

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2001.08.31	(73) Titular(es): PAION DEUTSCHLAND GMBH	
(30) Prioridade(s): 2000.08.31 US 229714 P 2001.08.23 US 938405	MARTINSTRASSE 10-12 52062 AACHEN	DE
(43) Data de publicação do pedido: 2003.12.03	(72) Inventor(es): MICHAEL JOHN MÖRSE	US
(45) Data e BPI da concessão: 2007.05.09 056/2007	BARRY W. FESTOFF	US
	(74) Mandatário: PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA	
	RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **ANÁLOGOS DA TROMBOMODULINA PARA UTILIZAÇÃO NA RECUPERAÇÃO DE LESÃO DA MEDULA ESPINAL**

(57) Resumo:

RESUMO

"ANÁLOGOS DA TROMBOMODULINA PARA UTILIZAÇÃO NA RECUPERAÇÃO DE LESÃO DA MEDULA ESPINAL"

A presente invenção refere-se à utilização de análogos da trombomodulina para o tratamento de lesão da medula espinal induzidas por traumatismo.

DESCRIÇÃO

"ANÁLOGOS DA TROMBOMODULINA PARA UTILIZAÇÃO NA RECUPERAÇÃO DE LESÃO DA MEDULA ESPINAL"

Este pedido reivindica o benefício do Pedido U.S. Provisório N° 60/229714, apresentado a 31 de Agosto de 2000.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um método de utilização de análogos da trombomodulina para a produção de um medicamento para o tratamento de traumatismos neurológicos associados com lesão da medula espinal em mamíferos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A trombomodulina (TM) é uma glicoproteína da membrana celular. Em humanos, encontra-se amplamente distribuída no endotélio dos vasos sanguíneos e dos vasos linfáticos. A sua importância fisiológica foi amplamente estudada. (Ver, por exemplo, Esmon *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1982), **257**:859-864; Salem *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1983), **259**:12246-12251).

A trombomodulina funciona como um receptor para a trombina, uma enzima central na cascata de coagulação. Sob a forma livre, a trombina promove a coagulação, tanto directamente, pela

conversão do fibrinogénio em fibrina, como indirectamente, pela activação de outras proteínas da cascata de coagulação (por exemplo, os Factores V, VIII e XIII) e através da activação das plaquetas. No entanto, quando ligado à trombomodulina, o complexo trombina-trombomodulina está envolvido na activação da proteína C em proteína C activada, a qual, então, exerce uma regulação negativa sobre a cascata de coagulação, pela inactivação proteolítica dos cofactores essenciais, Factor Va e Factor VIIIa (Esmon *et al.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (1991), **614**:30-43), resultando em actividade anticoagulante aumentada. O complexo trombina-trombomodulina está, também, envolvido na activação do inibidor da fibrinólise activável pela trombina (TAFI), o qual, quando activado, origina a inibição da fibrinólise. Embora os estudos iniciais tenham sido negativos, os estudos mais recentes indicaram que a trombomodulina não se encontra apenas presente em células endoteliais cerebrais (Boffa, *et al.*, *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* (1991), **33**:423-9; Wong, *et al.*, *Brain Res.* (1991), **556**:1-5; Wang, *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (1997), **17**:3139-46; Tran, *et al.*, *Stroke* (1996), **27**:2304-10; discussão 2310-1), sendo, também, expresso na superfície de astrócitos, onde esta actua de um modo idêntico à sua função nos vasos sanguíneos activando a proteína C, pela formação de um complexo com a trombina (Pindon, *et al.*, *Glia* (1997), **19**:259-68). A trombomodulina é, também, regulada positivamente em astrócitos reactivos no SNC, em resposta a lesões mecânicas (Pindon, *et al.*, *J. Neurosci.* (2000), **20**: 2543-50). Um relatório recente sugere que a trombomodulina recombinante bloqueia a activação pela trombina de outro receptor, o receptor 1 activado pela protease (PAR 1) em células neuronais em cultura (Sarker, *et al.* *Thromb. Haemost.* (1999), **82**:1071-77).

A proteína C activada tem sido, também, significativamente, associada à regulação de respostas inflamatórias envolvendo várias citocinas ou leucócitos activados (Esmon *et al.*, *Thromb. Haemost.* (1991), **66**:160-165). De um modo consistente com esta hipótese, os estudos demonstraram que a proteína C activada previne lesões vasculares pulmonares em ratos inoculados com endotoxina, inibindo a produção do factor da necrose tumoral (TNF- α), o qual activa os neutrófilos de um modo potente (Murakami *et al.*, *Blood* (1996), **87**:642-647; Murakami *et al.*, *Am. J. Physiol.* (1996), **272**:L197-2). A trombomodulina humana recombinante solúvel previne também as lesões vasculares pulmonares induzidas por endotoxinas, pela inibição da activação de neutrófilos através da activação da proteína C (Uchiba *et al.*, *Am. J. Physiol.* (1996), **271**:L470-5; Uchiba *et al.*, *Am. J. Physiol.* (1997), **273**:L889-94).

A lesão da medula espinal (SCI) é uma patologia grave, a qual produz deficiências para toda a vida (Stover *et al.*, *Paraplegia* (1987), **24**:225-228). Presentemente, encontram-se apenas disponíveis medidas terapêuticas limitadas para o seu tratamento (Bracken *et al.*, *New Engl. J. Med.* (1990), **322**: 1405-1411). De facto, a intervenção aguda mais frequentemente aceite após SCI, para além da cirurgia, consiste na administração do esteróide metilprednisolona (MP) (Hall, E. D., *Adv. Neurol.* (1993), **59**:241-8; Bracken, M. B., *J. Neurosurg.* (2000), **93**:1759; Bracken, M. B., *Cochrane Database Syst. Rev.* **2** (2000); Koszdin, *et al.*, *Anesthesiology* (2000), **92**:156-63). No entanto, após 10 anos de experiência este tratamento é ainda bastante controverso e uma meta-análise recente sugeriu que o tratamento com MP possa ser, na realidade, contra-indicado (Hurlbert, R. J., *J. Neurosurg.* (2000), **93**:1-7; Pointillart, *et al.*, *Spinal*

Cord (2000), **38**:71-6; Lankhorst, et al., *Brain Res.* (2000), **859**:334-40).

A patofisiologia da SCI inclui uma lesão mecânica primária e uma lesão neurológica secundária retardada (Tator et al., *J. Neurosurg.* (1991), **75**:15-26). Enquanto que a lesão primária é determinada pelas circunstâncias do traumatismo, os resultados da lesão secundária podem ser receptivos à modulação terapêutica. Embora os mecanismos envolvidos no processo da lesão secundária não se encontrem completamente compreendidos, podem estar envolvidas respostas inflamatórias que originam lesões endoteliais (Demopoulos, et al., *Scan. Electron Microsc.* (1978), **2**:677-680) e isto constitui uma área que pode servir como alvo para intervenção terapêutica. Foi, recentemente, demonstrado que o factor da necrose tumoral (TNF- α) desempenha um papel importante na SCI induzida por traumatismo por compressão em ratos, pela activação dos neutrófilos (Taoka, et al., *Neuroscience* (1997), **79**:1177-182; Taoka et al., *J Neurotrauma* (2000), **17**:219-29). Foi também descrito que a proteína C activada reduz a gravidade da SCI induzida por traumatismo por compressão, pela inibição da produção de TNF- α (Taoka et al., *J. Neurosci.* (1998), **18**:1392-1398). Os estudos demonstraram que a trombomodulina recombinante solúvel preveniu a SCI induzida por traumatismo por compressão num modelo da SCI de rato, pela inibição da acumulação de leucócitos, através da redução da expressão do ARNm do TNF- α no local da lesão (Taoka et al., *Thromb. Haemost.* (2000), **83**:462-468). Estas observações sugerem que a trombomodulina possa, também, prevenir a SCI induzida por traumatismo por contusão, através da activação da proteína C, com a inibição resultante da produção de TNF- α . Foram recentemente validados modelos de rato de contusão ou de

queda de um peso para SCI humana (Metz et al., *J Neurotrauma* (2000), **17**:1-17).

Os requerentes verificaram que determinadas composições da trombomodulina solúvel são eficazes na redução das lesões neurológicas após SCI, num modelo de rato e, conseqüentemente, são úteis no tratamento dessas lesões neurológicas em mamíferos. Têm sido produzidos análogos solúveis da trombomodulina que conservam a maioria, se não a totalidade, das actividades da proteína nativa. Para além disso, foram desenvolvidos análogos solúveis da trombomodulina, os quais são resistentes à oxidação, resistentes a proteólise ou que foram, de outra forma, modificados para possuir uma meia-vida mais longa em circulação e são descritos nas Patentes U.S. N° 5256770, 5863760 e 5466668. Estas composições foram anteriormente descritas como sendo úteis como agentes anti-trombóticos. No entanto, não se verificou qualquer divulgação em relação à utilidade destas composições como agentes terapêuticos para a melhoria de lesões neurológicas após SCI.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com a presente invenção, um aspecto desta invenção é dirigido a um método para a produção de um medicamento para o tratamento de lesões neurológicas resultantes de SCI, o qual compreende uma quantidade terapêuticamente eficaz de um análogo da trombomodulina recombinante, solúvel, o qual é resistente à oxidação e em que a metionina na posição 388 foi substituída por uma leucina, em que o análogo é numerado de acordo com a trombomodulina nativa (SEQ ID N°: 2)

Um aspecto adicional desta invenção utiliza análogos da trombomodulina, os quais contêm modificações adicionais para proporcionar resistência à quebra por proteases e/ou apresentar um padrão de glicosilação alterado.

