

(11) Número de Publicação: **PT 2308497 E**

(51) Classificação Internacional:

**A61K 31/727** (2014.01) **A61K 31/726** (2014.01)  
**A61K 9/08** (2014.01)

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

(22) Data de pedido: **2009.06.30**

(30) Prioridade(s): **2008.07.01 ES 200802002**

(43) Data de publicação do pedido: **2011.04.13**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.04.16**  
**140/2014**

(73) Titular(es):

**LABORATORIOS FARMACEUTICOS ROVI, S.A.**  
**35, CALLE JULIAN CAMARILLO 28037 MADRID**  
**ES**

(72) Inventor(es):

**IVÁN LÓPEZ-BELMONTE ENCINA** **ES**  
**MARÍA DE LOS ANGELES CANALES MAYORDOMO** **ES**  
**ELENA CEBADERA MIRANDA** **ES**

(74) Mandatário:

**ÁLVARO ALBANO DUARTE CATANA**  
**AVENIDA MARQUÊS DE TOMAR, Nº 44, 6<sup>º</sup> 1069-229 LISBOA**  
**PT**

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COM GLICOSAMINOGLICANOS E SUA UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DAS ÚLCERAS CRÓNICAS**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE A 5 UMA COMPOSIÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS PARA O TRATAMENTO DA ÚLCERA DO PÉ DIABÉTICO. REFERE-SE MAIS ESPECIFICAMENTE A HEPARINAS DE BAIXO PESO MOLECULAR (HBPM) E HEPARINAS DE MUITO BAIXO PESO MOLECULAR (HMBPM), PARA O TRATAMENTO DAS ÚLCERAS CRÓNICAS, EM 10 ESPECIAL AS ÚLCERAS DO PÉ DIABÉTICO, E MAIS ESPECIFICAMENTE PARA O FABRICO DE UM MEDICAMENTO DESTINADO AO TRATAMENTO DAS ÚLCERAS CRÓNICAS, E EM ESPECIAL DAS ÚLCERAS DO PÉ DIABÉTICO E DAS ÚLCERAS DE PRESSÃO.

DESCRICAo**COMPOSI****o****FARMAC****EUTICA** COM GLICOSAMINOGLICANOS E SUA  
UTILIZA**o****o** NO TRATAMENTO DAS **ULCERAS CR****ONICAS****5** **Âmbito da Inven****o**

A invenção refere-se a uma composição de glicosaminoglicanos para o tratamento das úlceras crónicas, em especial a úlcera do pé diabético e a úlcera de pressão. Refere-se mais especificamente a composições de heparinas de baixo peso molecular (HBPM) e heparinas de muito baixo peso molecular (HMBPM) para o tratamento das úlceras crónicas, e em especial para o fabrico de um medicamento para o tratamento das úlceras crónicas.

**Estado da Técnica**

**15** A *Diabetes Mellitus* (DM) é uma doença metabólica, que se caracteriza por um aumento sustentado dos níveis de glucose no plasma, o que contribui para o aparecimento dos primeiros sintomas de neuropatia periférica e de complicações macro e microvasculares. Segundo os dados publicados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a incidência de DM está a aumentar de forma alarmante, com uma prevalência de 2,8% na população mundial em 2000, estimando-se um aumento deste valor para 4,4%, em 2030. Assim, o número de doentes com DM foi de cerca de 171 milhões em 2000, estimando-se um aumento para os 366 milhões em 2030. Este aumento na incidência de DM tem estado associado, entre outros fatores, ao envelhecimento geral da população, dado existir uma relação direta entre a idade e a prevalência da doença. Neste sentido, estimou-se que a prevalência de DM em Espanha poderá situar-se entre 2% e 6%; 10% corresponderiam a DM de tipo 1, estimando-se que não estejam diagnosticados 50% dos doentes com DM de tipo 2. Considerando que os estudos publicados sobre a prevalência de DM nas diferentes regiões de Espanha são anteriores a 2002, e que a tendência é para um aumento da incidência da doença,

estima-se que existam atualmente mais de 2,5 milhões de diabéticos em Espanha.

Os danos neurológicos, tanto no sistema periférico como no sistema autónomo, representa, provavelmente, a complicação 5 mais comum da DM. Podendo ocorrer em ambos os tipos de DM, a sua prevalência e gravidade estão relacionadas com os anos de evolução da doença e com o grau de controlo da glicémia. Estima-se que esta complicação afete 60% dos doentes com DM, sendo a principal causa do aparecimento de úlceras nos pés dos 10 diabéticos. Face a este problema, a Associação Americana de Diabetes, na sua sexagésima sessão científica, afirmou que 15% dos doentes com DM desenvolvem úlcera do pé, ao longo da sua vida, e que as úlceras do pé são a causa de 6% das hospitalizações de doentes diabéticos. 15% de todas as úlceras 15 que ocorrem nos doentes com diabetes terminam numa amputação, sendo que as complicações associadas à DM são a principal causa das amputações não-traumáticas (40-70%) e que 85% das amputações realizadas em doentes diabéticos estão, por sua vez, relacionados com úlceras do pé. Nos estados 20 Unidos, são realizadas anualmente 100.000 amputações, o que afeta consideravelmente as despesas com a saúde, calculando- se que, em 2001, as úlceras e as amputações tiveram, nos EUA, um custo aproximado de 1.000 milhões de dólares e que esta despesa, no Reino Unido, representou apenas 456 milhões de 25 dólares. Estes custos resultantes da úlcera do pé diabético são muito variáveis, consoante tenha ou não ocorrido amputação, e assim, num estudo realizado na Suíça, em 1990, concluiu-se que, no caso das úlceras que sararam e que não tiveram qualquer componente isquémica, os respetivos custos 30 associados foram de 16.500 dólares. Em contrapartida, nos casos em que foi necessária uma amputação menor, as despesas atingiram os 27.000 dólares, ascendendo a 63.000 dólares nos casos em que ocorreu uma amputação maior.

A definição de pé diabético proposta pelo *Grupo de*

Consenso sobre Pie Diabético (Grupo de Consenso sobre o Pé Diabético) da Sociedade Espanhola de Angiologia e Cirurgia Vascular é a seguinte: "Alteração clínica de base etiopatogénica neuropática, induzida por uma hiperglycémia sustentada, e em que, com ou sem coexistência de isquémia e prévio desencadeante traumático, ocorre lesão e/ou ulceração do pé".

A ulceração do pé é uma complicaçāo significativa de doenças como a diabetes, com uma incidência anual ligeiramente superior a 2% (Abbott C.A., et al. (2002) *The North-West Diabetes Foot Care Study: incidence of, and risk factors for new diabetic foot ulceration in a community-based patient cohort.* Diabet. Med. 19(5):377-84). Estima-se que 15% dos doentes com diabetes irão desenvolver úlceras em alguma altura das suas vidas (Reiber G. E. (1996). *The epidemiology of diabetic foot problems.* Diabet. Med. 13 Supl. 1:S6-11) e que aproximadamente 10% a 30% dos que têm úlceras acabarão por ter de se submeter a uma amputação do membro (Lipsky B.A. (2004) *Medical treatment of diabetic foot infections.* Clin. Infect. Dis. 39 Supl. 2:S104-14). Além disso, esta situação complica-se no caso de existir uma isquémia do membro inferior no qual surge a úlcera, e que, na maioria dos casos, ocorre devido a uma insuficiente irrigação sanguínea, por uma elevada incidência de trombose.

Relativamente à taxa de mortalidade a 5 anos, dos doentes que foram submetidos a uma amputação dos membros inferiores, esta é de 50 a 60% (Reiber G. E. (1996). *The epidemiology of diabetic foot problems.* Diabet. Med. 13 Supl. 1:S6-11). Foram utilizados diversos métodos para o tratamento dos doentes com pé diabético, os quais incluem um estrito controlo metabólico, profilaxia dos fatores de risco passíveis de modificāo, desbridamento, aplicāo de pensos, tratamento antimicrobiano das infeções, eliminação da pressão sobre a área afetada, recurso a transplantes de pele, administração de fatores de

crescimento e utilização de métodos de revascularização, caso haja indicação para tal.

Na maioria dos casos, um tratamento deste tipo da úlcera crónica decorre por via tópica, por exemplo, é comum o uso de pensos em úlceras, como nas úlceras do pé diabético. Os novos tipos de pensos, estudados em ensaios clínicos controlados, incluem os pensos à base de membrana de polímero semipermeável, Promogran 313 (matriz de colagénio), alginato, carboximetilcelulose, hialuronano e pressão subatmosférica (Eldor R. et al. (2004) *New and experimental approaches to treatment of diabetic foot ulcers: a comprehensive review of emerging treatment strategies.* Diabet. Med. 21(11):1161-73). Foram igualmente desenvolvidos métodos para a criação de substitutos de pele, que são aplicados na lesão ulcerativa. O Dermagraft® é produzido por cultura de fibroblastos dérmicos humanos numa placa sintética de material bioabsorvível, que provou ser eficaz nas úlceras de baixo grau, com uma mais elevada taxa de cura em menos tempo (Marston W.A., et al. (2003) *Dermagraft Diabetic Foot Ulcer Study Group. The efficacy and safety of Dermagraft® in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial.* Diabetes Care 26:1701-5). O Apligraf® consiste numa camada dérmica formada por fibroblastos humanos numa matriz de colagénio de bovino do tipo I e numa camada epidérmica formada a partir de queratinócitos humanos. De modo semelhante, este substituto de pele tem provado estar significativamente associado a um processo de cura superior e mais rápido das lesões, quando aplicado a úlceras neuropáticas de baixo grau, não infetadas (Veves A., et al (2001) *Graftskin, a human skin equivalent, is effective in the management of non-infected neuropathic diabetic foot ulcers: a prospective randomized multicenter clinical trial.* Diabetes Care 24:290-5). Num ensaio clínico da fase III, aleatorizado, realizado em dupla ocultação e controlado com placebo, o Fator

de Crescimento Derivado das Plaquetas (PDGF), sob a forma de gel, provou ser eficaz e seguro para o tratamento de doentes diabéticos com úlceras neuropáticas e com uma boa perfusão sanguínea (Wieman TJ., et al. (1998) *Clinical efficacy of beclaperman (rh PDGF-BB) gel.* Diabetes Care 21 (5):822-7). A maioria dos doentes (95%) incluídos neste estudo apresentavam úlceras com uma área <10 cm<sup>2</sup> segundo uma avaliação feita por planimetria. O gel de becaplermina a 100 mg/g, comparativamente com o placebo, aumentou significativamente a proporção de fecho de toda a lesão, em 43% (50 vs. 35%, p=0,007) e reduziu em 32% (86 vs. 127 dias, p=0,013) o tempo até ser atingido esse efeito. Os resultados satisfatórios obtidos tanto com o PDGF como com a becaplermina (Regranex®) fizeram com que estes fármacos fossem aprovados para o tratamento das úlceras neuropáticas dos membros inferiores dos doentes diabéticos, que se estendiam já ao tecido subcutâneo, ou ainda mais profundamente, e que tinham uma boa irrigação sanguínea (Brem H., Sheehan P., Boulton AJ. (2004) *Protocol for treatment of diabetic foot ulcers.* Am. J. Surg. 187(5A): 1 S-1 OS). No entanto, alguns meses mais tarde, a FDA iniciou uma revisão de segurança, após ter recebido os dados dum estudo, que demonstravam um maior risco de cancro em doentes com diabetes que aplicavam topicalmente o fator de crescimento Regranex® da Johnson & Johnson, diretamente nas úlceras da perna e do pé diabético. Por conseguinte, esta alternativa terapêutica encontra-se atualmente a ser revista e foi limitada aos doentes sem predisposição para qualquer tipo de tumor.

No que se refere aos tratamentos por via parentérica local, foi publicado há alguns anos um método para a administração de um agente cicatrizante, como o Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), que consiste na infiltração de uma solução da biomolécula na lesão, mediante diversas injeções (WO 03053458). Este tratamento tem provado ser eficaz

na prevenção da amputação do pé diabético, mas tem o inconveniente de ser traumático para o doente, devido ao facto de a aplicação de injeções na lesão ser muito dolorosa e de terem de ser aplicadas várias injeções, durante várias 5 semanas, em cada tratamento. Também o documento EP 1499317 revela um método para o tratamento das complicações diabéticas, como o pé diabético, com inibidores de permutadores de sódio-hidrogénio do tipo 1 (NHE-1), enquanto a publicação internacional WO 02077155 descreve que o fator de 10 crescimento de queratinócitos (KGF-2) promove ou acelera a cura das lesões.

Finalmente, a publicação internacional W02007087759 refere-se a uma composição farmacêutica contendo microsferas com fatores de crescimento epidérmicos para administração 15 parentérica em doentes com patologias dermatológicas crónicas, como as úlceras do pé diabético. Muitas outras patentes focaram-se sobre outros métodos para acelerar o grau de cura. No entanto, nenhum destes métodos tem provado ser amplamente eficaz.

20 Além disso, têm sido publicados diversos estudos em literatura não patenteada, que revelaram certos resultados promissores para os doentes com pé diabético tratados com heparinas de baixo peso molecular (HBPM), basados no facto de as heparinas serem agentes antitrombóticos e anti- 25 inflamatórios conhecidos, que podem melhorar a microcirculação vascular. Em "Efeito de Dalteparin no tratamento das úlceras crónicas do pé em doentes diabéticos com doença arterial periférica oclusiva", Diabetes Care, vol. 26(9), setembro de 2003, assim como na publicação do mesmo 30 grupo, de M. Kalani, A. et al., intitulada "Efeitos benéficos de dalteparin na função hemostática e na oxigenação do tecido local em doentes com diabetes, doença vascular grave e úlceras do pé", Thrombosis Research. 120, 653-661, 2007, são descritos ensaios clínicos que demonstram que a heparina de

baixo peso molecular (LMWH), tal como dalteparin, melhoram a evolução das úlceras do pé diabético em doentes com doença arterial periférica oclusiva. No entanto, é de notar que, nestes artigos, os doentes são tratados concomitantemente com 5 ácido acetilssalicílico, ou seja, é sugerido o modo como a associação dos dois princípios ativos com efeito anticoagulante favorece sinergicamente a evolução da úlcera do pé diabético em doentes com doença arterial periférica oclusiva. "A heparina de baixo peso molecular parece melhorar 10 a circulação capilar local e curar as úlceras crónicas do pé nos doentes diabéticos". VASA, Brand 22, 1993, FET 2 revela também os resultados de ensaios clínicos realizados em dupla ocultação, controlados com placebo, para avaliação da eficácia de dalteparin em doentes com úlceras do pé 15 diabético. Os resultados preliminares deste estudo parecem indicar que a dalteparin pode ter um efeito benéfico na prevenção deste tipo de feridas, embora sempre em doses profiláticas, i.e., as doses de dalteparin nunca devem ser superiores a 2500 U.I. /dia, dado estarem previstas 20 hemorragias durante o tratamento com doses superiores, além de que um aumento da dose não implicaria uma maior eficácia no caso dos doentes com úlcera do pé diabético. Isto deve-se à convicção geral do estado da técnica de que os doentes diabéticos têm um maior risco de hemorragia do que os doentes 25 que não sofrem dessa doença (*Adverse impact of bleeding on prognosis in patients with acute coronary syndromes*, Eikelboom JW et al. *Circulation*. 2006 ago. 22; 114(8):774-82).

