



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) *Número de Publicação:* PT 728006 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
A61K031/70 A

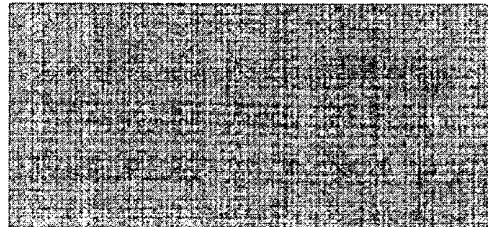
(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1993.03.16	(73) <i>Titular(es):</i> BTG INTERNATIONAL LIMITED 10 FLEET PLACE LIMEBURNER LANE LONDON EC4M 7SB REINO UNIDO GB
(30) <i>Prioridade:</i> 1992.03.17 GB 9205800	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1996.08.28	(72) <i>Inventor(es):</i> MARK WILLIAM JAMES FERGUSON GB
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2000.10.11	(74) <i>Mandatário(s):</i> MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO 50, 5º AND. 1269-163 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* USO DE FOSFATOS DE MANOSE PARA O TRATAMENTO DE PERTURBAÇÕES FIBRÓTICAS

(57) *Resumo:*

USO DE FOSFATOS DE MANOSE PARA O TRATAMENTO DE PERTURBAÇÕES
FIBRÓTICAS



Campo das Cebolas - 1149 - 035 LISBOA
 Telef.: 21 888 51 51 / 2 / 3
 Linha azul: 808 200 689
 Fax: 21 887 53 08 - 886 00 66
 E-mail: inpi @ mail. telepac. pt



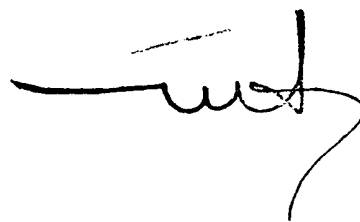
INSTITUTO NACIONAL
 DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 MINISTÉRIO DA ECONOMIA

FOLHA DO RESUMO

PAT. INV. <input checked="" type="checkbox"/>		MOD. UTI. <input type="checkbox"/>	MOD. IND. <input type="checkbox"/>	DES. IND. <input type="checkbox"/>	TOP. SEMIC. <input type="checkbox"/>	CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)	
N.º 728006 (11)		N.º Objectos <input type="checkbox"/>		N.º Desenhos <input type="checkbox"/>		DATA DO PEDIDO ___/___/___ (22)	
REQUERENTE (71) (NOME E MORADA) BTG INTERNATIONAL LIMITED, inglesa, industrial e comercial, com sede em 10 Fleet Place, Limeburner Lane, London EC4M 7SB, Reino Unido CÓDIGO POSTAL _____							
INVENTOR(ES) / AUTOR(ES) (72) MARK WILLIAM JAMES FERGUSON							
REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE(S) (30)					FIGURA (para interpretação do resumo)		
DATA DO PEDIDO	PAÍS DE ORIGEM	N.º DO PEDIDO					
17-03-92	GRÃ-BRETANHA	9205800					
EPÍGRAFE (54) "USO DE FOSFATOS DE MANOSE PARA O TRATAMENTO DE PERTURBAÇÕES FIBRÓTICAS"							
RESUMO (max. 150 palavras) (57)							

NÃO ESCREVER NAS ZONAS SOMBREADAS

SECRETARIA NACIONAL, S.A.
 SERVIÇOS DE REGISTO E MARCA
 1600-016 LISBOA



DESCRICÃO

Uso de fosfatos de manose para o tratamento de perturbações fibróticas

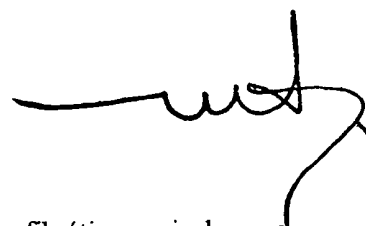
Enquadramento da invenção

1. Domínio da invenção

A presente invenção refere-se ao uso de certos compostos conhecidos para o novo fim de curar feridas e tratar certos outros estados associados com a acumulação de matriz extracelular nos tecidos.