Um aspecto adicional desta invenção utiliza um análogo da trombomodulina, conhecido com SolulinTM, o qual contêm modificações à sequência nativa da trombomodulina (SEQ ID N°: 2) nas seguintes posições: remoção dos aminoácidos 1-3, M388L, R456G, H457Q, S474A e terminação em P490.

Breve Descrição dos Desenhos

A FIG 1 mostra a sequência de aminoácidos da trombomodulina nativa (SEQ ID N°: 2), utilizando o sistema de numeração de Suzuki *et al.* (1987) *Embo J* **6**:1891-1897.

A FIG 2 mostra resultados da avaliação da função neuronal pela escala de avaliação da locomoção de campo aberto (LRS) de Basso, Beatty e Bresnahan, designada como escala de "BBB", em ratos, após lesão controlada da medula espinal por contusão. Os ratos feridos são tratados com veículo (soro fisiológico) ou com SolulinTM administrados intraperitonealmente (i. p.), após lesão, como descrito no Exemplo 2.

A FIG 3 (A e B), ilustra espécimes histológicos representativos de ratos com lesões da medula espinal após tratamento com soro fisiológico (Controlo) ou com SolulinTM, administrado i. p., 1 h após SCI moderada por contusão (força de 25 g.cm). São mostrados espécimes de

acima, sobre e abaixo da lesão. Na Figura 3A, os espécimes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E); na Figura 3B, os espécimes foram corados com tionina.

A FIG 4 mostra análises da extensão do volume da lesão, como determinada por exame histológico de ratos tratados com soro fisiológico (controlo) versus SolulinTM, sobre, acima e abaixo do epicentro da lesão. Foi determinada uma redução estatisticamente significativa de cerca de 40% ($p < 0,05$) no volume da lesão, com o tratamento com SolulinTM, em comparação com controlos tratados com soro fisiológico, com um teste t não emparelhado.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Definições

Como utilizado na descrição e nas reivindicações, a menos que especificado de outra forma, os termos seguintes têm os significados indicados:

O termo "resíduo" refere-se a um aminoácido que é incorporado num péptido. O aminoácido pode ser um aminoácido de ocorrência natural e, a menos que limitado de outra forma, pode abranger análogos conhecidos de aminoácidos naturais que podem funcionar de uma forma semelhante à dos aminoácidos de ocorrência natural. Para os objectivos desta divulgação, os resíduos de aminoácido são aqui designados pela sua abreviatura de três letras ou de uma letra aceites ou pela notação "AA", a qual significa a presença de um resíduo de aminoácido. Os

aminoácidos aqui referidos são descritos por designações abreviadas, como se segue:

Tabela 1: Nomenclatura do Aminoácidos

Nome	3 letras	1 letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido Aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido Glutâmico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Na descrição de uma substituição de um aminoácido, para os objectivos desta divulgação, a substituição é descrita fornecendo o aminoácido presente na trombomodulina nativa (SEQ ID N°: 2) (TM), a posição do aminoácido dentro da sequência da trombomodulina (utilizando o sistema de numeração de Suzuki

et al., *Embo Journal* (1987), **6**:1891-1897), seguida pelo aminoácido que foi substituído pelo original: *i. e.*, M388L refere-se à substituição da metionina na posição 388 por leucina).

"Trombomodulina nativa" refere-se à proteína completa, como esta ocorre na natureza (FIG 5: SEQ ID N°: 2). É conhecido que a trombomodulina nativa contém polimorfismos de ocorrência natural em determinados resíduos. Por exemplo, na posição 455, verifica-se uma variação de ocorrência natural no aminoácido que se encontra nesta posição, com alanina presente em 82% das ocorrências e valina presente em 18% das ocorrências (Van der Velden *et al.* (1991) *Throm. Haemeostasis* **65**:511-513.) Para os objectivos desta invenção, a sequência da trombomodulina nativa apresentada (FIG 5; SEQ ID N°: 2) é a que contém valina na posição 455, como descrito por Suzuki *et al.* (1987) *EMBO J* **6**:1891-1897. No entanto, todos os polimorfismos de ocorrência natural são incluídos no âmbito dos análogos reivindicados. Quando são descritas actividades biológicas referentes à TM nativa, o termo abrange uma forma aquosa solubilizada com detergente. Frequentemente, no contexto da comparação com uma actividade, um polipéptido solúvel transfectado pode apresentar propriedades substancialmente idênticas.

Os "análogos da trombomodulina" são péptidos que conservam, substancialmente, a actividade biológica da TM nativa, como discutido acima e os quais têm uma estrutura molecular diferente da de uma versão nativa da TM. Por exemplo, o termo refere-se a proteínas tendo uma sequência de aminoácidos idêntica ou homóloga à da trombomodulina nativa (SEQ ID N°: 2), a péptidos ou fragmentos da trombomodulina insolúveis e solúveis e a espécies de TM resistentes à oxidação, tendo todas actividade

semelhante à da trombomodulina. Estes compostos incluem, também, derivados e moléculas compreendendo modificações de aminoácidos que não reduzem, significativamente, as propriedades de cofactor de activação da proteína C da proteína, em comparação com a TM nativa.

O termo "TM mutante" refere-se a um análogo da TM contendo a substituição designada (como descrito acima) ou outra modificação indicada.

Os termos "péptidos" e "polipéptidos" referem-se a cadeias de aminoácidos cujos carbonos α se encontram ligados através de ligações peptídicas formadas por uma reacção de condensação entre o carbono α do grupo carboxilo de um aminoácido e o grupo amino de outro aminoácido. O aminoácido terminal numa extremidade da cadeia (terminal amino) tem, consequentemente, um grupo amino livre, enquanto que o aminoácido terminal na outra extremidade da cadeia (terminal carboxilo) tem um grupo carboxilo livre.

O termo "domínio" refere-se a uma sequência de aminoácido discreta que se pode associar com uma função ou característica particular. Tipicamente, um domínio apresenta uma unidade estrutural terciária característica. O gene da trombomodulina completo codifica um péptido precursor, contendo os domínios seguintes:

Tabela 2: Domínios da TM

Posição Aproximada do Aminoácido	Domínio
(-18)-(-1)	Sequência sinal
1-226	Domínio do terminal N (domínio da lectina; L)
227-462	Domínios semelhantes a 6 EGF (E)
463-497	Glicosilação ligada a O (D)
498-521	Transmembranar
522-557	Domínio citoplasmático

Ver Yost *et al.*, *Cell*, (1983), **34**:759-766 e Wen *et al.*, *Biochemistry* (1987), **26**:4350-4357.

Um "local de protease" refere-se a um aminoácido ou a uma série de aminoácidos num polipéptido da TM, os quais definem um local de reconhecimento, ligação, quebra ou outro, susceptível à actividade de uma protease, quando, por exemplo, um ou mais resíduos de aminoácido abrangidos por este local são substituídos por outros resíduos de aminoácidos ou são eliminados, deixando a protease de ter capacidade para quebrar a TM naquele local. Este termo abrange, também, regiões da molécula da TM que são inerentemente susceptíveis a proteases, e. g., por se encontrarem conformacionalmente expostas e disponíveis para uma actividade de protease.

Um "local de quebra por protease" refere-se à posição precisa na qual uma protease quebra o análogo do polipéptido da TM.

Um "terminal N único" e um "terminal C único" têm os seus significados literais, os quais, funcionalmente, se referem à propriedade da composição, e. g., em que após análise da sequência de aminoácidos sequencial convencional, cada ciclo de degradação resulta na remoção de um resíduo de aminoácido, o qual é, essencialmente, destituído de um resíduo de aminoácido diferente. Deste modo, após vários ciclos, e. g., 10 ciclos de remoção gradual dos aminoácidos do terminal N, apenas um aminoácido é, essencialmente, recuperado em cada ciclo. Em particular, não é detectada mais heterogeneidade na sequência do que a que seria estatisticamente prevista a partir de um polipéptido de cadeia única completamente puro de acordo com o processo analítico utilizado.

"Conserva, substancialmente, a actividade biológica da trombomodulina nativa (SEQ ID N°: 2)" e termos semelhantes, como aqui utilizados, significam que a trombomodulina partilha actividades biológicas com uma molécula da TM nativa ligada à membrana. Geralmente, a actividade em unidades por miligrama de proteína é, pelo menos, de cerca de 50%, normalmente, 75%, tipicamente, 85%, mais tipicamente, 95%, de um modo preferido, 100% e, de um modo mais preferido, mais de 100% da actividade da trombomodulina nativa (SEQ ID N°: 2). Esta actividade biológica pode ser a da activação da proteína C mediada pela trombina (APC), do tempo de coagulação da tromboplastina parcial activada (APTT), do tempo de coagulação da trombina (TCT) ou de qualquer das actividades biológicas da TM, de um modo preferido, terapêuticas. O padrão nativo para comparação é a versão da TM ligada a uma membrana, completa, mas, em muitos casos, pode ser utilizada uma TM solúvel, compreendendo o domínio lectina/EGF/ligado a O (TM.sub.LEO) como um padrão mais conveniente.