#### Breve Descrição da Invenção

30 O uso de glicosaminoglicanos no tratamento das úlceras crónicas, em especial das úlceras do pé diabético e, em especial, o uso de algumas heparinas de baixo peso molecular para este fim, tem sido descrita de uma forma grosseira para os doentes com problemas circulatórios graves, dado que estas

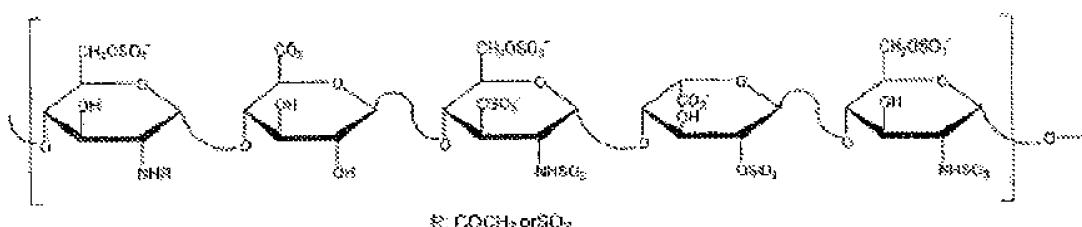
heparinas de baixo peso molecular têm atividade antitrombótica e anticoagulante, expressa como efeito do anti-fator X ativado (Xa) e efeito anti-fator IIa. No entanto, geralmente não são utilizados para os doentes diabéticos que sofrem de úlcera do pé diabético sem doença arterial periférica oclusiva, tendo em conta o risco de hemorragia que o tratamento com doses mais elevadas envolve. Isto é devido ao efeito do anti-fator Xa deste tipo de composto, que se traduz num efeito antitrombótico, o qual tem uma relação direta com o conteúdo dentro da estrutura heparinóide de um pentassacarídeo específico presente nas estruturas de sacarídeo, e que forma heparinas de baixo peso molecular e heparinas de muito baixo peso molecular, e ao efeito da relação anti-fator Xa/anti-fator IIa. Esta relação é determinada porque quanto maior for a quantidade de pentassacarídeo na estrutura total, maior será a atividade do anti-fator Xa, e, sendo o pentassacarídeo sintético (fondaparinux) o inibidor mais seletivo do fator Xa, é, por conseguinte, a molécula com a maior capacidade antitrombótica seletiva.

Portanto, a atividade antitrombótica de fondaparinux é a consequência da inibição seletiva do fator Xa, mediado pela antitrombina III (ATIII). Devido à sua ligação seletiva à ATIII, fondaparinux reforça 300 vezes a neutralização inata do fator Xa pela ATIII. A neutralização do fator Xa interrompe a cascata de coagulação sanguínea e inibe a formação de trombina e o desenvolvimento de trombos (ver a Figura 1).

Tendo em conta o estado da técnica, poderia inicialmente pensar-se que uma grande parte do pentassacarídeo da estrutura irá ser necessária para obter um efeito curativo (não-paliativo). No entanto, tal como indicado acima, este método não é praticado, devido ao risco de hemorragia que o tratamento com doses mais elevadas envolve. Os inventores da presente invenção conseguiram ultrapassar este problema do estado da técnica, uma vez que conseguiram demonstrar que,

apesar de o pentassacarídeo ser química ou enzimaticamente alterado em menor proporção, de uma forma seletiva, o efeito curativo e regenerador não é afetado, uma vez que aquilo que é realmente importante na estrutura do glicosaminoglicano é a 5 relação entre as cadeias de polissacarídeos que não contêm o pentassacarídeo. Além disso, os investigadores da presente invenção conseguiram determinar experimentalmente o efeito benéfico da administração de glicosaminoglicanos com menor teor em pentassacarídeo sobre qualquer tipo de úlcera 10 considerada crónica - e não só a úlcera do pé diabético - e que essa administração é eficaz mediante três vias de administração principais: parentérica, oral e tópica.

Foi devido aos trabalhos realizados no início dos anos de 1980, pelos grupos de Lindahl e Choay (Choay J, Lormeau JC, 15 Petitou M, Sinag P e Fareed J. Ann NY Acad Sci 1981; 370:644-649; Thunberg L, Bäckström G e Lindahl U. Carbohydr Res 1982; 100:393-410) que foi posta a hipótese de que, dentro das cadeias de heparina, há uma sequência específica que corresponde a um pentassacarídeo que interage seletivamente 20 com a antitrombina III. A estrutura deste pentassacarídeo é a seguinte (fórmula 1):



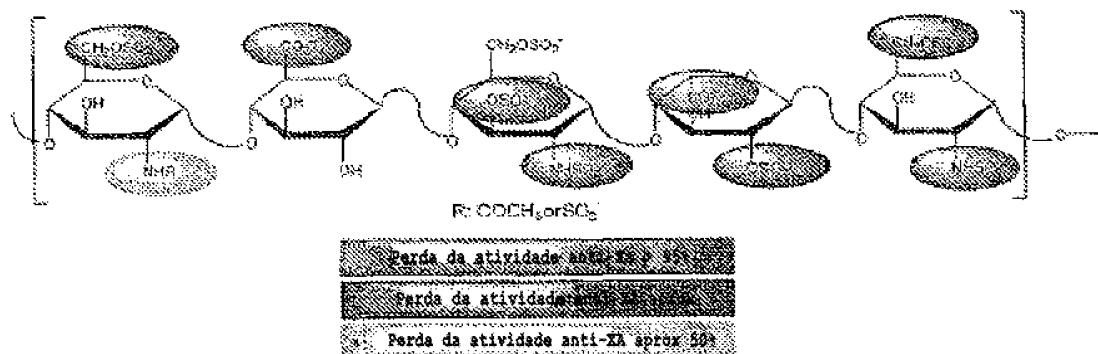
Fórmula 1

Na heparina não-fracionada, assim como nas várias HBPM ou HMBPM obtidas por métodos de despolimerização conhecidos 25 (enzimáticos, ácido nítrico,  $\beta$ -eliminação, etc.), há uma medição que permite determinar a quantidade de pentassacarídeo dentro da estrutura geral, através da quantificação do conteúdo de uma unidade de dissacarídeo específica e exclusiva

do pentassacarídeo designado por D-glucurónico, ligado à N-sulfo-3-sulfo-D-glucosamina (ANS,3S). Esta medição permite obter uma boa relação entre a percentagem presente deste dissacarídeo e o teor de pentassacarídeo na estrutura de 5 heparina e, por conseguinte, da atividade anti-FXa da heparina em questão (Guerrini M et al. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2007; 33: 478-787).

As diferentes modificações químicas e/ou enzimáticas, que 10 podem afetar a integridade do pentassacarídeo poderiam também estar relacionadas com uma diminuição da atividade anti-FXa do composto. Estas reações podem ser de-N- acetilações, N e O-sulfações, O-acilações, reações de abertura de anel, etc.

Por exemplo, se o pentassacarídeo estiver química ou 15 enzimaticamente alterado em relação ao grau de sulfiação, o efeito anti-Fator Xa é também alterado. No entanto, em diversos estudos (Lindahl U, Bäckström G e Thunberg L. *J. Biol. Chem.* 1983; 258:9826-9830; Riesenfeld J, Thunberg L, Höök M e Lindahl U. *J. Biol. Chem.* 1981; 256:2389-2393) ficou demonstrado que quando o grau de sulfiação é alterado, nem 20 todos os grupos sulfato presentes no pentassacarídeo com afinidade para a antitrombina III são igualmente importantes, sendo assim possível estabelecer de que modo a eliminação de qualquer destes grupos afeta a atividade do anti-Fator Xa deste último:



25

Por esta razão, na presente invenção foram física e quimicamente modificadas diferentes HBPM ou HMBPM (ver

exemplos) para alterar o pentassacarídeo responsável pela atividade anti-Fxa, de uma forma qualitativa e quantitativa, para demonstrar que, em caso de úlceras, especificamente a úlcera do pé diabético, o que interessa é que, neste tipo de glicosaminoglicanos há uma maior percentagem de sequências de oligossacarídeo rico nos monossacarídeos selecionados a partir do grupo que consiste em N-sulfo-D-glucosamina e ácido D-glucurónico, e em realizações preferenciais da invenção, também N-acetil-D-glucosamina, ácido L-idurónico e ácido L-idurónico 2-sulfatado e não tanto o pentassacarídeo responsável pela atividade anti-Fxa (a presença de elevadas concentrações da unidade N-sulfo-3O-sulfo-D-glucosamina essencial para a atividade antitrombótica do pentassacarídeo que não é necessário). Por esta razão, para efeitos da presente invenção, a percentagem de pentassacarídeo está limitada a um máximo de 20% do dissacarídeo característico do pentassacarídeo (ácido D-glucurónico ligado a N-sulfo-3-sulfo-D-glucosamina) na estrutura do glicosaminoglicano que, segundo o estado da técnica, é responsável pela atividade anti-Fxa e que, por conseguinte, de acordo com a última, seria adequada para ter uma percentagem mais elevada.

O estado da técnica demonstra claramente que o processo de cura das úlceras dos doentes diabéticos é alterado devido à própria doença, mas os inventores da presente invenção também demonstraram que o efeito da composição farmacêutica objeto da presente invenção surpreendentemente funciona para todos os tipos de úlceras, tanto crónicas como de pressão.

Para efeitos da presente invenção, as úlceras crónicas são entendidas como as soluções de continuidade, com perda de substância na pele. Consoante a origem das úlceras, estas podem ser classificadas como: úlceras de pressão, úlceras diabéticas, úlceras isquémicas (arteriais ou venosas), úlceras pós-queimaduras, úlceras pós-radioterapia, etc.

Esta classificação foi feita de acordo com a causa

- geradora da úlcera, embora o mecanismo fisiopatológico de conversão de uma ferida/úlcera numa situação crónica seja uma alteração do processo isquémico que leva a necrose cutânea e a uma dificuldade regenerativa da mesma por meios naturais
- 5 (Kirman CN. *Pressure ulcers, non-surgical treatment and principles*, Emedicine Jul. 2008 ([www.emedicine.com/plastic](http://www.emedicine.com/plastic))
- An G, Faeder J, Vodovotz Y. *Transactional systems biology: introduction of an engineering approach to the pathophysiology of the burn patient*. J Burn Care Res. 2008; 29(2):277-85.
- 10 Nikolovska S, et al. *The role of nitric oxide in the pathogenesis of venous ulcers*. Acta Dermatovenerol Croat 2005; 13(4):2426).

Neste sentido, pode por exemplo ocorrer isquémia devido a pressão externa sobre os capilares (decúbito ou úlcera de pressão), devido a ferimento por calor (queimadura), ou devido a obstrução vascular (diabetes, arteriosclerose, etc.). Após o processo isquémico da pele e órgãos circundantes, há uma reperfusão dos tecidos danificados, que aumenta a lesão inicial, levando a um agravamento e deterioração das lesões.

20 Desconhece-se o mecanismo exato do processo isquémia-reperfusão que agrava a lesão inicial, faz com que a lesão se torne crónica, e que ocorre após a necrose inicial, mas suspeita-se que a produção contínua de mediadores inflamatórios (citocinas, interleucina, etc.) agrava o

25 processo isquémico inicial, agravando também as lesões e levando a que a úlcera se torne crónica.

Para esse fim, foram avaliadas diferentes armas terapêuticas para modelar a produção de mediadores inflamatórios, que facilitam a regeneração dos tecidos, mas

30 que não agravam o dano celular. Há que sublinhar o facto de o processo de cicatrização de uma ferida ser o mesmo em praticamente todos os tecidos, após exposição a qualquer processo destrutivo (Gurtner GC et al. *Wound repair and regeneration*. Nature 2008; 453:314-21). A investigação recente

recaiu assim sobre as heparinas de baixo peso molecular na prevenção das feridas por queimadura (Ravikumar T et al. *Low molecular weight heparin-induced pharmacological modulation of burn wound healing*. Ann Burn fire Disast 2006; 19(3):1-10

5 Oremus M, et al. *The uses of heparin to treat burn injury*. Evid Rep Technol Assess (Full Rep). 2006; (148):1-58), embora atualmente não haja qualquer tratamento sistémico para facilitar a regeneração da úlcera crónica (Fonder MA et al. *Treating the chronic wound: A practical approach to the care*  
 10 *of non-healing wounds and wound care dressings*. J Am Acad dermatol 2008; 58:185-206), sendo ainda menos conhecida no caso dos glicosaminoglicanos qual é a composição e/ou a percentagem de monossacarídeos responsáveis por esta cura e pela atividade regeneradora que favorece o aparecimento de  
 15 sistemas fisiológicos, como o bloqueio da produção de mediadores inflamatórios, a regeneração capilar, ou a reperfusão da úlcera e os mecanismos de cura.

Por outras palavras, a composição objeto dos trabalhos da presente invenção, destinada às úlceras crónicas, mesmo nos  
 20 doentes que não sofrem de diabetes e nos quais se observa uma tendência para um certo tipo de úlcera crónica, que não cura facilmente, como as úlceras de pressão, entendendo-se como úlceras de pressão as que apresentam áreas danificadas na pele e nos tecidos subjacentes, provocadas por pressão prolongada  
 25 numa superfície plana dura, não necessariamente intensa e independente da posição. O termo úlcera de decúbito é atualmente rejeitado, dado referir-se à pressão, fator determinante do seu aparecimento, e porque exclui as úlceras que não surgiram devido à posição de decúbito.

30 É um problema comum no cuidado de doentes com doenças crónicas, em especial nos idosos com mobilidade limitada, com morbilidade e mortalidade considerável, com repercussão económica e social elevada, pelo que, para efeitos da presente invenção, é importante determinar que, embora a maioria dos

exemplos tenha sido realizada causando diabetes em animais, no Exemplo 5 vê-se claramente como a administração da composição farmacêutica objeto da presente invenção funciona surpreendentemente bem, apesar de o animal não ser diabético.

