



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0712607-7 A2**

(22) Data de Depósito: 24/05/2007
(43) Data da Publicação: 14/08/2012
(RPI 2171)



(51) Int.Cl.:
A01N 37/18
A61K 38/00
G01N 33/53
A61K 39/395
A61K 49/00
C12N 5/06
C12N 5/16

(54) Título: MÉTODOS DE TRATAMENTO DE ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL

(30) Prioridade Unionista: 25/05/2006 US 60/809149

(73) Titular(es): Biogen Idec Ma Inc

(72) Inventor(es): Jane K. Relton

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007069654 de 24/05/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/140249de 06/12/2007

(57) Resumo: MÉTODOS DE TRATAMENTO DE ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL.

Apresentam-se métodos e composições para o tratamento de acidente vascular cerebral.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODOS DE TRATAMENTO DE ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL".

REFERÊNCIA A PEDIDO RELACIONADO

5 Este pedido reivindica o benefício do pedido norte-americano provisório nº 60/809.149, depositado em 25 de maio de 2006, que é aqui incorporado por referência em sua inteireza.

FUNDAMENTOS

10 O acidente vascular cerebral é uma das principais causas de morte e incapacidade no mundo. Cerca de 700.000 americanos terão um acidente vascular cerebral este ano. Nos Estados Unidos, o acidente vascular cerebral é a terceira causa mais freqüente de morte e uma importante causa de incapacidade grave de longo prazo.

SUMÁRIO

15 A invenção se base, em parte, na observação de que a modulação de VLA-1 pode ser usada para tratar uma lesão isquêmica, por exemplo, acidente vascular cerebral. Portanto, em um aspecto, a invenção apresenta métodos de tratamento de acidente vascular cerebral em um sujeito. O método inclui a administração ao sujeito de um antagonista de VLA-1 em uma quantidade eficaz para tratar acidente vascular cerebral. Um "antagonista de
20 VLA-1" se refere a um agente (por exemplo, qualquer composto) que iniba pelo menos parcialmente uma interação ou atividade de VLA-1. Por exemplo, o agente inibe pelo menos parcialmente uma atividade de VLA-1 (por exemplo, a ligação de VLA-1 a um ligante, por exemplo, colágeno) ou o agente inibe pelo menos parcialmente um ácido nucléico que codifique VLA-1,
25 por exemplo, para reduzir a expressão da proteína VLA-1. Em uma modalidade, o agente reduz a capacidade de VLA-1 de se ligar a colágeno, por exemplo, colágeno IV, por exemplo, reduz a afinidade de ligação VLA-1/colágeno por um fator de pelo menos 2, 3, 5, 10, 20 50 ou 100, e/ou reduz a ligação VLA-1/colágeno em pelo menos 5%, por exemplo, pelo menos
30 10%, 25%, 50%, 75%, 90%, 95% ou mais, em comparação com a ligação na ausência do agente.

Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é um anticorpo

anti-VLA-1 ou seu fragmento de ligação a antígeno. O anticorpo anti-VLA-1 pode ser um anticorpo monoclonal ou seu fragmento de ligação a antígeno. O anticorpo anti-VLA-1 pode ser de comprimento total (por exemplo, uma IgG (por exemplo, uma IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (por exemplo, IgA1, IgA2), IgD e IgE ou pode incluir apenas um fragmento de ligação a antígeno (por exemplo, um fragmento Fab, F(ab')₂ ou scFv ou uma ou mais CDRs). Um anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno, pode incluir duas cadeias pesadas de imunoglobulina e duas cadeias leves de imunoglobulina ou pode ser um anticorpo de cadeia única. O anticorpo pode, opcionalmente, incluir uma região constante escolhida de um gene de região constante kapa, lambda, alfa, gama, delta, epsilon ou mu. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-VLA-1 inclui uma região constante de cadeia pesada e leve substancialmente de um anticorpo humano, por exemplo, uma região constante de IgG1 humana ou uma parte dela. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-VLA-1 é um anticorpo humano.

Em outras modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno, é um anticorpo quimérico ou humanizado. Conforme aqui discutido, os anticorpos podem ser com enxerto de CDR, humanizados ou, mais genericamente, anticorpos com CDRs de um anticorpo não humano e uma estrutura principal que é selecionada como menos imunogênica em seres humanos, por exemplo, menos antigênica que a estrutura murídea em que uma CDR murídea ocorra naturalmente.

Em uma modalidade preferida, o anticorpo anti-VLA-1 é um anticorpo de ocorrência não natural, por exemplo, um anticorpo quimérico, com enxerto de CDR ou humanizado com pelo menos CDR3 de cadeia pesada e, de preferência, todas as CDRs de cadeia pesada, mais preferivelmente todas as três CDRs de cadeia pesada e todas as três CDRs de cadeia leve de um anticorpo não humano, por exemplo, um anticorpo não humano aqui descrito. Em uma modalidade preferida, as CDRs podem diferir de uma CDR aqui mencionada por 1, 2 ou 3 resíduos de aminoácidos, por exemplo, a CDR3 de cadeia pesada pode ser de uma fonte aqui descrita, mas, de outra forma, outra CDR pode variar conforme aqui descrito.

Anticorpos anti-VLA-1 preferidos incluem, por exemplo, um anticorpo AQC2 humanizado (por exemplo, produzido por um hibridoma com o Nº de Depósito ATCC PTA-3274), AJH10 (ATCC PTA-3580), hAQC2 (ATCC PTA-3275), haAQC2 (ATCC PTA-3274), hsAQC2 (ATCC PTA-3356), mAQC2 (ATCC PTA-3273), e anticorpo monoclonal 1B3 (ATCC HB-10536). Em algumas modalidades, o anticorpo anti-VLA-1 pode se ligar ao mesmo epítipo que AQC2, AJH10, hAQC2, haAQC2, hsAQC2, mAQC2 e/ou 1B3. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-VLA-1 compete com AQC2, AJH10, hAQC2, haAQC2, hsAQC2, mAQC2, e/ou 1B3 pela ligação a VLA-1.

10 Em algumas modalidades, o anticorpo anti-VLA-1 se liga à subunidade $\alpha 1$ de VLA-1, por exemplo, o domínio $\alpha 1$ -I de VLA-1.

Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é um polipeptídeo, por exemplo, laminina ou colágeno I, III ou IV ou um peptídeo de ligação a VLA-1 de laminina ou colágeno I, III ou IV aqui descrito. Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é um peptídeo VLA-1, por exemplo, um fragmento da subunidade $\alpha 1$, por exemplo, um fragmento do domínio de $\alpha 1$ -I contendo a seqüência de aminoácidos VQRGGR ou uma seqüência de aminoácidos similar com substituições de aminoácidos conservadoras. Os peptídeos laminina, colágeno ou VLA-1 bloqueiam a função de VLA-1 conforme testado, por exemplo, por sua capacidade de inibir a adesão a colágeno IV dependente de K562- $\alpha 1$, conforme aqui descrito.

25 Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é um inibidor da expressão ou tradução de um ácido nucléico de VLA-1, como uma molécula de RNA de fita dupla (dsRNA), uma molécula anti-sentido, uma ribozima, uma molécula de hélice tripla, aptâmero ou qualquer de suas combinações.

Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é uma molécula pequena aqui descrita (por exemplo, um agente químico com um peso molecular de menos de 2.500 Da, de preferência, menos de 1.500 Da) ou uma substância química, por exemplo, uma molécula orgânica pequena.

30 Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 pode ser administrado em uma quantidade e/ou durante um tempo suficientes para reduzir a lesão isquêmica no tecido neuronal do cérebro.

O sujeito é tipicamente um mamífero, por exemplo, ser humano, cão, gato, macaco, coelho ou mamífero agrícola (por exemplo, cavalo, vaca, porco e outros). Por exemplo, o sujeito é um ser humano, por exemplo, um homem ou mulher. O sujeito pode ter pelo menos 18, 25, 30, 45, 50, 55, 60
5 ou 70 anos de idade.

Em uma modalidade, o sujeito experimentou um acidente vascular cerebral. O acidente pode ser um acidente vascular cerebral hemorrágico, acidente vascular cerebral isquêmico ou um ataque isquêmico transitório (TIA).

10 Em uma modalidade, o sujeito experimentou um acidente vascular cerebral até 48 horas, por exemplo, até 2, 3, 5, 8, 12, 20 ou 30 horas do tratamento. Em outra modalidade, o sujeito experimentou um acidente vascular cerebral mais de 48 horas antes, mas até as duas ou três últimas semanas, do tratamento.

15 Em outra modalidade, o sujeito tem risco de um acidente vascular cerebral, por exemplo, experimentou ou está experimentando condições que criam um risco de acidente vascular cerebral. Exemplos dessas condições incluem pressão sangüínea elevada; uso de tabaco; diabetes melito; doença da artéria carótida ou outra; doença de artérias periféricas; fibrilação
20 atrial; outra doença cardíaca; ataques isquêmicos transitórios (TIAs); certos transtornos sangüíneos (por exemplo, elevada contagem de hemácias; anemia falciforme); colesterol sangüíneo elevado; inatividade física e obesidade; excesso de álcool; algumas drogas ilegais; um acidente vascular cerebral anterior; ou ataque cardíaco anterior.

25 Em uma modalidade, o sujeito exibe um ou mais dos seguintes sintomas: dormência ou fraqueza súbita da face, dormência ou fraqueza súbita de um braço; dormência ou fraqueza súbita de uma perna; confusão súbita; dificuldade de fala súbita; dificuldade de entendimento súbita; problemas súbitos de visão em um ou ambos os olhos; dificuldade súbita de
30 andar; vertigem súbita; perda súbita de equilíbrio ou coordenação; cefaléia súbita e grave de causa desconhecida. Em algumas modalidades, o sujeito foi diagnosticado como tendo sofrido um acidente vascular cerebral.

Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é administrado em uma quantidade suficiente para reduzir o tamanho de um infarto, por exemplo, em pelo menos 5, 10, 15, 20, 40, 50, 60, 70 ou 80% ou mais, no tecido neuronal do cérebro, com relação ao tamanho do infarto em um sujeito não tratado. A quantidade suficiente para reduzir o tamanho de um infarto pode ser avaliada usando-se um modelo animal, por exemplo, conforme aqui descrito.

Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é administrado em uma quantidade suficiente para melhorar sintomas em um ou mais critérios de avaliação de acidente vascular cerebral, por exemplo, um critério ou escala aqui descrito, em pelo menos 5, 10, 15, 20, 40, 50, 60, 70 ou 80% ou mais ou em meio ponto ou ponto inteiro na escala. Por exemplo, a contagem na escala Rankin modificada pode ser reduzida em pelo menos 1 ponto, por exemplo, em pelo menos 2, 3 ou 4 pontos, e/ou a contagem pode ser diminuída para, por exemplo, 4, 3, 2, 1 ou 0, A contagem NIHSS pode ser reduzida em pelo menos 1 ponto, por exemplo, em pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20 pontos ou mais, e/ou a contagem pode ser diminuída para, por exemplo, 15, 13, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0, A contagem do índice Barthel pode ser aumentada em pelo menos 5 pontos, por exemplo, pelo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 pontos ou mais, e/ou a contagem pode ser aumentada para, por exemplo, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou 100.

Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é administrado a uma dosagem de 0,025 mg/kg por dia a 30 mg/kg por dia, por exemplo, 0,1 a 5 mg/kg, por exemplo, 0,3 a 3 mg/kg. Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é administrado pelo menos duas vezes em um período de 14 dias após um acidente vascular cerebral, por exemplo, pelo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ou 14 vezes em um período de 14 dias após um acidente vascular cerebral. O antagonista pode ser administrado, por exemplo, uma vez ao dia, em dias alternados, duas vezes por semana, uma vez por semana ou uma vez ao dia durante 1 dia, por exemplo, durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14 ou 28 dias. O antagonista de VLA-1 pode ser administrado por via intraveno-

sa ou parenteral.

Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é administrado em combinação com um tratamento para acidente vascular cerebral. Por exemplo, o tratamento inclui a administração de um segundo agente que proporcione um benefício terapêutico a um paciente que tenha tido ou esteja com risco de ter um acidente vascular cerebral. Segundos agentes exemplificativos incluem, por exemplo, um agente trombolítico (por exemplo, estreptoquinase, complexo ativador de plasminogênio-estreptoquinase acilado (APSAC), uroquinase, ativador de uroquinase-plasminogênio de cadeia única (scu-PA), agentes antiinflamatórios, enzimas do tipo trombina de venenos de cobras, como ancrod, inibidores de trombina, ativador de plasminogênio tissular (t-PA) e variantes biologicamente ativas de cada um dos acima); um anticoagulante (por exemplo, warfarin ou heparina); fármaco antiplaquetário (por exemplo, aspirina); um inibidor de glicoproteína IIb/IIIa; um glicosaminoglicano; cumarina; GCSF; melatonina; um inibidor de apoptose (por exemplo, inibidor de caspase), um antioxidante (por exemplo, NXY-059); e um neuroprotetor (por exemplo, um antagonista do receptor de NMDA ou um antagonista canabinoide).

Em uma modalidade preferida, o antagonista de VLA-1 e o segundo agente são administrados ao mesmo tempo. Em uma modalidade preferida, o antagonista de VLA-1 é administrado primeiro, e o segundo agente é administrado em segundo lugar. Em uma modalidade preferida, o segundo agente é administrado primeiro, e o antagonista de VLA-1 é administrado em segundo lugar.

Conforme aqui usado, "administrado em combinação" significa que dois ou mais agentes (por exemplo, o antagonista de VLA-1 e o segundo agente) são administrados a um sujeito ao mesmo tempo ou dentro de um intervalo, de modo que haja uma superposição dos efeitos de cada agente no paciente. De preferência, as administrações do primeiro e segundo agente são espaçadas suficientemente próximas entre si de modo que se consiga um efeito combinatório. O intervalo pode ser um intervalo de horas, dias ou semanas. Genericamente, os agentes são concomitantemente bio-

disponíveis, por exemplo, detectáveis, no sujeito. Em uma modalidade preferida, pelo menos uma administração de um dos agentes, por exemplo, do primeiro agente, é feita enquanto o outro agente, por exemplo, o antagonista de VLA-1, ainda está presente em um nível terapêutico no sujeito.

5 Em uma modalidade, o método também inclui a avaliação do
- sujeito quanto a um critério pós-acidente vascular cerebral, por exemplo, um
- critério ou escala de avaliação de acidente vascular cerebral aqui descrito.
Em algumas modalidades, a avaliação é realizada pelo menos 1 hora, por
exemplo, pelo menos 2, 4, 6, 8, 12, 24 ou 48 horas ou pelo menos 1 sema-
10 na, 2 semanas, 4 semanas, 10 semanas, 13 semanas, 20 semanas ou mais,
após a administração do antagonista de VLA-1. O sujeito pode ter sido avali-
ado em um ou mais dos seguintes períodos: antes do início do tratamento;
durante o tratamento; ou após um ou mais elementos do tratamento terem
sido administrados. A avaliação pode incluir a avaliação da necessidade de
15 tratamento adicional com o mesmo antagonista de VLA-1 ou de tratamento
adicional com agentes adicionais. Em uma modalidade preferida, se for obti-
do um resultado pré-selecionado da avaliação, procede-se a uma etapa adi-
cional, por exemplo, o sujeito recebe a administração de outro tratamento ou
se realiza outra avaliação ou teste.

20 Em outra modalidade, o método também inclui uma etapa de
identificação de um sujeito que tenha um acidente vascular cerebral (por e-
xemplo, acidente vascular cerebral isquêmico, acidente vascular cerebral
hemorrágico ou ataque isquêmico transitório) ou sintomas de um acidente
vascular cerebral.

25 Em um aspecto, a exposição apresenta um método de tratamen-
to de um sujeito, o método incluindo (a) a determinação de se um paciente
tem isquemia, por exemplo, isquemia pós-acidente vascular cerebral; (b) a
determinação de se o acidente vascular cerebral ou outro evento causador
de isquemia está dentro de um tempo pré-selecionado, por exemplo, um
30 tempo aqui descrito; e, se (a) e (b) forem satisfeitos, a administração ao su-
jeito de um antagonista de VLA-1 em uma quantidade eficaz para tratar a
isquemia.

Em um aspecto, a exposição apresenta um antagonista de VLA-1 para uso no tratamento de acidente vascular cerebral, por exemplo, conforme aqui descrito. O antagonista pode ser um antagonista de VLA-1 aqui descrito, por exemplo, um anticorpo contra VLA-1 aqui descrito. Em outro aspecto, a exposição apresenta o uso de um antagonista de VLA-1 para a fabricação de um medicamento para o tratamento de acidente vascular cerebral, por exemplo, conforme aqui descrito. O antagonista pode ser um antagonista de VLA-1 aqui descrito, por exemplo, um anticorpo contra VLA-1 aqui descrito.

Em um aspecto, a exposição apresenta um recipiente que inclui um antagonista de VLA-1, por exemplo, um anticorpo contra VLA-1, e um rótulo com instruções para uso do antagonista no tratamento de acidente vascular cerebral.

Em um aspecto, a exposição apresenta métodos para o tratamento de uma lesão isquêmica em um sujeito, por exemplo, uma lesão isquêmica aqui descrita, o método incluindo a administração ao sujeito de um antagonista de VLA-1, por exemplo, um anticorpo anti-VLA-1 aqui descrito, em uma quantidade eficaz para tratar a lesão isquêmica. Em outro aspecto, a exposição apresenta métodos para o tratamento de lesão de isquemia-reperfusão em um sujeito, o método incluindo a administração ao sujeito de um antagonista de VLA-1, por exemplo, um anticorpo anti-VLA-1 aqui descrito, em uma quantidade eficaz para tratar uma lesão de isquemia-reperfusão.

Em outro aspecto, a exposição apresenta métodos de tratamento de lesão cerebral traumática (TBI) em um sujeito. O método inclui a administração ao sujeito de um antagonista de VLA-1 em uma quantidade eficaz para tratar TBI.

Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é um anticorpo anti-VLA-1 ou seu fragmento de ligação a antígeno. O anticorpo anti-VLA-1 pode ser um anticorpo monoclonal ou seu fragmento de ligação a antígeno. O anticorpo anti-VLA-1 pode ser de comprimento total (por exemplo, uma IgG (por exemplo, uma IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (por exemplo, IgA1, IgA2), IgD, e IgE ou pode incluir apenas um fragmento de ligação a an-

tígeno (por exemplo, um fragmento Fab, F(ab')₂ ou scFv ou uma ou mais CDRs). Um anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno, pode incluir duas cadeias pesadas de imunoglobulina e duas cadeias leves de imunoglobulina ou pode ser um anticorpo de cadeia única. O anticorpo pode, opcionalmente, incluir uma região constante escolhida de um gene de região constante kapa, lambda, alfa, gama, delta, epsilon ou mu. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-VLA-1 inclui uma região constante de cadeia pesada e leve substancialmente de um anticorpo humano, por exemplo, uma região constante de IgG1 humana ou uma parte dela. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-VLA-1 é um anticorpo humano.

Em outras modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno, é um anticorpo quimérico ou humanizado. Conforme aqui discutido, os anticorpos podem ser com enxerto de CDR, humanizados ou, mais genericamente, anticorpos com CDRs de um anticorpo não humano e uma estrutura principal que é selecionada como menos imunogênica em seres humanos, por exemplo, menos antigênica que a estrutura murídea em que uma CDR murídea ocorra naturalmente.

Em uma modalidade preferida, o anticorpo anti-VLA-1 é um anticorpo de ocorrência não natural, por exemplo, um anticorpo quimérico, com enxerto de CDR ou humanizado com pelo menos CDR3 de cadeia pesada, e, de preferência, todas as CDRs de cadeia pesada, mais preferivelmente todas as três CDRs de cadeia pesada e todas as três CDRs de cadeia leve de um anticorpo não humano, por exemplo, um anticorpo não humano aqui descrito. Em uma modalidade preferida, as CDRs podem diferir de uma CDR aqui mencionada por 1, 2 ou 3 resíduos de aminoácidos, por exemplo, CDR3 de cadeia pesada pode ser de uma fonte aqui descrita, mas, de outra forma, outra CDR pode variar conforme aqui descrito.

