

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2012.11.08	(73) Titular(es): FUNDACIÓ INSTITUT D'INVESTIGACIÓ EN CIÈNCIES DE LA SALUT GERMANS TRIAS I PUJOL
(30) Prioridade(s): 2011.11.11 ES 201131816 P	CARRETERA DEL CANYET S/N 08916
(43) Data de publicação do pedido: 2014.09.17	BADALONA ES
(45) Data e BPI da concessão: 2016.06.01 163/2016	INSTITUTO DE INVESTIGACIÓ SANITARIA - FUNDACIÓ PARA LA INVESTIGACIÓ DEL HOSPITAL LA FE ES
	(72) Inventor(es):
	TERESA GASULL DALMAU ES
	NÚRIA DEGREGORIO-ROCASOLANO BARBANY ES
	ANTONIO DÁVALOS ERRANDO ES
	JUAN B SALOM SANVALERO ES
	ENRIQUE ALBORCH DOMÍNGUEZ ES
	(74) Mandatário:
	ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS PT RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA

(54) Epígrafe: **APOTRANSFERRINA PARA TRATAMENTO DO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO RELACIONA-SE COM A UTILIZAÇÃO DE APOTRANSFERRINA NA PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA O TRATAMENTO DO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL. A INVENÇÃO REFERE-SE PARTICULARMENTE À UTILIZAÇÃO DE APOTRANSFERRINA PARA A PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA O TRATAMENTO DE ACIDENTES VASCULARES CEREBRAIS EM QUE O FÁRMACO PREPARADO COM APOTRANSFERRINA É PARA ADMINISTRAÇÃO POR VIA VASCULAR, PREFERENCIALMENTE INTRAVENOSA OU INTRA-ARTERIAL.

RESUMO

**"APOTRANSFERRINA PARA TRATAMENTO DO ACIDENTE VASCULAR
CEREBRAL"**

A presente invenção relaciona-se com a utilização de apotransferrina na preparação de um medicamento para o tratamento do acidente vascular cerebral. A invenção refere-se particularmente à utilização de apotransferrina para a preparação de um medicamento para o tratamento de acidentes vasculares cerebrais em que o fármaco preparado com apotransferrina é para administração por via vascular, preferencialmente intravenosa ou intra-arterial.

DESCRIÇÃO**"APOTRANSFERRINA PARA TRATAMENTO DO ACIDENTE VASCULAR
CEREBRAL"**

A presente invenção está relacionada com o campo da medicina, e particularmente com o campo dos acidentes cerebrovasculares. Refere-se especificamente à utilização de apotransferrina para o tratamento do acidente vascular cerebral.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A isquémia cerebral é a redução do fluxo de sangue para níveis que são suficientes para manter o metabolismo necessário para a função normal e estrutura do cérebro. Quando o fornecimento de sangue diminui, o fornecimento de oxigênio, nutrientes e a eliminação de produtos do metabolismo de um tecido biológico também diminui, de que todos eles produzem lesões no tecido cerebral.

A isquémia cerebral pode ser total ou parcial, dependendo de se afecta todo o cérebro ou apenas uma ou várias áreas. As causas frequentes da isquémia cerebral total são a diminuição da potência cardíaca (paragem ou arritmias cardíacas) e a diminuição da resistência periférica (choque sistémico, cirurgia cardiovascular ou

hipotensão durante anestesia devida a cirurgia geral). A causa mais frequente da isquemia cerebral parcial é um acidente vascular cerebral.

Um acidente vascular cerebral é uma doença da circulação cerebral que provoca uma alteração transitória ou definitiva do funcionamento de uma ou várias partes do cérebro. De acordo com a sua etiologia, o acidente vascular cerebral pode ser isquémico ou hemorrágico. Um acidente vascular cerebral isquémico surge quando o cérebro perde fornecimento de sangue devido à interrupção súbita e imediata do fluxo sanguíneo, que ocorre frequentemente devido à oclusão de qualquer das artérias que fornecem a matéria cerebral devido a um coágulo sanguíneo. Em contraste, o acidente vascular cerebral hemorrágico é desencadeado pela ruptura de um vaso sanguíneo encefálico devido a um pico hipertensivo, um aneurisma congénito ou outras causas menos frequentes.

A afectação de áreas específicas do cérebro por acidentes vasculares cerebrais gera manifestações focalizadas como paralisia ou plegia de um hemicorpo (uma metade do corpo), paralisia facial, afasia (perda da capacidade de produzir ou compreender a linguagem) e desorientação, entre outras. Em geral, os sintomas de acidentes vasculares cerebrais são variáveis, dependendo da área do cérebro afectada. Nos casos mais leves, as consequências podem passar despercebidas e podem não ser muito limitantes para o doente devido à natureza anódina

dos sintomas. No entanto, os acidentes vasculares cerebrais frequentemente causam lesões neuronais permanentes ou resultam na morte do indivíduo. Na verdade, o acidente vascular cerebral é uma das principais causas de mortalidade e de incapacidade permanente em adultos na maioria dos países desenvolvidos.

Como comentado anteriormente, as lesões causadas pela isquémia cerebral após um acidente vascular cerebral estão relacionadas com o mau funcionamento do tecido cerebral e sua possível morte devido à falta de energia. Para restabelecer o fornecimento de energia após um episódio isquémico é portanto necessário restabelecer o fornecimento de sangue na área afectada.

Até à data, o único tratamento farmacológico aprovado para o tratamento de acidentes vasculares cerebrais é o activador do plasminogénio tecidual (tPA) por via intravenosa. O tPA tem um efeito trombolítico, *i.e.* produz a desintegração do coágulo que causa a falta de fornecimento de sangue na área do cérebro em risco. Portanto, este tratamento só está indicado para doentes com acidente vascular cerebral isquémico, sendo a sua utilização contraproducente em doentes com acidente vascular cerebral hemorrágico. Outra forma de restabelecer o fluxo de sangue é por uma intervenção cirúrgica que elimina a oclusão.

Seja qual for o tratamento, é importante que seja

prontamente realizado de modo a evitar grandes lesões no tecido causadas por isquémia cerebral. A administração de tPA está indicada apenas se for realizada durante as primeiras 4,5 horas após o início dos sintomas, embora também possa ser eficaz algumas horas mais tarde nos casos em que ainda há tecido recuperável. Isto significa que a janela terapêutica do tratamento trombolítico disponível é muito pequena. Além disso, embora o restabelecimento do fluxo sanguíneo (processo conhecido como reperfusão) ponha fim à situação de isquémia, implica novas lesões no tecido cerebral (lesões devidas à reperfusão).

As lesões devidas a reperfusão são devidas à resposta inflamatória dos tecidos afectados pela isquémia e, muito particularmente, à indução de stress oxidativo causado pela súbita disponibilidade de oxigénio. Estas lesões contribuem significativamente para prejudicar a saúde do doente de acidente vascular cerebral. Apesar do facto de estarem a ser feitos grandes esforços que permitem minimizar as lesões causadas por isquémia-reperfusão, até à data não existem estratégias eficazes para isto.

Uma área de investigação para limitar os efeitos negativos da reperfusão é a hipotermia terapêutica. A hipotermia pode ajudar a aliviar a pressão intracraniana e, por conseguinte, reduzir os efeitos nocivos da resposta imune inflamatória do doente e a produção de radicais livres durante a reperfusão. No entanto, esta terapêutica é complexa na sua aplicação e os seus efeitos são limitados.