5       Além disso, sem pretenderem limitar-se à teoria, os inventores acreditam, no entanto, que esta hipótese é suportada pelos resultados dos seus exemplos, porque se o pentassacarídeo sintético (fondaparinux) é utilizado para o tratamento das úlceras, e especificamente das úlceras do pé 10 diabético, a sua cura e/ou atividade regeneradora é altamente reduzida (quando deveria ser o contrário), do mesmo modo que se os monossacarídeos selecionados do grupo composto por N-sulfo-D-glucosamina e ácido D-glucurónico, assim como, em realizações preferenciais da invenção, também a N-acetil-15 D-glucosamina, o ácido L-idurónico e o ácido L-idurónico 2-sulfatado, são química e/ou enzimaticamente modificados, a atividade do glicosaminoglicano dos inventores diminui drasticamente, Conclui-se portanto que, embora exista uma percentagem de pentassacarídeo na estrutura, ela não é 20 responsável pela cicatrização e/ou atividade regeneradora do tecido, assim como se os monossacarídeos acima mencionados forem qualitativa ou quantitativamente alterados, não será obtida uma boa cicatrização e/ou atividade regeneradora dos tecidos.

25       Por esta razão, um aspeto principal da presente invenção tem como objetivo uma composição de glicosaminoglicanos contendo uma percentagem de determinados monossacarídeos, numa percentagem que não excede 20% do dissacarídeo característico do pentassacarídeo, para o tratamento das úlceras crónicas e, 30 em especial, da úlcera do pé diabético.

Os inventores da presente invenção preparam também uma relação entre a quantidade necessária dos monossacarídeos acima referida e a dose de um medicamento contendo uma quantidade farmaceuticamente eficaz de glicosaminoglicano,

relacionando a percentagem de monossacarídeos (U.I.) com a semivida do produto no plasma, para obter uma dose "terapêutica" para a doença e não uma dose profilática.

Nos estudos publicados até à data, o objetivo das novas 5 heparinas utilizadas para as úlceras crónicas, e em especial para as úlceras do pé diabético, tem sido sempre a profilaxia, ou seja, acreditava-se que o aumento da dose iria causar uma hemorragia no doente, ou uma terapêutica coadjuvante da doença com outro tipo de composto com ação a 10 diferentes níveis da cascata de coagulação, como AAS. Por conseguinte, as condições utilizadas nestes casos foram as habituais para a profilaxia, o que envolve a utilização de muito baixas concentrações de heparina, sendo a relação entre a semivida no plasma (em horas) e a dose em U.I. de 1:472 no 15 caso da bemiparina, por exemplo.

E isto é assim porque o efeito que se procura com a heparina é uma ação na profilaxia, uma vez que, tendo em conta o estado da técnica, a quantidade de pentassacarídeo responsável pela atividade antitrombótica é mais do que 20 suficiente para favorecer a vascularização dos membros inferiores nos doentes com úlcera do pé diabético, e que, em doses mais elevadas do que a dose indicada, em geral se crê haver um maior risco de hemorragia, devido ao excesso do referido efeito antitrombótico, tendo em conta que os doentes 25 diabéticos têm uma maior predisposição para as hemorragias, sem perceberem que o que é realmente importante é administrar uma maior quantidade de outros monossacarídeos que não façam parte do pentassacarídeo contido na formulação. Assim, e para esse efeito, têm sido sempre tradicionalmente utilizadas doses 30 muito baixas, nas quais a relação entre a semivida no plasma e a dose de LMWH em U.I. é inferior a 1:500, já que se considera que, desse modo, se consegue o mesmo efeito anticoagulante e antitrombótico, mas com um mais baixo risco de hemorragia nos doentes que já sofrem de uma doença

complexa, como a diabetes.

Tanto quanto é do conhecimento dos inventores, não existe qualquer literatura patenteada sobre o tratamento das úlceras do pé diabético com composições de glicosaminoglicanos, como 5 as heparinas de baixo peso molecular, sem que seja com doses profiláticas, uma vez que estas últimas não são curativas, mas sim preventivas, e realmente não curam as úlceras por meios de cicatrização com regeneração do tecido de granulação, sendo antes utilizadas porque se acredita que 10 previnem a formação das mesmas e, na maioria dos casos, são utilizadas no tratamento sinergético com outros fármacos, como ácido acetilssalicílico (AAS) (*"Effect of Dalteparin of healing of chronic foot ulcers in diabetic patients with peripheral arterial occlusive disease"*, Diabetes Care, vol. 15 26(9), setembro de 2003; M. Kalani, A. et al., intitulado *Beneficial effects of dalteparin on haemostatic function and local tissue oxygenation in patients with diabetes, severe vascular disease and foot ulcers*. Thrombosis Research. 120, 653-661, 2007).

20 Além disso, os inventores da presente invenção conseguiram eliminar os preconceitos do estado da técnica, uma vez que determinaram que, no caso de certos glicosaminoglicanos, como a HBPM e a HMBPM, a quantidade de pentassacarídeo para o tratamento das úlceras do pé diabético 25 (nos doentes diabéticos) não é significativa, pois o que é realmente importante é a presença de uma percentagem de sequências de oligossacarídeos ricos em determinados monossacarídeos específicos. Esta percentagem de determinados monossacarídeos específicos, mencionada na descrição detalhada 30 da presente invenção, é responsável pela cura deste tipo de úlceras em doentes diabéticos, porque quando este tipo de glicosaminoglicano é administrado por via subcutânea ou por via parentérica, o efeito de cicatrização é devido à presença de certas frações de oligossacarídeo, que não contêm o

pentassacarídeo geralmente associado no estado da técnica ao efeito do antifator-Xa nas heparinas de baixo peso molecular e de muito baixo peso molecular. Além disso, os inventores da presente invenção determinaram que, tendo em conta que o 5 pentassacarídeo é (quantitativa e qualitativamente) alterado ligeiramente na sua estrutura heparinóide, a atividade anti-FXa diminui consideravelmente. Contudo, não se observa uma diminuição similar no poder de cicatrização.

Por conseguinte, um importante problema no tratamento 10 das úlceras do pé diabético é conseguir a dose eficaz e efetiva de um medicamento, que consiga a regeneração do tecido isquémico e previna a amputação do pé diabético, e que, além disso, seja eficaz não só como profilaxia, mas também como tratamento terapêutico. Uma outra vantagem adicional que o 15 tratamento de eleição tem de ter é não ser muito traumático para o doente, já que as úlceras do pé diabético se caracterizam pelo facto de serem extremamente dolorosas, pelo que a via de administração não deverá ser muito traumática na proximidade da ferida. Portanto, para efeitos da presente 20 invenção, as vias de administração preferenciais são a via parentérica, a via oral e a via tópica, que é não-invasiva, ou que é diretamente aplicada na mucosa a tratar.

#### Descrição dos Desenhos

A Figura 1 representa o mecanismo de ação do 25 pentassacarídeo sintético (fondaparinux).

A Figura 2A representa a região dos sinais anoméricos (relações H1-C1) do espetro  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC de fondaparinux (pentassacarídeo responsável pela interação com a antitrombina III) registados a 298K em água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). No espetro, 30 podem ser observados cinco picos de relação, correspondendo aos cinco monossacarídeos que formam o pentassacarídeo. ANSred, N-sulfo-D-glucosamina da extremidade redutora; I2S, ácido L-idurónico 2-sulfatado; ANS,3S, N-sulfo-30-sulfo-D-glucosamina; G-(ANS,3S), ácido D-glucurónico precedendo a

unidade ANS,3S e ANS-(G), N-sulfo-D-glucosamina precedendo o anel de ácido D-glucurónico. O pico da relação H1-C1 da unidade G-(ANS,3S) foi assinalado com um círculo, porque é o sinal mais característico do pentassacarídeo e será tido como referência para quantificar a presença daquele em várias amostras. A percentagem deste monossacarídeo no fondaparinux é de 20%.

A Figura 2B representa a região dos sinais anoméricos (relações H1-C1) do espetro  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC da heparina de baixo peso molecular bemiparina, registados a 298K em água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). O espetro é muito mais complexo do que o obtido para fondaparinux (ver Figura 2A), devido à presença de novas unidades de monossacarídeo, que não estavam presentes no fondaparinux (I, ácido L-idurónico não-sulfatado; ANAc, N-acetil-D-glucosamina) e à alteração da percentagem das unidades existentes, como é o caso do anel de ácido L-idurónico 2-sulfatado, I2S, que está presente numa maior proporção. O pico da relação H1-C1 da unidade característica do pentassacarídeo G-(ANS,3S) foi assinalado com um círculo. Como pode ser observado na figura, a intensidade deste sinal diminuiu, comparativamente à amostra de fondaparinux, devido ao aumento da proporção de ácido D-glucurónico associada à N-sulfo-D-glucosamina G-(ANS), em que a última é o principal anel glucurónico. A diminuição da proporção do G-(ANS,3S) nas amostras de bemiparina, 1,5% do teor total em monossacarídeo, demonstra que a maioria das cadeias de oligossacarídeos não tem o motivo estrutural responsável pela interação com a antitrombina III.

Foram também marcados os seguintes sinais:

ANSred, N-sulfo-D-glucosamina da extremidade redutora; ANS,3S, N-sulfo-3O-sulfo-D-glucosamina.

A Figura 2C representa a região dos sinais anoméricos (relações H1-C1) do espetro  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC da heparina de muito baixo peso molecular R014 ckw2\_13\_11L, gravada a 298K em água

deuterada ( $D_2O$ ). O espetro é muito mais complexo do que o obtido para o fondaparinux (ver Figure 2A), devido à presença de novas unidades de monossacarídeos, que não estavam presentes no fondaparinux (I, ácido L-idurónico não-sulfatado; ANAc, N-acetil-D-glucosamina) e à alteração da proporção das unidades existentes, como é o caso do anel de ácido L-idurónico 2-sulfatado, I2S, que está presente numa maior proporção. O pico da relação H1-C1 da unidade G-(ANS,3S) característica do pentassacarídeo foi assinalado com um círculo. Como pode ser observado na figura, a intensidade deste sinal diminuiu em comparação com a amostra de fondaparinux, devido ao aumento da proporção de ácido D-glucurónico associada à N-sulfo-D-glucosamina G-(ANS), sendo a última o principal anel glucurónico. A diminuição da proporção da unidade G-(ANS,3S) nas amostras de R014 ckw2\_13\_11L, 2,6% do teor total de monossacarídeo, demonstra que a maioria das cadeias de oligossacarídeos não possui o motivo estrutural responsável pela interação com a antitrombina III.

Foram também marcados os seguintes sinais:

ANSred, N-sulfo-D-glucosamina da extremidade redutora; ANS,3S, N-sulfo-3O-sulfo-D-glucosamina.

A Figura 2D representa a região dos sinais anoméricos (relações H1-C1) do espetro  $^{13}C-^1H$  HSQC da heparina de baixo peso molecular enoxaparina, gravado a 298K em água deuterada ( $D_2O$ ). O espetro é muito mais complexo do que o obtido para o fondaparinux (ver Figure 2A), devido à presença de novas unidades de monossacarídeos, que não estavam presentes no fondaparinux (I, ácido L-idurónico não-sulfatado; ANAc, N-acetil-D-glucosamina) e à alteração da proporção das unidades existentes, como é o caso do anel de ácido L-idurónico 2-sulfatado, I2S, que está presente numa maior proporção. O pico da relação H1-C1 da unidade G-(ANS,3S) característica do pentassacarídeo, foi assinalada com um círculo. Como pode

ser observado na figura, a intensidade deste sinal diminuiu comparativamente à amostra de fondaparinux, devido ao aumento da proporção de ácido D-glucurónico ligado à N-sulfo-D-glucosamina G-(ANS), sendo esta última o principal anel 5 glucurónico. A diminuição da proporção da unidade G(ANS, 3S) nas amostras de enoxaparina, 1,7% do teor total de monossacarídeo, demonstra que a maioria das cadeias de oligossacarídeos não possui o motivo estrutural responsável pela interação com a antitrombina III.

10 Foram também marcados os seguintes sinais:

ANSred, N-sulfo-D-glucosamina da extremidade redutora; ANS, 3S, N-sulfo-3O-sulfo-D-glucosamina.

A Figura 2E representa a região dos sinais anoméricos (relações H1-C1) do espetro  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC da heparina de baixo 15 peso molecular tinzaparina, gravado a 298K em água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). O espetro é muito mais complexo do que o obtido para o fondaparinux (ver Figura 2A), devido à presença de novas unidades de monossacarídeos, que não estavam presentes no fondaparinux (I, ácido L-idurónico não-sulfatado; ANAc, N- 20 acetil-D-glucosamina) e à alteração da proporção das unidades existentes, como é o caso do anel de ácido L-idurónico 2-sulfatado, I2S, que está presente numa maior proporção. O pico da relação H1-C1 da unidade G-(ANS, 3S) característica do pentassacarídeo foi assinalado com um círculo. Como pode ser 25 observado na figura, a intensidade deste sinal diminuiu comparativamente à amostra de fondaparinux, devido ao aumento da proporção de ácido D-glucurónico ligado à N-sulfo-D-glucosamina G-(ANS), sendo a última o principal anel glucurónico. A diminuição da proporção da unidade G (ANS, 3S) 30 nas amostras de tinzaparina, 1,05% do teor total de monossacarídeos, demonstra que a maioria das cadeias de oligossacarídeos não possui o motivo estrutural responsável pela interação com a antitrombina III.

Foram também marcados os seguintes sinais:

ANSred, N-sulfo-D-glucosamina da extremidade redutora; ANS, 3S, N-sulfo-3O-sulfo-D-glucosamina.

A Figura 2F representa a região dos sinais anoméricos (relações H1-C1) do espetro  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC da heparina de muito baixo peso molecular R014-H13-96-5, gravada a 298K em água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). O espetro é muito mais complexo do que o obtido para o fondaparinux (ver Figura 2A), devido à presença de novas unidades de monossacarídeos, que não estavam presentes no fondaparinux (I, ácido L-idurónico não-sulfatado; ANAc, N-acetil-D-glucosamina) e à alteração da proporção das unidades existentes, como é o caso do anel de ácido L-idurónico 2-sulfatado, I2S, que está presente numa maior proporção. O pico da relação H1-C1 da unidade G-(ANS, 3S) característica do pentassacarídeo foi assinalado com um círculo. Como pode ser observado na figura, a intensidade deste sinal diminuiu, comparativamente à amostra de fondaparinux, devido ao aumento da proporção de ácido D-glucurónico ligada à N-sulfo-D-glucosamina G-(ANS), sendo a última o principal anel glucurónico. A diminuição da proporção da unidade G-(ANS, 3S) nas amostras de R014\_H13\_96\_5, 1,9% do teor total de monossacarídeos, demonstra que a maioria das cadeias de oligossacarídeos não possui o motivo estrutural responsável pela interação com a antitrombina III.