Anticorpos anti-VLA-1 preferidos incluem, por exemplo, um anticorpo AQC2 humanizado (por exemplo, produzido por um hibridoma com o Nº de Depósito ATCC PTA-3274), AJH10 (ATCC PTA-3580), hAQC2 (ATCC PTA-3275), haAQC2 (ATCC PTA-3274), hsAQC2 (ATCC PTA-3356), mAQC2 (ATCC PTA-3273), e anticorpo monoclonal 1B3 (ATCC HB-10536). Em al-

gumas modalidades, o anticorpo anti-VLA-1 pode se ligar ao mesmo epítipo que AQC2, AJH10, hAQC2, haAQC2, hsAQC2, mAQC2 e/ou 1B3. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-VLA-1 compete com AQC2, AJH10, hAQC2, haAQC2, hsAQC2, mAQC2 e/ou 1B3 pela ligação a VLA-1.

5 Em algumas modalidades, o anticorpo anti-VLA-1 se liga à subunidade $\alpha 1$ de VLA-1, por exemplo, o domínio $\alpha 1$ -I de VLA-1.

 Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é um polipeptídeo, por exemplo, laminina ou colágeno I, III ou IV ou um peptídeo de ligação a VLA-1 de laminina ou colágeno I, III ou IV aqui descrito. Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é um peptídeo VLA-1, por exemplo, um fragmento da subunidade $\alpha 1$, por exemplo, um fragmento do domínio $\alpha 1$ -I contendo a seqüência de aminoácidos VQRGGR ou uma seqüência de aminoácidos similar com substituições de aminoácidos conservadoras. Os peptídios laminina, colágeno ou VLA-1 bloqueiam a função de VLA-1 conforme testado, por exemplo, por sua capacidade de inibir a adesão dependente de K562- $\alpha 1$ a colágeno IV conforme aqui descrito. Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é um inibidor da expressão ou tradução de um ácido nucléico de VLA-1, como uma molécula de RNA de fita dupla (dsRNA), uma molécula anti-sentido, uma ribozima, uma molécula de hélice tripla, um aptâmero ou qualquer de suas combinações.

10

15

20

 Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é uma molécula pequena aqui descrita (por exemplo, um agente químico com um peso molecular de menos de 2.500 Da, de preferência, menos de 1.500 Da) ou uma substância química, por exemplo, uma molécula orgânica pequena.

25 Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 pode ser administrado em uma quantidade e/ou durante um tempo suficientes para tratar TBI, por exemplo, para curar, sanar, aliviar, atenuar, alterar, remediar, melhorar, beneficiar ou afetar TBI, por exemplo, um ou mais sintomas de TBI aqui descritos.

30 O sujeito é tipicamente um mamífero, por exemplo, ser humano, cão, gato, macaco, coelho ou mamífero agrícola (por exemplo, cavalo, vaca, porco e outros). Por exemplo, o sujeito é um ser humano, por exemplo, um

homem ou mulher. O sujeito pode ter pelo menos 18, 25, 30, 45, 50, 55, 60 ou 70 anos de idade.

5 A TBI pode ser, por exemplo, uma contusão, equimose, laceração ou hematoma. Em algumas modalidades, o antagonista de VLA-1 é administrado para tratar uma TBI primária. Em algumas modalidades, o antagonista de VLA-1 é administrado para tratar ou prevenir uma TBI secundária.

10 Em uma modalidade, o sujeito experimentou uma TBI em até 48 horas, por exemplo, em até 2, 3, 5, 8, 12, 20 ou 30 horas do tratamento. Em outra modalidade, o sujeito experimentou a TBI mais de 48 horas antes, mas até as duas ou três últimas semanas, do tratamento.

Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é administrado em uma quantidade suficiente para melhorar sintomas em um ou mais critérios de avaliação de TBI, por exemplo, um critério aqui descrito, em pelo menos 5, 10, 15, 20, 40, 50, 60, 70 ou 80% ou mais.

15 Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é administrado a uma dosagem de 0,025 mg/kg por dia a 30 mg/kg por dia, por exemplo, 0,1 a 5 mg/kg, por exemplo, 0,3 a 3 mg/kg. Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é administrado pelo menos duas vezes em um período de 14 dias após um acidente vascular cerebral, por exemplo, pelo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8,
20 9, 10, 11, 12, 13 ou 14 vezes em um período de 14 dias após um acidente vascular cerebral. O antagonista pode ser administrado, por exemplo, uma vez ao dia, em dias alternados, duas vezes por semana, uma vez por semana ou uma vez ao dia durante 1 dia, por exemplo, durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14 ou 28 dias. O antagonista de VLA-1 pode ser administrado por via intravenosa ou parenteral.
25

Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é administrado em combinação com um tratamento para TBI. Por exemplo, o antagonista de VLA-1 pode ser administrado em conjunto com cirurgia e/ou tratamentos para outras lesões e infecção. Em uma modalidade preferida, o antagonista de
30 VLA-1 e o segundo agente são administrados ao mesmo tempo. Em uma modalidade preferida, o antagonista de VLA-1 é administrado primeiro, e o segundo agente é administrado em segundo lugar. Em uma modalidade pre-

ferida, o segundo agente é administrado primeiro, e o antagonista de VLA-1 é administrado em segundo lugar.

Em uma modalidade, o método também inclui a avaliação do sujeito quanto a um critério de TBI aqui descrito. Em algumas modalidades, a avaliação é realizada pelo menos 1 hora, por exemplo, pelo menos 2, 4, 6, 8, 12, 24 ou 48 horas ou pelo menos 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 10 semanas, 13 semanas, 20 semanas ou mais, após a administração do antagonista de VLA-1. O sujeito pode ter sido avaliado em um ou mais dos seguintes períodos: antes do início do tratamento; durante o tratamento; ou após um ou mais elementos do tratamento terem sido administrados. A avaliação pode incluir a avaliação da necessidade de tratamento adicional com o mesmo antagonista de VLA-1 ou de tratamento adicional com agentes adicionais. Em uma modalidade preferida, se for obtido um resultado pré-selecionado da avaliação, procede-se a uma etapa adicional, por exemplo, o sujeito recebe a administração de outro tratamento ou se realiza outra avaliação ou teste.

Em um aspecto, a exposição apresenta um antagonista de VLA-1 para uso no tratamento de TBI, por exemplo, conforme aqui descrito. O antagonista pode ser um antagonista de VLA-1 aqui descrito, por exemplo, um anticorpo contra VLA-1 aqui descrito. Em outro aspecto, a exposição apresenta o uso de um antagonista de VLA-1 para a fabricação de um medicamento para o tratamento de TBI, por exemplo, conforme aqui descrito. O antagonista pode ser um antagonista de VLA-1 aqui descrito, por exemplo, um anticorpo contra VLA-1 aqui descrito.

Em um aspecto, a exposição apresenta um recipiente que inclui um antagonista de VLA-1, por exemplo, um anticorpo contra VLA-1, e um rótulo com instruções para uso do antagonista no tratamento de TBI.

Em outro aspecto, a exposição apresenta métodos de tratamento de uma lesão da medula espinhal (SCI) em um sujeito. O método inclui a administração ao sujeito de um antagonista de VLA-1 em uma quantidade eficaz para tratar SCI.

Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é um anticorpo

anti-VLA-1 ou seu fragmento de ligação a antígeno. O anticorpo anti-VLA-1 pode ser um anticorpo monoclonal ou seu fragmento de ligação a antígeno. O anticorpo anti-VLA-1 pode ser de comprimento total (por exemplo, uma IgG (por exemplo, uma IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (por exemplo, IgA1, IgA2), IgD, e IgE ou pode incluir apenas um fragmento de ligação a antígeno (por exemplo, um fragmento Fab, F(ab')₂ ou scFv ou uma ou mais CDRs). Um anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno, pode incluir duas cadeias pesadas de imunoglobulina e duas cadeias leves de imunoglobulina ou pode ser um anticorpo de cadeia única. O anticorpo pode, opcionalmente, incluir uma região constante escolhida de um gene de região constante kapa, lambda, alfa, gama, delta, epsilon ou mu. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-VLA-1 inclui uma região constante de cadeia pesada e leve substancialmente de um anticorpo humano, por exemplo, uma região constante de IgG1 humana ou uma parte dela. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-VLA-1 é um anticorpo humano.

Em outras modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno, é um anticorpo quimérico ou humanizado. Conforme aqui discutido, os anticorpos podem ser com enxerto de CDR, humanizados ou, mais genericamente, anticorpos com CDRs de um anticorpo não humano e uma estrutura principal que é selecionada como menos imunogênica em seres humanos, por exemplo, menos antigênica que a estrutura murídea em que uma CDR murídea ocorra naturalmente.

Em uma modalidade preferida, o anticorpo anti-VLA-1 é um anticorpo de ocorrência não natural, por exemplo, um anticorpo quimérico, com enxerto de CDR ou humanizado com pelo menos CDR3 de cadeia pesada, e, de preferência, todas as CDRs de cadeia pesada, mais preferivelmente todas as três CDRs de cadeia pesada e todas as três CDRs de cadeia leve de um anticorpo não humano, por exemplo, um anticorpo não humano aqui descrito. Em uma modalidade preferida, as CDRs podem diferir de uma CDR aqui mencionada por 1, 2 ou 3 resíduos de aminoácidos, por exemplo, CDR3 de cadeia pesada pode ser de uma fonte aqui descrita, mas, de outra forma, outra CDR pode variar conforme aqui descrito.

Anticorpos anti-VLA-1 preferidos incluem, por exemplo, um anticorpo AQC2 humanizado (por exemplo, produzido por um hibridoma com o N^o de Depósito ATCC PTA-3274), AJH10 (ATCC PTA-3580), hAQC2 (ATCC PTA-3275), haAQC2 (ATCC PTA-3274), hsAQC2 (ATCC PTA-3356), mAQC2 (ATCC PTA-3273) e anticorpo monoclonal 1B3 (ATCC HB-10536). Em algumas modalidades, o anticorpo anti-VLA-1 pode se ligar ao mesmo epítopo que AQC2, AJH10, hAQC2, haAQC2, hsAQC2, mAQC2 e/ou 1B3. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-VLA-1 compete com AQC2, AJH10, hAQC2, haAQC2, hsAQC2, mAQC2 e/ou 1B3 pela ligação a VLA-1.

10 Em algumas modalidades, o anticorpo anti-VLA-1 se liga à subunidade $\alpha 1$ de VLA-1, por exemplo, o domínio $\alpha 1$ -I de VLA-1.

Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é um polipeptídeo, por exemplo, laminina ou colágeno I, III ou IV ou um peptídeo de ligação a VLA-1 de laminina ou colágeno I, III ou IV aqui descrito. Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é um peptídeo VLA-1, por exemplo, um fragmento da subunidade $\alpha 1$, por exemplo, um fragmento do domínio $\alpha 1$ -I contendo a seqüência de aminoácidos VQRGGR ou uma seqüência de aminoácidos similar com substituições de aminoácidos conservadoras. Os peptídios laminina, colágeno ou VLA-1 bloqueiam a função de VLA-1 conforme testado, por exemplo, por sua capacidade de inibir a adesão dependente de K562- $\alpha 1$ a colágeno IV conforme aqui descrito. Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é um inibidor da expressão ou tradução de um ácido nucléico de VLA-1, como uma molécula de RNA de fita dupla (dsRNA), uma molécula anti-sentido, uma ribozima, uma molécula de hélice tripla, um aptâmero ou qualquer de suas combinações.

25 Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é uma molécula pequena aqui descrita (por exemplo, um agente químico com um peso molecular de menos de 2.500 Da, de preferência, menos de 1.500 Da) ou uma substância química, por exemplo, uma molécula orgânica pequena.

30 Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 pode ser administrado em uma quantidade e/ou durante um tempo suficientes para tratar SCI, por exemplo, para curar, sanar, aliviar, atenuar, alterar, remediar, melhorar,

beneficiar ou afetar SCI, por exemplo, uma ou mais sintomas de SCI aqui descrito.

O sujeito é tipicamente um mamífero, por exemplo, ser humano, cão, gato, macaco, coelho ou mamífero agrícola (por exemplo, cavalo, vaca, porco e outros). Por exemplo, o sujeito é um ser humano, por exemplo, um homem ou mulher. O sujeito pode ter pelo menos 18, 25, 30, 45, 50, 55, 60 ou 70 anos de idade.

Em algumas modalidades, o antagonista de VLA-1 é administrado para tratar uma SCI primária. Em algumas modalidades, o antagonista de VLA-1 é administrado para tratar ou prevenir uma SCI secundária.

Em uma modalidade, o sujeito experimentou a SCI em até 48 horas, por exemplo, em até 2, 3, 5, 8, 12, 20 ou 30 horas, do tratamento. Em outra modalidade, o sujeito experimentou a SCI mais de 48 horas antes, mas até as duas ou três últimas semanas, do tratamento.

Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é administrado em uma quantidade suficiente para melhorar sintomas em um ou mais critérios de avaliação de SCI, por exemplo, um critério aqui descrito, em pelo menos 5, 10, 15, 20, 40, 50, 60, 70 ou 80% ou mais.

Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é administrado a uma dosagem de 0,025 mg/kg por dia a 30 mg/kg por dia, por exemplo, 0,1 a 5 mg/kg, por exemplo, 0,3 a 3 mg/kg. Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é administrado pelo menos duas vezes em um período de 14 dias após um acidente vascular cerebral, por exemplo, pelo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ou 14 vezes em um período de 14 dias após um acidente vascular cerebral. O antagonista pode ser administrado, por exemplo, uma vez ao dia, em dias alternados, duas vezes por semana, uma vez por semana ou uma vez ao dia durante 1 dia, por exemplo, durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14 ou 28 dias. O antagonista de VLA-1 pode ser administrado por via intravenosa ou parenteral.

Em uma modalidade, o antagonista de VLA-1 é administrado em combinação com um segundo agente para o tratamento de SCI. O segundo agente pode ser, por exemplo, um corticosteróide ou um glicocorticóide, co-

mo metilprednisolona. Em uma modalidade preferida, o antagonista de VLA-1 e o segundo agente são administrados ao mesmo tempo. Em uma modalidade preferida, o antagonista de VLA-1 é administrado primeiro, e o segundo agente é administrado em segundo lugar. Em uma modalidade preferida, o segundo agente é administrado primeiro, e o antagonista de VLA-1 é administrado em segundo lugar.

Em uma modalidade, o método também inclui a avaliação do sujeito quanto a um critério de SCI aqui descrito. Em algumas modalidades, a avaliação é realizada pelo menos 1 hora, por exemplo, pelo menos 2, 4, 6, 8, 12, 24 ou 48 horas ou pelo menos 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 10 semanas, 13 semanas, 20 semanas ou mais, após a administração do antagonista de VLA-1. O sujeito pode ter sido avaliado em um ou mais dos seguintes períodos: antes do início do tratamento; durante o tratamento; ou após um ou mais elementos do tratamento terem sido administrados. A avaliação pode incluir a avaliação da necessidade de tratamento adicional com o mesmo antagonista de VLA-1 ou de tratamento adicional com agentes adicionais. Em uma modalidade preferida, se for obtido um resultado pré-selecionado da avaliação, procede-se a uma etapa adicional, por exemplo, o sujeito recebe a administração de outro tratamento ou se realiza outra avaliação ou teste.

Em um aspecto, a exposição apresenta um antagonista de VLA-1 para uso no tratamento de SCI, por exemplo, conforme aqui descrito. O antagonista pode ser um antagonista de VLA-1 aqui descrito, por exemplo, um anticorpo contra VLA-1 aqui descrito. Em outro aspecto, a exposição apresenta o uso de um antagonista de VLA-1 para a fabricação de um medicamento para o tratamento de SCI, por exemplo, conforme aqui descrito. O antagonista pode ser um antagonista de VLA-1 aqui descrito, por exemplo, um anticorpo contra VLA-1 aqui descrito.

Em um aspecto, a exposição apresenta um recipiente que inclui um antagonista de VLA-1, por exemplo, um anticorpo contra VLA-1, e um rótulo com instruções para uso do antagonista no tratamento de SCI.

Conforme aqui usado, o termo "tratamento", "tratar" ou "tratando"

refere-se à administração de uma terapia em uma quantidade, maneira e/ou modo eficaz para melhorar uma condição, sintoma ou parâmetro associado a um transtorno (por exemplo, acidente vascular cerebral, TBI ou SCI) ou para reduzir o início, progressão ou exacerbação do transtorno (incluindo lesão secundária causada pelo transtorno, por exemplo, acidente vascular cerebral, TBI ou SCI), em um grau estatisticamente significativo ou em um grau detectável por aqueles versados na técnica. Portanto, o tratamento pode obter benefícios terapêuticos e/ou profiláticos. Uma quantidade, maneira ou modo eficaz pode variar dependendo do sujeito e pode ser adaptada ao sujeito. Conforme aqui usado, "tratamento" também engloba o tratamento profilático de sujeitos com elevado risco de acidente vascular cerebral, por exemplo um sujeito que tenha experimentado um ataque isquêmico transitório. Em uma modalidade preferida, o antagonista de VLA-1 é administração após a lesão isquêmica. Em uma modalidade preferida, o antagonista de VLA-1 é administração após o sujeito ter tido um acidente vascular cerebral.

Conforme aqui usado, "uma quantidade eficaz para tratar" ou uma "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de um antagonista de VLA-1 que seja eficaz, por administração de uma dose única ou de múltiplas doses a um sujeito, para melhorar ou tratar profilaticamente uma condição, sintoma ou parâmetro associado a um transtorno ou para reduzir o início, progressão ou exacerbação do transtorno, em um grau estatisticamente significativo ou em um grau detectável por aqueles versados na técnica. Por exemplo, no contexto de um acidente vascular cerebral, "uma quantidade eficaz para tratar" é uma quantidade suficiente para reduzir o tamanho de um infarto, por exemplo, em pelo menos 5, 10, 15, 20, 40, 50, 60, 70 ou 80% ou mais, no tecido neuronal do cérebro, com relação ao tamanho do infarto em um sujeito não tratado. Alternativamente, "uma quantidade eficaz para tratar" é uma quantidade suficiente para melhorar sintomas em um ou mais critérios de avaliação de acidente vascular cerebral, TBI ou SCI aqui descritos em pelo menos 5, 10, 15, 20, 40, 50, 60, 70 ou 80% ou mais.

Conforme aqui usado, "acidente vascular cerebral" é um termo

genérico que se refere a condições causadas pela oclusão ou hemorragia de um ou mais vasos sanguíneos que suprem o cérebro, levando à morte celular. "Acidente vascular cerebral isquêmico", conforme aqui usado, refere-se a um acidente vascular cerebral causado por uma oclusão de um ou mais vasos sanguíneos que suprem o cérebro. Tipos de acidente vascular cerebral isquêmico incluem, por exemplo, acidente vascular cerebral embólico, acidente vascular cerebral cardioembólico, acidente vascular cerebral trombótico, trombose de grandes vasos, infarto lacunar, acidente vascular cerebral de artéria-artéria e acidente vascular cerebral criptogênico. "Acidente vascular cerebral hemorrágico", conforme aqui usado, refere-se a um acidente vascular cerebral causado por hemorragia de um ou mais vasos sanguíneos que suprem o cérebro. Tipos de acidente vascular cerebral hemorrágico incluem, por exemplo, acidente vascular cerebral subdural, acidente vascular cerebral intraparenquimal, acidente vascular cerebral epidural e acidente vascular cerebral subaracnóide.