Alguns estudos sugerem a utilização de agentes quelantes de ferro para evitar lesões devidas a reperfusão. Durante a reperfusão, o ferro transportado pelo sangue é capaz de catalisar as reacções que produzem espécies de oxigénio reactivas, sobretudo radicais hidroxilo. Estes radicais, por sua vez, iniciam a peroxidação dos lípidos, causam a degradação do ADN e inactivam enzimas. Devido ao seu teor elevado de lípidos, o cérebro é especialmente sensível à peroxidação, que causa danos consideráveis durante a reperfusão. O pedido de patente internacional WO2006/20727 propõe a utilização de desferroxamina como agente neuroprotector contra os efeitos nocivos da reperfusão. No entanto, a administração de desferroxamina coloca problemas devido à sua semi-vida reduzida no plasma e porque a sua injeção intravenosa pode causar hipotensão com o risco de choque letal, de modo que só é eficaz quando administrada por via intranasal na parte superior da cavidade nasal. Neste sentido, Green AR (*British Journal of Pharmacology*, 2008, vol. 153, S325-S338) descreve opções de tratamento para acidente vascular cerebral isquémico, sendo um deles a neuroprotecção utilizando quelantes de metais, como DP-B99, um derivado de BAPTA (ácido 1,2-bis(o-aminofenoxy)etano-N,N,N',N'-tetraacético), e PAN-811 (3-aminopiridino-2-carboxaldeído-tiossemicarbazona).

Foram sugeridas outras abordagens farmacológicas no campo, mas nenhuma delas demonstrou eficácia *in vivo* para o tratamento de lesões provocadas por acidente

vascular cerebral isquêmico e reperfusão. Por exemplo, Heikkinen *et al.* (*Scandinavian Cardiovascular Journal*, 2004, vol. 38, n. 3, páginas 178-186) descrevem a administração de apotransferrina intravenosa a porcos que sofrem uma paragem circulatória hipotérmica. No entanto, os autores concluem que não foi observada qualquer eficácia terapêutica substancial para este tratamento.

Além disso, Chen-Roetling J. *et al.* (*Neuropharmacology*, 2011, vol. 60, n. 2-3, páginas 423-431) descrevem que a apotransferrina pode mitigar a neurotoxicidade da hemoglobina após hemorragia intracerebral *in vitro*. Mas este estudo não sugere um tratamento apropriado para estados não relacionados com toxicidade da hemoglobina, como as lesões causadas por isquemia cerebral e reperfusão subsequente.

Assim, seria desejável encontrar novas estratégias para o tratamento de acidentes vasculares cerebrais.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Surpreendentemente, os presentes inventores verificaram que a administração de apotransferrina (ou transferrina isenta de ferro) na corrente sanguínea de um doente reduz consideravelmente as lesões causadas após um acidente vascular cerebral isquêmico.

Assim, num primeiro aspecto, a invenção propor-

ciona a utilização de apotransferrina para a preparação de um medicamento para o tratamento de acidente vascular cerebral isquémico. Este aspecto pode ser reformulado como apotransferrina para o tratamento de acidente vascular cerebral isquémico.

A invenção também se refere a um método de tratamento de acidente vascular cerebral isquémico pela administração de apotransferrina a um animal dele necessitado. Numa forma de realização específica, o animal é um mamífero, preferencialmente um ser humano.

"Acidente vascular cerebral" (também chamado enfarte cerebral, acidente vascular cerebral, apoplexia ou simplesmente acidente vascular) é entendido como sendo uma doença da circulação cerebral que causa uma alteração transitória ou definitiva no funcionamento de uma ou várias partes do cérebro. Quando só afecta uma área do cérebro, o acidente vascular é chamado "acidente vascular cerebral focal". Em alguns casos, o acidente vascular cerebral é transitório, com o fluxo de sangue a retornar à área afectada após um certo período de tempo (um processo chamado "reperusão"). Noutras ocasiões, não ocorre uma reperusão significativa do tecido, dando origem a um acidente vascular cerebral permanente. Por outro lado, dependendo da sua etiologia, o acidente vascular cerebral pode ser isquémico ("acidente vascular cerebral isquémico") ou hemorrágico ("acidente vascular cerebral hemorrágico") dependendo de se é produzido como consequência da oclusão

de qualquer das artérias que abastecem a matéria cerebral ou da ruptura de um vaso sanguíneo encefálico, respectivamente.

"Apotransferrina" é a fracção de transferrina que está isenta de ferro. A transferrina, ou siderofilina, é a proteína que transporta o ferro no sangue. É uma globulina beta-2, com forma elipsóide e com um peso molecular que varia entre 70000 e 95000 daltons, que tem dois sítios de ligação de ferro activos. Quando a transferrina está isenta de ferro é chamada apotransferrina. Quando a transferrina está saturada com ferro é chamado holotransferrina. A utilização de apotransferrina no tratamento de acidentes vasculares cerebrais tem a vantagem de que é uma proteína endógena em animais, o que implica um risco menor de produzir reacções adversas no organismo. Preferencialmente, a apotransferrina para utilização na presente invenção é apotransferrina humana.

Numa forma de realização do primeiro aspecto da invenção, a apotransferrina é administrada por via vascular.

"Administração por via vascular" entende-se como qualquer via de administração em que o fármaco é introduzido na corrente sanguínea, com o que atinge o tecido lesionado. Exemplos não limitativos de vias de administração que introduzem o fármaco na corrente sanguínea são: as vias intravenosa (IV) e intra-arterial

(IA), que introduzem o fármaco directamente na corrente sanguínea, bem como as vias sublingual, conjuntiva, subcutânea, intramuscular, intradérmica, rectal, oral e tópica, que introduzem o fármaco indirectamente na corrente sanguínea.

Assim, numa forma de realização específica, a invenção proporciona a utilização de apotransferrina na preparação de um medicamento para o tratamento de acidente vascular cerebral isquémico, em que o medicamento preparado com apotransferrina é administrado por via vascular. Esta forma de realização pode ser reformulada como apotransferrina para o tratamento de acidente vascular cerebral isquémico, em que a apotransferrina é administrada por via vascular.

A invenção também se refere a um método de tratamento de acidente vascular cerebral isquémico pela administração por via vascular de apotransferrina a um doente dele necessitado.

O facto de a administração de apotransferrina na corrente sanguínea ser eficaz para o tratamento de acidente vascular cerebral isquémico é surpreendente, uma vez que é conhecido que a apotransferrina não é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica (Andrews N. *et al.*, "Iron homeostasis: insights from genetics and animal models", *Nature Reviews Genetics*, 2000, vol. 1, páginas 208-217). No entanto, os inventores demonstraram a eficácia de

apotransferrina administrada na corrente sanguínea por via intravenosa (IV) no tratamento de lesões devidas a isquémia-reperfusão em dois modelos experimentais *in vivo* de acidente vascular cerebral transitório isquémico focal (ver FIG. 1 e FIG. 2). Ambos os modelos estudaram a afectação do tecido cerebral de ratos submetidos a isquémia-reperfusão 24 h após a administração de apotransferrina por injeção IV em comparação com controlos a quem não foi administrada apotransferrina. Os resultados indicam claramente que o volume de tecido lesionado é significativamente menor nos animais tratados com apotransferrina.