Foram também marcados os seguintes sinais:

ANSred, N-sulfo-D-glucosamina da extremidade redutora; ANS, 3S, N-sulfo-3O-sulfo-D-glucosamina.

A Figura 2G representa a região dos sinais anoméricos (relações H1-C1) do espetro  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC da heparina de baixo peso molecular BEMI\_99\_4, gravada a 298K em água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). O espetro é muito diferente do obtido para o fondaparinux (ver Figura 2A), devido à presença de novas unidades de monossacarídeos, que não estavam presentes no fondaparinux (I, ácido L-idurónico não-sulfatado; ANAc, N-

acetil-D-glucosamina) e ao desaparecimento de alguns dos sinais característicos, tais como ANS, 3S e G-(ANS, 3S). O desaparecimento do sinal do pentassacarídeo, G-(ANS, 3S) demonstra que este tipo de heparina de baixo peso molecular 5 não tem quantidades detetáveis do motivo estrutural responsável pela interação com a antitrombina III. De igual modo, o desaparecimento do sinal de I2S demonstra que esta LMWH tem também mudanças significativas nas unidades características da região regular de heparina.

10 A Figura 2H representa a região dos sinais anoméricos (relações H1-C1) do espetro  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC de heparina sódica, gravados a 298K em água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). O espetro é muito mais complexo do que o obtido para o fondaparinux (ver Figura 1), devido à presença de novas unidades de monossacarídeos, 15 que não estavam presentes no fondaparinux (I, ácido L-idurónico não-sulfatado; ANAc, N-acetil-D-glucosamina) e à alteração da proporção das unidades existentes, como é o caso do anel de ácido L-idurónico 2-sulfatado, I2S, que está presente numa maior proporção. O pico da relação H1-C1 da 20 unidade G-(ANS, 3S) característica do pentassacarídeo foi assinado com um círculo. Como pode ser observado na figura, a intensidade deste sinal diminuiu comparativamente à amostra de fondaparinux, devido ao aumento da proporção de ácido D-glucurónico ligada à N-sulfo-D-glucosamina G-(ANS), sendo esta 25 última o principal anel glucurónico. A diminuição da proporção da unidade G-(ANS, 3S) nas amostras de heparina sódica, 1,0% do teor total de monossacarídeo, demonstra que a maioria das cadeias de oligossacarídeos não possui o motivo estrutural responsável pela interação com a antitrombina III.

30 Foram também marcados os seguintes sinais:

ANSred, N-sulfo-D-glucosamina da extremidade redutora; ANS, 3S, N-sulfo-3O-sulfo-D-glucosamina.

A Figura 2I representa a região dos sinais anoméricos (relações H1-C1) do espetro  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC da heparina de baixo

peso molecular BEMI\_99\_2, gravada a 298K em água deuterada ( $D_2O$ ). O espetro é muito diferente do obtido para fondaparinux (ver Figura 1), devido à presença de novas unidades de monossacarídeos, que não estavam presentes no 5 fondaparinux (I, ácido L-idurónico não-sulfatado; ANAc, N-acetil-D-glucosamina; ANH2, D-glucosamina; ANH2,3S, D-3-O-sulfo-glucosamina) e ao desaparecimento de alguns dos sinais 10 característicos, tais como ANS,3S e G-(ANS,3S).

A Figura 2J representa a região dos sinais anoméricos 15 (relações H1-C1) do espetro  $^{13}C-^1H$  HSQC de heparina cálcica, gravada a 298K em água deuterada ( $D_2O$ ). O espetro é muito mais complexo do que o obtido para fondaparinux (ver Figura 1), devido à presença de novas unidades de monossacarídeos, que 20 não estavam presentes no fondaparinux (I, ácido L-idurónico não-sulfatado; ANAc, N-acetil-D-glucosamina) e à alteração da proporção das unidades existentes, como é o caso do anel de ácido L-idurónico 2-sulfatado, I2S, que está presente numa 25 maior proporção. O pico da relação H1-C1 da unidade G-(ANS, 3S) característica do pentassacarídeo foi assinalado com um círculo. Como se pode observar na figura, a intensidade deste sinal diminuiu comparativamente à amostra de fondaparinux, devido ao aumento da proporção de ácido D-glucurónico ligada à 30 N-sulfo-D-glucosamina G-(ANS), sendo esta última o principal anel glucurónico. A diminuição da proporção da unidade G-(ANS, 3S) nas amostras de heparina sódica, 1,0% do teor total de monossacarídeo, demonstra que a maioria das cadeias de oligossacarídeos não possui o motivo estrutural responsável 35 pela interação com a antitrombina III.

Foram também marcados os seguintes sinais:

30 ANSred, N-sulfo-D-glucosamina da extremidade redutora; ANS,3S, N-sulfo-3-O-sulfo-D-glucosamina.

A Figura 2K representa a região dos sinais anoméricos (relações H1-C1) do espetro  $^{13}C-^1H$  HSQC da heparina de baixo peso molecular BP06408-66/27-A, gravada a 298K em água

deuterada ( $D_2O$ ). O espetro é muito diferente do obtido para o fondaparinux (ver Figura 2A), devido à presença de novas unidades de monossacarídeos, que não estavam presentes no fondaparinux (I, ácido L-idurónico não-sulfatado; ANAc, N-acetil-D-glucosamina) e à diminuição dos sinais correspondentes a ANS,3S e G-(ANS,3S). A diminuição do sinal do pentassacarídeo, G-(ANS, 3S), demonstra que este tipo de heparina de baixo peso molecular tem uma baixa concentração do motivo estrutural responsável pela interação com a antitrombina III.

A Figure 2L representa a região dos sinais anoméricos (relações H1-C1) do espetro  $^{13}C-^1H$  HSQC da heparina de baixo peso molecular BP06408-66/28-A, gravado a 298K em água deuterada ( $D_2O$ ). O espetro é muito diferente do obtido para o fondaparinux (ver Figura 2A), devido à presença de novas unidades de monossacarídeos, que não estavam presentes no fondaparinux (I, ácido L-idurónico não-sulfatado; ANAc, N-acetil-D-glucosamina) e ao desaparecimento dos sinais correspondentes a ANS,3S e G-(ANS,3S). O desaparecimento do sinal do pentassacarídeo, G(ANS,3S), demonstra que este tipo de heparina de baixo peso molecular não possui quantidades detetáveis do motivo estrutural responsável pela interação com a antitrombina III.

A Figura 3 mostra que a percentagem de redução da área ulcerada nos ratos do Exemplo 2, quando a bemiparina é administrada numa relação de 1:950 entre a semivida e a dose, quando a bemiparina é administrada numa relação de 1:472 entre a semivida e a dose, e quando o fondaparinux é administrado em doses equivalentes às doses terapêuticas, i.e., 5 mg/ml, desde que tenha uma semivida de 17 horas no plasma, em indivíduos saudáveis, o que, portanto, em ratos Wistar, é de 0,22 mg por rato.

A Figura 4 mostra a evolução dos controlo da diabetes nos ratinhos do Exemplo 4, relativamente aos ratinhos tratados com

bemiparina sódica. A área ferida foi representada à direita de cada animal.

A Figura 5 mostra a evolução da percentagem de cura da ferida ao longo do tempo, nos ratinhos do Exemplo 4.

5 A Figura 6 mostra microfotografias das secções das feridas dos ratinhos do Exemplo 4, após coloração com hematoxilina-eosina. A. Controlo não-diabético. B. Animal diabético tratado com fondaparinux sódico. C. Animal diabético tratado com bemiparina sódica.

10 A Figura 7 representa a percentagem de redução da área ulcerada dos ratinhos do Exemplo 5, após administração de uma composição de controlo por via tópica, de uma composição tópica de bemiparina sódica e de uma composição tópica de fondaparinux sódica, uma composição tópica de heparina não-fracionada.

A Figura 8 mostra a evolução dos ratinhos do controlo não-diabético do Exemplo 5 em relação aos ratinhos tratados com heparina cálcica. A área da ferida foi representada à direita de cada animal.

20 A Figura 9 mostra a evolução da percentagem de cura da ferida ao longo do tempo, nos ratinhos do Exemplo 5.

A Figura 10 mostra microfotografias das secções de ferida dos ratinhos do Exemplo 5, após coloração com hematoxilina-eosina. A. Controlo não-diabético. B. Animal não-diabético tratado com bemiparina sódica. C. Animal não-diabético tratado com heparina cálcica.

30 A Figura 11 representa a percentagem de redução da área ulcerada no rato Wistar diabético, após administração de uma solução de controlo, por via oral, uma suspensão de 100 mg/kg de bemiparina sódica e uma suspensão de 10 mg/kg de fondaparinux sódica.

#### Descrição Detalhada da Invenção

O problema a ser resolvido pela presente invenção é, por conseguinte, proporcionar uma composição farmacêutica que

resolva os problemas da técnica anterior.

A solução baseia-se no facto de os inventores terem identificado uma composição farmacêutica de glicosaminoglicanos, por via subcutânea ou parentérica, por 5 via oral e/ou tópica, em especial HBPM e HMBPM, para o tratamento das úlceras crónicas, como as úlceras do pé diabético, com a seguinte percentagem dos seguintes monossacarídeos (na qual todas as percentagens estão acima da percentagem total de monossacarídeos da composição):

- 10 a) N-sulfo-D-glucosamina: 25-50%  
b) Ácido D-glucurónico: 3-25%

e **caracterizada por** uma proporção da unidade de dissacarídeos do ácido D-glucurónico ligada à N-sulfo-3-sulfo-D-glucosamina não ser superior a 25%, e de preferência não superior a 20%, 15 conseguindo resolver o problema indicado, uma vez que consegue a regeneração dos tecidos, prevenindo a amputação do membro, e também é eficaz como tratamento terapêutico e não apenas na profilaxia.

Um outro aspeto da invenção refere-se também ao uso de 20 uma composição de glicosaminoglicanos por via subcutânea ou parentérica, por via oral e/ou tópica, particularmente HBPM e HMBPM, com uma proporção característica pelo menos dos monossacarídeos selecionados a partir do grupo N-sulfo-D-glucosamina, N-acetil-D-glucosamina, ácido L-idurónico, ácido 25 L-idurónico 2-sulfatado e ácido D-glucurónico no fabrico de um medicamento alternativo para o tratamento das úlceras crónicas, como as úlceras de pressão e as úlceras do pé diabético.

A solução baseia-se no facto de os inventores terem 30 identificado que, contrariamente à crença geral, é possível administrar a um doente que sofre de úlcera do pé diabético um tratamento que consiste numa dose de heparina de baixo peso molecular (LMWH), classificado como a dose de tratamento de doença tromboembólica venosa, sem que exista um maior risco de

hemorragia, e obtendo surpreendentemente melhores resultados do que quando administrada em concentrações mais baixas, como as concentrações profiláticas habituais, devido à presença de uma certa percentagem de determinados monossacarídeos nos 5 glicosaminoglicanos. Assim, a presente invenção proporciona uma composição farmacêutica para o tratamento da úlcera do pé diabético, utilizando as doses terapêuticas habituais para a doença venosa tromboembólica, entendendo-se como doses terapêuticas aquelas em que a relação entre a semivida no 10 plasma e a dose da LMWH em U.I. se situa entre 1:800 e 1:5000, i.e., aquelas que contêm uma maior quantidade de monossacarídeos específicos.

Numa realização específica da presente invenção, é 15 proporcionada uma composição farmacêutica de glicosaminoglicanos por via subcutânea ou parentérica, via oral e/ou tópica, em especial HBPM e HMBPM, para o tratamento da úlcera do pé diabético, contendo a seguinte proporção dos seguintes monossacarídeos:

- N-sulfo-D-glucosamina: 25-50%
- N-acetil-D-glucosamina: 0-10%
- Ácido L-idurónico: 0-35%
- Ácido L-idurónico 2-sulfatado: 0-50%
- Ácido D-glucurónico: 3-25%

Numa outra realização específica da presente invenção, é 20 proporcionada uma composição farmacêutica de glicosaminoglicanos por via subcutânea ou parentérica, via oral e/ou tópica, em especial HBPM e HMBPM, para o tratamento da úlcera do pé diabético, com a seguinte proporção dos seguintes monossacarídeos:

- N-sulfo-D-glucosamina: 25-50%
- N-acetil-D-glucosamina: 0-10%
- Ácido L-idurónico: 0-10%
- Ácido L-idurónico 2-sulfatado: 15-50%
- Ácido D-glucurónico: 3-25%

Numa outra realização específica da presente invenção, é proporcionada uma composição farmacêutica de glicosaminoglicanos por via subcutânea ou parentérica, via oral e/ou tópica, em especial HBPM e HMBPM, para o tratamento da úlcera do pé diabético, com a seguinte proporção dos seguintes monossacarídeos:

- N-sulfo-D-glucosamina: 25-50%
- N-acetil-D-glucosamina: 0.1-8%
- Ácido L-idurónico: 1-10%
- 10 - Ácido L-idurónico 2-sulfatado: 15-40%
- Ácido D-glucurónico: 3-15%

Mais especificamente, a presente invenção pretende ser uma composição farmacêutica de glicosaminoglicanos para administração por via subcutânea ou parentérica, via oral e/ou tópica, em especial HBPM e HMBPM, para o tratamento das úlceras crónicas, como as úlceras do pé diabético, com uma percentagem da unidade de dissacarídeos do ácido D-glucurónico ligada à N-sulfo-3-sulfo-D-glucosamina (ANS,3S) inferior a 20%, mais preferencialmente inferior a 10% e ainda mais preferencialmente inferior a 5% do total da composição de sacarídeos.

Um dos méritos desta invenção é não só ter eliminado um preconceito do estado da técnica, mas também conseguir uma relação efetiva entre a percentagem dos monossacarídeos acima mencionados e a dose de medicamento contendo a composição farmacêutica acima referida necessária para tratar a úlcera do pé diabético, assim como para favorecer a cicatrização e regeneração dos tecidos, nos doentes, tendo em conta a semivida destes glicosaminoglicanos no plasma.

30 A semivida das diversas HBPM conhecidas no plasma é mostrada na Tabela 1, cujos dados foram extraídos da publicação Planes, A. *Review on bemiparin sodium - a second generation low molecular weight heparin - and its applications in venous thromboembolism. Expert opinion.*

Pharmacother. 2003; 4:1551-61.

