normais. Os corações dos animais isquémicos que receberam, sangue com heparina mostraram uma pequena recuperação : 12% CO, 44% LVSP e 34% dp/dt . Os corações a que foi distribuído sangue heparinado e copolímero mostraram uma excelente recuperação : 90% CO, 92% LVSP e 84% dp/dt . Para grupo que foi administrado com heparina e copolímero, todos os três parâmetros foram estatisticamente diferentes ($P < 0,01$) quando comparados com o grupo de controle isquémico (apenas heparina). As diferenças entre médias independentes foram determinadas pelo método do teste T de Student.

EXEMPLO VII

O teste foi realizado para demonstrar a capacidade da associação de superóxido dismutase é de um copolímero apropriado para produzir uma maior protecção a um miocárdio isquémico dos danos causados pela reperfusão associados com radicais de oxigénio e outros factores além da superóxido dismutase isolada.

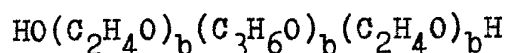
Sob anestesia geral (tiopental sódico na dose de 25 ml/kg), os animais foram incubados e ventilados com 70% de oxigénio com um débito de doze respirações por minuto. Um nível satisfatório de anestesia foi mantido com doses intermitentes pentotal adequados. Após preparação da pele, realizou-se a toracotomia anterior esquerda, abriu-se o pericárdio e expôs-se o coração. A artéria coronária descendente anterior esquerda foi identificada, isolada e rodeada com um laço metálico a um centímetro da sua origem. A obliteração

temporária da artéria coronária descendente anterior esquerda foi realizada por aperto do laço metálico durante 90 minutos. Durante o processo a pressão sanguínea e a taxa cardíaca foram controlados utilizando-se um registador de 8 canais Hewlett-Packard 7758B. A pressão sanguínea arterial foi controlada através de um cateter de calibre 18 na artéria femoral direita e medida com um transdutor de quartzo Hewlett-Packard. A evidência electrográfica para a isquémia do miocárdio antero-septal também foi controlada. A reperfusão do vaso ligado após 90 minutos de isquémia foi realizada por libertação gradual do laço metálico para evitar uma resposta hiperémica. Um desfibrilador estava disponível na sala como é necessário para todos os fármacos cardiotónicos se ocorre a fibrilação cardíaca ou colapso circulatório devido à ligação da artéria coronária descendente anterior esquerda. Os agentes terapêuticos foram perfundidos em conjunto com a reperfusão como se segue: superóxido dismutase bovina com aproximadamente 3000 unidades de actividade por miligrama doseado pelo método de McCord J. Biol. Chem., Vol. 244, p. 6049 (1969) obtida do Sigma Chemical Company, St. Louis, MO. Esta foi dissolvida em 100 ml de solução de cloreto de sódio normal e perfundida por via endovenosa durante 90 minutos iniciando-se 15 minutos antes a restauração da perfusão. Assim simulou-se o efeito que ocorre durante a lise de um trombo coronário.

Uma solução de copolímero foi preparada com uma concentração a 2% em peso/volume de solução salina. Esta foi administrada por via endovenosa como uma dose durante 2 minutos numa dose suficiente para se obter uma taxa sanguínea de 0,6 mg/ml seguida de uma perfusão constante de aproximadamente 25 mg/kg/hora com a finalidade de se manter a taxa san-

guínea de aproximadamente 0,6 mg/ml durante a restante experiência.

O copolímero de óxido de etileno - óxido de propileno tinha a seguinte fórmula:



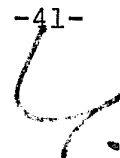
na qual o peso molecular da fração hidrófoba representada por $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ é aproximadamente 1750 e o peso molecular total do composto é 8400.

O efeito sinérgico da associação foi demonstrado pela comparação dos resultados de cães tratados com copolímero e superóxido dismutase e os cães tratados com outro material isolado ou sem qualquer tratamento.

Os agentes foram perfundidos por via endovenosa utilizando-se uma bomba de perfusão IVAC 560. A perfusão começou 15 minutos antes da libertação do laço metálico e continuou até à administração da dose total para cada grupo. O peito foi fechado em fases. Um tubo no peito foi utilizado para evacuar o pneumotorax e foi retirado quando se retomou a respiração espontânea. O fluido endovenoso foi administrado (solução de Ringer lactado) para compensar durante 24 horas, o período de NPO precedente à operação em adição a uma proporção de 3 para 1, para compensar o sangue perdido. Os animais foram mantidos e assistidos cuidadosamente durante 24 horas. Cada animal foi em seguida retomado para a operação seguinte e a incisão anterior foi reaberta sob anestesia geral. O animal foi sacrificado utilizando-se uma sobredose de barbiturato. O coração e 4 cm da aorta ascendente proximal foram retirados para assegurar a inclusão das origens das artérias coronárias.