Conforme aqui usado, "lesão cerebral traumática" ou "TBI" refere-se a lesão ao cérebro causada por força física ou trauma. TBI pode ser primária ou secundária. "TBI primária" ocorre imediatamente após a força física ou trauma e pode resultar, por exemplo, em hematoma expansivo, hemorragia subaracnóide, edema cerebral, pressão intracraniana elevada e hipóxia cerebral. "TBI secundária" pode ocorrer durante um período de horas a dias após a força física ou trauma e pode levar a eventos secundários graves (por exemplo, acidente vascular cerebral). TBI é definida como "leve", quando um paciente tem uma contagem entre 13 e 15 na Escala de Coma de Glasgow (GCS). TBI leve pode estar associada a uma perda de consciência (LOC) durante 5 minutos ou menos após a força física ou trauma e/ou amnésia durante um período de 10 minutos ou menos após a força física ou trauma. TBI é definida como "moderada a grave", quando o paciente tem uma contagem de menos de 13 na GCS.

Conforme aqui usado, "lesão da medula espinhal" ou "SCI" refere-se a uma lesão traumática mantida da medula espinhal e/ou da área em torno dela. A medula espinhal pode ser comprimida, cortada ou contundida,

levando a lesão física ou fisiológica dos axônios e afetando a condução de impulsos neuroelétricos ao longo do comprimento dos axônios afetados. Grandes populações de axônios, incluindo seus corpos celulares associados, podem morrer, causando perda de comunicação entre o cérebro e os nervos periféricos. SCI leva, portanto, a uma perda súbita de função motora completa ou parcial, cuja extensão depende da localização da lesão. SCI superior (cervical) pode resultar em perda total da função motora, quadriplegia, perda de controle respiratório e/ou colapso cardiovascular. SCI inferior (torácica) pode resultar em paraplegia, sem envolver disfunção dos braços ou respiratória.

Todas as patentes, pedidos de patentes e referências são aqui incorporadas por referência em suas inteirezas. Em caso de conflito, prevalece o presente pedido.

Os detalhes de uma ou mais modalidades da invenção são apresentados nos desenhos anexos e descrição abaixo. Outras características, objetos e vantagens da invenção ficarão claros com a descrição e desenhos e com as reivindicações.

DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A FIG. 1A é um gráfico da avaliação de comportamento após MCAO.

A FIG. 1B é um gráfico da porcentagem do hemisfério infartado em camundongos de controle e tratamento com anticorpo anti-VLA-1 após MCAO.

A FIG. 1C é um gráfico do volume de infarto em camundongos de controle e tratamento com anticorpo anti-VLA-1 após MCAO.

A FIG. 1D é um gráfico da porcentagem de edema em camundongos de controle e tratamento com anticorpo anti-VLA-1 após MCAO.

A FIG. 2A é um gráfico do volume de infarto em camundongos de controle e tratamento com anticorpo anti-VLA-1 após MCAO.

A FIG. 2B é um gráfico da porcentagem de edema em camundongos de controle e tratamento com anticorpo anti-VLA-1 após MCAO.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Os resultados aqui apresentados mostram que um bloqueio do anticorpo contra VLA-1 pode reduzir o tamanho do infarto *in vivo* em um modelo de isquemia cerebral. Os resultados demonstram, entre outras coisas, que a administração de um antagonista de VLA-1, por exemplo, um anticorpo contra VLA-1, pode reduzir a lesão isquêmica no SNC, particularmente lesão isquêmica traumática. Portanto, um antagonista de VLA-1, por exemplo, um anticorpo contra VLA-1, pode ser administrado para tratar acidente vascular cerebral, lesão cerebral traumática (TBI) e lesão da medula espinhal (SCI), por exemplo, isoladamente ou em combinação com outro tratamento, assim como outras lesões isquêmicas.

VLA-1

Integrinas são uma superfamília de receptores de superfície celular que medeiam a adesão célula a célula e célula a matriz. Sabe-se que essas proteínas fornecem ancoragem, assim como sinais para o crescimento celular, migração e diferenciação durante o desenvolvimento e reparo tissular. Foram implicadas em processos imunes e inflamatórios.

Integrinas são proteínas heterodiméricas compostas por duas cadeias polipeptídicas não covalentemente ligadas, α e β . A terminação amino de cada cadeia forma uma cabeça globular que contribui para a ligação intercadeias e ligação com o ligante. As cabeças globulares estão conectadas aos segmentos transmembrana por pedúnculos. As caudas citoplasmáticas normalmente têm menos de 50 resíduos de aminoácidos de comprimento. Subfamílias de integrina foram originalmente definidas com base em qual subunidade β era usada para formar os heterodímeros. As integrinas contendo $\beta 1$ também são chamadas moléculas VLA, referindo-se a antígenos de "ativação muito tardia". VLA-1 a VLA-6 se referem a membros da subfamília $\beta 1$ contendo $\alpha 1$ a $\alpha 6$ (isto é, CD49a a CD49f), respectivamente. Para uma revisão geral, veja *Cellular and Molecular Immunology*, eds. Abul K. Abbas et al., W. B. Saunders Company, Philadelphia, PA, 2000.

Sabe-se que colágeno (ambos os tipos I e IV) e laminina são ligantes de integrina $\alpha 1 \beta 1$ (isto é, VLA-1). VLA-1 foi implicado na adesão celular e migração no colágeno (Keely et al., 1995, *J. Cell Sci.* 108: 595-607;

e Gotwals et al., 1996, J. Clin. Invest. 97: 2469-2477); na promoção da contração e reorganização de matrizes de colágeno, um componente crítico da cicatrização de feridas (Gotwals et al., supra ; e Chiro, 1991, Cell 67 : 403-410); e na regulação da expressão de genes envolvidos na remodelagem da matriz extracelular (Riikonen et al., 1995, J. Biol. Chem. 270: 1-5; e Langholz et al., 1995, J. Cell Biol. 131: 1903-1915).

Antagonistas de VLA-1

Vários agentes podem ser usados como antagonistas de VLA-1 para tratar acidente vascular cerebral. Esses agentes incluem anticorpos contra VLA-1 ou contra uma parte de VLA-1, por exemplo, contra a subunidade $\alpha 1$ de VLA-1. Alguns agentes preferidos incluem os anticorpos anti-VLA-1 apresentados nos pedidos de patentes norte-americanas nº 60/283.794, depositado em 14 de abril de 2001, e 60/303.689, depositado em 6 de julho de 2001, e apresentados no WO 02/083854. As exposições desses pedidos são aqui incorporadas por referência em sua inteireza. Outros agentes incluem moléculas pequenas que bloqueiem a interação de VLA-1 a seu ligante, por exemplo, colágeno ou laminina, ou modulem a sinalização celular de integrina para diminuir a atividade celular ou função bioquímica associada a VLA-1. Agentes utilizáveis nos métodos aqui apresentados também incluem aqueles que reduzem a expressão de VLA-1, como por terapia genética e tecnologia anti-sentido.

Anticorpos anti-VLA-1

Antagonistas de VLA-1 exemplificativos incluem anticorpos que se ligam a VLA-1. Em uma modalidade, o anticorpo inibe a interação entre VLA-1 e um ligante de VLA-1 (por exemplo, colágeno), por exemplo, por bloqueio físico da interação, diminuindo a afinidade de VLA-1 e/ou um ligante de VLA-1 por sua contrapartida, rompimento ou desestabilização de complexos de VLA-1, seqüestração de VLA-1 ou busca de VLA-1 para degradação. Em uma modalidade, o anticorpo pode se ligar a VLA-1 em um ou mais resíduos de aminoácidos que participam da interface de ligação VLA-1/ligante. Esses resíduos de aminoácidos podem ser identificados, por exemplo, por varredura de alanina. Em outra modalidade, o anticorpo pode se ligar a resí-

duos que não participam na ligação VLA-1/ligante. Por exemplo, o anticorpo pode alterar uma conformação de VLA-1 e, dessa forma, reduzir a afinidade de ligação, ou o anticorpo pode bloquear estericamente a ligação VLA-1/ligante. Em uma modalidade, o anticorpo pode reduzir a ativação de um evento ou atividade mediada por VLA-1.

Conforme aqui usado, o termo "anticorpo" refere-se a uma proteína que inclui pelo menos uma região variável de imunoglobulina, por exemplo, uma seqüência de aminoácidos que apresente um domínio variável de imunoglobulina ou uma seqüência de domínio variável de imunoglobulina. Por exemplo, um anticorpo pode incluir uma região variável de cadeia pesada (H) (aqui abreviada como VH), e uma região variável de cadeia leve (L) (aqui abreviada como VL). Em outro exemplo, um anticorpo inclui duas regiões variáveis de cadeia pesada (H) e duas regiões variáveis de cadeia leve (L). O termo "anticorpo" engloba fragmentos de ligação a antígeno de anticorpos (por exemplo, anticorpos de cadeia única, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fd, fragmentos Fv e fragmentos dAb), assim como anticorpos completos, por exemplo, imunoglobulinas intactadas e/ou de comprimento total dos tipos IgA, IgG (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgE, IgD, IgM (assim como seus subtipos). As cadeias leves da imunoglobulina podem ser dos tipos kapa ou lambda. Em uma modalidade, o anticorpo é glicosilado. Um anticorpo can be funcional para citotoxicidade dependente de anticorpo e/ou citotoxicidade mediada por complemento ou pode ser não funcional para uma ou ambas essas atividades.

As regiões VH e VL podem ser adicionalmente subdivididas em regiões de hipervariabilidade, chamadas de "regiões determinantes de complementaridade" ("CDR"), entrecortadas por regiões que sejam mais conservadas, chamadas de "regiões de estrutura principal" (FR). A extensão das FR's e CDR's foi definida com precisão (veja, Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição*, Departamento Norte-americano de Saúde e Serviços Humanos, Publicação NIH No. 91-3242; e Chothia, C. *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917). Usam-se aqui as definições de Kabat. Cada VH e VL é tipicamente composta por três CDR's e

quatro FR's, dispostas da terminação amino para a terminação carboxila na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Um "domínio de imunoglobulina" refere-se a um domínio do domínio variável ou constante de moléculas de imunoglobulina. Domínios de imunoglobulinas tipicamente contêm duas folhas β formadas por cerca de 5 sete filamentos β e uma ligação dissulfeto conservada (veja, por exemplo, A. F. Williams e A. N. Barclay (1988) *Ann. Rev Immunol.* 6:381-405). Uma "seqüência de domínio variável de imunoglobulina" refere-se a uma seqüência de aminoácidos que pode formar uma estrutura suficiente para posicionar 10 seqüências de CDR em uma conformação adequada para ligação a antígeno. Por exemplo, a seqüência pode incluir toda ou parte da seqüência de aminoácidos de um domínio variável de ocorrência natural. Por exemplo, a seqüência pode omitir um, dois ou mais aminoácidos N ou C terminais, aminoácidos internos, pode incluir uma ou mais inserções ou aminoácidos 15 terminais adicionais ou pode incluir outras alterações. Em uma modalidade, um polipeptídio que inclui uma seqüência de domínio variável de imunoglobulina pode se associar a outra seqüência de domínio variável de imunoglobulina para formar uma estrutura de ligação de alvo (ou "sítio de ligação a antígeno"), por exemplo, uma estrutura que interaja com VLA-1.

20 A cadeia VH ou VL do anticorpo também pode incluir toda ou parte de uma região constante de cadeia pesada ou leve, para, dessa maneira, formar uma cadeia de imunoglobulina pesada ou leve, respectivamente. Em uma modalidade, o anticorpo é um tetrâmero de duas cadeias pesadas de imunoglobulina e duas cadeias leves de imunoglobulina. As cadeias 25 pesadas e leves de imunoglobulinas podem ser conectadas por ligações dissulfeto. A região constante de cadeia pesada tipicamente inclui três domínios constantes, CH1, CH2 e CH3. A região constante de cadeia leve tipicamente inclui um domínio CL. A região variável das cadeias pesadas e leves contém um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos tipicamente medeiam a ligação do anticorpo a tecidos ou 30 fatores do hospedeiro, incluindo várias células do sistema imune (por exemplo, células efectoras) e o primeiro componente (Clq) do sistema complemen-

to clássico.

Uma ou mais regiões de um anticorpo podem ser humanas, efetivamente humanas ou humanizadas. Por exemplo, uma ou mais das regiões variáveis podem ser humanas ou efetivamente humanas. Por exemplo, uma
5 ou mais das CDRs, por exemplo, HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, e LC CDR3, podem ser humanas. Cada uma das CDRs de cadeia leve pode ser humana. HC CDR3 pode ser humana. Uma ou mais das regiões de estrutura principal podem ser humanas, por exemplo, FR1, FR2, FR3, e FR4 da HC ou LC. Em uma modalidade, todas as regiões de
10 estrutura principal são humanas, por exemplo, derivadas de uma célula somática humana, por exemplo, uma célula hematopoiética que produza imunoglobulinas ou uma célula não hematopoiética. Em uma modalidade, as seqüências humanas são seqüências de linhagem germinativa, por exemplo, codificadas por um ácido nucléico de linhagem germinativa. Uma ou mais
15 das regiões constantes podem ser humanas, efetivamente humanas ou humanizadas. Em outra modalidade, pelo menos 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95 ou 98% das regiões de estrutura principal (por exemplo, FR1, FR2, e FR3, coletivamente, ou FR1, FR2, FR3, e FR4, coletivamente) ou o anticorpo inteiro podem ser humanas, efetivamente humanas ou humanizadas. Por exemplo,
20 FR1, FR2, e FR3 coletivamente podem ser pelo menos 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 98 ou 99% idênticas ou completamente idênticas a uma seqüência humana codificada por um segmento de linhagem germinativa humana.

Uma região variável de imunoglobulina "efetivamente humana" é uma região variável de imunoglobulina que inclui um número suficiente de
25 posições de aminoácidos de estrutura principal humana, de modo que a região variável de imunoglobulina não provoque uma resposta imunogênica em um ser humano normal. Um anticorpo "efetivamente humano" é um anticorpo que inclui um número suficiente de posições de aminoácidos humanas, de modo que o anticorpo não provoque uma resposta imunogênica em
30 um ser humano normal.

Uma região variável de imunoglobulina "humanizada" é uma região variável de imunoglobulina que é modificada de modo que a forma mo-

dificada provoque uma resposta imune menor em um ser humano do que a forma não modificada, por exemplo, é modificada para incluir um número suficiente de posições de aminoácidos de estrutura principal humana de modo que a região variável de imunoglobulina não provoque uma resposta imunogênica em um ser humano normal. Descrições de imunoglobulinas "humanizadas" incluem, por exemplo, as patentes norte-americanas nº 6.407.213 e 5.693.762. Em alguns casos, imunoglobulinas humanizadas podem incluir um aminoácido não humano em uma ou mais posições de aminoácidos da estrutura principal.

10 Anticorpos anti-VLA-1 também podem ser anticorpos quiméricos, por exemplo, gerados por manipulação de um anticorpo cognato (por exemplo, murídeo, de rato ou coelho). Por exemplo, um anticorpo cognato pode ser alterado por tecnologia de DNA recombinante, de modo que parte das ou todas as regiões de articulação e/ou constantes das cadeias pesadas e/ou

15 leves sejam substituídas pelos componentes correspondentes de um anticorpo de outra espécie (por exemplo, de um ser humano). Em geral, os domínios variáveis do anticorpo manipulado permanecem idênticos ou substancialmente assim aos domínios variáveis dos anticorpo cognato. Esse anticorpo manipulado é chamado de anticorpo quimérico e é menos antigênico

20 que o anticorpo cognato quando administrado a um indivíduo da espécie da qual a região de articulação e/ou constante é derivada (por exemplo, um ser humano). Métodos de preparação de anticorpos quiméricos são bem conhecidos na técnica. Regiões constantes preferidas incluem, mas não se limitam a, aquelas derivadas de IgG1 e IgG4.

25 Anticorpos anti-VLA-1 exemplificativos utilizáveis nos métodos aqui descritos incluem, por exemplo, o anticorpo monoclonal AJH10 (ATCC PTA-3580; depositado em 2 de agosto 2001 na Coleção Americana de Cultura de Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209), hAQC2 (ATCC PTA-3275; depositado em 18 de abril de 2001), ha-

30 AQC2 (ATCC PTA-3274; depositado em 18 de abril de 2001), hsAQC2 (ATCC PTA-3356; depositado em 4 de maio de 2001) e mAQC2 (ATCC PTA-3273). Todos esses anticorpos foram depositados de acordo com o

Tratado de Budapeste. Outros anticorpos anti-VLA-1 incluem, por exemplo, o anticorpo monoclonal 1B3 (ATCC HB-10536) descrito nas patentes norte-americanas nº 5.391.481 e 5.788.966, e Ha31/8.

Geração de anticorpo

5 Anticorpos que se ligam a VLA-1 podem ser gerados por vários meios, incluindo imunização, por exemplo, usando um animal ou métodos in vitro, como exposição em fagos. Todo ou parte do VLA-1 pode ser usado como um imunógeno ou como um alvo para seleção. Por exemplo, VLA-1 ou seu fragmento, por exemplo, toda ou parte de uma subunidade $\alpha 1$ de VLA-1, 10 por exemplo, um domínio $\alpha 1$ -I, pode ser usado como um imunógeno. Em uma modalidade, o animal imunizado contém células produtoras de imunoglobulinas com loci de imunoglobulinas naturais, humanos ou parcialmente humanos. Em uma modalidade, o animal não humano inclui pelo menos uma parte de um gene de imunoglobulina humano. Por exemplo, é possível ma- 15 nipular cepas de camundongos deficientes na produção de anticorpos de camundongo com grandes fragmentos de loci de Ig humana. Usando-se a tecnologia de hibridoma, podem-se produzir e selecionar anticorpos monoclonais específicos para antígenos derivados dos genes com a especificidade desejada. Veja, por exemplo, XENOMOUSE™, Green *et al.* (1994) *Nat. Gen.* 7:13-21; US 2003-0070185; patente norte-americana nº 5.789.650; e 20 WO 96/34096.

 Anticorpos não humanos contra VLA-1 também podem ser produzidos, por exemplo, em um roedor. O anticorpo não humano pode ser humanizado, por exemplo, conforme descrito em EP 239 400; patentes norte- 25 americanas nº 6.602.503; 5.693.761; e 6.407.213, desimmunizados ou de outra forma modificados para torná-los efetivamente humanos.

 A EP 239 400 (Winter *et al.*) descreve a alteração de anticorpos por substituição (com uma dada região variável) de suas regiões determinantes de complementaridade (CDRs) para uma espécie com aquelas de 30 outra. Tipicamente, CDRs de um anticorpo não humano (por exemplo, murídeo) são substituídas nas regiões correspondentes de um anticorpo humano usando-se tecnologia de ácidos nucléicos recombinantes para produzir se-

qüências que codificam o anticorpo substituído desejado. Segmentos do gene de região constante humana do isotipo desejado (normalmente gama I para CH e kapa para CL) podem ser adicionados, e os genes de cadeias pesadas e leves humanizadas podem ser co-expressados em células de mamíferos para produzir anticorpo humanizado solúvel. Outros métodos para a humanização de anticorpos também podem ser usados. Por exemplo, outros métodos podem ser responsáveis pela estrutura tridimensional do anticorpo, posições na estrutura principal que estejam em proximidade tridimensional com determinantes de ligação e seqüências peptídicas imunogênicas. Veja, por exemplo, WO 90/07861; patentes norte-americanas nº 5.693.762; 5.693.761; 5.585.089; e 5.530.101; Tempest *et al.* (1991) *Biotechnology* 9:266-271; e patente norte-americana nº 6.407.213.