2. Descrição da técnica relacionada

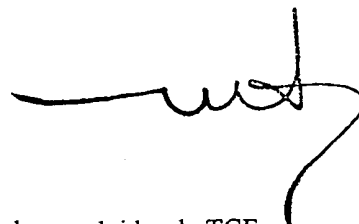
Um dos problemas que existem consiste no facto de, embora as feridas nas pessoas e outros mamíferos normalmente cicatrizarem com razoável rapidez, forma-se muitas vezes um tecido em crosta desagradável. É sabido que estão implicados factores de crescimento nas perturbações fibróticas. Foram feitas várias propostas para melhorar os efeitos das perturbações fibróticas através da administração às mesmas quer do factor de crescimento quer de anticorpos. Veja-se, por exemplo, W.A. Border *et al.*, *Nature* 346 371-374 (1990), que mostrou que a produção de matriz extracelular na glomerulonefrite proliferativa mesangial aguda (inflamação do rim que se pensa ser causada por danos imunológicos nas células) está associada com o aumento da produção do factor de transformação do crescimento (TGF)- β 1 e é suprimida pela administração de anti-TGF- β 1. E. Kovacs, *Immunology Today* 12 (1) 17-23 (1991) conclui que bloqueando os efeitos de certas citocinas (tais como a TNF- α) com anticorpos diminuiu a fibrose em modelos animais de danos nos tecidos. A Publicação do Pedido PCT N^o WO 91/04748 (La Jolla Cancer Research Foundation) propõe o tratamento de patologias associadas com a acumulação de matriz extracelular no tecido com factor de crescimento derivado de plateleto (PGDF) ou com anticorpos ao TGF-



- β 1. As doenças tratadas são, em geral, perturbações fibróticas e incluem a glomerulonefrite, o síndrome da aflição respiratória nos adultos, a cirrose do fígado, doenças fibrocíticas, a fibrose, cancros fibróticos, fibroides, fibroadenomas e fibrossarcomas. São mencionados outros estados fibróticos. O método pode também ser usado para tratar ou prevenir a formação excessiva de escaras, tais como escaras queloides (tecido de escara duro e irregular na pele que se forma quando uma ferida está sob tensão) e/ou é produzido em pessoas geneticamente predispostas. M. Shah, D. M. Foreman e M. W. J. Ferguson, *The Lancet* 339, 213-214 (Jan 25, 1992), descrevem o controlo da formação de escaras nas feridas através da administração de um anticorpo que neutraliza o TGF- β 1 e - β 2.

Os mecanismos biológicos através dos quais os factores de crescimento operam não estão bem entendidos, veja-se C. C. Bascom *et al.*, *Molecular and Cellular Biology* 9, 5508-5515 (1989).

É sabido que o TGF- β 1 é sintetizado como uma pré-pro-proteína de 390 amino ácidos que é convertida em proteína desenvolvida por clivagem entre os resíduos da 278 e 279. Contudo, o TGF- β 1 isolado *in vivo* é predominantemente encontrado sob a forma de um complexo latente de elevado peso molecular (LTGF- β 1) em que a pro-região está ainda associada com a molécula desenvolvida, apesar da clivagem da ligação de péptido. O TGF- β 2 e β -3 têm também formas latentes. Todos revelaram ligar-se a um receptor de membrana de plasma denominado receptor II do factor de crescimento tipo manose-6-fosfato/insulina independente do catião. A ligação ocorre através dos resíduos de manose-6-fosfato ligados nos sítios de glicosilação dentro da pró-região e, no caso do TGF- β 1 e TGF- β 2, mostrou ser inibido pelos anticorpos para o receptor. No caso do TGF- β 1, a ligação é inibida pelo próprio manose-6-fosfato. Veja-se P. A. Dennis e D. B. Rifkin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 580-584 (1991), M. N. Lioubin, H. Marquardt, R. Roth, K. S. Kovacina e A. F. Purchio, *Journal of Cellular Biochemistry* 45, 112-121 (1991) e K. Miyazano *et al.*, *Annals of the New York Academy of Sciences* 593, 51-58 (1990). Não tem sido claro se é