"Locais de glicosilação" refere-se a resíduos de aminoácido, os quais são reconhecidos por uma célula eucariota como posições para a ligação de resíduos de açúcar. Os aminoácidos onde os açúcares se ligam são, tipicamente, resíduos de Asn (para açúcares ligados a N), treonina ou serina (para açúcares ligados a O). O local específico de ligação é, tipicamente, assinalado por uma sequência de aminoácidos, e. g., Asn-X-(Thr ou Ser), para a maioria das ligações ligadas a N e (Thr ou Ser)-X-X-Pro, para a maioria das ligações ligadas O, em que X é qualquer aminoácido. A sequência de reconhecimento para os glicosaminoglicanos (um tipo específico de açúcar sulfatado) é geralmente Ser-Gly-X-Gly mas pode também, ser X-Ser-Gly-X-Val. Os termos ligados a N e ligado a O, referem-se ao grupo químico que funciona como o local de ligação entre a parte açúcar e o resíduo do ácido amido. Os açúcares ligados a N encontram-se ligados através de um grupo amino; os açúcares ligados a O encontram-se ligados através de um grupo hidroxilo.

"Tempo de meia-vida de circulação *in vivo*" refere-se ao tempo médio que uma actividade plasmática administrada num mamífero leva para se reduzir para metade.

Um "análogo da TM solúvel" é um análogo da TM que é solúvel numa solução aquosa e, tipicamente, pode ser segregado por uma célula. Para a administração farmacológica, o análogo da TM solúvel ou um análogo insolúvel podem ser, opcionalmente, combinados com vesículas de fosfolípidos, detergentes ou outros compostos semelhantes, bem conhecidos dos especialistas na técnica da formulação farmacológica. Os análogos da TM preferidos da presente invenção são solúveis na corrente sanguínea, tornando os análogos úteis em várias terapias, anticoagulantes e outras. As modificações que fazem a TM

solúvel, tipicamente, não afectam, significativamente, muitas actividades, em relação à trombomodulina nativa (SEQ ID N°: 2), e. g., afinidade para a trombina ou actividade na activação da proteína C.

“Domínio de glicosilação ligada a O” refere-se à sequência de aminoácidos numerados de 463 a 497 da sequência da trombomodulina nativa (SEQ ID N°: 2), como representado na Tabela 2 (ver a página 5).

“Análogos resistentes à oxidação” refere-se a análogos da trombomodulina que são capazes de manter uma quantidade substancial de actividade biológica após exposição a um agente oxidante, tais como, radicais de oxigénio, Cloramina T, peróxido de hidrogénio ou neutrófilos activados.

“SolulinTM” refere-se a um análogo da trombomodulina descrito na Patente U.S. N° 5256770, no qual foram realizadas as seguintes modificações da sequência da trombomodulina nativa (SEQ ID N°: 2): remoção dos aminoácidos 1-3, M388L, R456G, H457Q, S474A e terminação em P490.

“Excipientes farmacêuticos” refere-se a materiais não-tóxicos, aceitáveis medicamente, os quais são utilizados para realizar uma terapia médica. Estes materiais podem ser inertes, tais como água e sal ou biologicamente activos, tais como um antibiótico ou analgésico.

“Capacidade reduzida” refere-se a uma diminuição estatisticamente significativa de uma propriedade biológica. A propriedade é ilimitada e a medição ou a quantificação da propriedade são realizadas através de meios padrão.

"Resíduos de açúcar" referem-se aos hidratos de carbono hexose e pentose, incluindo glucosaminas e a outros derivados de hidrato de carbono e partes, os quais se encontram covalentemente ligados a uma proteína.

"Substituintes de sulfato" são substituintes contendo enxofre, nos açúcares pentose ou hexose.

"Conversão do fibrinogénio em fibrina mediada pela trombina" refere-se à actividade enzimática pela qual a trombina quebra a proteína precursora fibrinogénio para produzir um monómero de fibrina, o qual, subsequentemente, polimeriza para formar um coágulo sanguíneo.

"Doença trombótica" refere-se a uma patologia patogénica num mamífero, caracterizada pela formação de um ou mais trombos que são ou podem ser prejudiciais à saúde do mamífero.

"SCI", como aqui utilizado, refere-se a lesões traumáticas sofridas pela medula espinal e pela área em redor desta. Esta inclui lesões de contusão e/ou compressão, assim como lesões de transecção. O modelo utilizado nos estudos que suportam a utilidade desta invenção é o da contusão, o qual se aproxima mais dos tipos de SCI sofridos por humanos em acidentes com veículos motorizados e/ou lesões relacionadas com desportos. Todas as SCI são caracterizadas pela perda súbita da função motora completa ou parcial e a extensão desta perda depende da localização das lesões no interior da medula. As lesões superiores (cervicais) podem resultar na perda total da função motora ou tetraplegia e perda do controlo respiratório e, por vezes, colapso cardiovascular. As lesões inferiores podem

resultar em paraplegia, mas sem envolvimento dos braços ou disfunção respiratória.

"Mamífero". inclui humanos e animais domesticados, tais como gatos, cães, porco, gado, ovelhas, cabras, cavalos, coelhos e semelhantes.

"Quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se à quantidade do análogo da trombomodulina, o qual, quando administrado a um mamífero que deste necessite, de um modo preferido, um humano, é suficiente para efectuar o tratamento, como definido abaixo, para lesões neurológicas resultantes da SCI. A quantidade do análogo da trombomodulina que constitui uma "quantidade terapeuticamente eficaz" irá variar, dependendo do análogo da trombomodulina, da gravidade da SCI e da idade do mamífero a ser tratado, mas pode ser determinada, rotineiramente, por um comum especialista na técnica, tendo em consideração o seu próprio conhecimento e a presente divulgação.

"Tratar" ou "tratamento", como aqui utilizado, abrange a melhoria das lesões neurológicas associadas com a SCI num mamífero, de um modo preferido, num humano, em que as lesões se encontram associadas com a perda da função motora e/ou respiratória e inclui o tratamento, o qual resulta na recuperação melhorada da função neurológica.

Utilidade da Invenção

Esta invenção é dirigida a um método para a produção de um medicamento para o tratamento em mamíferos, de traumatismos neurológicos associados com lesões da medula espinal (SCI). Como

discutido acima, a proteína C activada inibe a produção de TNF- α , uma molécula que demonstrou desempenhar um papel importante na SCI induzida por traumatismo por compressão e é conhecido o facto da trombomodulina, num complexo com trombina, produzir a proteína C activada. A presente invenção proporciona um medicamento para o tratamento de mamíferos tendo SCI, compreendendo análogos da trombomodulina, os quais possuem a mesma actividade que a trombomodulina nativa (SEQ ID N°: 2), mas os quais apresentam propriedades que fazem dos análogos, melhores agentes terapêuticos.

Para demonstrar a utilidade dos análogos da trombomodulina da invenção como agentes terapêuticos para o tratamento de traumatismos neurológicos associados com SCI, foram avaliados análogos da trombomodulina para a sua capacidade (1) para melhorar a pontuação na escala de avaliação da locomoção (LRS), a qual constitui um método para avaliar a função da medula espinal e (2) para melhorar a histologia da medula espinal, a qual proporciona uma perspectiva da regeneração da medula espinal, em ratos após SCI (ver Figuras 2-4).

Como uma indicação adicional da utilidade da administração parentérica do análogo da trombomodulina (SolulinTM) neste contexto, foi determinado que a administração intraperitoneal (i. p.) de SolulinTM tem efeitos significativos sobre as funções de coagulação do plasma.

Os estudos indicam que é preferida a intervenção terapêutica precoce (1-3 horas após as lesões).

Modelos Animais para a SCI

Foram utilizados vários sistemas experimentais para investigar a patofisiologia da SCI e testar os efeitos dos agentes neuroprotectores, em laboratório (Amar e Levy, *Neurosurgery* (1999), **44**:1027-1040). Os paradigmas experimentais actuais envolvem a submissão de culturas de células neuronais ou de segmentos anatomicamente intactos da medula espinal, a várias agressões mecânicas ou de isquémicas, tais como a queda de um peso, focal ou compressão extradural circunferencial com um balão, pressão com um grampo, lesões fotoquímicas ou térmicas, forças distraccionais ou traumatismo por pistão.

Um método mais preferido, o qual se aproxima mais significativamente da SCI humana (Metz, et al., *J. Neurotrauma* (2000), **17**:1-17) consiste em infligir uma contusão da medula espinal, de acordo com o protocolo do Multi-Center Animal Spinal Cord Injury Study (MASCIS), utilizando a contusão controlada pelo método da queda de um peso (Gruner, J. A, *J. Neurotrauma* (1992), **9**:123-6; Basso, et al., *J. Neurotrauma* (1996), **13**:343-59). As lesões resultantes podem ser avaliadas por exame histológico (e. g., microscopia óptica ou electrónica e, em especial, métodos de coloração e sinalização) (Gruner, J. A., *Ibid.*), medidas dos resultados eletrofisiológicos (e. g., potenciais evocados) (Metz, et al., *J. Neurotrauma* (2000), **17**:1-17) ou avaliações comportamentais (e. g., locomoção de campo aberto ou estabilidade postural sobre um plano inclinado) (Basso, et al., *J. Neurotrauma* (1996), **13**:343-59).