Os inventores observaram que, surpreendentemente, a administração vascular (por via IV) de apotransferrina também é benéfica na ausência de reperfusão ou restauração do fluxo sanguíneo. A FIG. 3 mostra os resultados obtidos com a administração de apotransferrina num modelo experimental *in vivo* do acidente vascular cerebral isquémico focal permanente. Neste modelo a apotransferrina foi administrada por via IV 50 min depois de ter tido lugar uma oclusão permanente da artéria cerebral média nos ratos, sem reperfusão. Observou-se que os ratos tratados com apotransferrina por via IV mostram menos lesões cerebrais do que os controlos não tratados; particularmente, observa-se que o volume da área cerebral lesionada nos ratos tratados com apotransferrina é 50% menor. Além disso, os resultados preliminares de ensaios neurológicos indicam que os ratos submetidos a uma oclusão permanente da artéria cerebral média apresentam menos défice neurológico e

executar tarefas motoras envolvendo a área cerebral isquêmica com maior eficiência quando tratados com apotransferrina.

A utilização de apotransferrina no tratamento de acidentes vasculares cerebrais isquêmicos tem, por conseguinte, a vantagem adicional de que a sua eficácia vai mais além do que reduzir as lesões devidas a reperfusão, produzindo efeitos benéficos nos doentes de acidente vascular cerebral que não podem ser tratados com agentes trombolíticos, com neurointervenção ou de qualquer outra forma. A relevância clínica é significativa uma vez que, até à data, os doentes nessa situação não podem beneficiar de qualquer tratamento.

Por outro lado, a eficácia de apotransferrina na redução das lesões provocadas por isquemia cerebral após um acidente vascular cerebral contrasta com os efeitos nocivos da holotransferrina. A FIG. 4 demonstra que a administração IV de holotransferrina induz a morte neuronal e uma vasta produção de radicais livres em neurónios de cultura submetidos a um modelo *in vitro* de isquemia chamado privação de oxigénio e glucose (OGD). Assim, das fracções existentes de transferrina, só a apotransferrina é capaz de exercer efeitos benéficos no tecido isquémico. Além disso, a holo-transferrina administrada intravascularmente antes de a isquemia ocorrer aumenta o volume de enfarte avaliado nas primeiras horas após o início da oclusão num modelo de acidente vascular cerebral experimental *in vivo* (FIG. 5).

As vias de administração vascular incluem injeção IV e IA. Estas vias de administração envolvem várias vantagens em relação à velocidade de acção (o fármaco chega rapidamente à área afectada), facilidade de administração, controlo da dose, etc. Assim, o tratamento com apotransferrina para acidente vascular cerebral pode ser administrado directamente na corrente sanguínea através de um cateter intravenoso ou intra-arterial, que é muito conveniente em doentes que, como no caso dos doentes com acidente vascular cerebral, ou estão muito agitados, ou incapazes de executar acções simples como a ingestão de um fármaco. Por outro lado, a administração de apotransferrina por via IV ou IA facilita a administração deste agente activo conjuntamente com um agente trombolítico, como tPA, ou outro agente terapêutico, numa terapêutica de associação para o tratamento do acidente vascular cerebral.

A invenção também contempla a administração de apotransferrina por outra via de administração vascular, por exemplo, oral ou sublingual. Além disso, a invenção contempla a administração de apotransferrina por injeção epidural, injeção intracraniana ou aplicação intranasal.

Assim, numa forma de realização específica, a via de administração de apotransferrina é intravenosa ou intra-arterial. Numa outra forma de realização específica, a via de administração de apotransferrina é sublingual. Noutra forma de realização específica, a via de administração é intranasal.

A administração de apotransferrina de acordo com a invenção é útil para o tratamento do acidente vascular cerebral, independentemente da extensão do acidente vascular cerebral. Assim, a invenção refere-se ao tratamento de acidentes vasculares cerebrais permanentes ou transitórios, bem como ao tratamento de um acidente vascular cerebral causado por um coágulo (isquémico).

Numa forma de realização específica, a invenção proporciona apotransferrina para o tratamento de um acidente vascular cerebral isquémico que é um acidente vascular cerebral isquémico focal agudo.

Numa forma de realização, a invenção proporciona apotransferrina para o tratamento de um acidente vascular cerebral permanente. Noutra forma de realização é proporcionada apotransferrina para o tratamento de um acidente vascular cerebral transitório.

Os doentes que sofreram um acidente vascular cerebral isquémico podem por vezes ser susceptíveis ao tratamento com terapêutica trombolítica. Nestes casos, o tratamento do acidente vascular cerebral com a terapêutica trombolítica pode ser vantajosamente associado a terapêutica baseada em apotransferrina. Enquanto o agente trombolítico possibilita o restabelecimento da circulação de sangue na área afectada, a apotransferrina minimiza as lesões produzidas pela isquémia e a reperfusão, evitando

grandes lesões no tecido. Assim, numa forma de realização específica, a invenção proporciona apotransferrina para o tratamento do acidente vascular cerebral isquémico em associação com um agente trombolítico. Preferencialmente, o agente trombolítico é um activador de plasminogénio tecidual humano.

Em geral, o tratamento com apotransferrina vai ser realizado o mais rapidamente possível para evitar grandes lesões ao tecido cerebral, de modo a que o profissional médico pode considerar que é adequado administrar apotransferrina logo que o doente de acidente vascular cerebral chega aos seus cuidados. Em alguns casos, como doentes susceptíveis de serem tratados com terapêutica trombolítica, a apotransferrina pode ser administrada no momento da reperfusão. "No momento da reperfusão" é entendida como variando de duas horas antes até 2 horas depois da reperfusão, bem como exactamente ao mesmo tempo que a reperfusão. Isto implica que a apotransferrina pode ser administrada ao mesmo tempo que é administrado um agente trombolítico, ou na altura da realização de uma intervenção cirúrgica para eliminar o coágulo que está a obstruir o fluxo de sangue. Nos casos em que o restabelecimento do fluxo de sangue é inexistente ou muito limitado, a administração de apotransferrina também é vantajosa e, em geral, esta vai ser realizada o mais cedo possível após o diagnóstico.

A presente invenção também proporciona a

utilização de apotransferrina para o tratamento de doentes de acidente vascular cerebral isquémico em associação com outras terapêuticas. Terapêuticas adequadas para a sua utilização em associação com terapêutica à base de apotransferrina são, como anteriormente mencionado, o tratamento trombolítico e/ou a intervenção cirúrgica para eliminar a causa de acidente vascular cerebral isquémico. Outras terapêuticas adequadas para a sua utilização em associação com a terapêutica à base de apotransferrina são, sem limitação, intervenção cirúrgica para diminuir a hemorragia que causou o acidente vascular cerebral hemorrágico, tratamento com citicolina, com agentes quelantes, com agentes anti-oxidantes, com limitadores de lesões excitotóxicos, com agentes anti-inflamatórios, com fluoxetina, ou conjuntamente com outras apoformas de moléculas de transporte do ferro que utilizam receptores para o seu transporte como, por exemplo, lactoferrina.

Numa forma de realização específica, a apotransferrina é utilizado em terapêutica de associação com um agente quelante, por exemplo um agente quelante de ferro. Noutra forma de realização específica, o agente quelante é desferroxamina. Noutra forma de realização específica, a apotransferrina é utilizada em terapêutica de associação com um agente quelante de outro metal diferente do ferro. Noutra forma de realização específica, a apotransferrina é utilizada em associação com citicolina. A citicolina (citidina-5'-difosfocolina) é um intermediário na síntese de fosfatidilcolina a partir de colina que

demonstrou um efeito benéfico na evolução de hipoxia e isquemia cerebral.