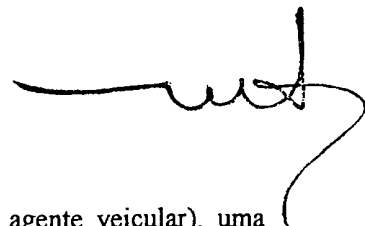


desejável impedir a geração in vivo das formas activas desenvolvidas de TGFs ou se a ligação do receptor de manose-6-fosfato é o único meio de activar a proteína desenvolvida. Foi sugerido na literatura que o TGF- β 1 é activado em várias condições de pH: veja-se "The Transforming Growth Factor β s" em "Peptide Growth Factors and Their Receptors 1" (eds. M. B. Sporn and A. B. Roberts), Springer Verlag 1990, páginas 419-472, na página 432 e nas referências aqui citadas. Veja-se também K. Miyazano et al., supra, na página 55, que menciona a activação por enzimas, tais como plasmina, catepsina D e uma glicosidase. Estes autores sugerem também que elevadas concentrações de ácido siálico ou de manose-6-fosfato activam a forma latente. Outra técnica anterior é ainda mencionada abaixo, cuja relevância não é evidente sem conhecimento da invenção, depois da secção "Resumo da Invenção".

Resumo da Invenção

Descobriu-se agora que o manose-6-fosfato (M-6-P) é útil na estimulação (aceleração) da cicatrização de feridas, enquanto mitiga ou impede a formação de tecido de escaras. O termo "manose" refere-se aqui exclusivamente ao D-isómero natural. Também, o manose-1-fosfato é útil na estimulação da cicatrização de feridas embora não tenha necessariamente qualquer efeito anti-escarificação. O fosfato de manose (um termo aqui usado colectivamente para referir os 6-fosfatos e os 1-fosfatos) pode ser usado como tal, sob a forma de um sal farmacologicamente aceitável, por exemplo, um sal de mono-sódio ou de di-sódio, ou em qualquer forma bioprecursora ou "pró-fármaco" efectiva para libertar o fosfato de manose na área da ferida.

Por isso, a invenção inclui o novo uso de manose-6-fosfato no fabrico de uma formulação para uso no tratamento de mamíferos a fim de impedir ou reduzir uma doença fibrosa associada com a acumulação de matriz extracelular e com elevados níveis de factores β 1 ou β 2 de transformação do crescimento, e para uso na redução da formação de escaras durante a cicatrização de feridas; e o novo uso de manose-6-fosfatos e manose-1-fosfatos no fabrico de uma formulação para uso na aceleração da cicatrização de feridas. Inclui também formulações particulares para este fim,



nomeadamente um creme ou gel (que inclui um veículo ou agente veicular), uma solução estéril (que inclui um diluente fisiologicamente aceitável) e pensos para feridas e materiais de implantes que incorporam o fosfato de manose, tal como se disse anteriormente.

Descrição adicional de técnica anterior

A publicação do Pedido de Patente PCT WO 90/01938 (Universidade Nacional Australiana) refere-se ao uso de fosfatos de açúcar, em especial manose-6-fosfato ou glucose-1-fosfato, para tratamentos anti-inflamatórios ou imuno-supressores. O termo "anti-inflamatório", tal como aqui é usado, NÃO significa a redução de inchaços causados por contusões, picadas de insectos, etc., mas refere-se antes à acção dos agentes contra doenças autoimunes suspeitas, incluindo a esclerose múltipla e a artrite reumatoide, e contra a rejeição de enxertos.

O Pedido de Patente PCT WO 91/09604 (Perstorp AB) refere-se ao uso de qualquer uma grande classe de fosfatos de açúcar, incluindo o manose-6-fosfato, para tratar uma larga variedade de estados que incluem danos nos tecidos, tais como a formação de edemas, o derrame vascular, queimaduras e danos (não especificados) na retina ocular. Não existem exemplos e todo o documento carece obviamente de credibilidade científica.

Outra técnica anterior ainda menos relevante compreende as seguintes patentes:

A EP-A 230 023 (Marion Laboratories Inc.) refere-se a poli-sacáridos poli-sulfatados para acelerar a cicatrização de feridas, sendo um exemplo o penta-sulfato de manose; a EP-A 221 728 (Silveti) propõe uma composição de um mono-sacárido, por exemplo, manose e um hidrolizato de amido para cicatrizar feridas; a US-A 4 889 844 (Silveti) é semelhante na descrição mas tem reivindicações mais limitadas; a GB-A 2 048 070 refere-se a uma composição para cicatrização de feridas que contém um açúcar apropriadamente na forma adquirida em qualquer loja, de preferência sacarose, e um

agente anti-bacteriano, por exemplo, povidona/iodo; a GB-A 2 092 001 refere-se ao uso de frotose-1,6-difosfato de sódio para tratar doentes com queimaduras; a US-A 4 703 040 usa 6-difosfato de frutose-1 para tratar o síndrome da angústia respiratória nos adultos; a Publicação do Pedido de Patente Japonesa Nº 254477/1984 (Nisshin Flour Millings) refere-se a um derivado de hidrocarbilo fosfato de cadeia longa de manose-1-fosfato como agente carcinostático.