Ensaaios Laboratoriais para a Medição da Actividade da TM

Encontram-se disponíveis vários ensaios laboratoriais para a medição da actividade da TM. A actividade de cofactor da proteína C pode ser medida no ensaio descrito por Salem, *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1984), **259**(19):12246-12251 e Galvin, *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1987), **262**(5):2199-2205. Resumidamente, este ensaio consiste em dois passos. O primeiro consiste na incubação do análogo da TM do teste, com trombina e proteína C, sob condições definidas. No segundo passo, a trombina é inactivada com hirudina ou antitrombina III e heparina e a actividade da proteína C recém-activada é determinada pela utilização de um substrato cromogénico, através do qual o cromóforo é libertado pela actividade proteolítica da proteína C activada. Este ensaio é realizado com reagentes purificados.

Alternativamente, o efeito de um análogo da TM pode ser medido utilizando plasma em ensaios do tempo de coagulação, tais como do tempo da tromboplastina parcial activada (aPTT), tempo de coagulação da trombina (TCT) e/ou tempo da protrombina (PT). O ensaio do aPTT está dependente, tanto da activação da proteína C, assim como da inibição directa da trombina, enquanto que os ensaios do TCT e do PT dependem, apenas, da inibição da trombina. O prolongamento do tempo de coagulação em qualquer um destes ensaios demonstra que a molécula pode inibir a coagulação no plasma. Os ensaios podem ser realizados num medidor automático do tempo de coagulação de acordo com as especificações do fabricante; Medical Laboratory Automation Inc distribuído por American Scientific Products, McGaw Park, III). (ver, também, Salem *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1984), **259**: 12246-12251).

A activação do TAFI pode ser medida como descrito por Wang *et al.* (*J. Biol. Chem.* (2000), **275**:22942-22947), utilizando o facto do TAFI activado ser uma carboxipeptidase. Neste ensaio, são incubados extractos, contendo o análogo da trombomodulina em questão, com trombina e a mistura é, então, incubada com TAFI purificado. A quantidade do TAFI activado produzido é determinada pela utilização de um substrato cromogénico, através do qual o cromóforo é libertado pela actividade proteolítica do TAFI activado. Alternativamente, a activação do TAFI pode ser ensaiada através de um ensaio de lise do coágulo do plasma num sistema definido, utilizando proteínas purificadas ou num meio de plasma (Nagashima, *et al.*, *Throm. Research* (2000), **98**: 333-342).

Os ensaios descritos acima são utilizados para identificar análogos da TM solúveis que têm capacidade de ligação à trombina e avaliar a capacidade do complexo trombina-trombomodulina, formado com estes análogos, para activar a proteína C, tanto em sistemas purificados, como num meio de plasma. Podem ser utilizados ensaios adicionais, para avaliar outras actividades da trombomodulina nativa (SEQ ID N°: 2), tais como a inibição da formação de fibrina a partir do fibrinogénio, catalisada pela trombina (Jakubowski, *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1986), **261**(8):3876-3882), inibição da activação do Factor V pela trombina (Esmon, *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1982), **257**:7944-7947), inibição acelerada da trombina pela antitrombina III e cofactor II da heparina (Esmon *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1983) **258**: 12238-12242), inibição da activação do Factor XII pela trombina. (Polgar, *et al.*, *Thromb. Haemostas.* (1987), **58**:140), a inibição da inactivação da proteína S mediada pela trombina (Thompson e Salem, *J. Clin. Inv.* (1986), **78** (1):13-17) e inibição da

ativação e agregação das plaquetas mediada pela trombina (Esmon, et al., *J. Biol. Chem.* (1983), **258**:12238-12242).

Modificações da trombomodulina

As modificações da molécula da trombomodulina nativa (SEQ ID N°: 2) são úteis para aumentar a eficácia terapêutica dos análogos da trombomodulina da presente invenção.

As composições de análogo da TM, particularmente, preferidas, são as que apresentam uma ou mais das características seguintes:

- (i) estas são resistentes à oxidação,
- (ii) estas apresentam resistência a protease,
- (iii) estas têm terminais N ou C homogêneos,
- (iv) estas foram modificadas após tradução, e. g., por glicosilação de, pelo menos, alguns dos locais de glicosilação da trombomodulina nativa (SEQ ID N°: 2),
- (v) estas têm propriedades de ligação dupla recíproca linear da trombina,
- (vi) estas são solúveis em solução aquosa, em quantidades relativamente baixas de detergentes e, tipicamente, não apresentam uma sequência transmembranar.

Estas modificações foram descritas nas Patentes U.S. N° 5256770, 5863760 e 5466668.

Em particular, as modificações preferidas da molécula da TM, as quais se referem a estas características, incluem a remoção dos aminoácidos 1-13, terminação em P490 e as substituições seguintes: M388L (para a resistência à oxidação), R456G e H457Q (ambas para a resistência à proteólise) e S474A (bloqueia a adição de glicosaminoglicano e reduz a velocidade de eliminação).

É mais preferida uma molécula compreendendo todas estas modificações, a qual é designada como SolulinTM.

Preparação dos análogos da TM desta Invenção

A preparação dos análogos da TM utilizados nesta invenção é divulgada nas patentes U.S. N°. 5256770, 5863760 e 5466668.

Administração Geral do medicamento de acordo com a invenção, compreendendo

O medicamento análogos da trombomodulina, uma forma de introdução da Administração do medicamento, compreendendo análogos da trombomodulina da invenção, sob a forma pura ou numa composição farmacêutica apropriada, pode ser realizado através de qualquer das formas de administração ou agentes utilizados em utilizações semelhantes. Deste modo, a administração pode ser, por exemplo, oralmente, nasalmente, parentericamente, topicamente, transdermicamente ou rectalmente, sob a forma de formas de dosagem sólidas, semi-sólidas, de pó liofilizado ou líquidas, tais, como por exemplo, comprimidos, supositórios, pílulas, cápsulas de gelatina elásticas moles e rígidas, pós, soluções, suspensões ou aerossóis ou semelhantes, de um modo

preferido, sob formas de dosagem unitária adequadas para a administração simples de dosagens precisas. As composições irão incluir um veículo ou excipiente farmacêutico convencional e um composto da invenção como o/um agente activo, e, para além disso, podem incluir outros agentes medicinais, agentes farmacêuticos, veículos, adjuvantes, etc.

De um modo geral, dependendo do modo de administração pretendido, as composições farmacêuticamente aceitáveis irão conter, cerca de, 1% a, cerca de, 99%, em peso, de (um) composto(s) da invenção ou de um seu sal farmacêuticamente aceitável e 99% a 1%, em peso, de um excipiente farmacêuticamente adequado. De um modo preferido, a composição irá ter, cerca de, 5% a 75%, em peso, de (um) composto(s) da invenção ou de um seu sal farmacêuticamente aceitável, sendo o remanescente constituído por excipientes farmacêuticos adequados.

Os compostos da invenção ou os seus sais farmacêuticamente aceitáveis podem, também, ser formulados num supositório utilizando, por exemplo, cerca de, 0,5% a, cerca de, 50% do ingrediente activo, introduzido num veículo que se dissolve lentamente dentro do organismo, e. g., polioxietilenoglicóis e polietilenoglicóis (PEG), e. g., PEG 1000 (96%) e PEG 4000 (4%).

A via preferida de administração é parentericamente, por exemplo, por injeção. A injeção pode ser subcutânea, intravenosa ou intramuscular. Estes análogos são administrados em quantidades farmacêuticamente eficazes e, frequentemente, sob a forma de sais farmacêuticamente aceitáveis, tais como sais de adição ácida. Esse sais podem incluir, e. g., cloridrato, bromidrato, fosfato, sulfato, acetato, benzoato, malato, citrato, glicina, glutamato e aspartato, entre outros. Ver

Goodman e Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8^a ed., Pergamon Press, 1985, o qual é aqui incorporado por referência. As composições líquidas farmacêuticamente administráveis podem ser preparadas, por exemplo, por dissolução, dispersão, etc., de (um) composto(s) da invenção (cerca de 0,5% a, cerca de, 20%) ou de um seu sal farmacêuticamente aceitável e adjuvantes farmacêuticos opcionais, num veículo, tais como, por exemplo, água, soro fisiológico, dextrose aquosa, glicerol, etanol e semelhantes, para, deste modo, formar uma solução ou uma suspensão.

Se pretendido, uma composição farmacêutica da invenção pode conter, também, quantidades menores de substâncias auxiliares, tais como agentes molhantes ou emulsionantes, agentes tamponantes do pH, antioxidantes e semelhantes, tais como, por exemplo, ácido cítrico, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina, hidroxitolueno butilado, etc.