O perito na arte compreende que a terapêutica de associação é eficaz quando os agentes terapêuticos são administrados fazendo parte da mesma composição, mas também quando fazem parte de composições diferentes, quer seja para administração simultânea, sequencial ou separada. Por outro lado, o perito na arte irá compreender que a apotransferrina pode ser prescrita para o tratamento de acidente vascular cerebral isquêmico com uma indicação para utilização em associação com outro agente activo.

A invenção também se refere a composições farmacêuticas que compreendem uma quantidade terapeuticamente eficaz de apotransferrina, conjuntamente com quantidades suficientes de excipientes e veículos farmacêuticamente aceitáveis. Numa forma de realização específica, a composição farmacêutica da invenção é concebido para a sua administração vascular, por exemplo para a sua administração por via IV ou IA.

Por "farmacêuticamente aceitável" entende-se que os compostos, materiais ou composições são apropriados para serem administradas a um animal, incluindo um ser humano, sem induzir toxicidade, irritação, incompatibilidade, instabilidade, resposta alérgica ou outros semelhantes. Cada excipiente ou veículo farmacêuticamente aceitável também tem de ser aceitável no sentido de ser compatível

com os outros ingredientes da composição farmacêutica da invenção. As composições da presente invenção podem adicionalmente compreender componentes que permitem uma libertação controlada ou maior conforto.

Preferencialmente, as composições da invenção vão ser administradas a doentes por via IV ou IA. Como os peritos na arte podem entender, as composições podem ser preparadas em diferentes formas adequadas para administração por via IV ou IA. Numa forma de realização específica, a composição compreende apotransferrina e soro fisiológico.

Nas aplicações terapêuticas, os agentes activos são administrados a um doente que sofre de uma doença numa quantidade terapeuticamente eficaz. "Quantidade terapeuticamente eficaz" entende-se ser uma quantidade de agentes activos suficientes para proporcionar benefícios ao doente. A quantidade de apotransferrina que a composição farmacêutica da invenção compreende pode ser determinada por um perito na arte seguindo protocolos correntes no domínio da medicina clínica. A quantidade terapeuticamente eficaz é também conhecida como a dose. A dose exacta vai depender da via de administração, da gravidade da doença e do estado de saúde geral do doente. Ao doente podem ser administradas doses individuais ou múltiplas (a intervalos de tempo) do agente activo. Por exemplo, para administração IV ou IA de apotransferrina é possível utilizar quantidades entre 1 e 2000 mg por kg de peso, ou entre 10 e 1500 mg por

kg de peso ou entre 50 e 1000 mg por kg de peso, ou entre 100 e 800 mg por kg de peso, ou entre 100 e 600 mg por kg de peso, ou entre 120 e 500 mg por kg de peso, ou entre 150 e 400 mg por kg de peso.

A apotransferrina para a sua utilização na presente invenção pode ser preparada por métodos conhecidos do estado da técnica. Por exemplo, o pedido de patente internacional WO2000/001407 descreve métodos para preparar apotransferrina humana para composições farmacêuticas. Também é possível obter apotransferrina em forma recombinante.

A presente invenção também contempla uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade terapêuticamente eficaz de apotransferrina, conjuntamente com quantidades suficientes de excipientes e veículos farmacêuticamente aceitáveis, para a sua utilização no tratamento de acidente vascular cerebral isquêmico. Isto pode ser reformulado como a utilização de uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade terapêuticamente eficaz de apotransferrina, conjuntamente com quantidades suficientes de excipientes e veículos farmacêuticamente aceitáveis, para a preparação de um medicamento para o tratamento de acidente vascular cerebral isquêmico. Numa forma de realização específica, o tratamento do acidente vascular cerebral isquêmico é realizado por administração da composição da invenção por via vascular, por exemplo por via IV ou IA, e a composição é formulada para a administração por via IV ou IA.

Finalmente, a invenção também se refere a um método de tratamento de acidente vascular cerebral isquémico compreendendo a administração ao doente, preferencialmente por via vascular, de uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de apotransferrina, conjuntamente com quantidades suficientes de excipientes e veículos farmacêuticamente aceitáveis.

Ao longo da descrição e das reivindicações a palavra "compreende" e suas variantes não pretendem excluir outras características técnicas, aditivos, componentes ou passos. Para os peritos na arte, outros objectos, vantagens e características da invenção serão em parte inferidas a partir da descrição e em parte a partir da prática da invenção. Além disso, a presente invenção abrange todas as combinações possíveis de formas de realização específicas e preferidas aqui indicadas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

FIG. 1. Volume do enfarte cortical induzido em ratos por 60 minutos de oclusão da artéria cerebral média por ligadura. A, imagem da área afectada nos cérebros dos ratos. B, percentagem do volume de tecido cerebral enfartado com administração de: (2) apotransferrina ou (1) veículo. Em relação aos exemplos, a FIG. 1 está relacionada com o ponto 1 dos resultados.

FIG. 2. Volume de enfarte cortical induzida em ratos por 90 minutos de oclusão da artéria cerebral média por filamento intraluminal. A, imagem da área afectada nos cérebros dos ratos. B, percentagem do volume de tecido enfartado com a administração de: (2) apotransferrina ou (1) veículo. Em relação aos exemplos, a FIG. 2 está relacionada com o ponto 1 dos resultados.

FIG. 3. Percentagem de volume de enfarte cortical induzido em ratos pela oclusão permanente da artéria cerebral média por ligadura com a administração de: (2) apotransferrina ou (1) veículo. Em relação aos exemplos, a FIG. 3 está relacionada com o ponto 1 do resultados.

FIG. 4. A, Determinação do efeito de diferentes concentrações de holotransferrina (HTF) sobre a morte neuronal em: (a) culturas normóxicas ou (b) culturas sujeitas a privação de oxigénio e glucose (OGD) e 30 min de reperfusão. O eixo de Y mostra a morte neuronal determinada pela incorporação de iodeto de propídio em células. B, produção de radicais livres em: (a) neurónios em cultura de controlo, (1) neurónios com adição de FeCl_3 50 μM ou (2) neurónios com adição de HTf 5 μM . O eixo Y mostra a percentagem de fluorescência DCF vs OGD/veículo. Em relação aos exemplos, a FIG. 4 está relacionado com o ponto 2 dos resultados.

FIG. 5. Lesão neuronal medida por ressonância

magnética nuclear em ratos submetidos à oclusão transitória da artéria cerebral média por filamento intraluminal após injeção intravascular de veículo (1) ou holotransferrina (2). O eixo de X representa o tempo em minutos enquanto o eixo de Y representa o volume de lesão neuronal em mm³ de acordo com a sequência DWI. Em relação aos exemplos, a FIG. 5 está relacionada com o ponto 2 dos resultados.

EXEMPLOS

Os exemplos seguintes são proporcionados a título de ilustração e sem pretender ser limitativos da presente invenção.