<b>Tabela 1</b>		
LMWH	Gama de semividas no plasma (horas)	Semivida no plasma (horas)
RO-14	6,5 - 6,9	6,7
Bemiparina	5,2 - 5,4	5,3
Enoxaparina	4,0 - 4,4	4,2
Nadroparina	3,7	3,7
Dalteparin	2,3 - 2,8	2,5
Tinzaparina	3,0	3,0

Em relação aos diferentes tipos de HBPM, observa-se que as doses utilizadas dependem, de modo inversamente proporcional, da sua semivida no plasma, conforme mostra a 5 Tabela 2 (Fonte: ver o artigo acima referido "Expert opinion Pharmacother", excetuando-se o caso do RO14, cujos dados são provenientes de estudos do requerente):

**Tabela 2**

LMWH	Dose média	Relação aproximada
Nadroparina	7.600	1:8,00
Dalteparin	10.000	1:9,50
Tinzaparina	10.000	1:1.900
LMWH	Dose média	Relação aproximada
Nadroparina	7.600	1:2.00
Dalteparin	10.000	1:4.000
Tinzaparina	10.000	1:3.300

Em resultado disso, um aspeto adicional da invenção visa a utilização de glicosaminoglicanos, em especial heparinas de baixo peso molecular, no fabrico de um medicamento para o tratamento da úlcera do pé diabético, **caracterizado por** a relação entre a semivida no plasma e a dose em U.I. da LMWH se situar entre 1:800 e 1:5.000, i.e., **caracterizado por** ser administrada uma composição contendo uma maior quantidade de monossacarídeos selecionados de um grupo composto por N-sulfo-D-glucosamina, N-acetil-D-glucosamina e ácido D-glucurónico, e em realizações preferenciais da invenção, também ácido L-idurónico e ácido L-idurónico 2-sulfatado, e uma percentagem da unidade de dissacarídeo do ácido D-glucurónico ligada à N-sulfo-3-sulfo-D-glucosamina inferior a 20% do total da composição de sacarídeos, para o tratamento da úlcera do pé diabético, mais preferencialmente inferior a 10% e ainda mais preferencialmente inferior a 5%.

Num outro aspeto, a invenção visa utilizar uma heparina de baixo peso molecular no fabrico de um medicamento para o tratamento da úlcera do pé diabético, no qual a LMWH é uma heparina com um peso molecular médio inferior a 6.000 Dalton.

Num outro aspeto, a invenção visa utilizar uma heparina de baixo peso molecular no fabrico de um medicamento para o tratamento da úlcera do pé diabético, **caracterizado por** a semivida no plasma se situar entre 5,2 e 5,4 e a dose média

diária ser de 5.000 U.I., o que assegura ter uma percentagem específica dos monossacarídeos selecionados do grupo composto por N-sulfo-D-glucosamina e ácido D-glucurónico e, em realizações preferenciais da invenção, também N-acetil-D-glucosamina, ácido L-idurónico e ácido L-idurónico 2-sulfatado, e a unidade de dissacarídeo do ácido G-glucurónico ligada à N-sulfo-3-sulfo-D-glucosamina ser inferior a 20% do total da composição de sacarídeos, mais preferencialmente menos de 10% e ainda mais preferencialmente menos de 5%.

Num outro aspeto, a invenção visa utilizar uma heparina de baixo peso molecular no fabrico de um medicamento para o tratamento da úlcera do pé diabético, **caracterizado por** a semivida no plasma se situar entre 4,0 e 4,4 e a dose média diária ser de 7.600 U.I., o que assegura ter uma percentagem específica dos monossacarídeos selecionados do grupo composto por N-sulfo-D-glucosamina, N-acetil-D-glucosamina, ácido L-idurónico, ácido L-idurónico 2-sulfatado e ácido D-glucurónico.

Num outro aspeto, a invenção visa a utilização de uma heparina de baixo peso molecular no fabrico de um medicamento para o tratamento da úlcera do pé diabético, **caracterizado por** a semivida no plasma se situar entre 2,3 e 2,8 e de a dose média diária ser de 10.000 U.I., o que assegura ter uma percentagem específica de monossacarídeos selecionados do grupo composto por N-sulfo-D-glucosamina e ácido D-glucurónico e, nas realizações preferenciais da invenção, também N-acetil-D-glucosamina, ácido L-idurónico e ácido L-idurónico 2-sulfatado.

Tal como indicado, o resultado de administrar uma LMWH numa dose de tratamento em que a relação entre a semivida de cada LMWH no plasma e a dose em U.I. de cada LMWH se situa entre 1:800 e 1:5.000, a vantagem de administrar um medicamento alternativo para o tratamento das úlceras crónicas, como as úlceras do pé diabético, proporcionando uma

maior eficácia do que os tratamentos tradicionais, é conseguido sem um aumento significativo dos inconvenientes tipicamente associados a este tratamento, tal como um maior risco de hemorragia, devido ao facto de conter uma maior 5 quantidade de determinados monossacarídeos e uma quantidade limitada da unidade de dissacarídeos do ácido D-glucurónico ligado à N-sulfo-3-sulfo-D-glucosamina inferior a 20% do total da composição de sacarídeos.

Esta invenção foi possível em resultado do facto de os 10 inventores terem ultrapassado o preconceito existente no campo técnico das heparinas contra o aumento da concentração de HBPM para níveis da ordem das doses de tratamento da doença tromboembólica venosa, em vez de manterem as habituais doses profiláticas (mais baixas), acreditando que esse aumento iria 15 aumentar significativamente o risco de hemorragia, sem ter efeitos benéficos relativamente à melhoria da regeneração e cicatrização do tecido epitelial, conforme se observou na presente invenção.

Além disso, sem quererem ser levados pela teoria, os 20 inventores da presente invenção consideram, no entanto, que os resultados dos exemplos suportam as suas hipóteses, uma vez que se o pentassacarídeo sintético (fondaparinux) é utilizado para o tratamento da úlcera do pé diabético, a atividade cicatrizante e/ou regeneradora é altamente reduzida (quando 25 deveria ser o inverso), do mesmo modo que se os monossacarídeos selecionados do grupo que é composto por N-sulfo-D-glucosamina, N-acetil-D-glucosamina, ácido L-idurónico, ácido L-idurónico 2-sulfatado e ácido D-glucurónico forem química ou enzimaticamente modificados, a atividade da 30 composição de glicosaminoglicano diminui consideravelmente. Conclui-se portanto que, embora haja uma porção de pentassacarídeo na estrutura, ela não é responsável pela atividade cicatrizante e/ou regeneradora, assim como se os monossacarídeos acima referidos forem qualitativa ou

quantitativamente alterados, não será obtida uma boa atividade cicatrizante e/ou regeneradora.

EXEMPLOS

Os exemplos específicos que se seguem servem para ilustrar a natureza da presente invenção. Estes exemplos são incluídos apenas a título ilustrativo e não devem ser interpretados como limitações à invenção que aqui se reivindica.

Realizou-se uma série de experiências para demonstrar que o uso de glicosaminoglicanos, como as heparinas de baixo peso molecular, no fabrico de medicamentos para o tratamento da úlcera do pé diabético em doses terapêuticas de HBPM, nas quais a relação entre a semivida de cada LMWH no plasma e a dose da LMWH em U.I. se situa entre 1:800 e 1:5.000 proporciona as vantagens da invenção indicadas.

Nestas experiências foram utilizados diversos compostos, em especial os seguintes:

Produtos comerciais:

- Fondaparinux: pentassacarídeo análogo com elevada afinidade para a antitrombina III obtida por síntese química. Tem as seguintes características, entre outras: peso molecular de 1728 Daltons e um anti-fator Xa ativo em U.I./mg.

- Bemiparina: é uma heparina de segunda geração, com um baixo peso molecular (peso molecular médio de 3.600 Daltons) e uma relação anti-Xa/anti-IIa superior a 8. A Bemiparina é obtida por uma nova despolimerização e fracionamento - beta-eliminação por um método em meio não-aquoso para atingir um peso molecular ainda mais baixo que as heparinas anteriores, assim como uma distribuição ótima dos fragmentos das mesmas, de modo a que a percentagem de fragmentos resultante, de mais de 6.000 Daltons, seja muito inferior ao resto da HBPM, com uma elevada percentagem de cadeias abaixo da extensão crítica (MW<5,400 D). Sem pretenderem ser levados pela teoria,

os inventores acreditam que são precisamente os monossacarídeos presentes que não fazem parte da porção característica do pentassacarídeo responsável pela atividade antitrombótica, que são considerados secundários e que, até 5 agora, não foram considerados importantes, que conferem à HBPM da invenção as vantagens indicadas; por esta razão, quanto maior for a dose de monossacarídeos, melhor a cicatrização e a cura das úlceras do pé diabético.

10 - Enoxaparina: heparina de baixo peso molecular, obtida por despolimerização por um método de  $\beta$ -eliminação num meio aquoso dos ésteres de benzilo previamente formados de heparina. Tem, entre outras, as seguintes características (Ph. Eur. 6th Edition): Peso molecular médio de 3500-5500 Daltons e uma atividade anti-fator Xa de 90 -125 U.I./mg.

15 - Dalteparin: heparina de baixo peso molecular, obtida por despolimerização com ácido nitroso. Tem, entre outras, as seguintes características (Ph. Eur. 6th Edition): peso molecular médio de 5600-6400 Daltons e uma atividade anti-fator Xa de 110-210 U.I./mg.

20 - Tinzaparina: heparina de baixo peso molecular, obtida por despolimerização enzimática com heparinase I. Tem, entre outras, as seguintes características (Ph. Eur. 6th Edition): peso molecular médio 5500-7500 Daltons e uma atividade anti-fator Xa de 70-120 U.I./mg.

25 - Heparina sódica: heparina não-fracionada. Tem, entre outras, as seguintes características (Ph. Eur. 6th Edition): atividade anticoagulante:  $\geq 150$  U.I./mg.

30 - Heparina cálcica: heparina não-fracionada. Tem, entre outras, as seguintes características (Ph. Eur. 6th Edition): atividade anticoagulante:  $\geq 150$  U.I./mg.

Produtos em fase de investigação:

- RO-14: heparina de muito baixo peso molecular, obtida por despolimerização por um método de  $\beta$ -eliminação, num meio não-aquoso. Tem, entre outras, as seguintes características:

peso molecular médio de 1800-3000 Daltons e uma atividade anti-fator Xa de 80-140 U.I./mg.

- BEMI-99/4: é uma heparina de baixo peso molecular, com um grau de sulfação alterado, de modo a ter apenas grupos sulfato na posição N das glucosaminas. Por esta razão, a sua atividade anti-fator Xa diminui consideravelmente, porque a porção de pentassacarídeo é qualitativa e quantitativamente afetada. As modificações para obtenção desta heparina baseiam-se numa reação da des-N,O-sulfação, que decorre segundo as condições descritas por Nagasawa e Inoue (Nagasawa K, Inoue Y. *De-N-sulfation. Methods Carbohydr. Chem.* 1980; 8:287-289) e de N-sulfação, segundo as condições da Lloyd et al. Lloyd AG, Embrey G, Fowler LJ. *Studies on heparin degradation-I: Preparation of [35S] sulphamate derivatives for studies on heparin degrading enzymes of mammalian origin.* *Biochem. Pharmacol.* 1971; 20:637-648); assim, dissolvem-se 10 g de bemiparina em 150 ml de água e passa-se a solução através de uma coluna Dowex 50WX8, H<sup>+</sup>. O eluato é neutralizado com piridina e liofilizado, obtendo-se 11,2 g de sal de piridínio de bemiparina.

O sal de piridínio de bemiparina (3 g) é dissolvido em 75 ml de dimetilssulfóxido, contendo 10% de metanol, e a solução é mantida durante 24 horas a 105°C. Decorrido este tempo, acrescentam-se 75 ml de água, ajusta-se o pH para 9,0-9,5 com hidróxido de sódio e agita-se a mistura durante 15 minutos. A solução é neutralizada com ácido clorídrico, dissolvem-se 0,5 g de cloreto de sódio e a mistura é precipitada com a adição de 3 volumes de metanol, obtendo-se o derivado des-N,O-sulfatado.

O derivado des-N, O-sulfatado (1 g) é N-sulfatado, de acordo com as condições de Lloyd et al. O produto é dissolvido em 75 ml de uma solução saturada de bicarbonato de sódio e o pH é ajustado para 9. A solução é aquecida a 55°C e adicionam-se 3 g de complexo de trióxido de enxofre-

trimetilamina. A reação é mantida durante 3 horas a 55°C. Decorrido este tempo, adicionam-se novamente 3 g de complexo de trióxido de enxofre-trimetilamina, deixando-se a reação a 55°C durante mais 3 horas. A solução é arrefecida e o pH 5 ajustado para 7 com ácido clorídrico; junta-se 1 g de cloreto de sódio e a mistura é precipitada com três volumes de metanol, obtendo-se 0,88 g de BEMI-99/4. O produto obtido tem as seguintes características: peso molecular médio de 3468 Dalton e uma atividade anti-fator Xa de 4 U.I./mg.

10 - BEMI-99/2: heparina de baixo peso molecular, com o seu grau de sulfatação alterado sob o efeito de uma reação de des-N-sulfatação.

Isto envolve uma diminuição da sua atividade anti-fator Xa, porque o pentassacarídeo é afetado.

15 As modificações para obtenção desta heparina baseiam-se nas condições descritas por Nagasawa e Inoue (Nagasawa K, Inoue Y. *De-N-sulfation. Methods Carbohydr. Chem.* 1980; 6:287-289). Dissolvem-se 3 g de sal de piridínio de bemiparina (preparado conforme indicado no exemplo anterior) 20 em 450 ml de dimetil-sulfóxido contendo 10% de metanol, e a solução é mantida durante 2 horas a 55°C. Decorrido este tempo, o pH é ajustado para 9,0-9,5 com hidróxido de sódio e a mistura é agitada durante 15 minutos. A solução é neutralizada com ácido clorídrico, dissolvem-se 0,5 g de 25 cloreto de sódio e a mistura é precipitada com a adição de 3 volumes de metanol, obtendo-se o derivado des-N,O-sulfatado. Obtém-se 0,91 g de BEMI-99/2. O produto obtido tem as seguintes características: peso molecular médio de 3619 Dalton e uma atividade anti-fator Xa de 19 U.I./mg.

30 - H13-96/5: é uma heparina de baixo peso molecular, com um mais baixo grau de acetilação. Por esta razão, a sua atividade anti-fator Xa diminui consideravelmente, porque a porção de pentassacarídeo é qualitativa e quantitativamente afetada. Neste caso, para se poder obter este

glicosaminoglicano, é feita uma des-N-acetilação, segundo as condições descritas por Shaklee e Conrad (Shaklee PN, Conrad HE. *Hydrazinolysis of heparin and other glycosaminoglycans*. Biochem J 1984; 217:187-197). Assim, dissolvem-se 5 g de RO-14 5 em 125 ml de hidrazina anidra, contendo 1% de sulfato de hidrazina, e mantém-se a mistura a 95°C durante 6 horas. A solução é concentrada até secar, redissolvida numa quantidade mínima de água e neutralizada com ácido clorídrico. Adicionam-se 2,5 g de cloreto de sódio e precipita-se a mistura com 3 10 volumes de metanol, obtendo-se o produto H13-96/5 (3,4 g). O produto obtido tem as seguintes características: peso molecular médio de 2008 Daltons e uma atividade anti-fator Xa de 46 U.I./mg.