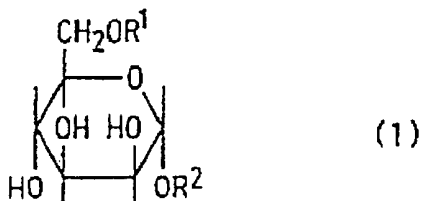
A técnica anterior acima necessita de ser vista à luz das descobertas ligadas com a presente invenção, com base em testes animais, que a glucose, a galactose, a manose, o glucose-6-fosfato, o galactose-6-fosfato e o glicerol-3-fosfato não têm efeito discernível na cicatrização de feridas.

Breve descrição dos desenhos

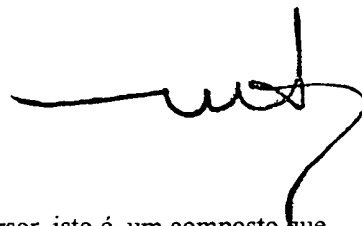
A Figura 1 representa um gráfico de cálculos de hidroxiprolina rádiomarcada, uma medida de síntese de colagénio e a deposição contra o tempo depois do ferimento, para feridas em ratos tratados com 6-fosfato ou 1-fosfato manose, glucose e um controlo.

Descrição das formas de realização preferidas

O manose-6-fosfato usado na presente invenção é da fórmula I, em que um dos símbolos R^1 e R^2 é hidrogénio e o outro é fosforilo, $PO(OH)_2$.



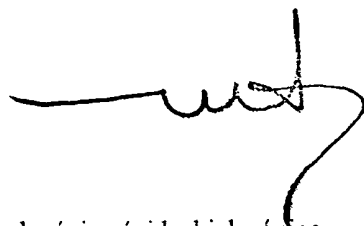
Pode ser administrado na forma de ácido fosfórico livre ou de um seu mono-sal ou di-sal farmacologicamente aceitável, por exemplo, um sal de sódio, cálcio, magnésio ou



bário. Pode também encontrar-se na forma de um bioprecursor, isto é, um composto que é convertido in situ (depois da aplicação ao corpo) no fosfato de manose. Isto pode ser atingido, por exemplo, ligando um grupo de álcool de açúcar do fosfato de manose a um ácido apropriado para formar um éster, em que esta ligação de éster é mais facilmente hidrolisável do que a ligação de fosfato de fosfato de manose. Outras formas de composto que vão libertar fosfato de manose em condições hidrolíticas, enzimáticas ou outras que prevalecem no local apropriado no corpo do estado fibrótico a ser tratado, em especial nas feridas na pele, serão evidentes para os químicos e estão englobadas na definição de fosfato de manose para os fins da presente invenção.

Na cicatrização de feridas considera-se que será desejável aplicar rapidamente o fosfato de manose à ferida, isto é, logo que possível depois da incisão, dano, etc., normalmente no prazo de 48 horas, de preferência no prazo de 24 horas e, mais preferencialmente ainda, dentro de 12 horas. Crê-se que é desejável manter uma concentração mais ou menos constante do fosfato de manose na área da ferida durante vários dias, por exemplo até 3 ou 4 dias, depois da formação do ferimento. É por isso preferível uma formulação de libertação controlada do fosfato de manose. Em princípio, não são apropriadas formulações de libertação muito lenta do fosfato de manose, embora formulações que permitam uma libertação rápida das concentrações mínimas e, a seguir, uma libertação lenta, possam ser apropriadas nalguns casos. Em qualquer caso, a libertação lenta é, em princípio, útil no tratamento de outras perturbações fibróticas.