Materiais e métodos

1. Modelo *in vitro*

1.1. Cultura primária de neurónios do cortex cerebral de rato. As culturas de neurónios corticais foram preparadas seguindo o protocolo anteriormente descrito (Ponce J. et al., "The effect of simvastatina on the proteome of detergent resistant membrane domains: decreases of specific proteins previously related to cytoskeleton regulation, calcium homostasis and cell fate", *Proteomics*, 2010, vol. 10, páginas 1954-1965), embora os neurónios fossem semeados em placas com 24 poços.

1.2. Privação de oxigénio e glucose. Os estudos

foram realizados em neurónios cultivados 11 dias. Para produzir a privação de oxigénio e glucose (OGD) o meio de cultura condicionado foi removido e mantido separadamente. As células expostas a OGD foram incubadas durante 90 min com meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen, Barcelona, Espanha) numa atmosfera contendo 0,1% de O₂. As células de controlo foram incubadas com DMEM suplementado com 4,5 g/L de glucose em condições normóxicas. A reperfusão foi produzida por devolução do meio condicionado e condições de normoxia às células durante 30 min.

1.3. Tratamentos em neurónios de cultura. Os neurónios corticais de cultura foram tratados com FeCl₃ (10-50 µM), complexo de holo-transferrina (HTf) (1-5 µM) ou apotransferrina (1-5 µM) (Sigma, Madrid, Espanha) durante o período de reperfusão.

1.4. Determinação da morte celular. Os estudos de morte celular foram determinados após a medição da incorporação de iodeto de propídio nas células (Sigma, Madrid, Espanha) utilizando o método anteriormente descrito (Rudolph J. G. *et al.*, "Use of a multiwell fluorescence scanner with propidium iodide to assess NMDA mediated excitotoxicity in rat cortical neuronal cultures". *Neurosci. Lett.*, 1997, vol. 221, páginas 149-152).

1.5. Produção de radicais livres de oxigénio. Como um índice para a produção de •OH + peróxido a

conversão do composto diacetato de 5-(e -6)-clorometil-2,7-diclorodi-hidrofluoresceína, mistura de isómeros, éster de acetilo (CM-H2DCFDA) (Invitrogen, Barcelona, Espanha) em diclorofluoresceína (DCF). Os neurónios expostos a OGD foram reperfundidos durante 30 min na presença ou na ausência de 5 μ M de HTf ou 50 μ M de FeCl₃. O composto CM-H2DCFDA (10 μ M) foi adicionado ao meio de perfusão e imagens ao microscópio foram adquiridos com o filtro adequado como indicado pelo fabricante. A intensidade do sinal foi quantificada utilizando o programa Image J (NIH, EUA).

2. Modelos *in vivo*

Todos os protocolos experimentais em que participaram animais foram aprovados pelo Comité de ética na experimentação animal da Fundació Institut D'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol. Os animais foram anestesiados por exposição a 5% de isofluorano ou 2% de sevoflurano numa mistura de 30/70% de O₂/N₂O. Os animais permaneceram anestesiados durante todo o procedimento cirúrgico devido à inalação de uma dose de manutenção de anestesia de 1,5-2,0% de isofluorano ou 0,5-1 de sevoflurano numa mistura de 30/70% de O₂/N₂O. Uma vez concluídas as intervenções para executar os modelos experimentais de acidente vascular cerebral, as incisões cirúrgicas foram suturadas e os animais foram devolvidos às suas gaiolas, permanecendo nelas durante 24 h até o momento da realização dos ensaios neurológicos pós-isquémia e do

sacrifício do animal. Em alguns casos, os animais foram submetidos a ensaios neurológicos nos dias anteriores à realização da cirurgia e estes resultados foram comparados com os resultados dos ensaios idênticos realizados no pós-operatório.

2.1. Processo de isquémia cerebral focal transitória realizada por ligadura da artéria cerebral média (MCA).

Ratos Sprague-Dawley machos (250-270 g, Harlan Laboratories, Barcelona) foram sujeitos a uma pequena craniotomia para expor a artéria cerebral média que foi ligada imediatamente antes da sua bifurcação no ramo frontal e parietal mesmo antes do ramo oftálmico. A interrupção do fluxo sanguíneo foi verificada à lupa cirúrgica e ambas as artérias carótidas foram ocluídas durante 60 min. No final dos 60 minutos ambas as carótidas e a artéria cerebral média foram desligadas, e imediatamente depois a solução de veículo (solução de soro fisiológico) ou 50 mg de apotransferrina (Sigma, Madrid, Espanha) em solução de veículo foi administrada directamente no compartimento intravascular por injeção em vasos da cauda do animal.

2.2. Processo de isquémia cerebral focal permanente realizada por ligadura de MCA.

O protocolo é idêntico ao descrito na secção 2.1.

excepto que a MCA e a carótida esquerda permanecem ligadas até ao momento do sacrifício do animal e o veículo ou a apotransferrina foram administrados 50 minutos após o início da isquémia.

2.3. Processo de isquémia cerebral focal transitória utilizando filamento intraluminal. Efeito da administração de apotransferrina.

Ratos Wistar machos (300-350 g, Charles River Laboratories, Barcelona, Espanha) foram anestesiados com uma injeção de 5 mg/kg de diazepam (Almirall Prodesfarma, Barcelona, Espanha), 100 mg/kg de cetamina (Ketolar, Parke-Davis, El Prat de Llobregat, Barcelona, Espanha) e 0,3 mg/kg de atropina (B Braun Medical, Rubí, Barcelona, Espanha) para permitir a sua intubação para ventilação mecânica (Harvard Apparatus, ventilador 683 para roedor, Holliston, MA, EUA). A anestesia foi prolongada por exposição a 0,5-1% de sevoflurano (Sevorane, Abbott Laboratories, Madrid, Espanha) numa mistura de 30/70% de O₂/N₂O. Isquémia focal foi induzida no hemisfério direito utilizando um filamento de nylon que é introduzido até à oclusão do MCAO seguindo o protocolo descrito por Longa E. Z. *et al.* (Longa E. Z. *et al.*, "Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats", *Stroke* 1989, vol. 20, páginas 84-91). A oclusão e redução do fluxo sanguíneo foram medidas com uma sonda de laser Doppler fixada ao crânio na área parietal adjacente à extremidade

da área de abastecimento de MCA. 90 min após o início da isquémia, o filamento intraluminal foi retirado, houve uma espera de 5-10 min para verificar o restabelecimento efectivo do fluxo sanguíneo para os seus níveis prévios e um total de 100 mg de apotransferrina foram administrados intravascularmente em duas administrações realizadas com 30 minutos de diferença (Sigma, Madrid, Espanha). Como controlos, foram utilizados ratos a quem foi administrado veículo em vez de apotransferrina.

2.4. Isquémia cerebral focal transitória utilizando filamento intraluminal. Efeito da administração de holotransferrina.

Nesta experiência, foi utilizado o mesmo processo descrito por Longa E. Z. *et al.*, mas em ratos Sprague-Dawley machos de 250-280 g (biotério da Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Espanha). Além disso, os animais foram injectados intravascularmente com 85 mg de holotransferrina ou veículo 10 min antes de se iniciar a oclusão. Depois de realizada a oclusão, os animais foram introduzidos num aparelho de ressonância magnética nuclear (9,4 T) (Bruker Biospan, Ettlingen, Alemanha) para determinar o volume de tecido cerebral hipoperfundido durante os 90 min de isquémia e a sequência de imagiologia ponderada de difusão (DWI) correspondendo a uma área cerebral lesionada. Várias determinações foram realizadas a intervalos de 15 minutos durante os 90 min de

isquémia e até atingir 165 minutos desde o início da oclusão.