Às vezes, a transferência direta de CDRs para uma estrutura principal humana leva a uma perda de afinidade de ligação a antígeno do anticorpo resultante. Isso é porque, em alguns anticorpos cognatos, certos aminoácidos dentro das regiões de estrutura principal interagem com as CDRs e, dessa forma, influenciam a afinidade de ligação global a antígeno do anticorpo. Nesses casos, seria crítico introduzir "mutações retrógradadas" nas regiões de estrutura principal do anticorpo receptor para reter a atividade de ligação a antígeno do anticorpo cognato. A abordagem geral de preparação de mutações retrógradadas é conhecida na técnica. Por exemplo, Queen *et al.*(supra), Co *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA88 : 2869-2873(1991), e WO 90/07861 (Protein Design Labs Inc.) descrevem uma abordagem que envolve duas etapas chave. Na primeira, as regiões V humanas de estrutura principal são escolhidas por análise computadorizada quanto à homologia ótima de seqüência de proteína com a região V de estrutura principal do anticorpo murídeo cognato. Então, a estrutura terciária da região V murídea é modelada por computador para se visualizarem resíduos de aminoácidos de estrutura principal que provavelmente interajam com as CDRs murídeas, e esses resíduos de aminoácidos murídeos são, então, superpostos à estrutura principal humana homóloga. Com essa abordagem em duas etapas, há vários critérios para projetar anticorpos humanizados. O primeiro critério é

usar, como receptor humano, a estrutura principal de uma imunoglobulina humana particular que normalmente seja homóloga à imunoglobulina doadora não humana ou usar uma estrutura principal de consenso de muitos anticorpos humanos. O segundo critério é usar o aminoácido doador, em vez do receptor, se o resíduo receptor humano for incomum, e o resíduo doador for típico para seqüências humanas em um resíduo específico da estrutura principal. O terceiro critério é usar a o resíduo de aminoácido de estrutura principal doador, em vez do receptor, nas posições imediatamente adjacentes às CDRs.

10 Também se pode usar uma abordagem diferente, conforme descrita, por exemplo, em Tempest, *Biotechnology* 9: 266-271 (1991). Com essa abordagem, as estruturas principais de região V derivadas de cadeias pesadas e leves NEWM e REI, respectivamente, são usadas para enxertia de CDR sem introdução radical de resíduos de camundongo. Uma vantagem do uso dessa abordagem é que as estruturas tridimensionais de regiões variáveis NEWM e REI são conhecidas por cristalografia de raios X e, portanto, interações específicas entre CDRs e resíduos de estrutura principal de região V podem ser prontamente modelados.

20 Anticorpos monoclonais completamente humanos que se ligam a VLA-1 podem ser produzidos, por exemplo, usando-se esplenócitos humanos previamente preparados *in vitro*, conforme descrito por Boerner *et al.* (1991) *J. Immunol.* 147:86-95. Eles também podem ser preparados por clonagem de repertório, conforme descrito por Persson *et al.* (1991) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88:2432-2436, ou por Huang e Stollar (1991) *J. Immunol. Methods* 141:227-236; também a patente norte-americana nº 5.798.230. Grandes bibliotecas de exposição em fagos humanas não imunizadas também podem ser usadas para isolar anticorpos de alta afinidade que possam ser desenvolvidos como substâncias terapêuticas humanas usando-se tecnologia de fagos padronizada (veja, por exemplo, Hoogenboom *et al.* (1998) *Immunotechnology* 4:1-20; Hoogenboom *et al.* (2000) *Immunol Today* 2:371-8; e US 2003-0232333). Outros métodos para a produção de anticorpos completamente humanos envolvem o uso de animais não humanos que te-

nham loci Ig endógenos inativados e sejam transgênicos para genes de cadeias pesadas e cadeias leves de anticorpos humanos não rearranjados. Esses animais transgênicos podem ser imunizados com α 1-I ou seu fragmento antigênico desejado, e se preparam, então, hibridomas a partir de

5 células B derivados deles. Esses métodos são descritos, por exemplo, nas várias publicações/patentes da GenPharm/Medarex (Palo Alto, CA) referentes a camundongos transgênicos contendo miniloci de Ig humanos (por exemplo, patente norte-americana nº 5.789.650); as várias publicações/patentes da Abgenix (Fremont, CA) com relação a XENOMICE (por

10 exemplo, patentes norte-americanas nº 6.075.181; 6.150.584 e 6.162.963; Green et al., *Nature Genetics* 7: 13-21 (1994); e Mendez et al., 15 (2): 146-56 (1997)); e as várias publicações/patentes da Kirin (Japão) referentes a camundongos "transômicos" (por exemplo, EP 843 961, e Tomizuka et al., *Nature Genetics* 16: 133-1443 (1997)).

15 Produção de Anticorpo e Proteína

Anticorpos e outras proteínas aqui descritas podem ser produzidas em células procarióticas e eucarióticas. Em uma modalidade, os anticorpos (por exemplo, scFv's) são expressados em uma célula de levedura como *Pichia* (veja, por exemplo, Powers et al. (2001) *J. Immunol. Methods*

20 251:123-35), *Hanseula* ou *Saccharomyces*.

Anticorpos, particularmente anticorpos de comprimento total, por exemplo, IgG's, podem ser produzidos em células de mamíferos. Células hospedeiras de mamíferos exemplificativas incluem as de Ovário de Hamster Chinês (células CHO) (incluindo células CHO dhfr-, descritas em Urlaub e

25 Chasin (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, usadas com um marcador selecionável DHFR, por exemplo, conforme descrito em Kaufman e Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), linhagens celulares linfocíticas, por exemplo, células de mieloma NS0 e células SP2, células COS, K562, e uma célula de um animal transgênico, por exemplo, um mamífero transgênico.

30 Por exemplo, a célula é uma célula epitelial mamária.

Além da seqüência de ácido nucléico que codifica o domínio de imunoglobulina, os vetores de expressão recombinantes podem ser portado-

res de seqüências de ácidos nucléicos adicionais, como seqüências que regulam a replicação do vetor em células hospedeiras (por exemplo, origens de replicação) e genes marcadores selecionáveis. O gene marcador selecionável facilita a seleção de células hospedeiras nas quais o vetor tenha sido introduzido (veja, por exemplo, patentes norte-americanas nº 4.399.216; 4.634.665; e 5.179.017). Genes marcadores selecionáveis exemplificativos incluem o gene da diidrofolato redutase (DHFR) (para uso em células hospedeiras *dhfr* com seleção por metotrexato/amplificação) e o gene *neo* (para seleção de G418).

10 Em um sistema exemplificativo para expressão recombinante de um anticorpo (por exemplo, um anticorpo de comprimento total ou sua parte de ligação a antígeno), um vetor de expressão recombinante que codifica tanto a cadeia pesada do anticorpo, quanto a cadeia leve do anticorpo é introduzido em células CHO *dhfr*- por transfecção mediada por fosfato de cálcio. Dentro do vetor de expressão recombinante, os genes de cadeias pesadas e leves de anticorpo são cada um opercionalmente ligados a elementos reguladores intensificadores/promotores (por exemplo, derivados de SV40, CMV, adenovírus e outros, como um elemento regulador intensificador de CMV/promotor de AdMLP ou um elemento regulador intensificador de SV40/promotor de AdMLP) para acionar altos níveis de transcrição dos genes. O vetor de expressão recombinante também é portador de um gene de DHFR, que permite a seleção de células CHO que tenham sido transfectadas com o vetor usando seleção em metotrexato/amplificação. As células hospedeiras transformantes selecionadas são cultivadas para permitir a expressão das cadeias pesadas e leves de anticorpo, e se recupera anticorpo intacto do meio de cultura. Usam-se técnicas de biologia molecular padronizadas para preparar o vetor de expressão recombinante, para transfectar as células hospedeiras, para selecionar os transformantes, para cultivar as células hospedeiras e para recuperar o anticorpo do meio de cultura. Por exemplo, alguns anticorpos podem ser isolados por cromatografia de afinidade com uma Proteína A ou Proteína G.

Os anticorpos também podem incluir modificações, por exemplo,

modificações que alterem a função Fc, por exemplo, para diminuir o remover a interação com um receptor de Fc ou com C1q ou com ambos. Por exemplo, a região constante de IgG1 humana pode sofrer uma mutação em um ou mais resíduos, por exemplo, um ou mais dos resíduos 234 e 237, por exemplo, de acordo com a numeração na patente norte-americana nº 5.648.260. Outras modificações exemplificativas incluem aquelas descritas na patente norte-americana nº 5.648.260.

Para algumas proteínas que incluem um domínio Fc, o sistema de produção de anticorpo/proteína pode ser projetado para sintetizar anticorpos ou outras proteínas em que a região Fc seja glicosilada. Por exemplo, o domínio Fc de moléculas de IgG é glicosilado na asparagina 297 no domínio CH2. O domínio Fc também pode incluir outras modificações após a tradução eucariótica. Em outros casos, a proteína é produzida em uma forma que não seja glicosilada.

Os anticorpos também podem ser produzidos por um animal transgênico. Por exemplo, a patente norte-americana nº 5.849.992 descreve um método para a expressão de um anticorpo na glândula mamária de um mamífero transgênico. Constrói-se um transgene que inclui um promotor específico para leite e seqüências de ácidos nucleicos que codificam o anticorpo de interesse, por exemplo, um anticorpo aqui descrito, e uma seqüência de sinal para secreção. O leite produzido por fêmeas desses mamíferos transgênicos inclui, secretada nele, a proteína de interesse, por exemplo, um anticorpo. A proteína pode ser purificada do leite ou, para algumas aplicações, usada diretamente.

25 Outras Frações

Os anticorpos aqui descritos também podem compreender outras frações para efetuar as funções desejadas. Por exemplo, os anticorpos podem incluir uma fração de toxina (por exemplo, toxóide tetânico ou ricina) ou um radionuclídeo (por exemplo, ^{111}In ou ^{90}Y) para matar células alvo dos anticorpos (veja, por exemplo, a patente norte-americana nº 6.307.026). Os anticorpos podem compreender uma fração (por exemplo, biotina, frações fluorescentes, frações radioativas, etiquetas de histidina e outras) para um

fácil isolamento ou detecção. Os anticorpos também podem compreender uma fração que possa prolongar sua meia-vida sérica, por exemplo, uma fração polietileno glicol (PEG).

Antagonistas Polipeptídicos

5 Além dos anticorpos, antagonistas de VLA-1 utilizáveis nos métodos aqui descritos incluem polipeptídios que inibem a função de VLA-1, por exemplo, por bloqueio da interação entre VLA-1 e seus ligantes fisiológicos como colágeno, por exemplo, colágeno I, III ou IV ou laminina ou por modulação da sinalização celular dependente de VLA-1.

10 Um antagonista de VLA-1 é um agente que tenha uma ou mais das seguintes propriedades: (1) reveste ou se liga a um antígeno VLA-1 na superfície de uma célula portadora de VLA-1 com uma especificidade suficiente para inibir uma interação VLA-1/ligante de VLA-1, por exemplo, a interação VLA-1/colágeno; (2) reveste ou se liga a um antígeno VLA-1 na superfície de uma célula portadora de VLA-1 com especificidade suficiente para modificar, e de preferência inibir, a transdução de um sinal mediado por VLA-1, por exemplo, sinalização mediada por VLA-1/colágeno; (3) reveste ou se liga a um ligante de VLA-1, por exemplo, colágeno (por exemplo, colágeno I, III ou IV) ou laminina, com uma especificidade suficiente para inibir a interação VLA-1/ligante de VLA-1; (4) reveste ou se liga a um ligante de VLA-1, por exemplo, colágeno (por exemplo, colágeno I, III ou IV) ou laminina, com especificidade suficiente para modificar, e de preferência inibir, a transdução de sinalização de VLA-1 mediada por ligante de VLA-1, por exemplo, sinalização de VLA-1 mediada por colágeno. Em modalidades preferidas, o antagonista de VLA-1 tem uma ou ambas as propriedades 1 e 2. Em outras modalidades preferidas, o antagonista de VLA-1 tem uma ou ambas as propriedades 3 e 4.

Para fins dos métodos aqui descritos, qualquer agente capaz de se ligar a antígenos VLA-1 na superfície de células portadoras de VLA-1 e que bloqueie eficazmente ou revista antígenos VLA-1 é considerado um equivalente do anticorpo monoclonal usado nos presentes exemplos.

Conforme aqui discutido, os antagonistas de VLA-1 usados nos

métodos aqui descritos não se limitam a anticorpos ou derivados de anticorpos, mas podem ser outras moléculas, por exemplo, formas solúveis de outras proteínas que se ligam a VLA-1, por exemplo, as proteínas de ligação natural a VLA-1. Esses antagonistas incluem colágeno I, III ou IV; peptídeos de ligação a VLA-1 de colágeno I, III ou IV; laminina; e peptídeos de ligação a VLA-1 de laminina (veja, por exemplo, Pfaff et al., Eur. J. Biochem. 225:975-84, 1994; Colognato-Pyke et al., J. Biol. Chem. 270: 9398-9406, 1995; e Colognato et al., J. Biol. Chem. 272: 29330-29336, 1997). Por exemplo, peptídeos de ligação a VLA-1 de colágeno I, III ou IV podem conter a seqüência de aminoácidos GFOGER (veja, por exemplo Knight et al., J. Biol. Chem. 275:35-40, 2000), GROGER (veja, por exemplo, Kim et al., J. Biol. Chem. 280:32512-32520, 2005) ou uma seqüência de aminoácidos conservadoramente substituída similar. Outros antagonistas incluem peptídeos de VLA-1, como um peptídeo contendo a seqüência de aminoácidos VQRGGR ou uma seqüência de aminoácidos conservadoramente substituída similar, e miméticos peptídicos, como aqueles descritos em WO 01/96365; patentes norte-americanas nº 6.326.403 e 6.001.961. Esses antagonistas podem agir por competição com a proteína de ligação a superfície celular pelo VLA-1 ou por outra alteração da função de VLA-1.

20 Antagonistas de Molécula Pequena

Além de anticorpos, antagonistas de VLA-1 utilizáveis nos métodos aqui descritos incluem quaisquer compostos não anticorpos que inibam a função de VLA-1, por exemplo, por bloqueio da interação entre VLA-1 e seus ligantes fisiológicos como colágeno ou por modulação da sinalização celular dependente de VLA-1. Exemplos desses compostos são compostos de pequena molécula, por exemplo, aqueles descritos em Weitz-Schmidt et al., Nat. Med. 7:687-692, 2001). Esses compostos podem ser identificados usando-se, por exemplo, bibliotecas combinatórias de pequenas moléculas, bibliotecas combinatórias de anticorpos, projetos racionais de fármacos e síntese orgânica tradicional, seguido por triagem de antagonismo usando-se qualquer método conhecidos na técnica.

Em um exemplo, VLA-1 expressado recombinantemente ou seus

fragmentos funcionais podem ser usados para a triagem de bibliotecas de compostos naturais, semi-sintéticos ou sintéticos. Tipos particularmente úteis de bibliotecas incluem bibliotecas combinatórias de pequenas moléculas orgânicas, bibliotecas de exposição em fagos e bibliotecas combinatórias de peptídios.

Métodos para a determinação se componentes da biblioteca se ligam a um polipeptídeo particular são bem conhecidos na técnica. Em geral, o alvo polipeptídico é fixado a um suporte sólido por ligação não específica ou específica. A ligação específica pode ser realizada usando-se um anticorpo que reconheça a proteína que está ligada a um suporte sólido, como uma placa ou coluna. Alternativamente, a ligação específica pode ser mediante uma etiqueta de epítopo, como ligação de GST a um suporte sólido revestido com glutationa ou a ligação de proteína de fusão de IgG a um suporte sólido de Proteína A.

Alternativamente, o VLA-1 expressado recombinantemente ou suas partes podem ser expressadas na na superfície do fato, como M13. Uma biblioteca em fase móvel é incubada sob condições que promovam a ligação específica entre o alvo e um composto. Compostos que se ligam ao alvo podem ser, então, identificados. Alternativamente, a biblioteca é fixada a um suporte sólido, e o alvo polipeptídico está na fase móvel.

A ligação entre um composto e o alvo VLA-1 pode ser determinada por inúmeros métodos. A ligação pode ser identificada por técnicas como ELISAs ou RIAs competitivos, por exemplo, em que a ligação de um composto a um alvo reduza a ligação de um anticorpo ao mesmo alvo. Esses métodos são bem conhecidos na técnica. Outro método é usar BiaCORE para medir interações entre um alvo e um composto usando métodos fornecidos pelo fabricante. Um método preferido é a triagem automatizada de alta produção; veja, por exemplo, Burbaum et al., *Curr Opin Chem Biol.* 1: 72-8 (1997), e Schullek et al., *Anal Biochem.* 246: 20-9 (1997).

Uma vez que um composto candidato que se ligue a um alvo seja identificado, pode-se determinar se o composto inibe a atividade do alvo. Por exemplo, o composto candidato pode ser usado para triagem por sua

capacidade de inibir a adesão dependente de K562- α 1 a colágeno IV. Veja, por exemplo, pedido norte-americano nº 60/303.689 e WO 02/083854. Em outro exemplo, o composto candidato é usado para competir com a ligação de um anticorpo anti-VLA-1 a (1) uma célula que expresse VLA-1 ou (2) uma molécula contendo a integrina α 1 β 1 ou seu fragmento, por exemplo, o domínio α I-I.

Outro método para identificar antagonistas de VLA-1 é usar a estrutura de VLA-1 expressado recombinantemente para um projeto racional de fármaco. Veja, por exemplo, WO 01/73444.

10 Antagonistas de ácidos nucleicos

Em certas implementações, usam-se antagonistas de ácidos nucleicos para diminuir a expressão de um gene endógeno que codifique VLA-1. Em uma modalidade, o antagonista de ácido nucleico é um siRNA que tenha como alvo mRNA que codifica VLA-1. Outros tipos de ácidos nucleicos de bloqueio também podem ser usados, por exemplo, um dsRNA, uma ribozima, um formador de hélice tripla, um aptâmero ou um ácido nucleico anti-sentido.

siRNAs são pequenos RNAs de fita dupla (dsRNAs) que incluem opcionalmente partes pendentes. Por exemplo, a região de dúplex de um siRNA tem cerca de 18 a 25 nucleotídeos de comprimento, por exemplo, cerca de 19, 20, 21, 22, 23 ou 24 nucleotídeos de comprimento. Tipicamente, as seqüências de siRNA são exatamente complementares ao mRNA alvo. dsRNAs e siRNAs, em particular, podem ser usados para silenciar a expressão de genes em células de mamíferos (por exemplo, células humanas). Veja, por exemplo, Clemens *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6499–6503; Billy *et al.* (2001) *Proc. Natl. Sci. USA* 98:14428–14433; Elbashir *et al.* (2001) *Nature*. 411:494-8; Yang *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:9942–9947, U.S. 20030166282, 20030143204, 20040038278, e 20030224432.

Agentes anti-sentido podem incluir, por exemplo, de cerca de 8 a cerca de 80 nucleobases (isto é, de cerca de 8 a cerca de 80 nucleotídeos), por exemplo, de cerca de 8 a cerca de 50 nucleobases ou de cerca de 12 a

cerca de 30 nucleobases. Compostos anti-sentido incluem ribozimas, oligonucleotídeos de seqüência guia externa (EGS) (oligozimas) e outros RNAs catalíticos curtos ou oligonucleotídeos catalíticos que se hibridizam ao ácido nucléico alvo e modulem sua expressão. Compostos anti-sentido podem incluir um trecho de pelo menos oito nucleobases consecutivas que sejam complementares a uma seqüência no gene alvo. Um oligonucleotídeo não precisa ser 100% complementar a sua seqüência de ácido nucléico alvo para ser especificamente hibridizável. Um oligonucleotídeo é especificamente hibridizável quando a ligação do oligonucleotídeo ao alvo interfere com a função normal function da molécula alvo, causando uma perda de utilidade, e há um grau suficiente de complementaridade para evitar ligação não específica do oligonucleotídeo a seqüências não alvo sob condições em que se deseje ligação específica, isto é, sob condições fisiológicas, no caso de ensaios in vivo ou tratamento terapêutico ou, no caso de ensaios in vitro, sob condições que sejam conduzidas os ensaios.