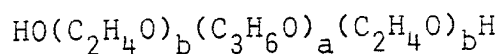
Esta técnica envolve a perfusão da artéria coronária descendente anterior esquerda com cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio, que cora de vermelho o miocárdio intacto e deixa o miocárdio enfartado sem coloração. Os limites da área do miocárdio em risco foram determinados por perfusão do restante do sistema coronário, via raiz da aorta, com corante azul de Evans. A área de risco foi definida pela ausência de corante azul de Evans.

Deve ser entendido, de facto, que as descrições anteriores se relacionam apenas com aspectos preferidos da presente invenção e que numerosas modificações e alterações podem ser realizadas sem atraçoar o espírito e o âmbito desta invenção tal como descrita nas reivindicações apensas.



R e i v i n d i c a ç õ e s

1.- Processo para a preparação de composições fibrinolíticas melhoradas, caracterizado pelo facto de se misturar um enzima fibrinolítico com um copolímero, como agente tensioactivo, de fórmula geral



na qual a representa um número inteiro tal que a fracção hidrófoba representada pelos grupos $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ apresenta um peso molecular compreendido, aproximadamente, entre 950 e 4000 e b representa um número inteiro tal que a fracção hidrófila representada pelos grupos $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})$ constitui, aproximadamente, 50 a 90%, em peso, do composto.

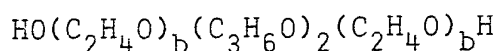
4

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se escolher o enzima fibrinolítico no grupo constituído por activador do plasminogénio tipo tecidular, estreptoquinase, prouroquinase e uroquinase.

3.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se incluir ainda um espurgador de radicais oxigénio.

4.- Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se escolher o expurgador de radicais oxigénio no grupo constituído por superóxido-dismutase e manitol.

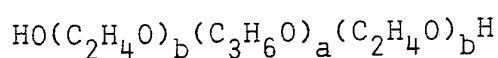
5.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se utilizar um copolímero, como agente tensioactivo, de fórmula geral



na qual a fracção hidrófoba representada pelos grupos $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ apresenta um peso molecular de, aproximadamente, 1750 sendo o peso molecular total deste composto de, aproximadamente, 8400.

6.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se promover a mistura do enzima fibrinolítico com o copolímero, como agente tensioactivo, em solução.

7.- Processo para a preparação de composições fibrinolíticas melhoradas utilizadas na lise de coágulos nos vasos sanguíneos, caracterizado pelo facto de se misturar uma quantidade eficaz de um enzima fibrinolítico com uma quantidade eficaz de um copolímero, como agente tensioactivo, de fórmula geral



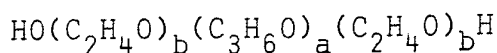
na qual a representa um número inteiro tal que a fracção hidrófoba representada pelos grupos $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ possui um peso molecular compreendido, aproximadamente, entre 950 e 4000, de preferência entre 1750 e 4000, e b representa um número inteiro tal que a fracção hidrófila representada pelos grupos $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})$ constitui, aproximadamente, 50 a 90% em peso do composto.

8.- Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de se escolher o enzima fibrinolítico no grupo constituído por activador do plasminogénio tipo tecidular, estreptoquinase, prouroquinase e uroquinase.

9.- Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de se incluir ainda um expurgador de radicais oxigénio.

10.- Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo facto de se escolher o expurgador dos radicais oxigénio no grupo constituído por superóxido-dismutase e manitol.

11.- Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de se utilizar um copolímero, como agente tensioactivo, de fórmula geral

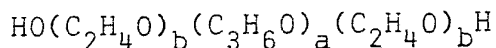


na qual a fracção hidrófoba representada pelos grupos $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ apresenta um peso molecular de, aproximadamente, 1750 sendo o peso molecular total deste composto de, aproximadamente, 8400.

12.- Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de se incluir ainda um agente anticoagulante.