2.5. Ensaaios neurológicos.

A isquémia cerebral focal unilateral realizada afecta só a função sensorial e motora do lado contralateral do animal. Foi realizada uma bateria de ensaios neurológicos para avaliar o grau de afectação cerebral sensorial e motora à esquerda e à direita do animal. O resultado de todos estes ensaios foi um valor de défice neurológico que se correlacionou com o volume de enfarte. Foi realizada uma linha de base pré-ensaios para cada animal como um controlo antes de se realizar a isquémia focal. Foram realizados os seguintes ensaios, que são bem conhecidos no estado da arte:

2.5.1. Ensaio dos pelos dos bigodes: Foi avaliada a resposta de cada animal à estimulação dos pelos dos bigodes do lado esquerdo e direito, realizada de modo a que o animal não tenha informação visual a este respeito.

2.5.2. Ensaio da capacidade preênsil: Foi determinado o tempo em que o animal foi capaz de aguentar o seu próprio peso agarrado pelos dois membros superiores a uma haste suspensa.

2.5.3. Ensaio do virar da esquina: Foi avaliada a capacidade dos animais de se virarem para a direita ou para

a esquerda quando colocados em frente de um ângulo de 30° de tal modo que tem de se virar para se movimentar.

2.5.4. Ensaio do autocolante: Foi posto um autocolante em cada um dos membros superiores do animal e foi determinado quanto tempo o animal levou a retirar cada autocolante.

2.5.6. Ensaio de suspensão da cauda: Registou-se a percentagem e o ângulo de rotação do corpo para a direita e esquerda que o animal realizou suspenso pela sua cauda.

2.5.7. Ensaio da grelha: este avalia a força que o animal pode exercer com os seus membros superiores agarrado a uma grelha.

2.6. Determinação do volume do enfarte.

Uma vez sacrificado o animal 24 horas após o início da isquémia cerebral, o cérebro foi dissecado e foi cortado em secções coronais de 2 mm que foram incubadas com solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio a 1% (TTC) (Sigma, Madrid, Espanha) durante 20 min a 37°C. As secções foram fotografadas e foi calculada a percentagem de área do cérebro não corada com TTC relativamente à área presente no hemisfério ipsilesional. A área não corada com TTC corresponde à área lesionada pelo acidente vascular cerebral.

Resultados

1. A administração intravenosa de apotransferrina reduz consideravelmente as lesões neuronais causadas após um acidente vascular cerebral.

As FIG. 1 e 2 mostram a eficácia da apotransferrina administrada na corrente sanguínea por via intravenosa no tratamento de isquémia cerebral em dois modelos experimentais *in vivo* de acidente vascular cerebral isquémico focal transitório. A FIG. 1 representa a redução do volume de enfarte cortical induzida por 60 minutos de oclusão da artéria cerebral média por ligadura da MCAO nos animais tratados com apotransferrina em comparação com os controlos a quem apenas foi administrado veículo. A FIG. 2 representa a redução do volume do enfarte induzida por 90 minutos de oclusão da artéria cerebral média por filamento intraluminal nos animais tratados com apotransferrina em comparação com os controlos. As áreas mais claras das imagens (A) das FIG. 1 e 2 indicam a área do cérebro afectada. Em ambos os casos, os resultados demonstram claramente que a administração de apotransferrina é altamente vantajosa na redução das lesões causadas por acidente vascular cerebral isquémico focal transitório.

Também foi observado o efeito da administração de apotransferrina por via intravenosa num modelo de acidente vascular cerebral focal permanente. A FIG. 3 mostra como a administração IV de apotransferrina 50 min depois de a

oclusão permanente da artéria cerebral média ter sido produzida nos ratos levou a uma redução considerável (cerca de 50%) do volume da área cerebral lesionada. Portanto, a administração de apotransferrina também é eficaz para o tratamento de acidente vascular cerebral focal permanente, em que não ocorre a reperfusão do tecido isquémico. Os animais submetidos a oclusão permanente da artéria cerebral média foram também o objecto de ensaios neurológicos com o objectivo de avaliar o seu grau de afectação sensorial e motora. Os resultados preliminares destes ensaios indicaram que os ratos apresentaram menos défice neurológico e executaram tarefas motoras envolvendo a área do cérebro afectada com maior eficácia quando tratados com apotransferrina, confirmando assim os resultados anteriores.

2. A holo-transferrina aumenta a lesão neuronal em modelos de acidente vascular cerebral *in vitro* e *in vivo*.

O efeito de holotransferrina (fracção de transferrina que está saturada com ferro) também foi estudado num modelo de isquémia *in vitro* chamado OGD. Como ilustrado na FIG. 4, a holotransferrina induz a morte neuronal (A) e uma extensa produção de radicais livres (B) em neurónios de cultura sujeitos a OGD. Foi consistentemente observado que holotransferrina injectada intravascularmente antes de o acidente vascular cerebral ocorrer aumenta a lesão neuronal causada pelo derrame. A FIG. 5 mostra o DWI (volume da imagem ponderada por difusão) medido por ressonância

magnética nuclear em animais sujeitos a isquémia cerebral focal transitória utilizando filamento intraluminal. Este DWI corresponde à área de tecido que vai morrer. A figura mostra que os animais tratados com holotransferrina em diferentes momentos antes de se efectuar a oclusão de MCA mostraram maior DWI do que os controlos, isto é, mostraram maiores lesões neuronais do que os controlos.

Estes resultados indicam que, ao contrário apotransferrina, a holotransferrina é prejudicial para os doentes de acidente vascular cerebral.

Lisboa, 18 de agosto de 2016

REIVINDICAÇÕES

1. Apotransferrina para utilização no tratamento de acidente vascular cerebral isquémico.

2. Apotransferrina para utilização de acordo com a reivindicação 1, que é para administração por via vascular.

3. Apotransferrina para utilização de acordo com a reivindicação 2, que que é para administração por via intravenosa ou intra-arterial.

4. Apotransferrina para utilização de acordo com a reivindicação 3, em que o acidente vascular cerebral isquémico é um acidente vascular cerebral isquémico focal agudo.

5. Apotransferrina para utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1-4, em associação com um agente seleccionado do grupo que consiste num agente trombolítico, num agente quelante, citicolina, fluoxetina e lactoferrina.

6. Apotransferrina para utilização de acordo com a reivindicação 5, em que a associação é com um agente trombolítico.

7. Apotransferrina para utilização de acordo com a reivindicação 6, em que o agente trombolítico é um activador do plasminogénio tecidual humano.

8. Apotransferrina para utilização de acordo com qualquer das reivindicações 6-7, que é administrada no momento da reperfusão.

9. Apotransferrina para utilização de acordo com a reivindicação 5, em que o agente quelante é desferroxamina.

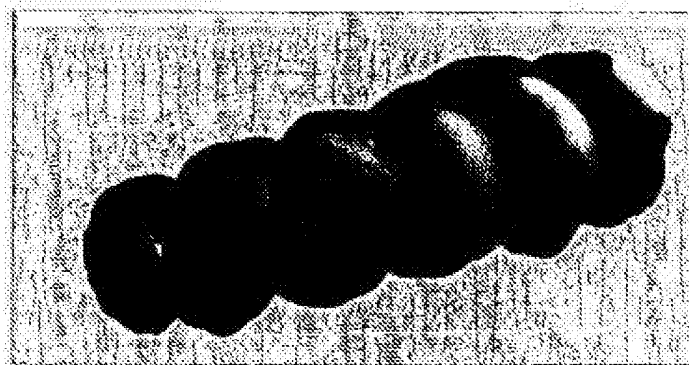
10. Apotransferrina para utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1-9, em que o acidente vascular cerebral é um acidente vascular cerebral transitório.