Os métodos efectivos de preparação dessas formas de dosagem, são conhecidos ou serão evidentes, para os especialistas nesta técnica; ver, por exemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18^a Ed., (Mack Publishing Company, Easton, Pensilvânia, 1990), o qual é aqui incorporado por referência. A composição a ser administrada irá conter, em qualquer situação, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto da invenção ou seu sal farmacêuticamente aceitável, para o tratamento de um estado de doença, aliviado pela redução dos níveis plasmáticos de Lp(a) ou pela inibição da produção de apo(a,) de acordo com os ensinamentos desta invenção.

O medicamento produzido de acordo com a invenção, compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz da trombomodulina, a qual irá variar dependendo de vários factores

incluindo a actividade do composto específico utilizado, a estabilidade metabólica e o período de tempo de acção do composto, idade, peso corporal, saúde geral, sexo, dieta, modo e tempo da administração, taxa de excreção, combinação de fármacos, gravidade dos estados de doença particulares e o hospedeiro sob terapia. Geralmente, estes medicamentos podem ser administrados a mamíferos, para utilização veterinária, tais como a animais domésticos e para utilização clínica em humanos de uma forma semelhante a outros agentes terapêuticos, ou seja, num veículo fisiologicamente aceitável. Em geral, a dosagem de administração do análogo da TM irá variar entre, cerca de, pelo menos, 0,0002, mais frequentemente, 0,02 e menos de 5000, frequentemente, menos de 2000, mais frequentemente, menos de 500 µg/kg, frequentemente, 0,02 a 2000 µg/kg e, mais frequentemente, 0,02 a 500 µg/kg do peso corporal do hospedeiro. Estas dosagens podem ser administradas por infusão constante ao longo de um período de tempo prolongado, até ser alcançado um nível circulante pretendido ou, de um modo preferido, sob a forma de uma injeção de uma pílula. As dosagens óptimas para um doente em particular podem ser rotineiramente determinadas por um comum especialista na técnica.

É considerado que um especialista na técnica, utilizando a descrição anterior, sem elaboração adicional, pode utilizar a presente invenção no seu âmbito total. Consequentemente, as formas de realização específicas preferidas seguintes, devem ser interpretadas como apenas ilustrativas e não limitantes do remanescente da divulgação de qualquer forma, em absoluto.

Nos exemplos anteriores e nos seguintes, todas as temperaturas são fornecidas não corrigidas em graus Celsius; e, a menos que indicado de outra forma, todas as proporções e percentagens são em peso.

Embora a presente invenção tenha sido descrita em referência às suas formas de realização específicas, deve ser entendido pelos especialistas na técnica que podem ser realizadas várias modificações e os equivalentes podem ser substituídos, sem divergir do verdadeiro espírito e âmbito da invenção. Para além disso, podem ser realizadas muitas modificações e podem ser substituídos equivalentes sem divergir do verdadeiro espírito e âmbito da invenção. Para além disso, podem ser realizadas muitas modificações para adaptar uma situação, material, composição de matéria, processo, passo ou passos de processo particulares, ao objectivo, espírito e âmbito da presente invenção. Todas essas modificações pretendem situar-se dentro do âmbito das reivindicações incluídas em anexo.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Modelo de Rato para SCI

Animais: São alojados ratos Sprague-Dawley adultos do sexo feminino (Charles River, NY), pesando 270-325 g, em ciclos de luz-escuridão de 12 horas e alimentação com ração para roedores *ad libitum* e foi fornecida água da torneira para beber. Todas as experiências dos animais são realizadas nas Instalações de Bem-estar Animal, sob as Orientações do NIH para estudos com animais. São utilizados, apenas, animais em bom estado de saúde. Uma semana antes dos processos cirúrgicos, os animais são tratados, diariamente, para os adaptar para medições da escala de avaliação da locomoção de campo aberto.

Processos Neurocirúrgicos: Os animais são anestesiados com uma injeção intraperitoneal de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg). O local da ferida é preparado para a contusão SCI

utilizando o impactador NYU, por remoção dos pelos e esterilização da área da incisão ao longo da área inferior torácica dorsal, de acordo com o protocolo MASCIS, como descrito (Gruner, J. A. *J. Neurotrauma* (1992), **9**:123-6; Basso, et al., *J. Neurotrauma* (1996), **13**:343-59).

Antes da lesão, a pressão sanguínea é monitorizada, é recolhido o sangue arterial para medições de gás e é registada a temperatura rectal.

Exemplo 2: Processos na Contusão e Após contusão

Contusão: a contusão da medula espinal é realizada utilizando o método de contusão controlada por queda de um peso com um impactador NYU, utilizando o protocolo descrito acima (Gruner, J. A. *J. Neurotrauma* (1992), **9**:123-126; Yong, et al., *J. Neurotrauma* (1998) **15**:459-472)

Processos após lesão: Durante as 48 horas após a lesão, o tratamento é efectuado, são recolhidos dados e são recolhidas amostras de sangue e urina. Cerca de um terço dos ratos é eutanizado, 48 horas após a lesão, para a determinação do volume da lesão aguda. Os restantes são mantidos durante 14 a 28 dias, após a lesão, para permitir que fossem realizadas determinações da função motora (LRS/BBB).

Tratamento com Solulin™ Uma hora após a lesão, é administrada uma injeção única i. p. de 70 µg de Solulin™, dissolvido em 200 µL de soro fisiológico normal, a um grupo de três ratos. Os animais do controlo com veículo, que tinham sofrido uma lesão completa, tal como o grupo de tratamento, receberam, apenas, soro fisiológico. Em algumas experiências, é

administrada uma segunda dose i. p. de 70 µg de SolulinTM dissolvido em 200 µL de soro fisiológico normal, 24 h após o impacto. Os animais de controlo (lesão simulada) foram sujeitos a todas as manipulações cirúrgicas, incluindo laminectomia, com excepção da lesão por queda de um peso.

Medição do aPTT É recolhido sangue para determinar os níveis plasmáticos do tempo da tromboplastina parcial activada (aPTT), 3, 6, 12, 24 e 72 horas após SCI. É recolhido sangue da veia caudal, utilizando uma seringa para a tuberculina de 1 mL, retirando, aproximadamente, 1 mL de sangue para o interior de tubos pré-medidos, com ácido cítrico. O sangue é imediatamente centrifugado, o plasma é removido e é congelado a -70 ° até os níveis do aPTT poderem ser medidos (Salem et al., *J. Biol Chem.* (1984), **259**L12246-12251). As medições do nível do aPTT demonstram que a actividade da trombomodulina é detectável durante, pelo menos, 24 horas após a injeção.

Foram utilizadas, pelo menos, três experiências distintas com três ratos por grupo de animais tratados com SolulinTM e controlo com veículo.

Avaliação das lesões neurológicas: Foram realizadas medições da escala de avaliação da locomoção de campo aberto (LRS/BBB) (Basso, et al., *J. Neurotrauma* (1996) **13**:343-59; Basso et al., *Exp. Neurol.* (1996) **139**:244-256) por 3 observadores anónimos distintos, ao longo de um período de 24 dias após a SCI. Os resultados são registados e introduzidos num programa informático desenvolvido para a LRS e são analisados.

Exemplo 3: Exame Histológico de Tecido da Medula Espinal

As amostras fixadas de medula espinal são embebidas e seccionadas, tanto longitudinalmente, como horizontalmente, para avaliar e medir a área do local da lesão, na lesão e em segmentos adjacentes, com hematoxilina e eosina (H&E), tionina e outros corantes. Ver a Figura 3. (Bethea, et al., *J. Neurotrauma* (1999), **16**:851-63).

A Figura 4 mostra uma análise do volume da lesão e indica que foi verificada uma redução estatisticamente significativa do volume da lesão para o tratamento com SolulinTM.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Festoff, Barry W.
Morser, Michael J.

<120> Análogos da Trombomodulina para Utilização na
Recuperação de Lesão da Medula Espinal

<130> 51960AUSM1

<150> 60/229714

<151> 2000-08-31

<160> 2

<170> PatentIn versão 3.1

<210> 1

<211> 3466

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (151)..(1875)

<223>

<220>

<221> mat_peptide

<222> (205)..()