A hibridização de oligonucleotídeos anti-sentido com mRNA (por exemplo, um mRNA que codifique VLA-1) pode interferir com uma ou mais das funções normais de mRNA. As funções de mRNA a sofrerem interferência incluem todas as funções chave, como, por exemplo, translocação do RNA para o sítio de tradução de proteína, tradução da proteína a partir do RNA, splicing do RNA para fornecer uma ou mais espécies de mRNA e atividade catalítica em que possa se envolver o RNA. A ligação de proteína(s) específica(s) ao RNA também pode sofrer interferência por hibridização de oligonucleotídeo anti-sentido ao RNA.

Compostos anti-sentido exemplificativos incluem seqüências de DNA ou RNA que se hibridizam especificamente ao ácido nucléico alvo, por exemplo, o mRNA que codifica VLA-1. A região complementar pode se estender entre cerca de 8 e cerca de 80 nucleobases. Os compostos podem incluir uma ou mais nucleobases modificadas. Nucleobases modificadas podem incluir, por exemplo, pirimidinas 5-substituídas, como 5-iodouracila, 5-iodocitosina, e C5-propinil pirimidinas como C5-propinilcitosina e C5-propiniluracila. Outras nucleobases modificadas adequadas incluem N⁴ --(C₁

-C₁₂) alquilaminocitosinas e N⁴,N⁴ --(C₁ -C₁₂) dialquilaminocitosinas. Nucleobases modificadas também podem incluir 7-substituídas-8-aza-7-desazapurinas e 7-substituídas-7-desazapurinas como, por exemplo, 7-iodo-7-desazapurinas, 7-ciano-7-desazapurinas, 7-aminocarbonil-7-desazapurinas. Exemplos dessas incluem 6-amino-7-iodo-7-desazapurinas, 6-amino-7-ciano-7-desazapurinas, 6-amino-7-aminocarbonil-7-desazapurinas, 2-amino-6-hidróxi-7-iodo-7-desazapurinas, 2-amino-6-hidróxi-7-ciano-7-desazapurinas, e 2-amino-6-hidróxi-7-aminocarbonil-7-desazapurinas. Além disso, N⁶ --(C₁ -C₁₂) alquilaminopurinas e N⁶,N⁶ --(C₁ -C₁₂) dialquilaminopurinas, incluindo N⁶ -metilaminoadenina e N⁶,N⁶ -dimetilaminoadenina, também são nucleobases modificadas adequadas. Da mesma forma, outras purinas 6-substituídas incluindo, por exemplo, 6-tioguanina podem constituir nucleobases modificadas apropriadas. Outras nucleobases adequadas incluem 2-tiouracila, 8-bromoadenina, 8-bromoguanina, 2-fluoroadenina e 2-fluoroguanina. Derivados de qualquer uma das nucleobases modificadas acima mencionadas também são apropriados. Substituintes de qualquer um dos compostos precedentes podem incluir C₁ -C₃₀ alquila, C₂ -C₃₀ alcenila, C₂ -C₃₀ alcinila, arila, aralquila, heteroarila, halo, amino, amido, nitro, tio, sulfonila, carboxila, alcóxi, alquilcarbonila, alcóxicarbonila e outros.

Descrições de outros tipos de agentes de ácidos nucléicos também estão disponíveis. Veja, por exemplo, patentes norte-americanas nº 4.987.071; 5.116.742; e 5.093.246; Woolf et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA; Antisense RNA and DNA*, D.A. Melton, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988); 89:7305-9; Haselhoff e Gerlach (1988) *Nature* 334:585-59; Heleno, C. (1991) *Anticancer Drug Des.* 6:569-84; Heleno (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36; e Maher (1992) *Bioassays* 14:807-15.

Os ácidos nucléicos aqui descritos, por exemplo, um ácido nucléico anti-sentido aqui descrito, podem ser incorporados em um construto de gene a ser usado como uma parte do protocolo de terapia genética para distribuir ácidos nucléicos que possam ser usados para expressar e produzir

agentes, por exemplo, ácidos nucleicos anti-sentido dentro das células. Construtos de expressão desses componentes podem ser administrados em qualquer veículo biologicamente eficaz, por exemplo, qualquer formulação ou composição capaz de distribuir o gene componente a célula in vivo. As

5 abordagens incluem a inserção do presente gene em vetores virais, incluindo retrovírus recombinantes, adenovírus, vírus adeno-associados, lentivírus e vírus da herpes simples-1, ou plasmídios bacterianos ou eucarióticos re-

10 combinantes. Vetores virais transfectam diretamente as células; DNA plasmídico pode ser distribuído com o auxílio de, por exemplo, lipossomos catiônicos (lipofectina) ou derivatizados (por exemplo, conjugados a anticorpo),

conjugados de polilisina, gramacidina S, invólucros virais artificiais ou outros desses veículos intracelulares, assim como injeção direta do construto de gene ou uma precipitação com CaPO_4 realizada in vivo.

Uma abordagem preferida para introdução in vivo de ácido nu-

15 cléico em uma célula é com o uso de um vetor viral contendo ácido nucleico, por exemplo, um cDNA. A infecção de células com um vetor viral tem a vantagem de uma grande proporção das células alvo poderem receber o ácido nucleico. Além disso, moléculas codificadas dentro do vetor viral, por exemplo, por um cDNA contido no vetor viral, são eficientemente expressadas em

20 células que tenham captado o ácido nucleico do vetor viral.

Vetores de retrovírus e vetores de vírus adeno-associados podem ser usados como um sistema de distribuição de gene recombinante para a transferência de genes exógenos in vivo, particularmente em seres humanos. Esses vetores proporcionam uma distribuição eficiente de genes em

25 células, e os ácidos nucleicos transferidos são integrados de maneira estável no DNA cromossomal do hospedeiro. Protocolos para a produção de retrovírus recombinantes e para a infecção de células in vitro ou in vivo com esses vírus podem ser encontrados em *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F.M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Se-

30 ções 9.10-9.14, e outros manuais de laboratório padronizados. Exemplos de retrovírus adequados incluem pLJ, pZIP, pWE e pEM, que são conhecidos por aqueles versados na técnica. Exemplos de linhagens de vírus de acondi-

cionamento adequados para a preparação tanto de sistemas retrovirais eotrópicos, quanto anfotrópicos incluem \square Crip, \square Cre, \square 2 e \square Am. Retrovíruses foram usados para introduzir vários genes em muitos tipos de células diferentes, incluindo células epiteliais, in vitro e/ou in vivo (veja, por exemplo, Eglitis *et al.* (1985) *Science* 230:1395-1398; Danos e Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6460-6464; Wilson *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3014-3018; Armentano *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6141-6145; Huber *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8039-8043; Ferry *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8377-8381; Chowdhury *et al.* (1991) *Science* 254:1802-1805; van Beusechem *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7640-7644; Kay *et al.* (1992) *Human Terapia genética* 3:641-647; Dai *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10892-10895; Hwu *et al.* (1993) *J. Immunol.* 150:4104-4115; patentes norte-americanas nº 4.868.116 e 4.980.286; Pedido PCT WO 89/07136; Pedido PCT WO 89/02468; Pedido PCT WO 89/05345; e Pedido PCT WO 92/07573).

Outro sistema de distribuição viral de genes utiliza vetores derivados de adenovírus. Veja, por exemplo, Berkner *et al.* (1988) *BioTechniques* 6:616; Rosenfeld *et al.* (1991) *Science* 252:431-434; e Rosenfeld *et al.* (1992) *Cell* 68:143-155. Vetores adenovirais adequados derivados de adenovírus cepa Ad tipo 5 dl324 ou outras cepas de adenovírus (por exemplo, Ad2, Ad3, Ad7 etc.) são conhecidos por aqueles versados na técnica.

Ainda outro sistema de vetor viral utilizável para a distribuição do presente gene é o vírus vírus adeno-associado (AAV). Veja, por exemplo, Flotte *et al.* (1992) *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7:349-356; Samulski *et al.* (1989) *J. Virol.* 63:3822-3828; e McLaughlin *et al.* (1989) *J. Virol.* 62:1963-1973.

Aptâmeros

Aptâmeros são seqüências oligonucleotídicas curtas que podem ser usadas para reconhecer e se ligar especificamente a quase qualquer molécula, incluindo proteínas de superfície celular. A evolução sistemática de ligantes pelo processo de enriquecimento exponencial (SELEX) é poderosa e pode ser usada para identificar prontamente esses aptâmeros. Aptâ-

meros podem ser preparados para uma ampla gama de proteínas de importância para terapia e diagnóstico, como fatores de crescimento e antígenos de superfície celular. Esses oligonucleotídeos se ligam a seus alvos com afinidades e especificidades similares a anticorpos (veja Ulrich (2006) *Handb Exp Pharmacol.* 173:305-26). Macugen® é um aptâmero terapêutico aprovado, que também é o primeiro agente anti-angiogênico aprovado para um transtorno comum dos olhos.

Fatores de transcrição artificiais

Fatores de transcrição artificiais também podem ser usados para regular a expressão de VLA-1. O fator de transcrição artificial pode ser projetado ou selecionado de uma biblioteca, por exemplo, quanto à capacidade de se ligar a uma seqüência em um gene endógeno que codifica VLA-1, por exemplo, em uma região reguladora, por exemplo, o promotor. Por exemplo, o fator de transcrição artificial pode ser preparado por seleção *in vitro* (por exemplo, usando-se exposição em fagos, patente norte-americana nº 6.534.261) ou *in vivo* ou por projeto baseado em um código de reconhecimento (veja, por exemplo, WO 00/42219 e patente norte-americana nº 6.511.808). Veja, por exemplo, Rebar *et al.* (1996) *Methods Enzymol* 267:129; Greisman e Pabo (1997) *Science* 275:657; Isalan *et al.* (2001) *Nat. Biotechnol* 19:656; e Wu *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:344 para, entre outros, métodos para a criação de bibliotecas de domínios de dedos de zinco variados.

Opcionalmente, um fator de transcrição artificial pode ser fusionado a um domínio regulador de transcrição, por exemplo, um domínio de ativação para ativar a transcrição ou um domínio de repressão para reprimir a transcrição. Em particular, domínios de repressão podem ser usados para diminuir a expressão de genes endógenos que codifiquem VLA-1. O próprio fator de transcrição artificial pode ser codificado por um ácido nucléico heterólogo que seja distribuído a uma célula, ou a própria proteína pode ser distribuída a uma célula (veja, por exemplo, patente norte-americana nº 6.534.261). O ácido nucléico heterólogo que inclui uma seqüência que codifique o fator de transcrição artificial pode estar operacionalmente ligado a um

promotor induzível, por exemplo, para permitir o controle fino do nível do fator de transcrição artificial na célula, por exemplo, células neuronais ou gliais, por exemplo, no ou próximo ao sítio da lesão do acidente vascular cerebral ou outra lesão aqui descrita.

5 Lesões Isquêmicas

Isquemia se refere a uma redução ou abolição do suprimento sangüíneo a um tecido. Os métodos aqui descritos podem ser usados para tratar lesões associadas a isquemia ou "lesões isquêmicas". Lesões isquêmicas podem incluir lesões, por exemplo, aos rins, fígado, pulmões, pâncreas, músculo esquelético, intestinos, coração e cérebro. Lesões isquêmicas podem estar associadas a ou ser causadas por, por exemplo, infarto agudo do miocárdio, angioplastia eletiva, enxerto de desvio da artéria coronariana, cirurgia envolvendo desvio cardíaco ou transplante de órgãos ou tecidos (por exemplo, transplante cardíaco), rejeição de tecidos após transplantes, doença de enxerto versus hospedeiro, acidente vascular cerebral, trauma na cabeça, afogamento, sépsis, parada cardíaca, choque, aterosclerose, hipertensão, doença cardíaca induzida por cocaína, doença cardíaca induzida pelo fumo, insuficiência cardíaca, hipertensão pulmonar, hemorragia, síndrome do vazamento capilar (como síndrome do desconforto respiratório de crianças e adultos), insuficiência de múltiplos sistemas de órgãos, um estado de baixa pressão oncótica de colóide (como inanição, anorexia nervosa ou insuficiência hepática com produção diminuída de proteínas séricas), anafilaxia, hipotermia, lesão pelo frio (por exemplo, devida a perfusão hipotérmica ou congelamento), síndrome hépato-renal, delirium tremens, uma lesão de esmagamento, insuficiência mesentérica, doença vascular periférica, claudicação, queimaduras, eletrocução, vasodilatação induzida por excesso de fármacos, vasoconstrição induzida por excesso de fármacos, exposição a radiação (por exemplo, durante fluorescopia ou formação de imagens radiográficas) ou exposição a alta energia, por exemplo, exposição a luz laser. A vasodilatação induzida por excesso de fármacos pode ser causada, por exemplo, por nitroprusseto, hidralazona, diazóxido, um bloqueador do canal de cálcio ou um anestésico geral. A vasoconstrição induzida por

excesso de fármacos pode ser causada, por exemplo, por neosinefrina, isoproterenol, dopamina, dobutamina ou cocaína.

Lesão de Isquemia-Reperfusão

"Lesão de isquemia-reperfusão" refere-se a uma lesão que resulta do reestabelecimento (reperfusão) do fluxo sanguíneo para uma região do corpo após uma interrupção temporária do fluxo. Por exemplo, a lesão de isquemia-reperfusão pode ocorrer durante certos procedimentos cirúrgicos, como reparo de aneurismas aórticos e transplante de órgãos. Clinicamente, a lesão de isquemia-reperfusão pode se manifestar por complicações como, por exemplo, disfunção pulmonar, incluindo síndrome do desconforto respiratório do adulto, disfunção renal, coagulopatias consumptivas, incluindo trombocitopenia, deposição de fibrina na microvascularização e coagulopatia intravascular disseminada, lesão da medula espinhal transitória ou permanente, arritmias cardíacas e eventos isquêmicos agudos, disfunção hepática, incluindo lesão hepatocelular aguda e necrose, disfunção gastrointestinal, incluindo hemorragia e/ou infarto e disfunção de múltiplos órgãos (MSOD) ou síndromes de desconforto inflamatório agudo (SIRS). A lesão pode ocorrer nas partes do corpo às quais o suprimento sanguíneo foi interrompido ou pode ocorrer em partes completamente supridas com sangue durante o período de isquemia.

Acidente Vascular Cerebral

Acidente vascular cerebral é um termo genérico para lesão cerebral aguda resultante de doença ou lesão dos vasos sanguíneos. O acidente vascular cerebral pode ser classificado em pelo menos duas categorias: acidente vascular cerebral hemorrágico (resultante do vazamento de sangue para fora dos vasos sanguíneos normais) e acidente vascular cerebral isquêmico (isquemia cerebral devida à falta de suprimento de sangue). Alguns eventos que podem causar acidente vascular cerebral isquêmico incluem trombose, embolismo, e hipoperfusão sistêmica (com isquemia e hipóxia resultantes).

Acidente vascular cerebral em geral causa morte e lesão neuronal no cérebro por privação de oxigênio e eventos secundários. A área do

cérebro que morre como resultado da falta de suprimento sangüíneo ou outra lesão é chamada de infarto. Em alguns casos, os tratamentos aqui descritos podem ser usados para reduzir ou minimizar o tamanho de um infarto, por exemplo, por redução de eventos secundários que causem morte ou lesão neuronal.

5 A obstrução de uma artéria cerebral resultante de um trombo que tenha se acumulado na parede de uma artéria do cérebro em geral é chamada de trombose cerebral. No embolismo cerebral, o material oclusivo que bloqueia a artéria cerebral surge a jusante na circulação (por exemplo, 10 um êmbolo é transportado para a artéria cerebral proveniente do coração). Como é difícil discernir se um acidente vascular cerebral é causado por trombose ou embolismo, usa-se o termo tromboembolismo para cobrir esses tipos de acidente vascular cerebral. Pode surgir hipoperfusão sistêmica como conseqüência de níveis sangüíneos diminuídos, hematócrito reduzido, 15 baixa pressão sangüínea ou incapacidade do coração de bombear sangue adequadamente.

Agentes trombolíticos, como ativador de plasminogênio tissular (t-PA), foram usados no tratamento de acidente vascular cerebral tromboembólico. Essas moléculas funcionam por lise do trombo que causa a isquemia. 20 Acredita-se que esses fármacos sejam mais úteis se administrados tão logo quanto possível após o acidente vascular cerebral agudo (de preferência, em até 3 horas), para restaurar pelo menos parcialmente o fluxo sangüíneo cerebral e para manter a viabilidade neuronal. Pode-se usar um antagonista de VLA-1, em vez de ou em combinação com, esses agentes trombolíticos, para se obter um benefício terapêutico em um sujeito que tenha experimentado um acidente vascular cerebral tromboembólico. 25

Como os agentes trombolíticos exacerbam o sangramento, seu uso em acidente vascular cerebral hemorrágico é contra-indicado. Entretanto, um antagonista de VLA-1 pode ser usado para proporcionar benefícios 30 terapêuticos em casos de acidente vascular cerebral hemorrágico.

Além disso, um antagonista de VLA-1 pode ser administrado como uma terapia profilática para acidente vascular cerebral ou como seu

componente, por exemplo, a um sujeito que tenha experimentado um TIA ou esteja exibindo sintomas de TIA. Quando os sintomas de acidente vascular cerebral durante menos de 24 horas, e o sujeito se recupera completamente, diz-se que o sujeito sofreu um ataque isquêmico transitório (TIA). Os sintomas de TIA incluem um prejuízo temporário da fala, visão, sensação ou movimento. Como se acredita que um TIA freqüentemente seja um prelúdio de um acidente vascular cerebral em escala total, sujeitos que tenham sofrido um TIA são candidatos à terapia profilática para acidente vascular cerebral, por exemplo, com um antagonista de VLA-1 isoladamente ou em combinação com outro agente, por exemplo, um agente anticoagulante (por exemplo, cumarina e heparina) ou um agente antiplaquetário (como aspirina e ticlopidina).

Outros Tratamentos Para Acidente Vascular Cerebral

Um tratamento para acidente vascular cerebral pode envolver o uso de um ou mais antagonistas de VLA-1 que possam ser usados em combinação com um ou mais tratamentos para acidente vascular cerebral. Os tratamentos podem ser administrados ao mesmo tempo, mas também em momentos separados, por exemplo, em momentos separados que estejam dentro de um intervalo especificado, por exemplo, dentro das mesmas 48, 24, 12, 6, 2 ou 1 horas. Além disso, os tratamentos podem usar modos de administração distintos.

Tratamentos que podem ser administrados em combinação com um antagonista de VLA-1 incluem: um agente trombolítico (por exemplo, estreptoquinase, complexo ativador de plasminogênio-estreptoquinase acilado (APSAC), uroquinase, ativador de uroquinase-plasminogênio de cadeia única (scu-PA), agentes antiinflamatórios, enzimas do tipo trombina de venenos de cobras, como ancrod, inibidores de trombina, ativador de plasminogênio tissular (t-PA) e variantes biologicamente ativas de cada um dos acima); um anticoagulante (por exemplo, warfarin ou heparina); fármaco antiplaquetário (por exemplo, aspirina); um inibidor de glicoproteína IIb/IIIa; um glicosaminoglicano; cumarina; GCSF; melatonina; um inibidor de caspase; antioxidantes (por exemplo, NXY-059, veja Lees et al., (2006) *N. Engl. J. Med* 354, 588-

600), um neuroprotetor (por exemplo, um antagonista do receptor de NMDA e um antagonista canabinóide), um anticorpo anti-CD18; um anticorpo anti-CD11a; um anticorpo anti-ICAM-1; um anticorpo anti-VLA-4, um anticorpo anti-TWEAK, um anticorpo anti-TWEAK-R, endarterectomia carotídea; angioplastia; inserção de um stent; e medicina alternativa (por exemplo, acupuntura, medicina tradicional chinesa, meditação, massagem tratamento com oxigênio hiperbárico ou pedagogia condutiva).