As formulações preferidas do fosfato de manose na presente invenção incluem cremes, unguentos e geles que podem ser formulados em qualquer via convencional com veículos ou agentes veiculares aquosos ou oleaginosos, que podem também incluir agentes anti-sépticos e outros agentes convencionais para o tratamento de feridas; soluções injectáveis estéreis que podem ser formuladas com qualquer diluente convencional apropriado, em especial soluções salinas fisiológicas; soluções estéreis administráveis com seringa do fosfato de manose e ácido hialurónico ou outros agentes veiculares ou diluentes de fluidos poliméricos; loções e pastas. Uma via particularmente conveniente de aplicação do fosfato de manose será através de um penso impregnado para feridas, tal como uma faixa, emplastro, uma almofada absorvente ou uma



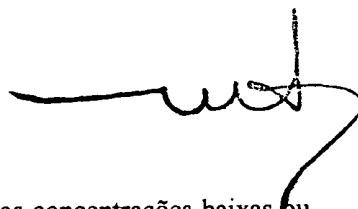
compressa polimérica ou de hidrogel, por exemplo, de colagénio, ácido hialurónico, alginato de sódio ou cloreto de vinilo. O fosfato de manose é incorporado no penso, por exemplo, por impregnação, e será normalmente armazenado em condições estéreis, pronta para ser usada. Para tratamentos internos, sugere-se um implante que compreende um polímero, como agente veicular, e o fosfato de manose. O manose-6-fosfato e, crê-se, o manose-1-fosfato são estáveis para a hidrólise em soluções, geles e outras formas húmidas, desde que as condições não sejam, alcalinas.

Embora a invenção seja principalmente de interesse em relação às feridas na pele, quer provenham de cirurgia ou de outra forma, incluindo lacerações de abrasões graves e queimaduras, é também aplicável a perturbações fibróticas da pele, por exemplo, o foto-dano (que se crê que regula certos efeitos de aumento no tecido fibroso) e irritabilidade e a outras doenças referidas anteriormente em ligação com a Publicação do Pedido PCT WO 91/04748 (La Jolla). Por acaso, a Reivindicação 1 do pedido La Jolla requer o contacto do tecido em que a matriz extracelular se acumulou com um agente que suprima a matriz extracelular que produz a actividade de TGF- β . O fosfato de manose usado na presente invenção parece não se enquadrar dentro desta definição.

Um aspecto particularmente importante da invenção reside no tratamento de perturbações fibróticas dos olhos, em especial as que conduzem ao glaucoma ou à formação da membrana epi-retinal quando uma lágrima no tecido do olho conduz à fibrose com contracção e franzimento da retina. A invenção inclui soluções estéreis em gotas para os olhos do fosfato de manose, de preferência o 6-fosfato, ou o seu sal ou o seu bioprecursor.

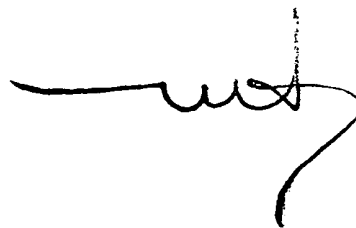
A cicatrização dos ligamentos é também melhorada pelo fosfato de manose, de preferência o 6-fosfato, ou o seu sal ou o seu bioprecursor.

O modo de aplicação do fosfato de manose será normalmente a aplicação tópica, por exemplo, a uma ferida (dentro e/ou à volta dela), mas em casos apropriados pode ser necessária a injeção subcutânea ou intradérmica ou implante a fim de atingir melhor o tecido afectado. Em casos extremos pode ser aconselhável a injeção intramuscular ou



intravenosa. Dados preliminares sugerem que são necessárias concentrações baixas ou moderadas de manose-6-fosfato a fim de acelerar e reduzir a formação de escaras na cicatrização da ferida. De preferência, o fosfato de manose é aplicado numa concentração de 10-60 mM à área afectada, pelo menos duas vezes ao dia durante, pelo menos, os primeiros três dias de tratamento.