11. Apotransferrina para utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1-9, em que o acidente vascular cerebral é um acidente vascular cerebral permanente.

12. Apotransferrina para utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1-11, em que a dose a ser administrada de apotransferrina está compreendida entre 1 e 1000 mg por kg de peso.

Lisboa, 18 de agosto de 2016

A



B

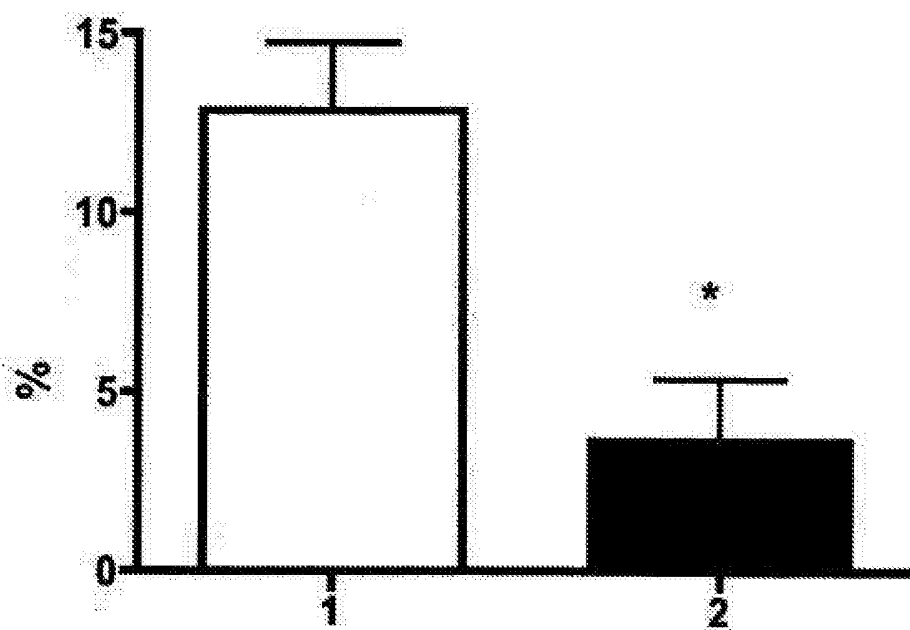
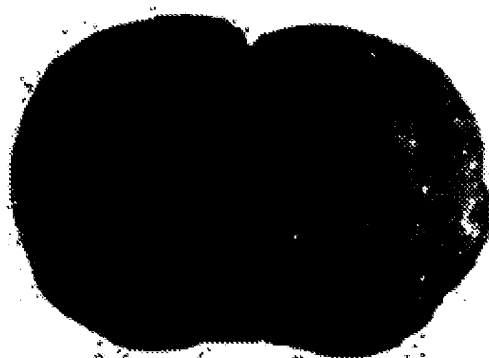