13.- Processo para a preparação de composições fibrinolíticas melhoradas utilizadas na dissolução de coágulos nos vasos sanguíneos sob a forma de soluções de concentrações diferentes para administração simultânea ou sequencial, caracterizado pelo facto

(a) de se dissolver uma quantidade eficaz, de acordo com o estado do doente, de um copolímero, como agente tensioactivo, de fórmula geral



na qual a representa um número inteiro tal que a fracção hidrófoba representada pelos grupos $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ possui um peso molecular compreendido entre 950 e 4000, de preferência entre 1750 e 4000, e b representa um número inteiro tal que a fracção hidrófila representada pelos

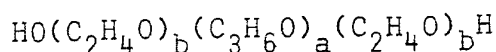
grupos (C_2H_4O) constitui, aproximadamente, 50 a 90%, em peso, do composto em um dissolvente aceitável em farmácia; e

(b) de se dissolver uma quantidade eficaz de um enzima fibrinolítico em um dissolvente aceitável em farmácia.

14.- Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo facto de se adicionar à solução contendo uma quantidade eficaz de um enzima fibrinolítico uma quantidade eficaz de um copolímero como agente tensioactivo.

15.- Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo facto de se escolher o enzima fibrinolítico no grupo constituído por activador de plasminogénio tipo tecidular, estreptoquinase, prouroquinase e uroquinase.

16.- Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo facto de se utilizar um copolímero, como agente tensioactivo, de fórmula geral

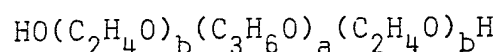


na qual a fracção hidrófoba representada pelos grupos (C_3H_6O) apresenta um peso molecular de, aproximadamente, 1750 sendo o peso molecular total deste composto de, aproximadamente, 8400.

4.

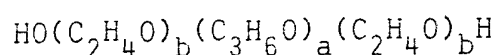
17.- Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo facto de se incluir ainda nas fases (a) ou (b) citadas antes um agente anticoagulante.

18.- Processo para a preparação de composições fibrinolíticas melhoradas utilizadas na eliminação da fibrina de um tumor, caracterizado pelo facto de se misturar uma quantidade eficaz de um enzima fibrinolítico com uma quantidade eficaz de um copolímero, como agente tensioactivo, de fórmula geral



na qual a representa um número inteiro tal que a fracção hidrófila representada pelos grupos $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ tem um peso molecular compreendido entre, aproximadamente, 950 e 4000, de preferência entre 1750 e 4000, e b representa um número inteiro tal que a fracção hidrófila representada pelos grupos $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})$ constitui, aproximadamente, 50 a 90%, em peso do composto.

19.- Processo para a preparação de composições fibrinolíticas melhoradas utilizadas no restabelecimento da circulação sanguínea e oxigenação de um tumor, caracterizado pelo facto de se dissolver, em um dissolvente apropriado aceitável sob o ponto de vista farmacêutico, uma quantidade eficaz de um copolímero, como agente tensioactivo, de fórmula geral



na qual a representa um número inteiro tal que a fracção hidrófoba representada pelos grupos (C_3H_6O) tem um peso molecular compreendido entre, aproximadamente, 950 e 4000, de preferência entre 1750 e 4000, e b representa um número inteiro tal que a fracção hidrófila representada pelos grupos (C_2H_4O) constitui, aproximadamente, 50 a 90%, em peso do composto.

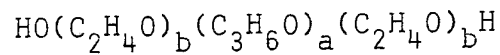
20.- Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo facto de se incorporar simultaneamente um agente quimioterapêutico.

21.- Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo facto de se incluir adicionalmente um reagente de diagnóstico com a finalidade de detectar um tumor.

22.- Processo de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo facto de se utilizar como reagente de diagnóstico um anticorpo monoclonal marcado radioactivamente e específico relativamente ao tumor.

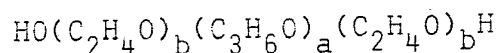
23.- Processo para a preparação de composições fibrinolíticas melhoradas, utilizadas no tratamento da anemia drepanocítica (eritrócitos em forma de foice), caracterizado pelo facto de se misturar uma quantidade eficaz de um enzima fibrinolítico com uma

quantidade eficaz de um copolímero, como agente tensioactivo, de fórmula geral



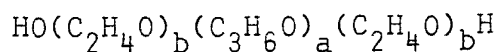
na qual a representa um número inteiro tal que a fracção hidrófila representada pelo grupo $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ tem um peso molecular compreendido entre, aproximadamente, 950 e 4000, de preferência entre 1750 e 4000, e b representa um número inteiro tal que a fracção hidrófila representada pelos grupos $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})$ constitui, aproximadamente, 50 a 90%, em peso, do composto.