Os Exemplos seguintes ilustram a invenção. Os fosfatos aqui referidos encontram-se na forma dos seus sais de mono-sódio com excepção do glicerol-3-fosfato no Exemplo 6, que está na forma de sal de di-sódio



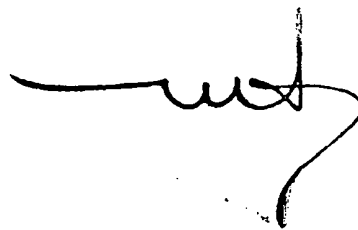
EXEMPLO 1

Fizeram-se quatro feridas por incisão com 1 cm de comprimento nos flancos de ratazanas Sprague Dawley adultas. Cada ferida atingiu a profundidade da carne parniculosa subjacente. Deixou-se em cada animal uma ferida não tratada como controlo. As outras três feridas foram tratadas por injeção subcutânea e intradérmica da pele circundante com manose-6-fosfato em solução salina fisiológica estéril, glucose-6-fosfato e manose-1-fosfato, respectivamente. Cada ferida foi tratada três vezes, nos dias 0, 1 e 2, depois do ferimento. As ratazanas foram tratadas com seis concentrações diferentes de cada reagente, nomeadamente 0,5, 1, 5, 20, 50 e 100 milimolares por animal, por injeção. Todas as ratazanas foram mortas 7 dias depois da cicatrização das feridas tendo sido extirpadas as feridas. O tecido da ferida foi congelado rapidamente em azoto líquido, crio-seccionado e pintado com vários anticorpos para detectar os macrófagos e os monocitos (indicadores da resposta inflamatória), laminina (uma molécula de matriz extracelular que mancha as membranas de base e realça a nova formação de vasos sanguíneos na ferida), fibronectina (uma molécula de matriz extracelular, que dá uma indicação da quantidade de moléculas de matriz extracelular presentes e a sua orientação) e colagénio (o principal constituinte do tecido de escara).

Os resultados mostraram que o manose-6-fosfato a 20 mM deu a cicatrização acelerada com melhores resultados, uma boa orientação das fibras de colagénio, com a restituição da arquitectura dérmica normal, seguido de perto pelo mesmo agente a 50 mM. As concentrações mais baixas deram pouco efeito, provavelmente pela dosagem inadequada. Por outro lado, 100 mM deu um fraco resultado, pior do que o controlo.

O manose-1-fosfato teve um melhor desempenho do que o controlo. Acelerou a cicatrização das feridas mas não teve qualquer efeito na formação de escaras. As fibras de colagénio estavam mal orientadas e não houve qualquer efeito nos monócitos e macrófagos.

O glucose-6-fosfato deu uma cicatrização das feridas levemente acelerada mas não tanto quanto o fosfato de manose.



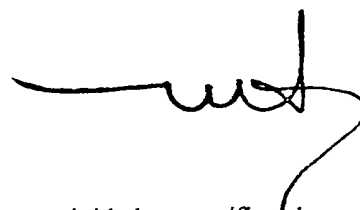
EXEMPLO 2

Injectaram-se manose-6-fosfato (M-6-P), manose-1-fosfato (M-1-P) e glucose (G) a 20 mM em feridas feitas por incisão separadas em ratazanas durante 3 dias, tal como se descreveu no Exemplo 1. Havia também uma ferida de controlo não injectada. Usou-se glucose para comparação, representando um açúcar não-fosforilado. Colheram-se as feridas ao fim de 3 dias e na 1^a, 2^a, 3^a, 4^a, 6^a e 10^a semanas. Os resultados confirmaram que o M-6-P e o M-1-P aceleraram a cicatrização das feridas, tal como é revelado pela recente deposição de colagénio dentro das feridas. Além disso, as feridas tratadas com M-6-P tinham números de monócitos e macrófagos ligeiramente aumentados (média de 249 monócitos e macrófagos/ferida com 1 semana em comparação com 201 nas feridas de controlo). As feridas dos animais tratados com M-6-P examinadas depois de 4, 6 e 10 semanas mostraram uma melhor organização e orientação das fibras de colagénio na derme do que as feridas tratadas com M-1-P e G. As feridas tratadas com G estavam atrasadas em termos de cicatrização, em comparação com os controlos e revelaram uma formação de escaras ligeiramente maior em comparação com os controlos.

EXEMPLO 3

Injectaram-se feridas com 20 mM de M-6-P, M-1-P e G durante 3 dias, tal como se descreveu anteriormente. Usou-se também uma ferida de controlo não-injectada. Marcaram-se as ratazanas com ³H.hidroxi prolina (1μCi/3,74 g) por via intraperitoneal, cada uma a 24, 16 e 8 horas antes da colheita da ferida. As feridas foram colhidas com microscópio com um tecido circundante de 1 mm ao fim de 3 dias, 1, 2, 3, 4, 6 e 10 semanas. Retiraram-se também amostras de controlo (pele normal). Pesaram-se então as amostras.