- BP06408-66/27-A: é uma heparina de baixo peso 15 molecular, com uma reduzida atividade anti-fator Xa, obtida pelo fracionamento de bemiparina, por cromatografia de afinidade em ATIII.

Para obter este derivado, passam-se 10 mg de bemiparina através de uma coluna de Sepharose 4B ativada com CNBr, 20 previamente ativada com ATIII (humana), preparada de acordo com as condições descritas por Höök et al. (Höök M, Björk I, Hopwood J, Lindahl U. FEBS Lett. 1976; 66:90-93). A coluna é eluada a 4°C com uma solução-tampão com um pH 7,40 de 1 mM Tris-HCl + 0,4 M NaCl, eluindo-se assim a fração com baixa 25 afinidade.

Esta fração é purificada por uma coluna de Biogel P2, eluindo com água. A solução contendo o produto é liofilizada, obtendo-se finalmente 7,6 mg do produto. O produto obtido tem as seguintes características: peso molecular médio de 3567 30 Daltons e uma atividade anti-fator Xa de 32 U.I./mg.

- BP06408-66/28-A: é uma heparina de baixo peso molecular, com atividade anti-fator Xa minimizada, obtida pelo fracionamento de bemiparina, por cromatografia de afinidade em ATIII. Para obter este derivado, passam-se 10 mg de

bemiparina através da coluna de afinidade descrita na preparação do produto anterior. A coluna é eluída a 4°C com uma solução-tampão com um pH de 7,40, composta por 1 mM Tris-HCl + 0,25 M NaCl, sendo eluída a fração com baixa afinidade.

5 Esta fração é purificada por uma coluna de Biogel P2, eluída com água. A solução contendo o produto é liofilizada, obtendo-se finalmente 3,6 mg de produto. O produto obtido apresenta as seguintes características: baixo peso molecular médio de 3611 Dalton e uma atividade anti-fator Xa de 5,4  
10 U.I./mg.

As experiências realizadas foram geralmente as seguintes: preparação e quantificação e identificação de frações das frações de glicosaminoglicano, por meio de NMR e administração em ratos Wistar previamente diabetizados e em  
15 ratinhos geneticamente modificados, a fim de avaliar a cura das referidas úlceras.

#### ESTUDO DA QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FRAÇÕES POR NMR

##### Determinação das percentagens de monossacarídeos dos produtos

Os inventores da presente invenção analisaram amostras comerciais e as suas próprias amostras de investigação, para determinarem as proporções de monossacarídeos responsáveis pela cura da úlcera do pé diabético, assim como as diferentes frações de sacarídeos presentes no pentassacarídeo.

O teor médio de monossacarídeos nas amostras de glicosaminoglicanos (GAG) foi determinado por meio da técnica da Ressonância Magnética Nuclear (RMN), utilizando experiências bidimensionais  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence - Coerência de Quantificação Heteronuclear Simples*) quantitativas, segundo o método descrito por Marco  
30 Guerrini *et al.* O aumento da resolução que obtida com a segunda dimensão permite quantificar sinais que se sobrepõem num espetro unidimensional, técnica que se reveste de especial interesse para o estudo de hidratos de carbono complexos, como os GAG. Estas moléculas têm graves problemas de sobreposição

num espetro  $^1\text{H}$  unidimensional, que torna difícil determinar as áreas de picos isolados em 1D para a sua quantificação.

A quantidade da unidade de ácido D-glucurónico ligada à N-sulfo-3-sulfo-D-glucosamina G(ANS,3S), presente em GAG 5 obtidos a partir da heparina natural, podem estar diretamente relacionados com a atividade anti-Xa da mesma, conforme descrito por M. Guerrini *et al.* Este dissacarídeo pertence ao pentassacarídeo responsável pela interação com a antitrombina III e apenas é detetado nas sequências ativas. O sinal de 10 relação do carbono anomérico deste tipo de ácido glucurónico com o hidrogénio diretamente ligado, aparece numa região característica, não-sobreposta no espetro HSQC e pode por isso ser utilizado para quantificar a proporção do pentassacarídeo no GAG.

15 Os espetros  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC de fondaparinux e de diferentes GAG estão representados nas Figuras 2A a 2L, nas quais o sinal da relação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  do protão anomérico correspondente à unidade de ácido glucurónico do pentassacarídeo foi assinalado com um círculo.

20 A medição da intensidade deste sinal nos espetros permite determinar a proporção de pentassacarídeo. Os resultados indicam que a percentagem do monossacarídeo G-(ANS,3S) em caso algum excede 3% nos GAG analisados, ao contrário de fondaparinux, na qual essa proporção é de 20%.

25 No entanto, os GAG estudados têm novas unidades de monossacarídeos, tais como anéis de ácido idurónico não-sulfatado (I) ou glucosaminas N-acetiladas (ANA). De igual modo, a percentagem da unidade de ácido idurónico 2-sulfatado é muito maior do que no pentassacarídeo. Por conseguinte, as 30 amostras analisadas contêm maioritariamente cadeias de oligossacarídeos diferentes de fondaparinux.

Fraçãoe s	Fondaparinux	Bemiparin	R014	H13_96	BEMI_99_2	BEMI 99_4	BP0640	BP0640	Enoxaparina	Dalteparin	Tinzaparina	Heparina não-	%
ANS	40	44.4	35.3	39.6	-	44.4	43.4	49.3	40.65	37.3	42.45	42.6	25-
ANAc	0	2.9	2.2	0.1	2.5	6.03	1.8	4.1	5.6	5.15	7.5	5.1	0-
I2S	20	30.7	28.3	23.1	26.9	0	34.6	22.6	26	37.7	30.2	38.4	0-
I	0	2.8	3.3	1.4	1.8	34.2	1.8	1.3	3.35	5.0	4.30	5.7	0-
G	20	5.7	J.7	6.8	5.7	9.26	6.2	8.6	8.4	7.25	7.9	7.0	3-
ANS, 3S	20	2.4	3.1	3.0	0	0	<0.1	0	2.2	2.3	1.0	2.2	<20
G-ANS, 3S	20	1.5	2.6	1.9	0	0	<0.1	0	1.7	2.05	1.05	1.0	<20

Todos os dados desta tabela estão expressos em %.

ANS: N-sulfo-D-glucosamina

ANAc: N-acetil-D-glucosamina

I2S: ácido L-idurónico 2-sulfatado

I: ácido L-idurónico

G: ácido D-glucurónico

ANS, 3S: N-sulfo-3-sulfo-D-glucosamina

G-ANS, 3S: ácido D-glucurónico ligado a N-sulfo-3-sulfo-D-glucosamina

## ESTUDO EM RATOS WISTAR, POR VIA PARENTÉRICA

Exemplo 1:Diabetização de ratos Wistar.

Para concretizar a presente realização foram administradas 5 doses de 45 mg/kg de estreptozotocina (STZ), que foram aplicadas por via intramuscular, para constituir um lote de 8 ratos diabéticos (Andrades Ja et al. *Engineering, expression, and renaturation of a collagen-targeted human bFGF fusion protein. Growth Factors.* 2001; 18(4):261-75).

10 Foram utilizados ratos Wistar machos, com um peso médio de 250 g por rato, aos quais foi administrada uma dose de 11,25 mg de STZ por rato, por via intramuscular, através da aplicação de 100 µl na pata esquerda de cada rato.

15 Foi administrada água glicosada (350 mg/dl) a todos os ratos, durante os três dias, e foram feitas diariamente medições de glicose, com um glicómetro, a fim de verificar se os ratos se encontravam realmente diabetizados. Por esta razão, antes da administração e, à mesma hora, 4 dias após a administração de estreptozotocina, foi colhida uma gota de sangue da veia caudal 20 de cada rato, para subsequente quantificação de glicémia e para ver se os animais estavam diabéticos, antes de iniciar o estudo de ulceração.

Tabela 1: Avaliação peso-glicémia dos ratos Wistar

RATO	PESO (g)	Glicémia Dia 0 (mg/dl)	Glicémia Dia 4 (mg/dl)	Glicémia Dia 9 (mg/dl)
1	250	120	>350	>350
2	245	129	>350	----
3	255	119	>350	----
4	250	135	>350	----
5	240	136	>350	----
6	260	171	>350	>350
7	270	124	>350	----
8	245	133	>350	----

Ulceração de ratos Wistar e medição do grau de cicatrização

Para este exemplo, foram escolhidos, no total, 3 grupos com 8 ratos Wistar:

Grupo de controlo:	2 ratos
Grupo 1: Dose elevada de heparina (217 U.I.)	3 ratos
Grupo 2: Dose baixa de heparina (108 U.I.)	3 ratos

A seleção dos ratos incluídos em cada grupo foi feita 5 aleatoriamente.

Uma vez diabetizados os ratos, foram-lhes feitas 4 úlceras com um diâmetro de 1cm cada uma, utilizando um bisturi. Foi seguido um protocolo de anestesia/analgesia com Ketamina/xilazina, de acordo com as recomendações do livro: 10 "Handbook of laboratory animal management and welfare" (Manual de gestão e bem-estar de animais de laboratório):

- Anestesia: 10 mg/kg de xilazina + 90 mg/kg de ketamina IP
- Analgesia: 300 mg/kg de paracetamol por via oral 15 (dissolvido em água)

No exemplo presente, no dia após a ulceração, todos os ratos incluídos no estudo, exceto um do Grupo 1 e outro do Grupo 2, estavam mortos. A causa da morte não se deveu a fenómenos de infecção, mas antes à possibilidade de um efeito da anestesia. 20 Por conseguinte, a experiência prosseguiu com dois ratos, cada um deles com quatro úlceras, um tratado com uma dose elevada de bemiparina e outro com uma dose baixa de bemiparina, tendo a experiência prosseguido para observar as diferenças na superfície em cicatrização e ulcerada entre as diferentes doses.

25 As úlceras foram tratadas com água e limpas durante 9 dias após a ulceração.

As administrações de bemiparina decorreram mediante uma solução de bemiparina, por via subcutânea (100 µl) para o tratamento das úlceras.

30 O diâmetro da úlcera foi quantificado por decalque da úlcera numa transparência, a fim de verificar a evolução da cicatrização.

A Tabela 2 mostra o cálculo da percentagem de redução da área ulcerada no dia 9 em relação ao dia 1:

Tabela 2

Rato 108 U.I.	Rato 217 U.I.
E 43,23%*	A 26,2%
F 17,36%	B 20,14%
G 32,24%	C 25,64%
H 23,59%	D 37,43%
Média: 24.3967,47	Média: 27.3567,25

(\*Exclui-se da média devido a uma quantificação errónea)

Evolução da cicatrização

5 Quantitativamente, não se observa uma grande diferença em relação à área das úlceras entre os dois ratos. No entanto, o processo de cicatrização do rato D=217 U.I. é macroscopicamente muito melhor, dado que o fecho da úlcera apresenta uma melhor qualidade na granulação ou na regeneração com menos conteúdo fibroso do que o rato D=108 I.U., pelo que se observa uma melhoria qualitativa em relação à cicatrização e regeneração do tecido ulcerado com a administração de D=217.

10

Exemplo 2:

Diabetização de ratos Wistar

15 Para concretizar a presente realização, foram administradas doses de 45 mg/kg de estreptozotocina (STZ), por via intramuscular, para constituir um lote de 8 ratos diabéticos (Andrades Ja et al. *Engineering, expression, and renaturation of a collagen-targeted human bFGF fusion protein. Growth*

20 *Factors.* 2001; 18(4):261-75).

Foram utilizados ratos Wistar macho, com um peso médio de 250 g por animal, aos quais foi administrada uma dose de 11,25 mg de STZ por rato, por via intramuscular, através da aplicação de 100 ml na pata esquerda de cada animal.

25 Foi administrada água glicosada (350 mg/dl) a todos os ratos, durante três dias e feitas medições diárias da glicose com um glicómetro, a fim de verificar se os ratos estavam de facto diabetizados. Por esta razão, antes da administração e à

mesma hora, 4 dias após a administração de estreptozotocina, foi colhida uma gota de sangue da veia caudal dos ratos, para subsequente quantificação da glicémia e para verificar se os animais estavam de facto diabéticos antes de iniciar o ensaio de 5 ulceração.

Tabela 3: Medição do peso-glicémia de ratos Wistar

RATO	PESO (g)	Glicémia		
		Dia 0 (mg/dl)	Dia 4 (mg/dl)	Dia 9 (mg/dl)
1	240	128	>350	1
2	240	132	>350	2
3	250	121	>350	3
4	260	138	>350	4
5	250	142	>350	5
6	245	136	>350	6
7	265	129	>350	7
8	245	141	>350	8

Ulceração de ratos Wistar e medição do grau de cicatrização

Para este exemplo, foram escolhidos, no total, 3 grupos com 8 ratos Wistar machos:

Grupo de controlo Fondaparinux	2 ratos
Grupo 1: Dose elevada de heparina (217 U.I.)	2 ratos
Grupo 2: Baixa dose de heparina (108 U.I.)	2 ratos

10 A seleção dos ratos incluídos em cada grupo foi feita aleatoriamente.

Uma vez diabetizados os ratos, foram-lhes feitas 2 úlceras com um diâmetro de 1cm cada, com um bisturi. Seguiu-se um protocolo de anestesia/analgesia com ketamina/xilazina, de 15 acordo com as recomendações do livro: "Handbook of laboratory animal management and welfare" (Manual de gestão e bem-estar de animais de laboratório):

- Anestesia: 10 mg/kg de xilazina + 90 mg/kg de ketamina IP
- 20 Analgesia: 300 mg/kg de paracetamol por via oral (dissolvido em água)

As úlceras foram tratadas com água e limpas durante 9 dias após a ulceração.

A administração de bemiparina e fondaparinux decorreram

mediante uma solução de bemiparina por via subcutânea (100  $\mu$ l) para o tratamento das úlceras.

O diâmetro da úlcera foi quantificado por decalque da úlcera numa transparência, a fim de verificar a evolução da 5 cicatrização.