24.- Processo para a preparação de composições fibrinolíticas melhoradas, utilizadas no tratamento da anemia depreanocítica, caracterizado pelo facto de se dissolver em um dissolvente apropriado, aceitável sob o ponto de vista farmacêutico, uma quantidade eficaz de um copolímero, como agente tensioactivo, de fórmula geral



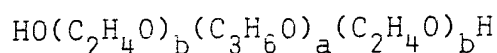
na qual a representa um número inteiro tal que a fracção hidrófila representada pelos grupos $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ tem um peso molecular compreendido entre, aproximadamente, 950 e 4000, de preferência entre 1750 e 4000, e b representa um número inteiro tal que a fracção hidrófila representada pelos grupos $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})$ constitui, aproximadamente, 50 a 90% em peso, do composto.

25.- Processo para a preparação de composições fibrinolíticas melhoradas utilizadas para prevenir a repetição de trombose associada a arteriosclerose, caracterizado pelo facto de se dissolver em um dissolvente apropriado, aceitável em farmácia, uma quantidade eficaz de um copolímero, como agente tensioactivo, de fórmula geral



na qual a representa um número inteiro tal que a fracção hidrófoba representada pelos grupos $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ tem um peso molecular compreendido entre, aproximadamente, 950 e 4000, de preferência entre 1750 e 4000, e b representa um número inteiro tal que a fracção hidrófila representada pelos grupos $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})$ constitui, aproximadamente, 50 a 90% em peso, do composto.

26.- Processo para a preparação de composições fibrinolíticas melhoradas utilizadas na perfusão de tecidos e órgãos para transplantação, caracterizado pelo facto de se misturar sangue, uma solução contendo uma quantidade eficaz de um agente anticoagulante e uma quantidade eficaz de um copolímero, como agente tensioactivo, de fórmula geral



na qual a representa um número inteiro tal que a fracção hidrófoba representada pelos grupos $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ tem um peso molecular compreendido entre, aproximadamente, 950 e 4000,

4.

de preferência entre 1750 e 4000, e b representa um número inteiro tal que a fracção hidrófila representada pelos grupos (C_2H_4O) constitui, aproximadamente, 50 a 90% em peso, do composto.

27.- Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo facto de se utilizar sangue total.

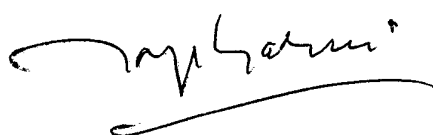
28.- Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo facto de se utilizar sangue diluído com uma solução coloidal.

29.- Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo facto de se utilizar sangue diluído com soro fisiológico.

30.- Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo facto de se utilizar heparina como agente anticoagulante,

Lisboa, 15 de Maio de 1987

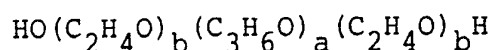
Dr. Agostinho José de Almeida



4.

R e i v i n d i c a c õ e s

31.- Processo para a preparação de composições fibrinolíticas melhoradas, caracterizado pelo facto de se misturar um expurgador do radical oxigênio com um copolímero, como agente tensioactivo, de fórmula geral

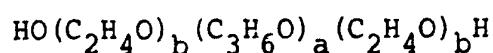


na qual

- a) representa um número inteiro tal que a fracção hidrófoba representada pelos grupos $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ tem um peso molecular compreendido entre aproximadamente 950 e 4000; e
- b) representa um número inteiro tal que a fracção hidrófila representada pelos grupos $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})$ constitui aproximadamente 50 % a 90 % em peso do composto.

32.- Processo de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo facto de se escolher o expurgador do radical oxigênio no grupo que consiste em superóxido dismutase e manitol.

33.- Método para a dissolução de coágulos sanguíneos nos vasos sanguíneos, caracterizado pelo facto de se injectar no corpo uma solução de uma composição fibrinolítica, compreendendo a composição uma solução com um expurgador do radical oxigénio e uma quantidade eficaz de um copolímero, como agente tensioactivo, de fórmula geral:

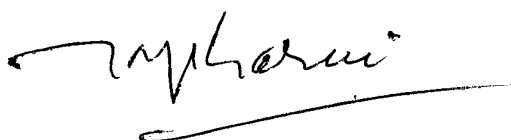


na qual

- a) representa um número inteiro tal que a fracção hidrófoba representada pelos grupos $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ tem um peso molecular compreendido entre cerca de 950 e 4000; e
- b) representa um número inteiro tal que a fracção hidrófila representada pelos grupos $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})$ constitui aproximadamente 50 % a 90 % em peso do composto, estando a concentração sanguínea do copolímero tensioactivo compreendida entre cerca de 0,1 mg/ml e 6 mg/ml.