A Figura 1 representa um diagrama da actividade específica da hidroxi prolina marcada em quedas/minuto/micrograma de hidroxi prolina para as feridas extirpadas, contra o tempo de colheita das feridas. Uma vez que a marca não estava disponível para



incorporação mais do que 24 horas antes de se matarem, a actividade específica da hidroxiprolina reflecte o grau de síntese líquida e a deposição de colagénio durante este período de 24 horas. Três dias depois do ferimento, as medidas das feridas e o controlo eram os mesmos. A medida da nova deposição de colagénio na ferida de controlo (quadrado preenchido) aumentou rapidamente para um máximo à volta do décimo quarto dia e manteve-se elevada até à sexta semana, antes de voltar ao nível de controlo normal da pele (símbolo grego pi) por volta da 10ª semana. Ambos o M-6-P (+) e o M-1-P (maior, quadrados sombreados) aumentaram a deposição de colagénio na ferida em cicatrização durante 28 dias pós-ferimento, antes de reduzir para os níveis da ferida de controlo. Em contraste, a adição de glucose (*) reduziu ligeiramente a quantidade de colagénio depositado para as primeiras 2 semanas depois do ferimento, antes de aumentar ligeiramente o colagénio entre a 3ª e a 4ª semanas.

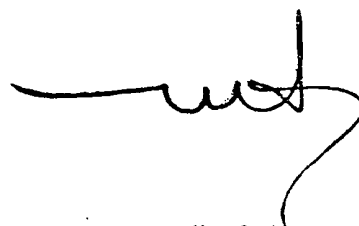
EXEMPLO 4

Para determinar se era necessária a fosforilação, usaram-se manose (não-fosforilada) e gliceraldeído-3-fosfato (G-3-P) em estudos de cicatrização. As feridas foram injectadas com 20 mM de manose e 20 mM de G-3-P durante 3 dias, tal como se descreveu anteriormente, e colheram-se depois de 7 e 14 dias. Ambas estas moléculas deram resultados semelhantes à glucose, isto é, retardaram a resposta de cicatrização das feridas, sugerindo que é necessária a fosforilação de manose para a cicatrização acelerada, e não deram qualquer actividade anti-formação de escaras.

EXEMPLO 5

Este Exemplo mostra os efeitos do aumento da frequência de aplicação na ferida.

Feriram-se ratas experimentais, tal como se descreveu anteriormente, e trataram-se as feridas com nada (controlo), 20 mM de manose-6-fosfato (M-6-P), 20 mM de manose-1-fosfato (M-1-P) ou 20 mM de manose. Contudo, em vez de lhes ser dada uma



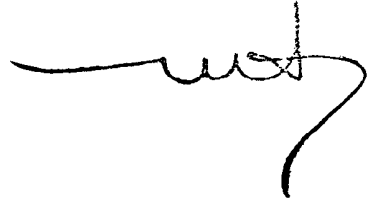
única injeção nos dias 0, 1 e 2, as feridas foram injectadas cada 8 horas nos dias 0, 1 e 2. As feridas foram colhidas depois de 7 e 14 dias e processadas para histologia e imunocitoquímica.

Tal como anteriormente, o manose-6-fosfato (M-6-P) acelerou a cicatrização das feridas tal como testado pela deposição recente de colagénio dentro da ferida (tal como fez o M-1-P) e também uma formação de escaras marcadamente reduzida. A organização do colagénio dentro da ferida foi grandemente melhorada e o efeito anti-formação de escaras do M-6-P foi melhor do que no caso das feridas tratadas com uma única injeção nos dias 0, 1 e 2. Estes dados sugerem que a aplicação mais frequente de manose-6-fosfato nos primeiros 3 dias a seguir ao ferimento dá um efeito anti-formação de escaras melhorado. Nenhum outro tratamento deu qualquer efeito anti-formação de escaras.