A Tabela 4 mostra o cálculo da percentagem de redução da área ulcerada no dia 9 em relação ao dia 1:

Tabela 4

Ratos 217 U.I. Lote	Ratos 108 U.I. Lote	Ratos Fondaparinux
A 29,31%	E 16,96%	H 17,00%*
B 31,85%	F 13,26%	I 20,69%
C 28,40%	G 19,14%	J 21,32%
D 24,89%	H 19,71%	K 23,81%
Média: 27,35 $\pm$ 7,25	Média: 24,39 $\pm$ 7,47	Média: 20,70 $\pm$ 7,20

As médias dos três lotes deste estudo estão indicadas na

10 Figura 3.

#### Evolução da cicatrização

Neste estudo, aparece já uma redução da área ulcerada, entre o dia 0 e o dia 9 (ver Figura 3); além disso, como no Exemplo 1, observa-se de facto uma diferença macroscopicamente 15 quantitativa relativamente ao tipo de cicatrização do tecido ulcerado: o processo de cicatrização do rato D=217 U.I. é macroscopicamente muito melhor do que no caso de fondaparinux, em que a ferida apresenta uma ligeira variação no dia 9 em relação ao dia 0. No caso do rato com D=217, o fecho da úlcera 20 tinha uma qualidade superior na granulação ou na regeneração do tecido dérmico, com menos conteúdo fibroso que o rato D=108 U.I., ou seja, observa-se uma melhoria qualitativa em relação à cicatrização e regeneração do tecido ulcerado, com a administração de D=217 e do rato com fondaparinux.

25 Exemplo 3:

#### Diabetização de ratos Wistar

Para concretizar a presente realização, foram administradas doses de 45 mg/kg de estreptozotocina (STZ), por via intramuscular, para tornar diabéticos um lote de 10 ratos 30 (Andrades Ja et al. *Engineering, expression, and renaturation*

of a collagen-targeted human bFGF fusion protein. *Growth Factors.* 2001; 18(4):261-75).

Foram utilizados ratos Wistar machos com um peso médio de 250 g por rato, aos quais foi administrada uma dose de 11,25 mg 5 de STZ por rato, através da aplicação por via intramuscular de 100 ml, na pata esquerda de cada rato.

A diabetes foi induzida em 6 de todos os ratos e 4 deles 10 foram deixados como não-diabéticos, num grupo de controlo, para testar o resultado da cicatrização das úlceras crónicas não causadas por diabetes.

Foi administrada água glicosada (350 mg/dl) aos ratos, durante três dias e feitas medições diárias da glicose com um glicómetro, a fim de verificar se os ratos estavam de facto 15 diabetizados. Por esta razão, antes da administração e à mesma hora, 4 dias após a administração de estreptozotocina, foi colhida uma gota de sangue da veia caudal dos ratos, para subsequente quantificação da glicémia e para verificar se os animais estavam de facto diabéticos antes de iniciar o ensaio de 20 ulceração.

20 Tabela 5: Medição do peso-glicémia de ratos Wistar

RATO	PESO (g)	Glicémia	
		Dia 0 (mg/dl)	Dia 4 (mg/dl)
1	25	13	>35
2	25	14	>35
3	25	12	>35
4	26	12	>35
5	25	14	>35
6	26	14	>35
RATOS NÃO-DIABÉTICOS			
RATO	PESO (g)	Glicémia	
		Dia 0 (mg/dl)	Dia 4 (mg/dl)
7	24	13	14
8	26	14	13
9	24	15	12
1	25	14	13

Ulceração de ratos Wistar e medição do grau de cicatrização

Para este exemplo, foram escolhidos, no total, 5 grupos de 10 ratos Wistar machos:

Grupo de controlo não-diabéticos	2 ratos
Grupo de controlo diabéticos	2 ratos
Grupo 1: Não-diabéticos Bemiparina (217)	2 ratos
Grupo 2: Diabéticos Bemi 99_2 (2,2)	2 ratos
Grupo 3: Diabéticos fondaparinux (0,22)	2 ratos

A seleção dos ratos incluídos em cada grupo foi feita aleatoriamente.

5       Uma vez prontos os ratos, foram-lhes feitas 2 úlceras com um diâmetro de 1cm cada, com um bisturi. Seguiu-se um protocolo de anestesia/analgesia com ketamina/xilazina, de acordo com as recomendações do livro: "Handbook of laboratory animal management and welfare" (Manual de gestão e bem-estar de animais de laboratório):

- Anestesia: 10 mg/kg de xilazina + 90 mg/kg de ketamina IP
- Analgesia: 200 mg/kg de ibuprofeno por via oral (dissolvido em 1 litro de água)

15       No presente exemplo, no dia a seguir à ulceração, um dos ratos diabéticos do grupo 3 estava morto. A causa da morte não se deveu a fenómenos de infecção, mas antes à possibilidade de um efeito da anestesia. Por conseguinte, a experiência prosseguiu com 8 ratos, cada um deles com duas úlceras, do grupo de controlo diabéticos, do grupo de controlo não-diabéticos, do grupo 1 e do grupo 2, e com 1 rato com duas úlceras, do grupo 3, pelo que a experiência prosseguiu para observar as diferenças na superfície em cicatrização e ulcerada entre as diferentes doses.

25       As úlceras foram tratadas com água e limpas durante 9 dias após a ulceração. Foi para o tratamento das úlceras. O diâmetro da úlcera foi quantificado por decalque da úlcera numa transparência, a fim de verificar a evolução da cicatrização.

30       A Tabela 6 mostra o cálculo da percentagem de cicatrização no dia 9 em relação ao dia 1:

Tabela 6

Controlo não-	Grupo 1	Controlo	Bemi 99_2	Fondaparinux
A 39,85%	A 75,05%	A 56,70%	A 51,98%	A 50,99%
B 46,12%	B 69,83%	B 57,24%	B 37,08%	B 49,55%
C 51,02%	C 72,56%	C 47,41%	C 68,21%	--
D 43,74%	D 69,83%	D 51,82%	D 62,12%	--%
Média: 45,18%	Média:	Média:	Média:	Média:

Neste ensaio foi realizado um estudo da percentagem de cura: conforme se observa, os ratos, num processo de estudo de 9 dias, apresentam uma percentagem de cura de aproximadamente 50%,

5 i.e., em 9 dias a ferida reduziu para metade. No entanto, conforme observado nos exemplos anteriores, quando da administração de uma composição de oligossacarídeos com uma percentagem mais elevada de monossacarídeos:

a) N-sulfo-D-glucosamina: 25-50%

10 b) Ácido D-glucurónico: 3-25%

em que a percentagem da unidade de dissacarídeo do ácido D-glucurónico ligada à N-sulfo-3-sulfo-D-glucosamina não é superior a 20%, observando-se que a cicatrização aumenta para aproximadamente 70%, e mesmo mais se a dose for superior (maior 15 quantidade em relação ao total de monossacarídeos).

Em ratos não-diabéticos, a cicatrização é semelhante à dos ratos diabetizados. Por outras palavras, não se observa qualquer diferença entre a cicatrização dos animais de controlo diabéticos e não-diabéticos.

20 Quando da administração de fondaparinux, a percentagem de cura manteve-se igual, i.e., não houve qualquer evolução comparativamente aos animais de controlo diabéticos, pelo que se conclui que este produto não favorece realmente a cura das úlceras.

25 Quando é administrada a heparina de baixo peso molecular Bemi\_99\_2, a resposta é praticamente a mesma que a do respetivo controlo diabético, pelo que se conclui que este produto não favorece realmente a cicatrização das úlceras, devido ao facto de ter alterado os monossacarídeos responsáveis pela 30 cicatrização das úlceras.

No caso da administração de bemiparina não-diabética (217 U.I./rato), i.e., os ratos do Grupo 1, observa-se que a cicatrização é substancialmente reduzida em 71,82%, comparativamente ao respetivo controlo não-diabético, pelo que 5 se conclui que, no caso das úlceras crónicas de doentes não-diabéticos (como as úlceras de pressão), com a administração de uma composição à base de oligossacarídeos com uma mais elevada percentagem de monossacarídeos:

a) N-sulfo-D-glucosamina: 25-50%

10 b) Ácido D-glucurónico: 3-25%

em que a percentagem da unidade de dissacarídeo do ácido D-glucurónico ligada à N-sulfo-3-sulfo-D-glucosamina não é superior a 20%, se observa que a cicatrização é de aproximadamente 70%.

15 Como conclusões gerais qualitativas dos estudos, dá-se ênfase ao facto de o processo de cicatrização dos ratos do Grupo 1 ser macroscopicamente muito melhor, dado que o fecho da úlcera teve uma qualidade mais elevada na granulação ou na regeneração do tecido dérmico com menos conteúdo fibroso do que 20 nos restantes grupos.

#### ESTUDO EM RATOS WISTAR POR VIA ORAL

O objetivo deste estudo consiste em avaliar a atividade cicatrizante dos produtos estudados: fondaparinux sódico e bemiparina, após a respetiva administração por via oral no 25 modelo de ferida de rato diabético.

Ambos os tratamentos foram administrados por via oral, num volume de administração de 10 ml/kg. No caso de fondaparinux, foi administrada uma dose de 10mg/kg, e no caso de bemiparina, foram administrados 100 mg/kg.

30 O grupo de controlo recebeu apenas o veículo utilizado na preparação do produto estudado. O veículo para a reparação do produto estudado é uma solução a 1,5% (w/v) de bicarbonato em água para injetáveis. Verificou-se que o pH das formulações preparadas era superior a 8,00.

35 Diabetização de ratos Wistar

No início do estudo foi induzida *Diabetes mellitus* em todos os animais. Para esse fim, foi-lhes aplicada uma única injeção intraperitoneal de estreptoziotocina (60mg/kg, 10ml/kg). Depois de 72 horas, o estabelecimento da diabetes foi verificado pela 5 análise dos níveis de glicose no sangue. Para esse fim, os animais foram anestesiados com isoflurano e extraíram-se 0,8 ml de sangue do plexo retro-orbicular. Os animais tinham de ter níveis de glicose superiores a 15 mmol/l. Uma semana após a indução da diabetes, foi feita a ferida.

10 Os animais foram anestesiados (ketamina + xilazina, 90 + 10 mg/kg, i.m.). Foram-lhes rapadas as costas, que foram limpas com desinfetante (povidona-iodina) e a área onde a ferida iria ser feita foi marcada com um molde, a fim de homogeneizar a respetiva posição em todos os animais.

15 A ferida foi feita por incisão circular com um diâmetro de aproximadamente 1,5cm, e a pele da região dorsal média foi removida. Após a intervenção, administrhou-se 1 ml de soro fisiológico por animal, por via intraperitoneal. Durante os 7 dias após a intervenção, foi assegurada a analgesia 20 (paracetamol, 1 mg/ml), através da água de beber.

No dia após ter sido feita a ferida e durante um total de 14 dias, os tratamentos foram administrados aos animais. Foi feito o respetivo *follow-up*, sendo avaliada macroscopicamente a evolução das feridas, duas vezes por semana, por fotografia 25 digital da ferida. O peso corporal dos animais foi também registado duas vezes por semana.

No dia após a última administração, os animais foram sacrificados com uma overdose de anestesia (pentobarbital sódico). Extraiu-se a área onde tinha sido feita a ferida. A 30 metade da frente foi congelada em nitrogénio líquido e guardada num congelador (-80 ± 5°C) e a metade de trás foi guardada em formol para tratamento histológico posterior.

#### Medição do grau de cicatrização

A área da ferida foi calculada como a percentagem de 35 redução da mesma, para avaliar o respetivo grau de cura, através

da fórmula estandardizada:

$$\% \text{ cura} = \frac{(A_{\text{baseline}} - A_{\text{tempo}})}{(A_{\text{baseline}})} \times 100$$

A medição efetuada imediatamente após a intervenção ou incisão, foi utilizada como a área inicial.

**5 Ratos não-diabetizados**

No dia seguinte, e durante um total de 14 dias, foram administrados aos animais 10mg/kg, por via oral.

Para isso, os animais foram previamente distribuídos de forma homogénea, segundo o seu peso corporal, pelos seguintes 10 grupos de tratamento, com pelo menos 5 animais por grupo:

Tratamento	Dose
Controlo não-diabético	
Ratos tratados fondaparinux	–
sódico	10 mg/kg
Ratos tratados com	100 mg/kg
bemiparina sódica	

No dia a seguir a ser feita a ferida, e por um total de 14 dias, os tratamentos atribuídos foram administrados aos animais.

Foi feito o *follow-up* dos animais e a evolução das feridas 15 avaliada macroscopicamente, duas vezes por semana, por fotografia digital da ferida. O peso corporal dos animais foi também registado duas vezes por semana.

Medição da área da ferida.

Os valores correspondentes à área da ferida não foram 20 significativos. Neste caso, os ratos tratados com bemiparina sódica reduziram a área de ulceração mais ou menos na mesma medida que os animais de controlo.

Avaliação histopatológica.

Os animais foram sacrificados no dia do estudo e a área de 25 pele onde a ferida foi provocada foi guardada em formol para uma avaliação histopatológica (coloração com hematoxilina-eosina).

A cada uma delas foi atribuída uma classificação

histológica, na gama de grau I até grau V, em que I significa a ferida não curada e V significa a ferida totalmente epitelizada. A classificação baseia-se no grau de invasão celular, na formação de tecido de granulação, na vascularização e epitelização.

As classificações histopatológicas obtidas para os diferentes grupos estão indicadas na seguinte tabela:

Tratamento	Pontuaç	Grau
Controlo não-diabético	10,0	II
Animal diabético tratado com	9,5	II
Animal diabético tratado com	9,0	II

Todas as amostras pertencentes aos animais sacrificados 15 dias após o início do tratamento desenvolveram atividade 10 cicatrizante, com clara presença de tecido de granulação, neovascularização e reepitelização mais ou menos total da 15 ulceração induzida na pele.

Neste caso, todos os animais apresentam um grau mais ou 15 menos idêntico de cicatrização média; no entanto, no grupo de controlo e no grupo tratado com fondaparinux, observa-se que 20 existe uma elevada variabilidade nos dados com que a média é calculada. De qualquer modo, os 5 animais do grupo tratados com bemiparina sódica obtiveram um valor histológico de 9,0, em que se observa que o grau de cicatrização é surpreendentemente homogéneo.

Além disso, observa-se um processo de formação de crosta 25 mais pronunciado no caso dos grupos tratados com Bemiparina do que nos animais tratados com fondaparinux. Neste sentido, há que sublinhar que a formação de crosta é essencial no processo de cicatrização de feridas, já que preenche o objetivo de limitar a perda de água transdérmica e de funcionar como uma barreira contra as bactérias e os patógenos exteriores, 30 prevenindo a infecção da ferida.

Neste exemplo, os ratos nos quais se formou crosta nos dias 30 anteriores, demonstram, na análise histopatológica da cicatriz, que o padrão da derme está mais próximo da normalidade, comparativamente às feridas dos animais nos quais não se formou

crosta, ou em que esta é menor, apesar do facto de, após a queda da crosta, a área de cicatrização ser maior e de, por conseguinte, a medição não ser conclusiva comparativamente aos animais nos quais não houve formação de crosta. Por conseguinte, 5 a formação de crosta é um bom indicador do processo natural de cicatrização, o qual, neste caso particular, apenas é observado macroscopicamente no grupo tratado com bemiparina.