FIG. 1

A



B

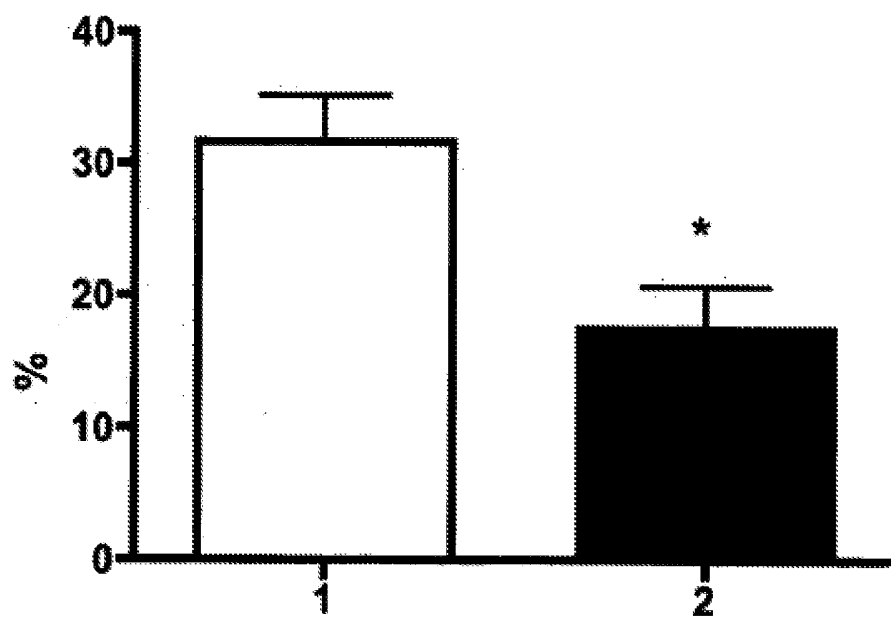


FIG. 2

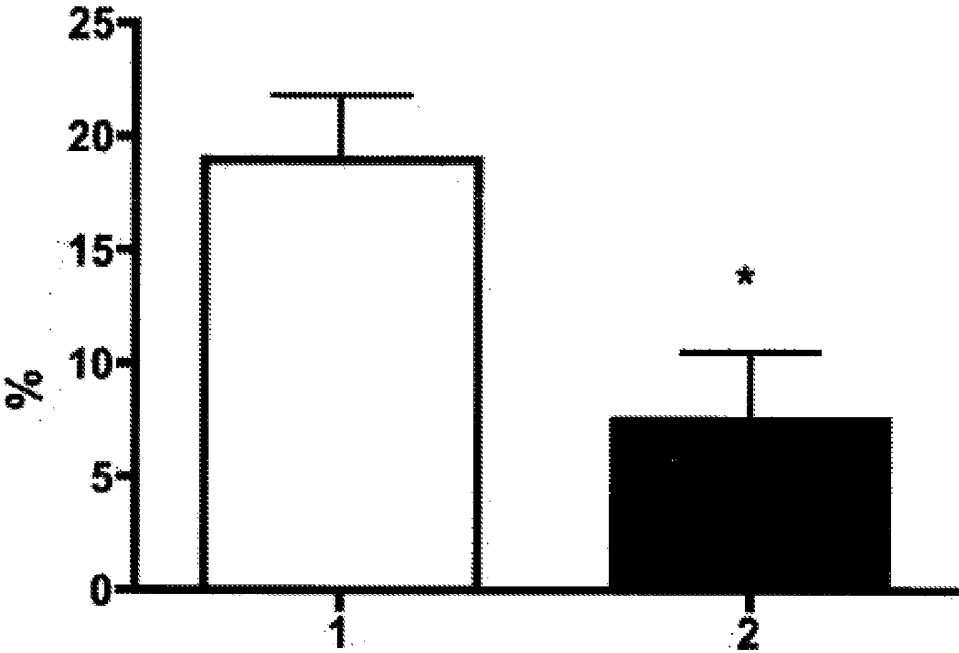


FIG. 3

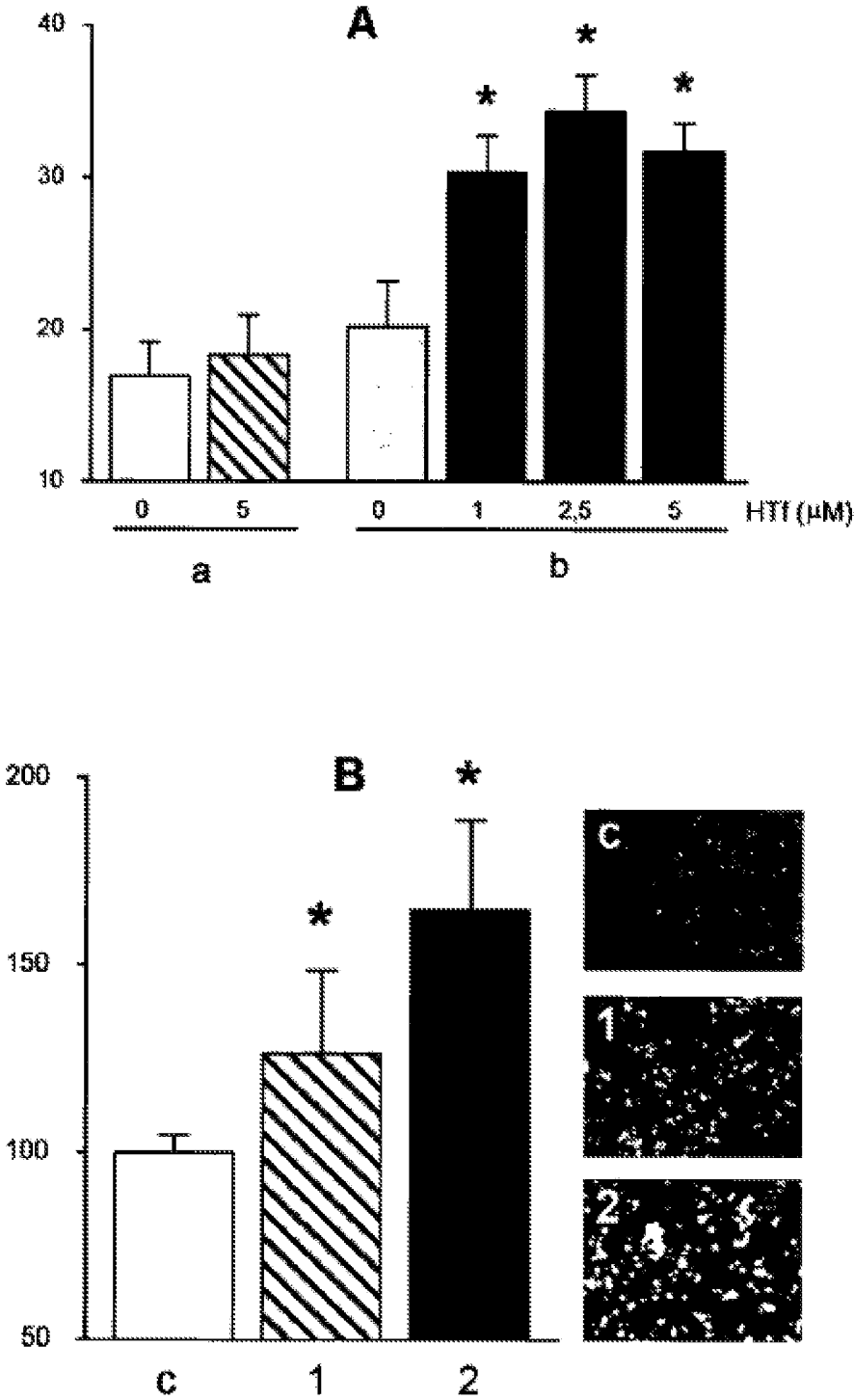


FIG. 4

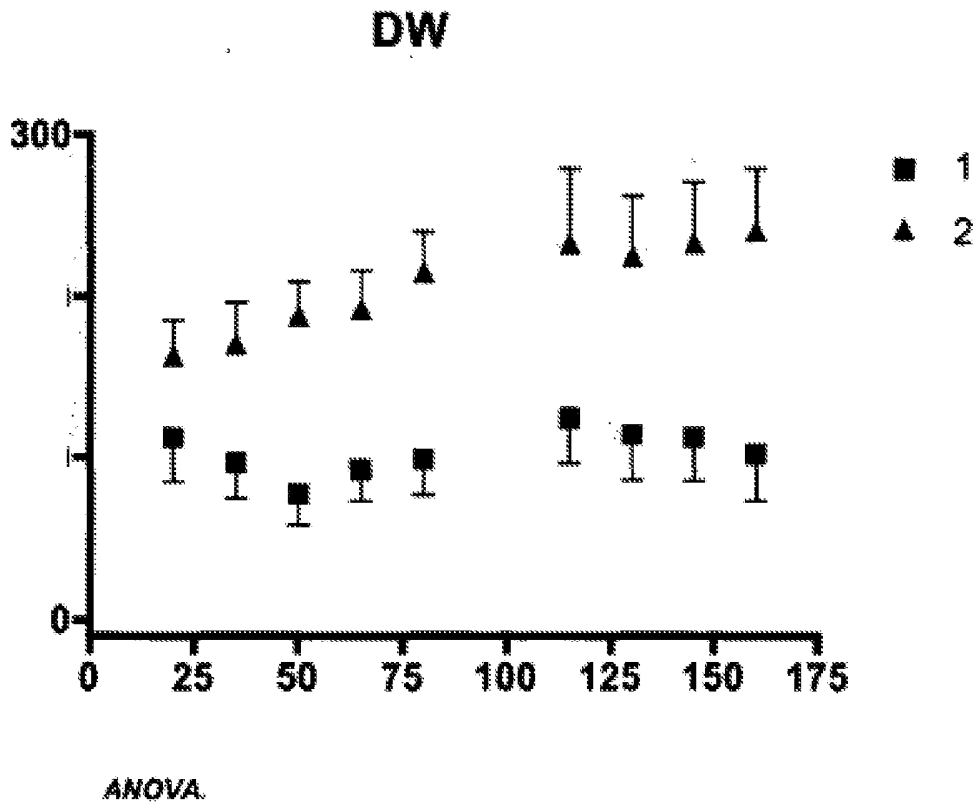


FIG. 5

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- * WO 200620727 A
- * WO 2000001407 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- * GREEN AR. *British Journal of Pharmacology*, 2006, vol. 153, S325-S336
- * HEIKKINEN et al. *Scandinavian Cardiovascular Journal*, 2004, vol. 38 (3), 178-186
- * CHEN-ROETLING J et al. *Neuropharmacology*, 2011, vol. 60 (2-3), 423-431
- * ANDREWS N et al. Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nature Reviews Genetics*, 2000, vol. 1, 208-217
- * PONCE J. et al. The effect of simvastatin on the proteome of detergent resistant membrane domains: decreases of specific proteins previously related to cytoskeleton regulation, calcium homeostasis and cell fate. *Proteomics*, 2010, vol. 10, 1954-1965
- * RUDOLPH J.G. et al. Use of a multiwell fluorescence scanner with propidium iodide to assess NMDA mediated excitotoxicity in rat cortical neuronal cultures. *Neurosci. Lett.*, 1997, vol. 221, 149-152
- * LONGA E.Z. et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1986, vol. 20, 84-91