Exemplos particulares de tratamentos de combinação incluem a administração de um antagonista de VLA-1 a um sujeito que tenha experimentado um acidente vascular cerebral pouco depois do início dos sintomas do acidente vascular cerebral e ao mesmo tempo que outro tratamento, como t-PA. No dia seguinte, o sujeito também pode começar tratamentos diários com um fármaco antiplaquetário para proteger contra um futuro acidente vascular cerebral e posteriormente receber doses adicionais do antagonista de VLA-1, para manter a biodisponibilidade do antagonista de VLA-1. Como outro exemplo, um sujeito que tenha experimentado um TIA pode começar o tratamento com antagonista de VLA-1 imediatamente após o diagnóstico de TIA, a uma dose que proporcione benefícios biológicos durante pelo menos uma semana, e, então, começar a terapia antiplaquetária no dia seguinte.

20 Fatores de Risco Para Acidente Vascular Cerebral

Fatores de risco para acidentes vasculares cerebrais podem ser usados para identificar um sujeito que possa receber uma dose profilática de um antagonista de VLA-1 ou que deva ser monitorizado quanto a sinais adicionais de que é necessário tratamento com um antagonista de VLA-1. Em alguns casos, trata-se o sujeito se o sujeito tiver dois, três ou quatro ou mais fatores de risco, por exemplo, os fatores de risco relacionados abaixo.

Pressão sangüínea elevada: Pressão sangüínea elevada (140/90 mm Hg ou mais) é um fator de risco altamente significativo para acidente vascular cerebral.

30 Uso de tabaco: Fumar cigarros é um importante fator de risco prevenível para acidente vascular cerebral. A nicotina e o monóxido de carbono na fumaça do tabaco reduzem a quantidade de oxigênio no sangue.

Também lesam as paredes de vasos sangüíneos, tornam mais provável a formação de coágulos. O uso de alguns tipos de pílulas de controle de natalidade combinado com o uso de cigarros aumenta grandemente o risco de acidente vascular cerebral.

5 Diabetes melito: Diabetes é definido como uma glicose plasmática em jejum (açúcar sangüíneo) de 126 mg/dL ou mais medida em duas ocasiões. Embora o diabetes seja tratável, tê-lo aumenta o risco de acidente vascular cerebral de uma pessoa. Muitas pessoas com diabetes também têm pressão sangüínea elevada, colesterol sangüíneo elevado e estão acima do peso. Esses fatores adicionais também aumentam o risco de acidente vascular cerebral.

15 Doença da artéria carótida ou outra: As artérias carótidas no pescoço suprem o sangue para o cérebro. Uma artéria carótida estreitada por depósitos gordurosos de aterosclerose (acúmulos de placas nas paredes da artéria) pode ficar bloqueada por um coágulo sangüíneo. A doença da artéria carótida também é chamada de estenose da artéria carótida.

20 Doença de artérias periféricas: Sujeitos com doença de artérias periféricas têm um risco mais elevado de doença da artéria carótida, o que eleva seu risco de acidente vascular cerebral. Doença de artérias periféricas é o estreitamento de vasos sangüíneos portadores de sangue para os músculos das pernas e braços. É causada por acúmulos de placas gordurosas nas paredes das artérias.

25 Fibrilação atrial eleva o risco de acidente vascular cerebral. As câmaras superiores do coração tremulam, em vez de bater eficazmente, o que pode deixar o sangue empoeçar e coagular. Se o coágulo se soltar, entra na corrente sangüínea e aloja em uma artéria que leva ao cérebro, resulta um acidente vascular cerebral.

30 Outra doença cardíaca: Sujeitos com doença cardíaca coronariana ou insuficiência cardíaca têm um maior risco de acidente vascular cerebral do que aqueles com corações que funcionem normalmente. Cardiomiopatia dilatada (um coração aumentado), doença da válvula cardíaca e alguns tipos de defeitos cardíacos congênitos também elevam o risco de acidente

vascular cerebral.

Ataques isquêmicos transitórios (TIAs): TIAs são "acidentes vasculares cerebrais de aviso" que produzem sintomas do tipo acidente vascular cerebral, mas sem lesão duradoura. O reconhecimento e tratamento de TIAs pode reduzir o risco de um grande acidente vascular cerebral.

Certos transtornos sangüíneos: A elevada contagem de hemácias espessa o sangue e torna coágulos mais prováveis. Isso eleva o risco de acidente vascular cerebral. Anemia falciforme (também chamada de anemia de células em foice) é um transtorno genético que afeta principalmente afro-americanos. Hemácias "em forma de foice" são menos capazes de transportar oxigênio para os tecidos e órgãos do corpo e tendem a grudar nas paredes dos vasos sangüíneos, o que pode bloquear artérias do cérebro e causar um acidente vascular cerebral.

Colesterol sangüíneo elevado: Um alto nível de colesterol total no sangue (240 mg/dL ou mais) é um importante fator de risco para doença coronariana, o que eleva o risco de acidente vascular cerebral. Altos níveis de colesterol LDL (mais de 100 mg/dL) e triglicérides (gorduras sangüíneas, 150 mg/dL ou mais) aumentam o risco de acidente vascular cerebral em pessoas com doença cardíaca coronariana anterior, acidente vascular cerebral isquêmico ou ataque isquêmico transitório (TIA). Baixos níveis (menos de 40 mg/dL) de colesterol HDL também elevam o risco de acidente vascular cerebral.

Inatividade física e obesidade: Ser inativo, obeso ou ambos pode aumentar o risco de pressão sangüínea elevada, colesterol sangüíneo elevado, diabetes, doença cardíaca e acidente vascular cerebral.

Abuso de substâncias: Beber quantidades excessivas de álcool e o uso de drogas intravenosas também aumenta o risco de acidente vascular cerebral.

Elevação da idade: Embora sujeitos de todas as idades, incluindo crianças, tenham acidentes vasculares cerebrais, quanto mais velho o sujeito, maior o risco de acidente vascular cerebral. Por exemplo, o risco pode ser muito maior com mais de 55, 60, 70, 80 ou 85 anos.

Sexo (gênero): O acidente vascular cerebral é mais comum em homens do que em mulheres. Na maioria dos grupos etários, mais homens do que mulheres têm um acidente vascular cerebral em um dado ano. Entretanto, as mulheres representam mais da metade de todas as mortes por acidente vascular cerebral. Mulheres grávidas têm um risco mais elevado de acidente vascular cerebral.

Hereditariedade (história familiar): O risco de acidente vascular cerebral é maior se um pai, avô, irmã ou irmão tiver tido um acidente vascular cerebral. Da mesma forma, certos antecedentes étnicos podem levar a um risco aumentado de acidente vascular cerebral.

Acidente vascular cerebral ou ataque cardíaco anterior: Um sujeito que tenha tido um acidente vascular cerebral ou um ataque cardíaco tem um risco muito mais elevado de ter subseqüentemente um acidente vascular cerebral.

15 CrITÉRIOS de Avaliação de Acidente Vascular Cerebral

A capacidade de um antagonista de VLA-1 de tratar um sujeito com ou com risco de acidente vascular cerebral pode ser avaliada, subjetiva ou objetivamente, por exemplo, usando-se vários critérios. Há inúmeras ferramentas de avaliação disponíveis para proporcionar a avaliação.

20 Ferramentas exemplificativas de avaliação pré-hospital de acidente vascular cerebral incluem a Escala de Acidente Vascular Cerebral de Cincinnati e a Triagem Pré-hospital de Acidente Vascular Cerebral de Los Angeles (LAPSS). Escalas de avaliação aguda incluem, por exemplo, a Escala Neurológica Canadense (CNS), a Escala de Coma de Glasgow (GCS),
25 a Escala de Acidente Vascular Cerebral Hemisférica, a Escala de Hunt e Hess, a Escala de Acidente Vascular Cerebral de Mathew, o Mini-Exame de Estado Mental (MMSE), a Escala de Acidente Vascular Cerebral do NIH (NIHSS), a Escala de Acidente Vascular Cerebral de Orgogozo, a Classificação do Projeto de Acidente Vascular Cerebral da Comunidade de Oxfordshire (Bamford) e a Escala de Acidente Vascular Cerebral Escandinava. Escalas de avaliação funcional incluem a Escala de Equilíbrio de Berg, a Escala de Rankin Modificada, a Escala de Impacto de Acidente Vascular Cerebral

(SIS) e a Medida de Qualidade de Vida Específica Para Acidente Vascular Cerebral (SS-QOL). Ferramentas de avaliação de resultado incluem a Classificação de Resultado de Acidente Vascular Cerebral da Associação Americana de Cardiologia (AHA SOC), o Índice de Barthel, a Medida de Independência Funcional (FIM™), a Escala de Resultado de Glasgow (GOS) e os Levantamentos de Saúde SF-36™ e SF-12™. Outros testes de diagnóstico e triagem incluem o Teste do Braço de Pesquisa de Ação, a Escala de Demência de Blessed, o Teste de Informação-Memória-Concentração na Demência de Blessed, os critérios do DSM-IV para o diagnóstico de demência vascular, a Contagem de Isquemia de Hachinski, a Escala de Classificação de Depressão de Hamilton, os critérios de NINDS - AIREN para o diagnóstico de demência vascular, a Contagem de Prognóstico de Orpington, o Teste de Orientação-Memória-Concentração de Short, o esquema de classificação de Trombose em Infarto do Miocárdio, formação de imagem por MRI (por exemplo, técnicas de formação de imagem por difusão e perfusão (Henninger et al., Stroke 37:1283-1287, 2006), técnicas de MRI ponderadas por difusão (DWI) e formação de imagens sensíveis a fluxo, por exemplo, recuperação de inversão atenuada por fluido (FLAIR)), formação de imagens funcionais e espectroscópicas (Koroshetz, Ann. Neurol. 39:283-284, 1996), e PET (Heiss et al., Cerebrovasc. Brain Metab. Rev. 5:235-263, 1993).

Pode-se realizar uma avaliação antes e/ou depois da administração de um antagonista de VLA-1.

Lesão Cerebral Traumática

Um antagonista de VLA-1 aqui descrito pode ser usado para tratar lesão cerebral traumática. Uma lesão ao cérebro por uma força física é genericamente chamada de lesão cerebral traumática (TBI). O efeito resultante de TBI causa alteração de processos cerebrais normais atribuíveis a alterações na estrutura e/ou função do cérebro. Há dois tipos básicos de lesão cerebral: lesão com a cabeça aberta e lesão com a cabeça fechada. Em uma lesão com a cabeça aberta, um objeto, como uma bala, penetra no crânio e lesa o tecido cerebral. A lesão com a cabeça fechada normalmente é causada por um movimento rápido da cabeça, durante o qual o cérebro é

sacudido para frente e para trás, batendo contra o crânio. As lesões com a cabeça fechada são as mais comuns das duas, freqüentemente resultando de acidentes envolvendo veículos motorizados ou quedas. Em uma lesão com a cabeça fechada, a força bruta ou o movimento violeto lesa o cérebro.

5 A tensão desse movimento rápido rompe e estira fibras nervosas ou axônios, rompendo conexões entre diferentes partes do cérebro. Na maioria dos casos, um coágulo sangüíneo ou hematoma resultante pode empurrar o cérebro em torno dele, elevando a pressão dentro da cabeça. Lesões com cabeça aberta ou fechada podem causar danos graves ao cérebro, resultando na

10 necessidade de atenção médica imediata.

Dependendo do tipo de força que atinge a cabeça, podem resultar várias lesões, como qualquer uma das seguintes: sacudidura do cérebro dentro do crânio, concussão, fratura do crânio, contusão, hematoma subdural ou lesão axonal difusa. Embora a experiência de cada pessoa seja diferente, há problemas comuns que muitas pessoas com TBI enfrentam. As

15 possibilidades documentadas incluem dificuldades de concentração, resolução de problemas ineficaz, problemas de memória de curto e longo prazo e habilidades motoras ou sensoriais prejudicadas, ao ponto de uma incapacidade de efetuar tarefas diárias independentemente, como comer, vestir-se

20 ou tomar banho. O conceito mais amplamente aceito de lesão cerebral divide o processo em eventos primários e secundários. A lesão cerebral primária é considerada mais ou menos completa no momento do impacto, ao passo que a lesão secundária evolui durante um período de horas a dias após o trauma.

25 Lesões primárias são aquelas comumente associadas a situações de emergência, como acidentes de automóveis ou qualquer coisa que cause perda temporária da consciência ou fratura do crânio. Contusões ou lesões do tipo ferida freqüentemente ocorrem sob a localização de um impacto particular. O deslocamento e a rotação do cérebro dentro do crânio

30 após uma lesão com a cabeça fechada resultam em lesão de cisalhamento às fibras nervosas ou axônios de conexão longa do cérebro, o que é chamado de lesão axonal difusa. Lacerações são definidas como o rasgamento dos

lobos frontal e temporal ou de vasos sangüíneos, causado pela rotação do cérebro sobre as saliências dentro do crânio. Hematomas ou coágulos sangüíneos resultam quando vasos pequenos são rompidos pela lesão, Podem ocorrer entre o crânio e o cérebro (hematoma epidural ou subdural) ou dentro da própria substância do cérebro (hematoma intracerebral). Em qualquer caso, se forem suficientemente grandes, comprimirão ou deslocarão o cérebro, lesando estruturas sensíveis dentro do tronco cerebral. Também podem elevar a pressão dentro do crânio e, por fim, interromper o suprimento sangüíneo para o cérebro.

10 Uma lesão secundária retardada no nível celular foi reconhecida como uma importante contribuição para a perda final de tecido que ocorre após a lesão cerebral. Uma cascata de eventos fisiológicos, vasculares e bioquímicos é posta em movimento no tecido lesado. Esse processo envolve uma multiplicidade de sistemas, incluindo possíveis alterações em neuropeptídeos, eletrólitos, como cálcio e magnésio, aminoácidos excitatórios, metabólitos de ácido araquidônico, como as prostagladinas e leucotrienos, e a formação de radicais livres de oxigênio. Essa lesão tissular secundária está na raiz da maioria dos efeitos adversos graves de longo prazo que uma pessoa com lesão cerebral pode experimentar. Procedimentos que minimizem essa lesão podem ser a diferença entre a recuperação a uma condição normal ou quase normal ou incapacidade permanente.

25 A lesão difusa a vasos sangüíneos é cada vez mais implicada como um importante componente da lesão cerebral. A resposta vascular parece ser bifásica. Dependendo da gravidade do trauma, alterações precoces incluem uma elevação inicial na pressão sangüínea, uma perda precoce da regulação automática dos vasos sangüíneos cerebrais e um rompimento transitório da barreira hêmato-encefálica (BBB). O pico das alterações vasculares ocorre aproximadamente seis horas após a lesão, mas podem persistir durante até seis dias. O significado clínico dessas alterações dos vasos sangüíneos ainda não está claro, mas pode se relacionar com um inchamento cerebral retardado que é freqüentemente visto, particularmente em pessoas mais jovens.

O processo pelo qual contusões do cérebro produzem necrose cerebral também é complexo e também se prolonga durante um período de horas. Processos tóxicos incluem a liberação de radicais livres de oxigênio, danos a membranas celulares, abertura de canais de íons a um influxo de cálcio, liberação de citocinas e metabolismo de ácidos graxos livres em substâncias altamente reativas que podem causar espasmo vascular e isquemia. Radicais livres são formados em algum momento em quase todos os mecanismos de lesão secundária. O alvo primário dos radicais livres são os ácidos graxos da membrana celular. Um processo conhecido como peroxidação de lipídios lesa membranas de células neuronais, gliais e vasculares de maneira geometricamente progressiva. Se não controlada, a peroxidação de lipídios se espalha sobre a superfície da membrana celular e, finalmente, leva à morte celular. Assim, radicais livres lesam células endoteliais, rompem a barreira hêmato-encefálica (BBB) e lesam diretamente as células cerebrais, causando edema e alterações estruturais em neurônios e glia. O rompimento da BBB é responsável pelo edema cerebral e exposição de células cerebrais a produtos lesivos transportados pelo sangue.

Insultos sistêmicos secundários (for a do cérebro) podem, conseqüentemente, levar a lesões adicionais do cérebro. Isso é extremamente comum após lesões cerebrais de todos os graus de gravidade, particularmente se estiverem associadas a múltiplas lesões. Assim, pessoas com lesão cerebral podem experimentar combinações de baixo oxigênio sanguíneo, pressão sanguínea, alterações no coração e pulmão, febre, transtornos da coagulação sanguínea e outras alterações adversas a intervalos recorrentes nos dias seguintes à lesão cerebral. Essas ocorrem no momento em que o mecanismo regulatório normal, pelo qual os vasos vasculares cerebrais podem se relaxar para manter um suprimento adequado de oxigênio e sangue durante esses eventos adversos, é prejudicado como resultado do trauma original.

Os protocolos de avaliação imediata são limitados em sua eficiência e confiabilidade e são freqüentemente invasivos. A varredura tomográfica auxiliada por computador (CT) é atualmente aceita como um procedi-

mento diagnóstico padrão para a avaliação de TBI, pois pode identificar muitas anormalidades associadas a lesão cerebral primária, é amplamente disponível e pode ser realizada a um custo relativamente baixo (Marik et al. Chest 122:688-711 2002; McAllister et al. Journal of Clinical e Experimental
5 Neuropsychology 23:775-791 2001). Entretanto, o uso de varredura de CT no diagnóstico e controle de pacientes que se apresentem em departamentos de emergência com TBI pode variar entre as instituições, e os próprios resultados da varredura de CT podem ser maus preditores do desenvolvimento neuropsiquiátrico nos sujeitos com TBI, particularmente no caso de
10 lesão TBI leve (McCullagh et al. Brain Injury 15:489-497 2001).

O tratamento imediato de TBI tipicamente envolve cirurgia para controlar o sangramento no e em torno do cérebro, monitorização e controle da pressão intracraniana, manutenção de um fluxo sanguíneo adequado para o cérebro e tratamento do corpo quanto a outras lesões e infecção. Aqueles com lesões cerebrais leves freqüentemente experimentam sintomas sutis e podem atrasar o tratamento durante dias ou mesmo semanas. Uma vez que um paciente se decida a procurar cuidados médicos, pode-se usar observação, testes neurológicos, imagem de ressonância magnética (MRI),
15 varredura por tomografia de emissão de pósitrons (PET), varredura de CT de emissão de fóton único (SPECT), monitorização do nível de um neurotransmissor no fluido espinhal, varreduras de tomografia computadorizada (CT) e raios X para determinar a extensão da lesão do paciente. O tipo e a gravidade da lesão determinam os cuidados adicionais.

Um antagonista de VLA-1 pode ser usado, isoladamente ou em
25 combinação com outro tratamento, para se conseguir um benefício terapêutico em um sujeito que tenha experimentado uma TBI. Além disso, um antagonista de VLA-1 pode ser administrado como uma terapia profilática para TBI ou como seu componente, por exemplo, a um sujeito que tenha experimentado uma TBI ou esteja exibindo sintomas de uma TBI. Por exemplo, um
30 antagonista de VLA-1 pode ser usado para tratar uma lesão primária, uma lesão secundária ou ambas. Alternativamente, um antagonista de VLA-1 pode ser usado para tratar uma lesão primária e como uma terapia profilática

para uma lesão secundária. Pode-se fazer uma avaliação antes e/ou depois da administração de um antagonista de VLA-1.