34.- Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo facto de o expurgador do radical oxigénio ser escolhido no grupo que consiste em superóxido dismutase e manitol,

Lisboa, 18 de Janeiro de 1989

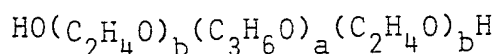


4.

R E S U M O

"Processo para a preparação de composições com acção fibrinolítica melhorada contendo um agente tensioactivo copolimérico"

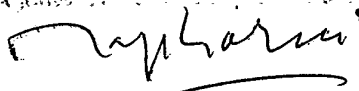
A presente invenção refere-se a um processo para a preparação de composições utilizadas na lise e dissolução de coágulos sanguíneos e restabelecimento e manutenção da circulação sanguínea através das coronárias que sofreram trombose ou outros vasos sanguíneos, que consiste em misturar um enzima fibrinolítico como, por exemplo, a estreptoquinase, uroquinase, activador do plasminogénio tipo tecidual ou outros com um copolímero, como agente tensioactivo, como por exemplo um produto resultante da condensação de óxido de etileno - óxido de propileno de fórmula geral



na qual a representa um número inteiro tal que a fracção hidrófoba representada pelos grupos (C_3H_6O) tem um peso molecular compreendido entre, aproximadamente, 950 e 4000, de preferência entre 1750 e 3500, e b representa um número inteiro tal que a fracção hidrófila representada pelos grupos (C_2H_4O) constitui, aproximadamente, 50 a 90% em peso, do composto.

Estas composições utilizam-se também na perfusão de tecidos e órgãos para transplantação.

Lisboa, 15 de Maio de 1987

Agência de Patentes e Marcas


4.

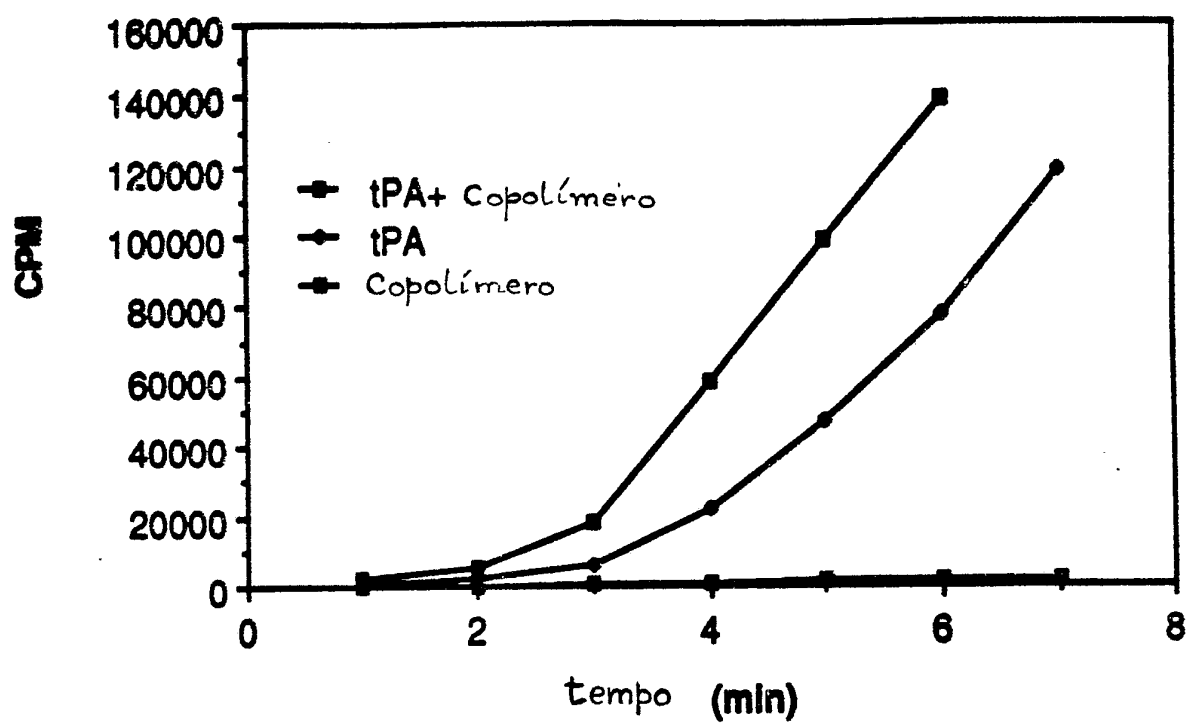


Fig. 1