<223>

<400> 1

```
caggggctgc gcgcagcggc aagaagtgtc tgggctggga cggacaggag aggctgtcgc      60
catcggcgctc ctgtgcccct ctgtccggc acggccctgt cgcagtgcc gcgctttccc      120
cggcgccctgc acgcggcgcg cctgggtaac atg ctt ggg gtc ctg gtc ctt ggc      174
                               Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly
                               -15

gcg ctg gcc ctg gcc ggc ctg ggg ttc ccc gca ccc gca gag ccg cag      222
Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly Phe Pro Ala Pro Ala Glu Pro Gln
-10                               -5          -1  1          5

ccg ggt ggc agc cag tgc gtc gag cac gac tgc ttc gcg ctc tac ccg      270
Pro Gly Gly Ser Gln Cys Val Glu His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro
          10          15          20

ggc ccc gcg acc ttc ctc aat gcc agt cag atc tgc gac gga ctg cgg      318
Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala Ser Gln Ile Cys Asp Gly Leu Arg
          25          30          35

ggc cac cta atg aca gtg cgc tcc tcg gtg gct gcc gat gtc att tcc      366
Gly His Leu Met Thr Val Arg Ser Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser
          40          45          50
```


ttg cta ctg aac ggc gac ggc ggc gtt ggc cgc cgg cgc ctc tgg atc Leu Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly Val Gly Arg Arg Arg Leu Trp Ile 55 60 65 70	414
ggc ctg cag ctg cca ccc ggc tgc ggc gac ccc aag cgc ctc ggg ccc Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly Cys Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro 75 80 85	462
ctg cgc ggc ttc cag tgg gtt acg gga gac aac aac acc agc tat agc Leu Arg Gly Phe Gln Trp Val Thr Gly Asp Asn Asn Thr Ser Tyr Ser 90 95 100	510
agg tgg gca cgg ctc gac ctc aat ggg gct ccc ctc tgc ggc ccg ttg Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu 105 110 115	558
tgc gtc gct gtc tcc gct gct gag gcc act gtg ccc agc gag ccg atc Cys Val Ala Val Ser Ala Ala Glu Ala Thr Val Pro Ser Glu Pro Ile 120 125 130	606
tgg gag gag cag cag tgc gaa gtg aag gcc gat ggc ttc ctc tgc gag Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val Lys Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu 135 140 145 150	654
ttc cac ttc cca gcc acc tgc agg cca ctg gct gtg gag ccc ggc gcc Phe His Phe Pro Ala Thr Cys Arg Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly Ala 155 160 165	702
gcg gct gcc gcc gtc tcg atc acc tac ggc acc ccg ttc gcg gcc cgc Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr Tyr Gly Thr Pro Phe Ala Ala Arg 170 175 180	750
gga gcg gac ttc cag gcg ctg ccg gtg ggc agc tcc gcc gcg gtg gct Gly Ala Asp Phe Gln Ala Leu Pro Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala 185 190 195	798
ccc ctc ggc tta cag cta atg tgc acc gcg ccg ccc gga gcg gtc cag Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys Thr Ala Pro Pro Gly Ala Val Gln 200 205 210	846
ggg cac tgg gcc agg gag gcg ccg ggc gct tgg gac tgc agc gtg gag Gly His Trp Ala Arg Glu Ala Pro Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu 215 220 225 230	894
aac ggc ggc tgc gag cac gcg tgc aat gcg atc cct ggg gct ccc cgc Asn Gly Gly Cys Glu His Ala Cys Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg 235 240 245	942
tgc cag tgc cca gcc ggc gcc gcc ctg cag gca gac ggg cgc tcc tgc Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys 250 255 260	990
acc gca tcc gcg acg cag tcc tgc aac gac ctc tgc gag cac ttc tgc Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys 265 270 275	1038
gtt ccc aac ccc gac cag ccg ggc tcc tac tcg tgc atg tgc gag acc Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr 280 285 290	1086

ggc tac cgg ctg gcg gcc gac caa cac cgg tgc gag gac gtg gat gac Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln His Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp 295 300 305 310	1134
tgc ata ctg gag ccc agt ccg tgt ccg cag cgc tgt gtc aac aca cag Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln 315 320 325	1182
ggt ggc ttc gag tgc cac tgc tac cct aac tac gac ctg gtg gac ggc Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp Gly 330 335 340	1230
gag tgt gtg gag ccc gtg gac ccg tgc ttc aga gcc aac tgc gag tac Glu Cys Val Glu Pro Val Asp Pro Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr 345 350 355	1278
cag tgc cag ccc ctg aac caa act agc tac ctc tgc gtc tgc gcc gag Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu 360 365 370	1326
ggc ttc gcg ccc att ccc cac gag ccg cac agg tgc cag atg ttt tgc Gly Phe Ala Pro Ile Pro His Glu Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys 375 380 385 390	1374
aac cag act gcc tgt cca gcc gac tgc gac ccc aac acc cag gct agc Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser 395 400 405	1422
tgt gag tgc cct gaa ggc tac atc ctg gac gac ggt ttc atc tgc acg Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr 410 415 420	1470
gac atc gac gag tgc gaa aac ggc ggc ttc tgc tcc ggg gtg tgc cac Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His 425 430 435	1518
aac ctc ccc ggt acc ttc gag tgc atc tgc ggg ccc gac tcg gcc ctt Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu 440 445 450	1566
gtc cgc cac att ggc acc gac tgt gac tcc ggc aag gtg gac ggt ggc Val Arg His Ile Gly Thr Asp Cys Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly 455 460 465 470	1614
gac agc ggc tct ggc gag ccc ccg ccc agc ccg acg ccc ggc tcc acc Asp Ser Gly Ser Gly Glu Pro Pro Pro Ser Pro Thr Pro Gly Ser Thr 475 480 485	1662
ttg act cct ccg gcc gtg ggg ctc gtg cat tcg ggc ttg ctc ata ggc Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu Val His Ser Gly Leu Leu Ile Gly 490 495 500	1710
atc tcc atc gcg agc ctg tgc ctg gtg gtg gcg ctt ttg gcg ctc ctc Ile Ser Ile Ala Ser Leu Cys Leu Val Val Ala Leu Leu Ala Leu Leu 505 510 515	1758

tgc cac ctg cgc aag aag cag ggc gcc gcc agg gcc aag atg gag tac	1806
Cys His Leu Arg Lys Lys Gln Gly Ala Ala Arg Ala Lys Met Glu Tyr	
520 525 530	
aag tgc gcg gcc cct tcc aag gag gta gtg ctg cag cac gtg cgg acc	1854
Lys Cys Ala Ala Pro Ser Lys Glu Val Val Leu Gln His Val Arg Thr	
535 540 545 550	
gag cgg acg ccg cag aga ctc tgagcggcct ccgtccagga gcctggctcc	1905
Glu Arg Thr Pro Gln Arg Leu	
555	
gtccaggagc ctgtgcctcc tcacccccag ctttgctacc aaagcacctt agctggcatt	1965
acagctggag aagaccctcc ccgcaccccc caagctgttt tcttctattc catggctaac	2025
tggcgagggg gtgattagag ggaggagaat gagcctcggc ctcttcctg acgtcactgg	2085
accactgggc aatgatggca attttgtaac gaagacacag actgcgattt gtcccaggtc	2145
ctcactaccg ggcgcaggag ggtgagcgtt attggtcggc agccttctgg gcagaccttg	2205
acctcgtggg ctagggatga ctaaaatatt tatttttttt aagtatttag gtttttgttt	2265
gtttcctttg ttcttacctg tatgtctcca gtatccactt tgcacagctc tccggctctt	2325
ctctctctac aaactccac ttgtcatgtg acaggtaaac tatcttgggtg aatttttttt	2385
tcctagccct ctacattta tgaagcaagc ccacttatt cccattctt cctagttttc	2445
tcctcccagg aactgggcca actcacctga gtcaccctac ctgtgcctga ccctacttct	2505
tttgctctta gctgtctgct cagacagaac ccctacatga aacagaaaca aaaacactaa	2565
aaataaaaaat ggccatttgc tttttcacca gatttgctaa tttatcctga aatttcagat	2625
tcccagagca aaataatttt.aaacaaagg tggatgttaa aaggtattaa attgatgttg	2685
ctggactgtc atagaaatta cacccaaaga ggtattttatc tttactttta aacagtgagc	2745
ctgaattttg ttgctgtttt gatttgact gaaaaatgg aattgttgct aatcttctta	2805
tgcaattttcc ttttttgta. ttattactta tttttgacag tgttgaaaat gttcagaagg	2865
ttgctctaga ttgcgagaag agacaaacac ctcccaggag acagttcaag aaagcttcaa	2925
actgcatgat tcatgccaat tagcaattga ctgtcactgt tccttgtcac tggtagacca	2985
aaataaaacc gactctactg gtcttgtgga attgggagct tgggaatgga tcctggagga	3045
tgcccaatta gggcctagcc ttaatcaggt cctcagagaa tttctaccat ttcagagagg	3105
ccttttgga tgtggcccct gaacaagaat tggaagctgc cctgcccctg ggagctgggt	3165
agaaatgcag aatcctaggc tccaccccat ccagttcatg agaatctata ttaacaaga	3225
tctgcagggg gtgtgtctgc tcagtaattt gaggacaacc attccagact gcttccaatt	3285
ttctggaata catgaaatat agatcagtta taagtagcag gccaaagtcag gcccttattt	3345

tcaagaaact gaggaatttt ctttgtgtag ctttgctctt tggtagaaaa ggctaggtac 3405
acagctctag acactgccac acaggtctg caaggtcttt ggttcagcta agccggaatt 3465
c 3466

<210> 2

<211> 575

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly
-15 -10 -5

Phe Pro Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln Cys Val Glu
-1 1 5 10

His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala
15 20 25 30

Ser Gln Ile Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val Arg Ser
35 40 45

Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly
50 55 60

Val Gly Arg Arg Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly Cys
65 70 75

Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg Gly Phe Gln Trp Val Thr
80 85 90

Gly Asp Asn Asn Thr Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
95 100 105 110

Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala Val Ser Ala Ala Glu
115 120 125

Ala Thr Val Pro Ser Glu Pro Ile Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val
130 135 140

Lys Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro Ala Thr Cys Arg
145 150 155

Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr
 160 165 170

Tyr Gly Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln Ala Leu Pro
 175 180 185 190

Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys
 195 200 205

Thr Ala Pro Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu Ala Pro
 210 215 220

Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala Cys
 225 230 235

Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala Ala
 240 245 250

Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys
 255 260 265 270

Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly
 275 280 285

Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln
 290 295 300

His Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys
 305 310 315

Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr
 320 325 330

Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys Val Glu Pro Val Asp Pro
 335 340 345 350

Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr
 355 360 365

Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile Pro His Glu
 370 375 380

Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp
 385 390 395

Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile
 400 405 410

Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly
 415 420 425 430

Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys
 435 440 445

Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Val Arg His Ile Gly Thr Asp Cys
 450 455 460

Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly Ser Gly Glu Pro Pro
 465 470 475

Pro Ser Pro Thr Pro Gly Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu
 480 485 490

Val His Ser Gly Leu Leu Ile Gly Ile Ser Ile Ala Ser Leu Cys Leu
 495 500 505 510

Val Val Ala Leu Leu Ala Leu Leu Cys His Leu Arg Lys Lys Gln Gly
 515 520 525

Ala Ala Arg Ala Lys Met Glu Tyr Lys Cys Ala Ala Pro Ser Lys Glu
 530 535 540

Val Val Leu Gln His Val Arg Thr Glu Arg Thr Pro Gln Arg Leu
 545 550 555

Lisboa, 31 de Julho de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um análogo recombinante da trombomodulina solúvel, o qual é resistente à oxidação e em que a metionina na posição 388 foi substituída por uma leucina, em que o análogo é numerado de acordo com a SEQ ID N°: 2 da trombomodulina nativa, para a produção de um medicamento para o tratamento de Lesões da Medula Espinal.
2. Utilização da reivindicação 1, em que o análogo da trombomodulina é modificado nos resíduos de açúcar do domínio de glicosilação ligado a O, da SEQ ID N°: 2 da trombomodulina nativa.
3. Utilização da reivindicação 1 ou 2, em que o análogo da trombomodulina é modificado de forma a que o domínio de glicosilação ligado a O não apresente qualquer sulfato de condroitina.
4. Utilização de uma das reivindicações anteriores, em que o análogo foi tornado resistente à clivagem por proteases.
5. Utilização de uma das reivindicações anteriores, em que o análogo da trombomodulina (SolulinTM) tem a sequência de aminoácidos da trombomodulina nativa (SEQ ID N°: 2) modificada nas posições seguintes:

remoção dos aminoácidos 1-3

M388L

R456G

H457Q

S474A, e

terminação em P490.

6. Utilização de uma das reivindicações anteriores, em que o mamífero é um humano.

Lisboa, 31 de Julho de 2007

FIGURA 1

Met	Leu	Gly	Val	Leu	Val	Leu	Gly	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Gly	Leu	Gly	
			-15					-10					-5			
Phe	Pro	Ala	Pro	Ala	Glu	Pro	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Gln	Cys	Val	Glu	
	-1	1				5					10					
His	Asp	Cys	Phe	Ala	Leu	Tyr	Pro	Gly	Pro	Ala	Thr	Phe	Leu	Asn	Ala	
15					20					25					30	
Ser	Gln	Ile	Cys	Asp	Gly	Leu	Arg	Gly	His	Leu	Met	Thr	Val	Arg	Ser	
				35					40					45		
Ser	Val	Ala	Ala	Asp	Val	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Asn	Gly	Asp	Gly	Gly	
			50					55					60			
Val	Gly	Arg	Arg	Arg	Leu	Trp	Ile	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Pro	Gly	Cys	
		65					70					75				
Gly	Asp	Pro	Lys	Arg	Leu	Gly	Pro	Leu	Arg	Gly	Phe	Gln	Trp	Val	Thr	
	80					85					90					
Gly	Asp	Asn	Asn	Thr	Ser	Tyr	Ser	Arg	Trp	Ala	Arg	Leu	Asp	Leu	Asn	
95					100					105					110	
Gly	Ala	Pro	Leu	Cys	Gly	Pro	Leu	Cys	Val	Ala	Val	Ser	Ala	Ala	Glu	
				115					120					125		
Ala	Thr	Val	Pro	Ser	Glu	Pro	Ile	Trp	Glu	Glu	Gln	Gln	Cys	Glu	Val	
			130					135					140			
Lys	Ala	Asp	Gly	Phe	Leu	Cys	Glu	Phe	His	Phe	Pro	Ala	Thr	Cys	Arg	
	145						150				155					
Pro	Leu	Ala	Val	Glu	Pro	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	Ser	Ile	Thr	
	160					165						170				
Tyr	Gly	Thr	Pro	Phe	Ala	Ala	Arg	Gly	Ala	Asp	Phe	Gln	Ala	Leu	Pro	
175					180					185					190	
Val	Gly	Ser	Ser	Ala	Ala	Val	Ala	Pro	Leu	Gly	Leu	Gln	Leu	Met	Cys	
				195					200					205		
Thr	Ala	Pro	Pro	Gly	Ala	Val	Gln	Gly	His	Trp	Ala	Arg	Glu	Ala	Pro	
			210					215					220			
Gly	Ala	Trp	Asp	Cys	Ser	Val	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Glu	His	Ala	Cys	
		225					230					235				
Asn	Ala	Ile	Pro	Gly	Ala	Pro	Arg	Cys	Gln	Cys	Pro	Ala	Gly	Ala	Ala	
	240					245					250					
Leu	Gln	Ala	Asp	Gly	Arg	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Ala	Thr	Gln	Ser	Cys	
255					260					265					270	

FIGURA 1 (cont.)

Asn	Asp	Leu	Cys	Glu	His	Phe	Cys	Val	Pro	Asn	Pro	Asp	Gln	Pro	Gly	275	280	285
Ser	Tyr	Ser	Cys	Met	Cys	Glu	Thr	Gly	Tyr	Arg	Leu	Ala	Ala	Asp	Gln	290	295	300
His	Arg	Cys	Glu	Asp	Val	Asp	Asp	Cys	Ile	Leu	Glu	Pro	Ser	Pro	Cys	305	310	315
Pro	Gln	Arg	Cys	Val	Asn	Thr	Gln	Gly	Gly	Phe	Glu	Cys	His	Cys	Tyr	320	325	330
Pro	Asn	Tyr	Asp	Leu	Val	Asp	Gly	Glu	Cys	Val	Glu	Pro	Val	Asp	Pro	335	340	345
Cys	Phe	Arg	Ala	Asn	Cys	Glu	Tyr	Gln	Cys	Gln	Pro	Leu	Asn	Gln	Thr	355	360	365
Ser	Tyr	Leu	Cys	Val	Cys	Ala	Glu	Gly	Phe	Ala	Pro	Ile	Pro	His	Glu	370	375	380
Pro	His	Arg	Cys	Gln	Met	Phe	Cys	Asn	Gln	Thr	Ala	Cys	Pro	Ala	Asp	385	390	395
Cys	Asp	Pro	Asn	Thr	Gln	Ala	Ser	Cys	Glu	Cys	Pro	Glu	Gly	Tyr	Ile	400	405	410
Leu	Asp	Asp	Gly	Phe	Ile	Cys	Thr	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Glu	Asn	Gly	415	420	425
Gly	Phe	Cys	Ser	Gly	Val	Cys	His	Asn	Leu	Pro	Gly	Thr	Phe	Glu	Cys	435	440	445
Ile	Cys	Gly	Pro	Asp	Ser	Ala	Leu	Val	Arg	His	Ile	Gly	Thr	Asp	Cys	450	455	460
Asp	Ser	Gly	Lys	Val	Asp	Gly	Gly	Asp	Ser	Gly	Ser	Gly	Glu	Pro	Pro	465	470	475
Pro	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Ser	Thr	Leu	Thr	Pro	Pro	Ala	Val	Gly	Leu	480	485	490
Val	His	Ser	Gly	Leu	Leu	Ile	Gly	Ile	Ser	Ile	Ala	Ser	Leu	Cys	Leu	495	500	505
Val	Val	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Cys	His	Leu	Arg	Lys	Lys	Gln	Gly	515	520	525
Ala	Ala	Arg	Ala	Lys	Met	Glu	Tyr	Lys	Cys	Ala	Ala	Pro	Ser	Lys	Glu	530	535	540
Val	Val	Leu	Gln	His	Val	Arg	Thr	Glu	Arg	Thr	Pro	Gln	Arg	Leu		545	550	555