Lesão da Medula Espinhal

Um antagonista de VLA-1 aqui descrito pode ser usado para tratar lesão da medula espinhal. Lesão da medula espinhal (SCI) é um insulto à medula espinhal que resulta em uma alteração, temporária ou permanente, de sua função motora, sensorial ou autônoma normal. Tanto estudos clínicos, quanto experimentais evidenciam que a medula espinhal sofre lesões primárias e secundárias após uma SCI aguda. SCI primária surge de rompimento mecânico, transecção, patologia extradural ou tração de elementos neurais. Essa lesão normalmente ocorre com fratura e/ou deslocamento da espinha. Entretanto, SCI primária pode ocorrer na ausência de fratura ou deslocamento da espinha. Lesões penetrantes devidas a balas ou armas também podem causar SCI primária (Burney et al., Arch Surg 128(5): 596-9 (1993)). Mais comumente, fragmentos ósseos deslocados causam lesões penetrantes da medula espinhal ou de nervos espinhais segmentais. Uma patologia extradural também pode causar SCI primária. Hematomas ou abscessos epidurais causam compressão medular aguda e lesão. A compressão da medula espinhal por doença metastática é uma emergência oncológica comum. Tração longitudinal com ou sem flexão e/ou extensão da coluna vertebral pode resultar em SCI primária sem fratura ou deslocamento espinhal. Um antagonista de VLA-1 pode ser usado para tratar uma lesão espinhal primária.

A fisiopatologia de SCI secundária envolve uma multiplicidade de eventos celulares e moleculares que progridem durante os primeiros dias após a lesão (Tator, Brain Pathology 5:407-413 (1995)). A causa mais importante de SCI secundária é a lesão vascular à medula espinhal causada por rompimento arterial, trombose arterial e hipoperfusão devida ao choque. A SCI pode ser mantida mediante isquemia por danos ou comprometimento de artérias espinhais. SCI devida a isquemia pode ocorrer durante uma cirurgia, quando o fluxo sanguíneo aórtico é temporariamente interrompido. Um antagonista de VLA-1 aqui descrito pode ser usado para tratar ou prevenir lesão

SCI secundária.

Lesão da medula espinhal também podem ser causada por toxicidade (Tator, Brain Pathology 5:407-413 (1995)). Uma das toxicidades mais urgentes na lesão da medula espinhal é o acúmulo e subsequente dano exercido pelo neurotransmissor de aminoácido excitatório. Excitotoxicidade induzida por glutamato causa uma elevação do cálcio intracelular. O cálcio intracelular elevado pode, por sua vez, causar ativação de proteases ou lipases dependentes de cálcio, o que causa danos adicionais devidos à ruptura de componentes citoesqueléticos, incluindo neurofilamentos, e a dissolução de membranas celulares. A produção excessiva de ácido araquidônico e eicosanóides, como prostaglandinas, pode estar relacionada à peroxidação de lipídios e radicais livres de oxigênio. A liberação de eicosanóides vasoativos por membranas neuronais lesadas pode, por sua vez, causar isquemia pós-traumática progressiva por indução de vasoespasmo. Opióides endógenos também podem estar envolvidos no processo de lesão secundária por seus efeitos sobre a circulação local ou sistêmica ou por efeitos diretos sobre a medula lesada. Um antagonista de VLA-1 aqui descrito pode ser usado para tratar ou prevenir lesão da medula espinhal resultante de toxicidade.

Edema significativo e progressivo pode se seguir a uma lesão da medula espinhal. Não se sabe se o próprio edema é lesivo ou se é um epifenômeno de outro mecanismo de lesão, como isquemia ou toxicidade do glutamato. O edema pode se espalhar pela medula a partir do sítio da lesão por uma distância considerável rostral e caudalmente, tanto em modelos experimentais, quanto em casos clínicos.

SCI são classificadas como completas e incompletas, com base na extensão da lesão, de acordo com a Escala de Prejuízo da Associação Americana de Lesões Espinhais (ASIA). Na SCI completa, não há nenhuma função sensorial ou motora preservada nos segmentos sacrais mais baixos (Waters et al., Paraplegia 29(9): 573-81(1991)). Na SCI incompleta, a função sensorial ou motora é preservada abaixo do nível da lesão, incluindo os segmentos sacrais mais baixos (Waters et al., Archives of Physical Medicine e Rehabilitation 75(3): 306-11 (1994)). Lesões incompletas da medula pode

evoluir para lesões mais completas. Mais comumente, o nível da lesão sobe um ou dois níveis espinhais durante as horas a dias após o evento inicial.

Outras classificações de SCI incluem síndrome da medula central, síndrome de Brown-Sequard, síndrome da medula anterior, síndrome do cone medular e síndrome da cauda eqüina. A síndrome da medula central freqüentemente está associada a uma lesão na região cervical, levando a maior fraqueza nos membros superiores do que nos membros inferiores, poupando a parte sensorial sacral. A síndrome de Brown-Sequard envolve uma lesão de hemi-seção da medula, causando uma perda proprioceptiva e motora ipsilateral relativamente maior, com perda contralateral de sensibilidade a dor e temperatura. A síndrome da medula anterior freqüentemente está associada a uma lesão que causa perda variável de função motora e sensibilidade à dor e temperatura, ao passo que a propriocepção é preservada. A síndrome do cone medular está associada a lesão à medula sacral e raízes dos nervos lombares. Essa síndrome se caracteriza por arreflexia da bexiga, intestinos e membros inferiores, ao passo que os segmentos sacrais podem ocasionalmente mostrar reflexos preservados (por exemplo, reflexos bulbocavernoso e de micção). A síndrome de cauda eqüina é devida à lesão às raízes nervosas lombo-sacrais no canal espinhal, levando a bexiga, intestino e membros inferiores arreflexivos.

O choque neurogênico pode resultar de SCI (Tator, Brain Pathology 5:407-413 (1995)). Choque neurogênico se refere à tríade hemodinâmica de hipotensão, bradicardia e vasodilação periférica por disfunção autônoma e interrupção do controle do sistema nervoso simpático na SCI aguda, e é diferenciado do choque espinhal e hipovolêmico. O choque hipovolêmico tende a estar associado a taquicardia. O choque espinhal é definido como a perda completa de toda a função neurológica, incluindo reflexos e tônus retal, abaixo de um nível específico que esteja associado a disfunção autônoma. Um aumento inicial da pressão sangüínea é notado, devido à liberação de catecolaminas, seguido por hipotensão. Observa-se paralisia flácida, incluindo do intestino e bexiga, e, às vezes, desenvolve-se priapismo mantido. Esses sintomas tendem a durar várias horas a dias, até que os arcos refle-

xos abaixo do nível da lesão comecem a funcionar novamente.

A atual terapia para SCI busca melhorar a função motora e a sensação em pacientes com o transtorno. Corticosteróides são a base da terapia. Acredita-se que glucocorticóides, como metilprednisolona, reduzam os efeitos secundários de SCI aguda, e o uso de altas doses de metilprednisolona em SCI aguda não penetrante se tornou do padrão de cuidados na América do Norte.

Um antagonista de VLA-1 aqui descrito pode ser usado para tratar qualquer classificação de SCI ou seu sintoma, conforme aqui descrito. Um antagonista de VLA-1 pode ser usado isoladamente ou em combinação com outra terapia conhecida para SCI.

Composições Farmacêuticas

Um antagonista de VLA-1 (por exemplo, um anticorpo anti-VLA-1) pode ser formulado como uma composição farmacêutica, por exemplo, para administração a um sujeito para tratar acidente vascular cerebral, TBI ou SCI. Tipicamente, uma composição farmacêutica inclui um veículo farmacêuticamente aceitável. Conforme aqui usado, "veículo farmacêuticamente aceitável" inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de retardo de absorção e outros, que sejam fisiologicamente compatíveis. A composição pode incluir um sal farmacêuticamente aceitável, por exemplo, um sal de adição de ácido ou um sal de adição de base (veja, por exemplo, Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19).

O antagonista de VLA-1 pode ser formulado de acordo com métodos padronizados. A formulação farmacêutica é uma técnica bem estabelecida e é adicionalmente descrita, por exemplo, em Gennaro (ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel *et al.*, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7^a Ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727); e Kibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 3^a ed. (2000) (ISBN: 091733096X).

Em uma modalidade, um antagonista de VLA-1 (por exemplo, um anticorpo anti-VLA-1) pode ser formulado com materiais de excipiente, como cloreto de sódio, fosfato dibásico de sódio heptaidratado, fosfato monobásico de sódio e um estabilizador. Pode ser fornecido, por exemplo, em
5 uma solução tamponada a uma concentração adequada e pode ser armazenado a 2 – 8°C.

As composições farmacêuticas podem estar em várias formas. Essas incluem, por exemplo, formas de dosagem líquidas, semi-sólidas e sólidas, como soluções líquidas (por exemplo, soluções injetáveis e para
10 infusão), dispersões ou suspensões, comprimidos, pílulas, pós, lipossomos e supositórios. A forma preferida pode depender da via de administração desejada e da aplicação terapêutica. Tipicamente, composições para os agentes aqui descritos estão na forma de soluções injetáveis ou para infusão.

Essas composições podem ser administradas de modo parenteral (por exemplo, injeção intravenosa, subcutânea, intraperitoneal ou intramuscular). As expressões "administração parenteral" e "administrado por via
15 parenteral", conforme aqui usadas, significam modos de administração diferentes da administração enteral e tópica, normalmente por injeção, e incluem, sem limitação, injeção e infusão intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intra-orbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnóide, intra-espinal, epidural, intracerebral, intracraniana, intracarótida e intra-esternal.
20

A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, dispersão, lipossomo ou outra estrutura ordenada adequada para
25 armazenamento estável a alta concentração. Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas por incorporação de um agente aqui descrito na quantidade requerida, em um solvente apropriado, com um ou uma combinação de ingredientes acima enumerados, conforme requerido, seguido por
30 esterilização por filtração. Genericamente, dispersões são preparadas por incorporação de um agente aqui descrito em um veículo estéril que contenha um meio de dispersão básico e os outros ingredientes requeridos dentre a-

queles acima enumerados. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos de preparação preferidos são a secagem a vácuo e a liofilização, que fornecem um pó de um agente aqui descrito mais qualquer ingrediente desejado adicional a partir de uma solução dele previamente esterilizada por filtração. A fluidez apropriada de uma solução pode ser mantida, por exemplo, com o uso de um revestimento como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de uma dispersão e com o uso de surfatantes. A absorção prolongada de composições injetáveis pode ser ocasionada pela inclusão na composição de um agente que retarde a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

Em certas modalidades, o antagonista de VLA-1 pode ser preparado com um veículo que proteja o composto contra liberação rápida, como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, e sistemas de distribuição microencapsulados. Podem-se usar polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, como acetato de etileno vinila, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Muitos métodos para a preparação dessas formulações são patenteados ou genericamente conhecidos. Veja, por exemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Um antagonista de VLA-1 (por exemplo, um anticorpo anti-VLA-1) pode ser modificado, por exemplo, com uma fração que melhore sua estabilização e/ou retenção em circulação, por exemplo, no sangue, soro ou outros tecidos, por exemplo, em pelo menos 1.5, 2, 5, 10 ou 50 vezes. O antagonista modificado pode ser avaliado para se avaliar se pode atingir sítios de lesões após um acidente vascular cerebral, TBI ou SCI (por exemplo, com o uso de uma forma marcada do antagonista).

Por exemplo, o antagonista de VLA-1 (por exemplo, um anticorpo anti-VLA-1) pode ser associado a um polímero, por exemplo, um polímero substancialmente não antigênico, como um óxido de polialquileno ou um óxido de polietileno. Polímeros adequados variarão substancialmente em peso. Podem-se usar polímeros com pesos moleculares médios numéricos

variando de cerca de 200 a cerca de 35.000 Daltons (ou de cerca de 1.000 a cerca de 15.000, e de 2.000 a cerca de 12.500).

Por exemplo, um antagonista de VLA-1 pode ser conjugado a um polímero solúvel em água, por exemplo, um polímero de polivinila hidrofílico, por exemplo, álcool polivinílico ou polivinilpirrolidona. Uma lista não limitativa desses polímeros inclui homopolímeros de óxido de polialquilenos, como polietileno glicol (PEG) ou polipropileno glicóis, polióis polioxietilenados, seus copolímeros e seus copolímeros em blocos, contanto que a solubilidade em água dos copolímeros em blocos seja mantida. Polímeros utilizáveis adicionais incluem polioxialquilenos, como polioxietileno, polioxipropileno, e copolímeros em blocos de polioxietileno e polioxipropileno (Pluronic); poli-metacrilatos; carbômeros; e polissacarídeos ramificados ou não ramificados.

Quando o antagonista de VLA-1 (por exemplo, um anticorpo anti-VLA-1) é usado em combinação com um segundo agente, os dois agentes podem ser formulados separadamente ou juntos. Por exemplo, as respectivas composições farmacêuticas podem ser misturadas, por exemplo, pouco antes da administração e administradas juntas ou podem ser administradas separadamente, por exemplo, ao mesmo tempo ou em momentos diferentes.

Administração

Um antagonista de VLA-1 aqui descrito (por exemplo, um anticorpo anti-VLA-1) pode ser administrado a um sujeito, por exemplo, um sujeito humano, por vários métodos. Para muitas aplicações, a via de administração é uma dentre: injeção ou infusão intravenosa (IV), injeção subcutânea (SC), injeção intraperitoneal (IP) ou intramuscular. Em alguns casos, a administração pode ser diretamente no SNC, por exemplo, intratecal, intracerebroventricular (ICV), intracerebral ou intracraniana. O antagonista pode ser administrado como uma dose fixa ou em uma dose de mg/kg.

A dose também pode ser escolhida para reduzir ou evitar a produção de anticorpos contra o antagonista.

A via e/ou modo de administração do agente de bloqueio também pode ser adaptada ao caso individual, por exemplo, por monitorização do sujeito, por exemplo, usando-se imagens tomográficas, exames neuroló-

gicos e parâmetros padronizados associados a acidentes vasculares cerebrais, TBI ou SCI, por exemplo, os critérios de avaliação aqui descritos.

Os regimes de dosagem são ajustados para proporcionar a resposta desejada, por exemplo, uma resposta terapêutica ou um efeito terapêutico combinatório. Genericamente, qualquer combinação de doses (separadas ou co-formuladas) do antagonista de VLA-1 (por exemplo, um anticorpo anti-VLA-1) (e, opcionalmente, um segundo agente) pode ser usada para fornecer ao sujeito do agente em quantidades biodisponíveis. Por exemplo, podem-se administrar doses na faixa de 0,025 mg/kg – 100 mg/kg, 0,05 - 50 mg/kg, 0,1 - 30 mg/kg, 0,1 - 5 mg/kg ou 0,3 - 3 mg/kg.

Forma de dosagem unitária ou "dose fixa", conforme aqui usado, refere-se a unidades fisicamente distintas, adequadas como dosagens unitárias para os sujeitos a serem tratados; cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico requerido e, opcionalmente, em associação com o outro agente.

O antagonista de VLA-1 pode ser administrado pelo menos uma vez entre cerca de 10 minutos a cerca de 48 horas, mais preferivelmente entre cerca de 10 minutos e 24 horas, mais preferivelmente em 3 horas, após o início dos sintomas ou manifestação do acidente vascular cerebral, sintomas de TBI ou sintomas de SCI. Podem-se dar dosagens únicas ou múltiplas. Alternativamente ou além disso, o antagonista podem ser administrado mediante infusão contínua. O tratamento pode continuar durante dias, semanas, meses ou mesmo anos, para minimizar a lesão isquêmica do acidente vascular cerebral, para minimizar a lesão pelos eventos inflamatórios pós-acidente vascular cerebral, para prevenir outro acidente vascular cerebral ou para minimizar danos que poderiam resultar de um acidente vascular cerebral subsequente, para tratar TBI primária ou secundária ou sintomas ou para tratar SCI primária ou secundária ou sintomas.

Por exemplo, se um sujeito tiver risco de acidente vascular cerebral ou tiver sofrido um TIA, o antagonista pode ser administrado antes do início de um acidente vascular cerebral como uma medida preventiva. A du-

ração desse tratamento preventivo pode ser uma única dosagem do antagonista, ou o tratamento pode continuar (por exemplo, múltiplas dosagens), por exemplo, um sujeito com risco de acidente vascular cerebral pode ser tratado com o antagonista durante dias, semanas, meses ou mesmo anos, para
5 prevenir a ocorrência de um acidente vascular cerebral.

Uma composição farmacêutica pode incluir uma quantidade terapêuticamente eficaz de um antagonista aqui descrito. Essas quantidades eficazes podem ser determinadas com base no efeito do antagonista administrado ou no efeito combinatório de um antagonista e agente secundário,
10 se mais de um agente for usado. A quantidade terapêuticamente eficaz de um antagonista também pode variar de acordo com fatores como o estado da doença, idade, sexo e peso do indivíduo, e a capacidade do composto de provocar uma resposta desejada no indivíduo, por exemplo, melhora de pelo menos um parâmetro do transtorno, por exemplo, um parâmetro de acidente
15 vascular cerebral, TBI ou SCI ou a melhora de pelo menos um sintoma do transtorno, por exemplo, acidente vascular cerebral, TBI ou SCI. A quantidade terapêuticamente eficaz também é uma em que qualquer efeito tóxico ou prejudicial da composição seja superado pelos efeitos terapêuticamente benéficos.

20 Dispositivos e Kits

Composições farmacêuticas que incluam um antagonista de VLA-1 (por exemplo, um anticorpo anti-VLA-1) podem ser administradas com um dispositivo médico. O dispositivo pode ser projetado com características como portabilidade, armazenamento à temperatura ambiente e facilidade de
25 uso, de modo que possa ser usado em situações de emergência, por exemplo, por um sujeito não treinado ou por pessoal de emergência no campo, longe de instalações médicas e outros equipamentos médicos. O dispositivo pode incluir, por exemplo, uma ou mais caixas para armazenamento de preparações farmacêuticas que incluam um antagonista de VLA-1, e pode ser
30 configurado para distribuir uma ou mais doses unitárias do antagonista.

Por exemplo, a composição farmacêutica pode ser administrada com um dispositivo de injeção hipodérmica sem agulha, como os dispositi-

vos apresentados nas patentes norte-americanas nº 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; ou 4.596.556. Exemplos de implantes e módulos bem conhecidos incluem: patente norte-americana nº 4.487.603, que apresenta uma bomba de microinfusão implantável para distribuir medicação a uma taxa controlada; patente norte-americana nº 4.486.194, que apresenta um dispositivo terapêutico para administrar medicamentos através da pele; patente norte-americana nº 4.447.233, que apresenta uma bomba de infusão de medicamento para a distribuição de medicamento a uma taxa de infusão precisa; patente norte-americana nº 4.447.224, que apresenta um aparelho de infusão implantável de fluxo variável, para distribuição contínua de fármacos; patente norte-americana nº 4.439.196, que apresenta um sistema osmótico de distribuição de fármacos com compartimentos de múltiplas câmaras; e patente norte-americana nº 4.475.196, que apresenta um sistema osmótico de distribuição de fármacos. Muitos outros dispositivos, implantes, sistemas de distribuição e módulos também são conhecidos.

Um antagonista de VLA-1 (por exemplo, um anticorpo anti-VLA-1) pode ser fornecido em um kit. Em uma modalidade, o kit inclui (a) um recipiente que contém uma composição incluindo um antagonista de VLA-1, e, opcionalmente, (b) material informativo. O material informativo pode ser descritivo, intrutivo, de comercialização ou outro material que se refira aos métodos aqui descritos e/ou ao uso dos agentes para benefícios terapêutico. Em uma modalidade, o kit também inclui um segundo agente para o tratamento de acidente vascular cerebral, TBI ou SCI. Por exemplo, o kit inclui um primeiro recipiente que contém uma composição incluindo o antagonista de VLA-1, e um segundo recipiente incluindo o segundo agente.

O material informativo dos kits não está limitado em sua forma. Em uma modalidade, o material informativo pode incluir informações acerca da produção do composto, peso molecular do composto, concentração, data de validade, informações de lote ou local de produção e assim por diante. Em uma modalidade, o material informativo se refere a métodos de administração do antagonista de VLA-1 (por exemplo, um anticorpo anti-VLA-1), por

exemplo, em uma dose, forma de dosagem ou modo de administração adequado (por exemplo, uma dose, forma de dosagem ou modo de administração aqui descrito), para tratar um sujeito que tenha tido um acidente vascular cerebral, TBI ou SCI ou que tenha risco de acidente vascular cerebral, TBI ou SCI. A informação pode ser apresentada em vários formatos, incluindo texto impresso, material para leitura em computador, gravação de vídeo ou gravação de áudio ou uma informação que forneça um link ou endereço para material substantivo.