EXEMPLO 6

Este Exemplo compara os efeitos de outros açúcares fosforilados. Esta experiência foi semelhante no projecto a todas as anteriores. As feridas foram ou não-manipuladas (controlo) ou tratadas por injeção com 2 mM de glicerol-3-fosfato, 20 mM de galactose-6-fosfato, 20 mM de manose-6-fosfato ou 20 mM de galactose. As feridas foram colhidas nos dias 7 e 14 e na 6^a e 8^a semanas depois do ferimento. Foram estudados dois grupos de animais, aqueles que foram injectados cada 8 horas nos dias 0, 1 e 2 depois do ferimento e aqueles que foram injectados uma vez nos dias 0, 1 e 2 a seguir ao ferimento. Todas as secções histológicas foram analisadas por manchamento do tecido de conexão e imunocitoquímica, tal como se descreveu anteriormente.

Os resultados confirmaram que a aplicação de 20 milimolares de M-6-P em intervalos de 8 horas nos dias 0, 1 e 2, depois da formação das feridas, deram os melhores resultados. A cicatrização das feridas foi acelerada pela recente deposição do colagénio dentro da ferida e o tratamento teve uma marcada actividade anti-formação de escaras.




As feridas revelaram uma organização mais normal dos fibrilos de colagénio dentro da derme.

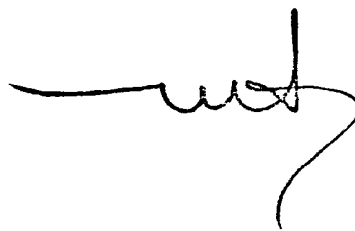
A galactose, galactose-6-fosfato e glicerol-3-fosfato não revelaram qualquer efeito, sendo as ferias semelhantes, ou algo, ligeiramente pior do que o controlo em termos de velocidade de cicatrização e resultado da formação de escaras final.

Lisboa, - 9 JAN. 2001

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

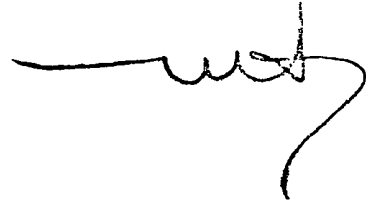


Dra. Maria Silvina Ferreira
Agente Oficial de Propriedade Industrial
R. Castilho, 201-3.º E - 1070-051 LISBOA
Telefs. 213 851 339 - 213 854 613



REIVINDICAÇÕES

1. Uso de manose-6-fosfato ou um seu sal ou bioprecursor farmacologicamente aceitável no fabrico de uma formulação para uso no tratamento de mamíferos, a fim de impedir ou mitigar uma perturbação fibrótica associada com a acumulação de matriz extracelular e com elevados níveis de factor de transformação do crescimento $\beta 1$ ou $\beta 2$.
2. Uso de acordo com a reivindicação 1, em que a perturbação fibrótica está relacionada com uma ferida na pele.
3. Uso de acordo com a reivindicação 2, em que a perturbação fibrótica está relacionada com os olhos.
4. Uso de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, em que o tratamento consiste em acelerar a cicatrização de feridas.
5. Uso de manose-6-fosfato ou um de seu sal ou bioprecursor farmacologicamente aceitável no fabrico de uma formulação para uso na redução da formação de escaras na cicatrização de feridas.
6. Uso de manose-1-fosfato ou um de seu sal ou bioprecursor farmacologicamente aceitável no fabrico de uma formulação para uso no tratamento de mamíferos, para acelerar a cicatrização de feridas.
7. Penso para feridas que incorpora manose-6- ou 1-fosfato ou um seu sal ou bioprecursor farmacologicamente aceitável.
8. Penso para feridas, de acordo com a reivindicação 7, na forma de uma banda, um emplastro, uma almofada absorvente ou um penso polimérico para ser colocado contra uma ferida.



9. Penso para feridas, de acordo com a reivindicação 7 ou 8, para ser usado num tratamento específico em uma qualquer das reivindicações 1 a 6.
10. Uso de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 6, em que a formulação é um creme ou um gel.
11. Uso de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 6, em que a formulação é uma solução estéril apropriada para injeção ou aplicação com seringa.
12. Uso de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 6, em que a formulação é uma solução estéril apropriada para ser usada como gotas para os olhos.

Lisboa, - 9 JAN. 2001

O Agente Oficial da Propriedade Industrial



Dra. Maria Silvana Ferreira
Agente Oficial da Propriedade Industrial
R. Castilho, 201-C/E - 1070-051 LISBOA
Telefs. 213 851 339 - 213 854 613