FIGURA 2: Avaliação da função neuronal

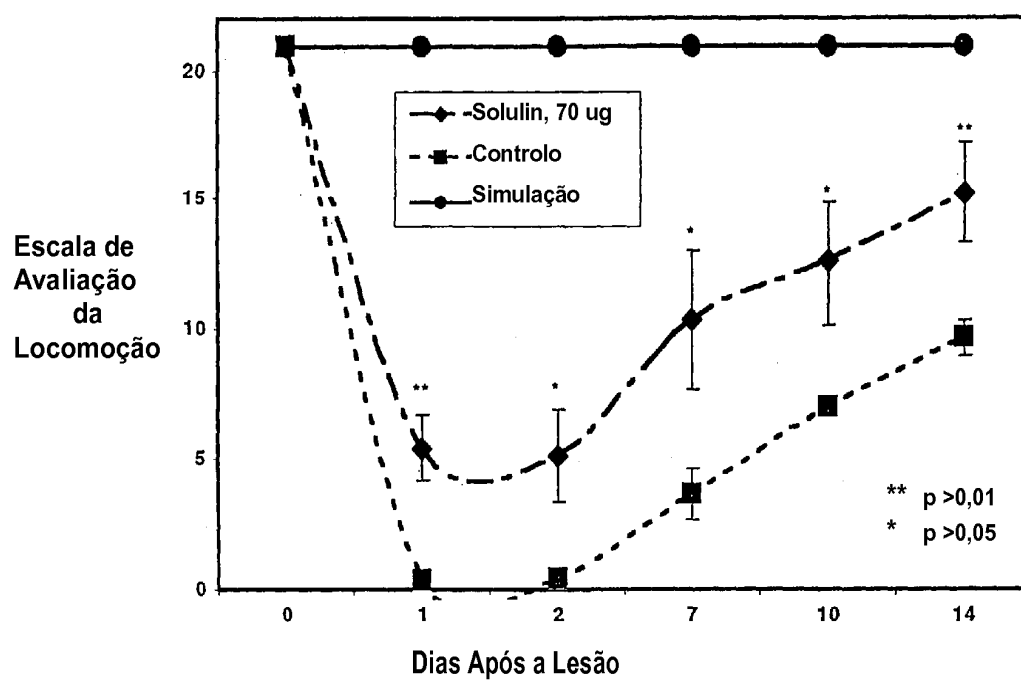


FIGURA 3A

H & E

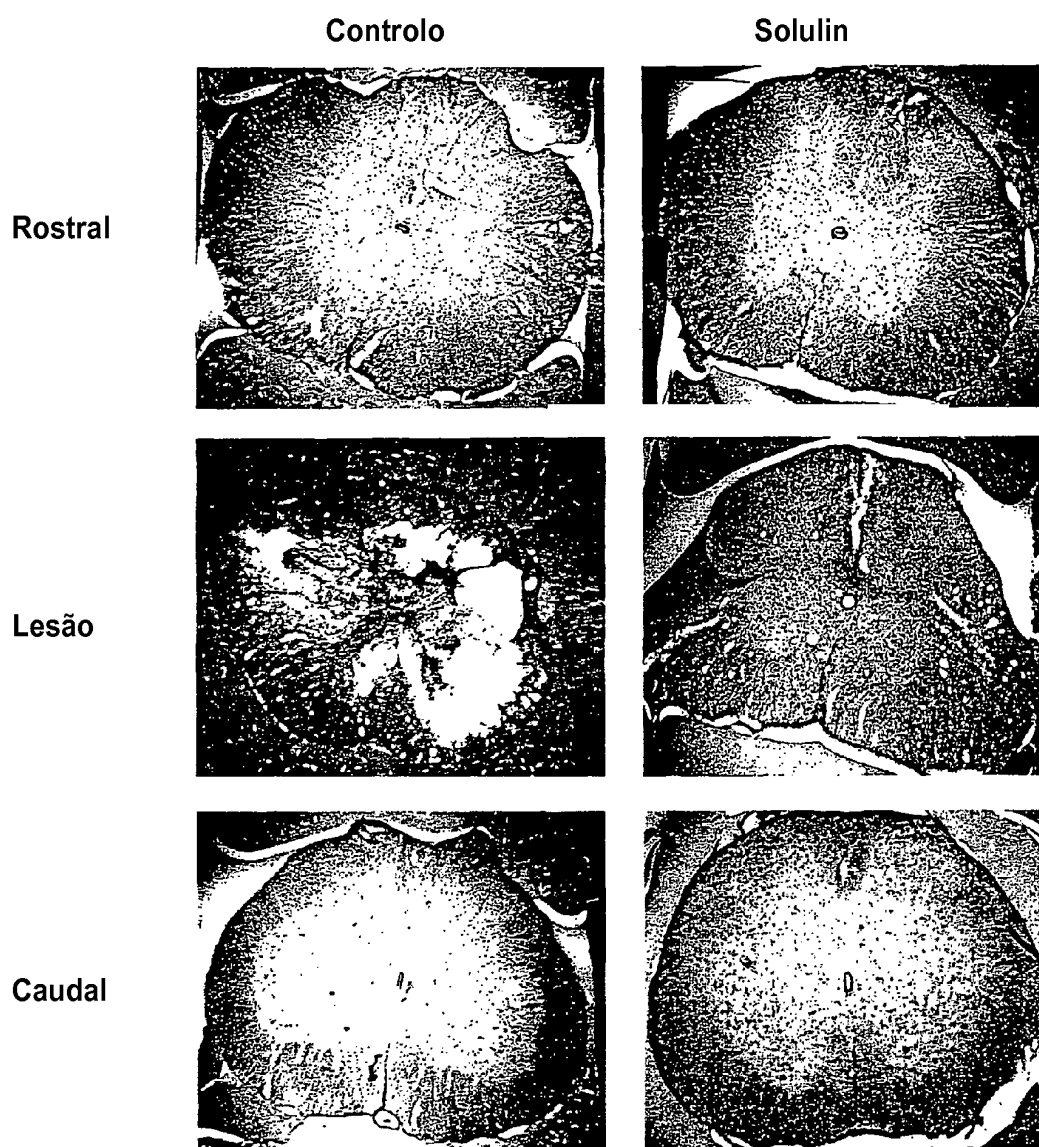


FIGURA 3B

Tionina

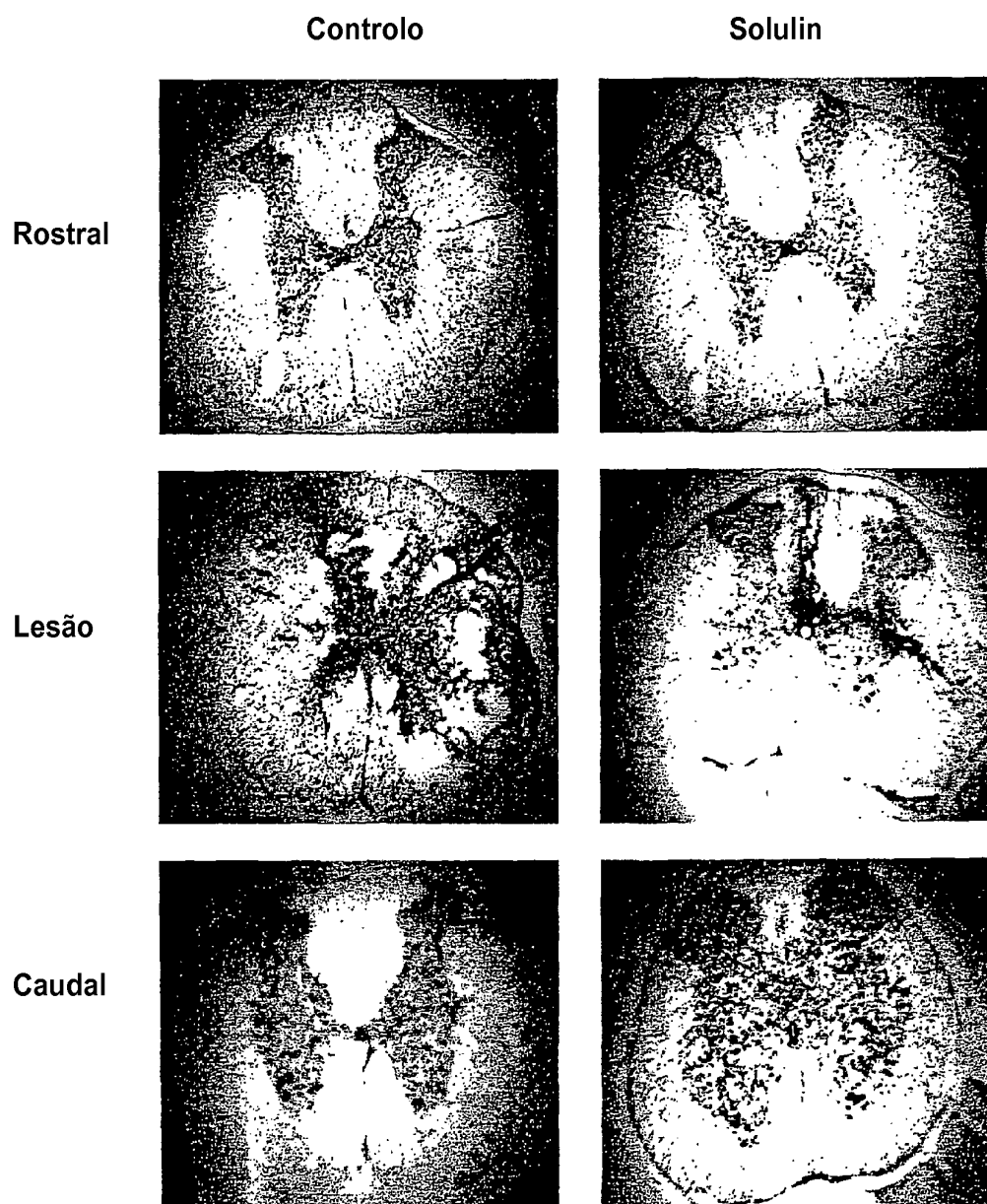


FIGURA 4: Análise da extensão da lesão