Além do antagonista, a composição no kit pode incluir outros ingredientes, como um solvente ou tampão, um estabilizador ou um preservativo. O antagonista pode ser fornecido em qualquer forma, por exemplo, forma líquida, seca ou liofilizada, de preferência substancialmente pura e/ou estéril. Quando os agentes são fornecidos em uma solução líquida, a solução líquida é, de preferência, uma solução aquosa. Quando os agentes são fornecidos como uma forma seca, a reconstituição em geral é pela adição de um solvente adequado. O solvente, por exemplo, água ou tampão estéril, pode ser opcionalmente fornecido no kit.

O kit pode incluir um ou mais recipientes para a composição ou composições contendo os agentes. Em algumas modalidades, o kit contém recipientes separados, divisórias ou compartimentos para a composição e material informativo. Por exemplo, a composição pode estar contida em uma garrafa, frasco ou seringa, e o material informativo pode estar contido em um bolsa ou pacote de plástico. Em outras modalidades, os elementos separados do kit estão contidos em um único recipiente não dividido. Por exemplo, a composição está contida em uma garrafa, frasco ou seringa que tenha, preso a ela, o material informativo na forma de um rótulo. Em algumas modalidades, o kit inclui uma pluralidade (por exemplo, um pacote) de recipientes individuais, cada um contendo uma ou mais formas de dosagem unitária (por exemplo, uma forma de dosagem aqui descrita) dos agentes. Os recipientes podem incluir uma dosagem unitária em combinação, por exemplo, uma unidade que inclua tanto o antagonista de VLA-1, quanto o segundo agente, por exemplo, em uma razão desejada. Por exemplo, o kit inclui uma

pluralidade de seringas, ampolas, embalagens de papel laminado, embalagens de blíster ou dispositivos médicos, por exemplo, cada um contendo uma única dose unitária em combinação. Os recipientes dos kits podem ser impermeáveis ao ar, à prova d'água (por exemplo, impermeáveis a alterações na umidade ou evaporação) e/ou impermeáveis à luz.

O kit inclui opcionalmente um dispositivo adequado para administração da composição, por exemplo, uma seringa ou outro dispositivo de distribuição adequado. O dispositivo pode ser fornecido pré-carregado com um ou ambos os agentes ou pode estar vazio, mas adequado para carregamento.

EXEMPLOS

Exemplo 1 – Efeitos do anticorpo anti-VLA-1 sobre isquemia cerebral focal Protocolo

Foram usados camundongos fêmeos C57B6 pesando 18 – 20 g do Charles River Lab para este estudo. Os animais foram agrupados em 2 grupos experimentais, delineados pelas seguintes condições.

Grupo	Tratamento	Dose	Via	N	Cirurgia
A	Veículo (P1.17)	30 mg/kg	IP	18 (inicial) 12 (final)	MCAO + perfusão
B	Anti-VLA-mAB (muHa31/8)	30 mg/kg	IP	18 (inicial) 12 (final)	MCAO + perfusão

Após a injeção intraperitoneal de Ha31/8 ou P1.17 murídeo, os camundongos foram anestesiados inicialmente com 2% de isofurano e, depois disso, mantidos em 1,0% de isofurano em O₂, distribuídos através de uma máscara facial. A temperatura retal foi mantida entre 36,8 e 37,2°C usando-se um colchão de aquecimento regulado por feedback (Harvard Apparatus, Inc. Holliston, MA). O fluxo sanguíneo cerebral regional (rCBF) foi monitorizado usando-se um PeriFlux System (Perimed Inc., Suécia) antes e durante a oclusão da artéria cerebral média (MCAO) e depois da reperfusão.

Para induzir a isquemia cerebral focal com oclusão reversível da artéria cerebral média (MCA), uma sutura de monofilamento de náilon 7.0 revestida com uma mistura de silicone/endurecedor (Heraeus Kulzer, Alemanha) foi inserida no lúmen da artéria carótida comum. A sutura foi avan-

çada $9 \pm 1,0$ mm a partir do sítio de inserção através da artéria carótida interna, até a parte proximal da artéria cerebral anterior, ocluindo completamente a MCA em sua origem. A medição fluxométrica de Laser Doppler do rCBF indicou que a oclusão da MCA foi bem sucedida em ambos os grupos, porque o rCBF caiu para 20% da linha basal. A MCAO durou duas horas; enquanto isso, a ferida foi fechada, e a anestesia foi descontinuada. Após 2 horas de oclusão da MCA, o filamento foi retirado, e os camundongos foram reperfundidos durante 24 horas. Determinou-se se o rCBF permanecia no nível anterior. Quatro animais foram excluídos desse estudo, porque se verificou que o rCBF aumentou de volta para mais de 50% do nível anterior 2 horas após a MCAO e antes da reperfusão. Todos os parâmetros fisiológicos antes, durante e depois da isquemia estavam dentro da faixa normal e não diferiram entre os grupos.

Os déficits neurológicos foram avaliados e contados 30 minutos após a MCAO e 24 horas após a reperfusão, respectivamente, no arquivo aberto. O teste foi descrito por Hara et al (1997):

- 0, nenhum déficit neurológico observável (normal),
- 1, incapacidade de estender a pata dianteira direita (leve);
- 2, circulando para o lado contralateral (moderada);
- 3, perda do caminhar ou do reflexo direito (grave).

O volume da lesão isquêmica após a oclusão da MCA foi medido em ambos os grupos. Os camundongos foram sacrificados por decapitação após 24 horas de reperfusão, após 2 horas da MCAO, e os cérebros foram rapidamente removidos e cortados em 6 seções coronais de 1 mm de espessura usando-se uma matriz de cérebro de camundongo. As seções de cérebro foram, então, tingidas em 2% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC, Sigma) à temperatura ambiente, no escuro, durante 30 min, então, colocados em formalina tamponada neutra a 10% durante uma noite. As seções de cérebro foram diretamente scaneadas em um scanner de imagens. A lesão foi medida na superfície posterior de cada seção (NIH Image 1.61, US National Institutes of Health). Realizou-se uma medição direta da área de infarto no córtex e estriado, que foi, então, corrigida para eliminar o

efeito do edema usando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de área de infarto indireto do córtex contralateral} = \left[\frac{\text{área contralateral} - \text{área não traumática ipsilateral}}{\text{área contralateral}} \right] \times 100.$$

O volume de infarto total foi calculado por integração numérica das áreas de infarto seqüenciais incluindo tanto o córtex, quanto o estriado. As medições foram feitas de modo que o observador fosse cego com relação ao tratamento anterior. O edema foi quantificado como a % de aumento no tamanho do hemisfério isquêmico comparado com o hemisfério não lesado contralateral.

10 Resultados

Camundongos tratados com anticorpo de controle que sofreram MCAO mantiveram extensas lesões em todas as regiões corticais e subcorticais do cérebro. O hemisfério isquêmico estava acentuadamente inchadas, e foram observados déficits comportamentais significativos (por exemplo, hemiparesia resultando em rotação e fraqueza do membro; veja a Figura 1A).

Camundongos tratados com anticorpo de controle (P1.17) mantiveram infartos abrangendo $47,1 \pm 3,8\%$ do hemisfério isquêmico. Os camundongos tratados com anticorpo anti-VLA-1 mantiveram infartos significativamente menores, variando apenas $34,3 \pm 4,2\%$ do hemisfério isquêmico ($P < 0,02$, teste T de Student não pareado, $n = 12$ por grupo), representando uma redução de 24% do tamanho do infarto (Figura 1B). Em termos volumétricos absolutos, isso era equivalente a um volume de infarto de controle médio de $80,8 \pm 6,8 \text{ mm}^3$ versus um volume de infarto médio tratado com anti-VLA-1 de $55,63 \pm 6,3 \text{ mm}^3$ (Figura 1C). O inchamento do cérebro ou edema foi calculado como a porcentagem de aumento do tamanho do hemisfério no hemisfério infartado em comparação com o hemisfério contralateral sem lesão. Camundongos tratados com controle (P1.17) mantiveram um aumento médio no tamanho do hemisfério de $18,1 \pm \%$ em comparação com camundongos tratados com anti-VLA-1 (Ha/31/8), que mantiveram um aumento no tamanho do hemisfério de $8,2\% \pm 1,9\%$ ($P < 0.05$, teste T de Student não pareado, $n = 12$ por grupo. Figura 1D). A Figura 2 demonstra uma resposta à dose usando três concentrações do anticorpo anti-VLA-1

(Ha31/8) e mostra que 3 mg/kg do anticorpo eram tão eficazes quanto 30 mg/kg na redução tanto do volume do infarto (Fig. 2A), quanto do edema (Fig. 2B).

5 Esses dados demonstram que o efeito neuroprotetor e antiinfla-
matório da inibição de VLA-1 em um modelo de oclusão de artéria cerebral
média reversível no camundongo. A patologia desse modelo é clinicamente
representativa da condição humana de acidente vascular cerebral e outras
lesões isquêmicas do SNC como TBI e SCI, e os presentes dados sugerem
10 desses e de outros transtornos relacionados a isquemia.

Foram descritas inúmeras modalidades da invenção. Todavia,
deve-se entender que várias modificações podem ser feitas sem sair do es-
pírito e âmbito da invenção. Portanto, outras modalidades estão dentro do
âmbito das reivindicações a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de tratamento de acidente vascular cerebral em um sujeito, o método compreendendo a administração ao sujeito de um antagonista de VLA-1 em uma quantidade eficaz para tratar acidente vascular cerebral.
5
2. Método de tratamento de acidente vascular cerebral em um sujeito, o método compreendendo a administração ao sujeito de um anticorpo anti-VLA-1 ou seu fragmento de ligação a antígeno.
3. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o acidente vascular cerebral é um acidente vascular cerebral isquêmico.
10
4. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o acidente vascular cerebral é um acidente vascular cerebral hemorrágico.
5. Método, de acordo com a reivindicação 2, em que o anticorpo anti-VLA-1 ou seu fragmento de ligação a antígeno, é um anticorpo anti-VLA-1 humano, quimérico ou humanizado ou seu fragmento de ligação a antígeno.
15
6. Método, de acordo com a reivindicação 2, em que o anticorpo anti-VLA-1, ou seu fragmento de ligação a antígeno, é um anticorpo AQC2 humanizado ou seu fragmento de ligação a antígeno.
20
7. Método, de acordo com a reivindicação 2, em que o anticorpo anti-VLA-1 ou seu fragmento de ligação a antígeno, é produzido por um híbrido com o Nº de Depósito ATCC PTA-3274.
8. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o sujeito é um mamífero.
25
9. Método, de acordo com a reivindicação 8, em que o sujeito é um ser humano.
10. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o sujeito sofreu um acidente vascular cerebral.
11. Método, de acordo com a reivindicação 10, em que o anticorpo anti-VLA-1 ou seu fragmento de ligação a antígeno, é administrado em até 48 horas do acidente vascular cerebral.
30
12. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o antago-

nista de VLA-1 é administrado por via intravenosa ou parenteral.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o antagonista de VLA-1 é administrado a uma dosagem de 0,1 mg/kg por dia a 5 mg/kg por dia.

5 14. Método, de acordo com a reivindicação 10, em que o antagonista de VLA-1 é administrado pelo menos duas vezes até 7 dias após o acidente vascular cerebral.

10 15. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o antagonista de VLA-1 é administrado em combinação com outro agente terapêutico.

15 16. Método, de acordo com a reivindicação 15, em que o outro agente terapêutico é selecionado do grupo que consiste em um agente antiplaquetário, uma enzima trombolítica, um inibidor de agregação, um inibidor de glicoproteína IIb/IIIa, um glicosaminoglicano, um inibidor de trombina, um anticoagulante, heparina, cumarina, tPA, GCSF, estreptoquinase, uroquinase, Ancrod, ácido acetilsalicílico, melatonina e um inibidor de caspase.

20 17. Método de tratamento de acidente vascular cerebral em um ser humano, o método compreendendo a administração ao ser humano de um anticorpo contra VLA-1 ou seu fragmento de ligação a antígeno em uma quantidade eficaz para tratar acidente vascular cerebral.

25 18. Método de tratamento de um ser humano que tenha tido um acidente vascular cerebral, o método compreendendo a administração ao ser humano, em até 72 horas do acidente vascular cerebral, de um anticorpo anti-VLA-1 de bloqueio humanizado, em uma quantidade eficaz para tratar o acidente vascular cerebral.

19. Método de tratamento de lesão cerebral traumática (TBI) em um sujeito, o método compreendendo a administração ao sujeito de um antagonista de VLA-1 em uma quantidade eficaz para tratar TBI.

30 20. Método de tratamento de lesão cerebral traumática (TBI) em um sujeito, o método compreendendo a administração ao sujeito de um anticorpo anti-VLA-1 ou seu fragmento de ligação a antígeno.

21. Método, de acordo com a reivindicação 19, em que a TBI é

uma contusão, equimose, laceração ou hematoma.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, em que o anticorpo anti-VLA-1 ou seu fragmento de ligação a antígeno, é um anticorpo anti-VLA-1 humano, quimérico ou humanizado ou seu fragmento de ligação a antígeno.

23. Método de tratamento de lesão da medula espinhal (SCI) em um sujeito, o método compreendendo a administração ao sujeito de um antagonista de VLA-1 em uma quantidade eficaz para tratar SCI.

24. Método de tratamento de lesão da medula espinhal (SCI) em um sujeito, o método compreendendo a administração ao sujeito de um anticorpo anti-VLA-1 ou seu fragmento de ligação a antígeno.

25. Método, de acordo com a reivindicação 23, em que a SCI é selecionada do grupo que consiste em SCI incompleta, síndrome da medula central, síndrome de Brown-Sequard, síndrome da medula anterior, síndrome do cone medular e síndrome da cauda eqüina.

26. Método, de acordo com a reivindicação 24, em que o anticorpo anti-VLA-1 ou seu fragmento de ligação a antígeno é um anticorpo anti-VLA-1 humano, quimérico ou humanizado ou seu fragmento de ligação a antígeno.

27. Método de tratamento de uma lesão isquêmica em um sujeito, o método compreendendo a administração ao sujeito de um anticorpo contra VLA-1 de bloqueio ou seu fragmento de ligação a antígeno, em uma quantidade eficaz para tratar a lesão.

28. Método de tratamento de lesão de isquemia-reperfusão em um sujeito, o método compreendendo a administração ao sujeito de um anticorpo contra VLA-1 de bloqueio ou seu fragmento de ligação a antígeno, em uma quantidade eficaz para tratar a lesão.

Avaliação de comportamento após MCAO

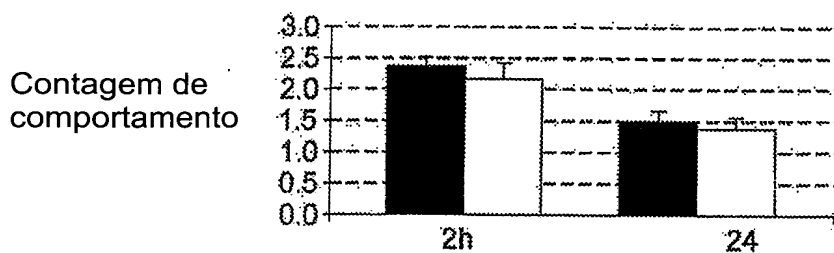


FIG. 1A

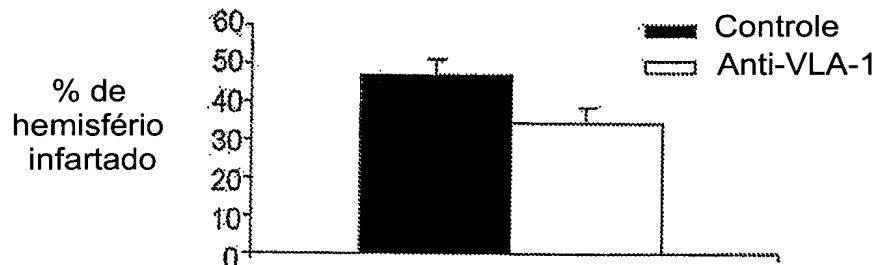


FIG. 1B

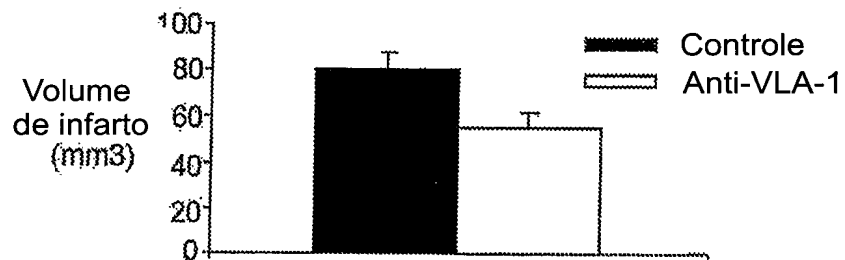


FIG. 1C

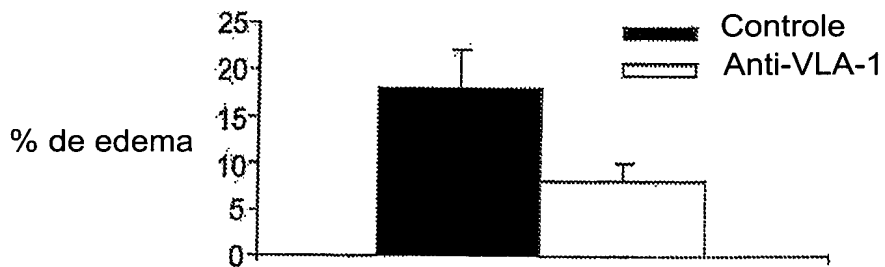


FIG. 1D

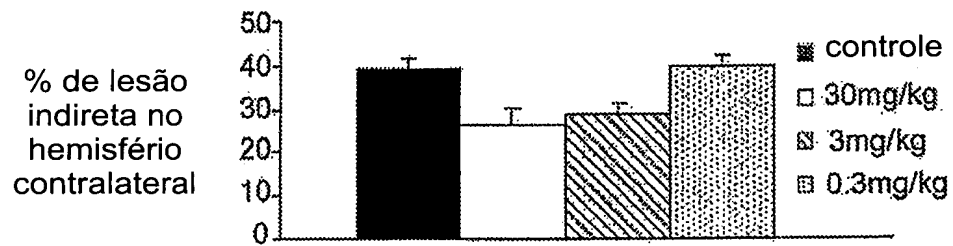
Volume de infarto após 90 minutos
de isquemia/72 de reperfusão

FIG. 2A

Edema

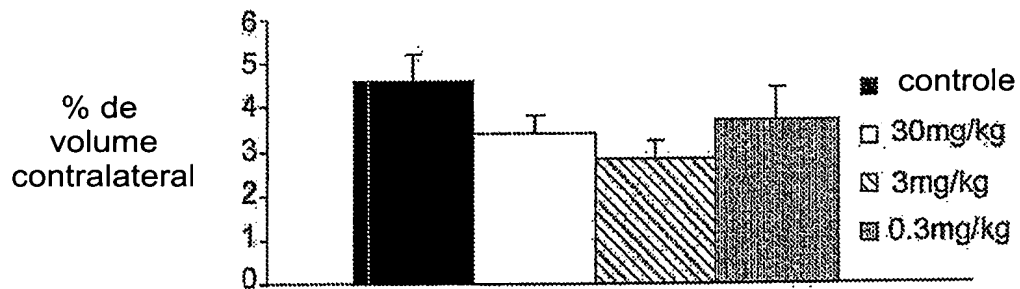


FIG. 2B

RESUMO

Patente de Invenção: "MÉTODOS DE TRATAMENTO DE ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL".

5 Apresentam-se métodos e composições para o tratamento de acidente vascular cerebral.