Estudo da relação da atividade inibidora do fator Xa do glicosaminoglicano e do seu

10 poder de cicatrização por via oral no rato diabético

No dia seguinte, e por um total de 14 dias, foram administrados aos animais 10 ml/kg, por via oral.

Para isso, os animais foram previamente distribuídos de forma homogénea, em função do peso do corpo, nos seguintes 15 grupos de tratamento:

Tratamento	Dose
Controlo diabético	
Rato tratado com	-
fondaparinux sódico	10 mg/kg
Rato tratado com bemiparina	100 mg/kg
sódica	

No dia após ser feita a ferida e por um total de 14 dias, foram administrados os tratamentos aos animais.

Foi feito o *follow-up* dos animais e a evolução das feridas avaliada macroscopicamente duas vezes por semana, por fotografia digital da ferida. O peso corporal dos animais também foi 20 registado duas vezes por semana.

Medição da área da ferida.

A Figura 11 mostra a evolução dos ratos de controlo diabetizados, relativamente aos ratos diabetizados tratados com 25 bemiparina sódica e fondaparinux. Este gráfico mostra como os ratos tratados com bemiparina cicatrizam muito melhor do que os tratados com fondaparinux. Em relação às áreas das úlceras, quando todos os produtos são comparados, é observado de que modo

os glicosaminoglicanos que apresentam uma maior percentagem de monossacarídeos da região regular têm um efeito benéfico sobre a cicatrização das feridas.

Avaliação histopatológica.

5 Os animais foram sacrificados no dia 15 do estudo e a área da pele onde a ferida foi causada foi guardada em formol, para avaliação histopatológica (coloração de hematoxilina-eosina).

A cada secção foi atribuída uma classificação histológica, na gama de grau I até grau V, em que I significa a ferida não 10 curada e V significa a ferida totalmente epitelizada. A classificação baseia-se no grau de invasão celular, na formação de tecido de granulação, na vascularização e epitelização.

Descrição da Classificação por Graus

Grau	Classificação	Descrição
I	1-3	Acumulação celular nula a mínima, ausência de tecido de granulação ou desenvolvimento epitelial.
II	4-6	Tecido de granulação fino e imaturo, dominado por células inflamatórias, mas com poucos fibroblastos, capilares ou deposição de colagénio; migração epitelial mínima.
III	7-9	Tecido de granulação moderadamente espesso. Pode variar desde ser dominado por células inflamatórias até maior presença de fibroblastos e deposição de colagénio, extensa neovascularização, migração epitelial mínima a moderada.
IV	10-12	Tecido de granulação vascular espesso, dominado por fibroblastos e extensa deposição de colagénio, o epitélio cobre parcial ou completamente a ferida.
V	13-15	Área correspondente à ferida totalmente epitelizada, sem ter mais ou menos vestígios da ferida.

A classificação histopatológica obtida para os diferentes grupos está indicada na seguinte tabela:

Tratamento	Classificação	Grau
Controlo diabético	10,0	II
Animal diabético tratado com	9,5	II
Animal diabético tratado com	11,3	IV

Todas as amostras pertencentes aos animais sacrificados 15 dias após o início do tratamento desenvolveram atividade cicatrizante, com clara presença de tecido de granulação, neovascularização e reepitelização total da ulceração dérmica induzida.

No grupo tratado com bemiparina sódica observa-se um tecido de granulação mais desenvolvido, neovascularização intensa, com um mais elevado nível de cicatrização, para além de uma maior homogeneidade nos resultados obtidos em todos os animais. Os animais hiperídicos tratados com bemiparina sódica revelaram níveis de cicatrização que são ainda mais elevados do que os do grupo de controlo normoglicémico.

Estes resultados são suportados pelos dados histológicos após obtenção de um nível mais elevado de cicatrização nos animais diabéticos tratados com bemiparina sódica.

#### ESTUDO DA ÚLCERA DO PÉ DIABÉTICO NO RATINHO DIABÉTICO COM DIABETES INDUZIDA GENETICAMENTE POR VIA SUBCUTÂNEA

##### Exemplo 4:

Ulceração do ratinho C57BL/KS BKS.Cg-m +Lepr<sup>db</sup> /+Lepr<sup>db</sup>/J diabético, medição do grau de cicatrização e avaliação histológica.

O ratinho C57BL/KsJ-db/db diabético foi utilizado como modelo da diabetes de tipo II, como tendo uma cicatrização alterada, ao contrário do ratinho com diabetes induzida pela estreptozotocina utilizada nos exemplos anteriores, que é o modelo da diabetes de tipo I (Michaels, J., et al, *db/db mice exhibit severe wound-healing impairments compared with other murine diabetic strains in a silicone-splinted excisional wound model*. Wound Repair Regen, 2007. 15(5): p. 665-70). O ratinho com diabetes genética desenvolve resistência à insulina e à

hiperglicemia, à semelhança do que se observa na diabetes do adulto. No total das feridas de espessura feitas no dorso dos animais a formação do tecido de granulação e o fecho das feridas demora mais tempo nestes animais do que nas mesmas 5 feridas causadas em animais não-diabéticos.

No primeiro dia do estudo, os animais foram anestesiados (ketamina + xilazina, 100 + 10 mg/kg, i.m.). O dorso dos animais foi rapado, a área limpa com disinfetante e a localização da ferida marcada com um molde, a fim de homogeneizar a respetiva 10 posição em todos os animais.

A ferida foi feita por incisão circular com um diâmetro de aproximadamente 1,5cm, e a pele da região dorsal média removida. Foi depois aplicado um penso semipermeável sobre a ferida. Após a intervenção, administrhou-se 1 ml de soro 15 fisiológico por animal, por via intraperitoneal.

Durante os 7 dias após a intervenção, foi assegurada a analgesia (paracetamol, 1 mg/ml), através da água de beber.

A área da ferida foi calculada como a percentagem de redução da mesma para avaliar o seu grau de cura, por meio da 20 fórmula estandardizada:

$$\% \text{ cura} = \frac{(A_{\text{baseline}} - A_{\text{tempo}})}{(A_{\text{baseline}})} \times 100$$

A medição efetuada imediatamente após a intervenção ou incisão foi utilizada como a área da baseline. No dia seguinte e ao longo de um total de 14 dias foram administrados os 25 tratamentos atribuídos.

Estudo da relação da atividade inibidora do fator Xa do glicosaminoglicano e do seu poder cicatrizante por via subcutânea.

No dia seguinte e durante um total de 14 dias foram 30 administrados 10ml/kg, por via subcutânea, no dorso dos animais, evitando a área da ferida.

Para esse fim, os animais foram previamente distribuídos de forma homogénea, segundo o seu peso corporal, nos seguintes

grupos de tratamento:

Tratamento	Dose
Controlo diabético	-
Animal diabético tratado com fondaparinux sódico	1 mg/kg
Animal diabético tratado com bemiparina sódica	1000 U.I. Xa/kg
Animal diabético tratado com bemiparina sódica	600 U.I. Xa/kg
Animal diabético tratado com BP06408-66/28A	10 mg/kg
Animal diabético tratado com RO-14	1000 U.I. Xa/kg

O *follow-up* dos animais decorreu por um período até 21 dias (tempo médio necessário para a cicatrização das feridas neste modelo animal). A avaliação foi efetuada por fotografia digital da ferida e análise subsequente da imagem.

#### Medição da área da ferida

A Figura 4 mostra a evolução dos ratos do controlo diabético em relação aos ratos tratados com bemiparina sódica. A área da ferida foi representada à direita de cada animal.

A Figura 5 mostra a evolução da percentagem de cura da ferida, ao longo do tempo.

Os animais diabéticos não tratados são os que apresentam o ritmo de cura mais lento, dado que os animais não atingiram os 90% de cura no dia 21, seguindo-se os animais tratados com fondaparinux, que também não atingiram a cura completa, mas apenas 96% no dia 21. Os animais tratados com bemiparina atingiram a cura completa aos 21 dias, com valores de cicatrização de 98% desde o dia 18.

Estes resultados indicam que não existe qualquer relação entre a atividade anti-Xa (determinada pela presença do pentassacarídeo responsável pela ligação à antitrombina III) dos glicosaminoglicanos utilizados e do seu efeito benéfico, já que a bemiparina sódica é o produto com o mais baixo teor de

pentassacarídeo na sua estrutura (só 1,5% do conteúdo total de monossacarídeos corresponde ao ácido D-glucurónico ligado à N-sulfo-3-sulfo-D-glucosamina, característica do pentassacarídeo), mas tem, no entanto tempos de cicatrização 5 mais curtos do que fondaparinux (o pentassacarídeo puro, o ácido D-glucurónico ligado à N-sulfo-3-sulfo-D-glucosamina representa 20% do teor total de monossacarídeos).

Em relação às áreas das úlceras, quando todos os produtos 10 são comparados, observa-se de que modo os glicosaminoglicanos com uma maior percentagem de monossacarídeos da região regular têm um efeito benéfico sobre a cicatrização das feridas. Este 15 facto é observado na Figura 5, onde se demonstra que tanto a heparina não-fracionada como a bemiparina sódica favorecem a cicatrização, obtendo uma percentagem superior a 80% após o dia 11 da administração.

#### Avaliação macroscópica

Nos dados extraídos, observam-se diferenças macroscópicas consideráveis entre os grupos da heparina cárlica não-fracionada, RO-14 e Bemiparina, observando-se um comportamento 20 diferente a partir do quinto dia de observação. Deste modo, pode ver-se como o grupo tratado com bemiparina apresenta uma clara diferença na qualidade da cicatriz após o quinto dia de tratamento, observando-se na ferida uma camada coberta com tecido de granulação, facto que não ocorre no grupo de controlo 25 e que ocorre apenas parcialmente no grupo tratado com fondaparinux.

Este facto diferenciador marca o ritmo e a qualidade do processo de cicatrização (conforme observado na Figura 5), já que o tecido de granulação é responsável pela regeneração e 30 cicatrização do tecido celular, além de proteger o animal de eventuais infecções.

Além disso, no grupo de controlo, observa-se que não é produzido tecido de granulação (a base da ferida é clara e brilhante) e que, no grupo tratado com Fondaparinux apenas se vê 35 tecido de granulação nos rebordos das feridas. Por conseguinte,

o fecho das feridas nos ratinhos diabéticos de controlo e nos ratinhos tratados com fondaparinux ocorre pela contração dos rebordos das feridas, processo que é mais lento do que o que decorre com a formação de tecido de granulação.

- 5 Adicionalmente, a ferida do grupo tratado com Bemiparina fecha no dia 18, enquanto no grupo de controlo a ferida se mantém aberta, com risco subsequente de infecções e complicações.

#### Avaliação histopatológica

10 Os animais foram sacrificados no dia 21 do estudo e as áreas de pele onde as feridas foram provocadas foram conservadas em formol, para uma avaliação histopatológica posterior (coloração com hematoxilina-eosina).

15 A cada secção foi dada uma classificação histológica, na gama de I a V, em que I significa a ferida não curada e V significa a ferida completamente epitelizada. A classificação baseia-se no grau de invasão celular, na formação de tecido de granulação, na vascularização e na epitelização.

Grau	Classificação	Descrição
I	1-3	Acumulação celular nula a mínima, ausência de tecido de granulação ou de desenvolvimento epitelial.
II	4-6	Tecido de granulação fino e imaturo, dominado por células inflamatórias, mas com poucos fibroblastos, capilares ou deposição de colagénio; migração epitelial mínima.
III	7-9	Tecido de granulação moderadamente espesso. Pode variar pelo facto de ser dominado por células inflamatórias, até uma maior presença de fibroblastos e deposição de colagénio, extensa neovascularização e migração epitelial mínima a moderada.
IV	10-12	Tecido de granulação espesso e

vascular, dominado por fibroblastos e extensa deposição de colagénio, em que o epitélio cobre parcial ou totalmente a ferida.

V	13-15	Área correspondente à ferida totalmente epitelizada, sem ter, mais ou menos, vestígios da ferida.
---	-------	---

As pontuações histopatológicas obtidas para os diferentes grupos estão indicadas na Tabela 7.

Tabela 7

Tratamento	Grau
Controlo diabético control	6,7
Animal diabético tratado com	7,2
Animal diabético tratado com	11,5
Animal diabético tratado com	8,0
Animal diabético tratado com	9,0

O estudo morfológico das secções correspondentes às amostras

5 de pele demonstrou a evolução normal do processo de reparação cicatricial em todos os grupos. Nos grupos tratados, o tecido de granulação está totalmente formado, obtendo a bemiparina sódica a melhor pontuação, já que, neste caso, se observa uma estrutura celular completamente nova, pela restituição à 10 situação original (ver Figura 6 painel C), em que são observados os seguintes resultados:

A. Reepitelização total. Infiltrado pouco inflamatório na derme. Presença moderada de fibroblastos na derme. Neovascularização moderada na derme.

15 B. Reepitelização total. Infiltrado inflamatório moderado, neutrófilos polimorfonucleares na derme. Presença moderada de fibroblastos na derme. Neovascularização moderada na derme.

C. Estrutura celular totalmente regenerada.

Dos resultados obtidos pela determinação da área da ferida 20 e da avaliação histopatológica, pode concluir-se que o melhor dos produtos ensaiados é a bemiparina, porque é a que apresenta o tempo de cicatrização mais curto e a mais elevada qualidade do tecido. Um outro produto que parece funcionar bastante bem é o

produto experimental BP06408-66/28-A. Por conseguinte, fica uma vez mais demonstrado que uma maior atividade inibidora do fator Xa não está relacionada com um melhor efeito sobre a cicatrização.

5        Estudo da relação da atividade inibidora do fator Xa do glicosaminoglicano e do seu poder de cicatrização por via tópica.

Neste caso case, as formulações tópicas foram preparadas para administração direta nas úlceras, sendo os veículos destas 10 formulações formados por Carbopol, Phenonip®, Span 80, Glicerol e água.

15       A ulceração e medição da área foram realizadas conforme detalhado nos ensaios de administração subcutânea. No dia a seguir à incisão, e ao longo de um total de 14 dias, os tratamentos atribuídos, 0,15 ml/animal, por via tópica, no dorso do animal, acima da ferida, foram administrados aos animais.

Para esse fim, os animais foram previamente distribuídos de forma homogénea, segundo o peso corporal, pelos seguintes grupos de tratamento:

Tratamento	Dose
Controlo diabético	-
Animal diabético tratado com bemiparina	1000 U.I./kg
Animal diabético tratado com fondaparinux	1000 U.I./kg
Animal diabético tratado com heparina cálcica	1000 U.I./kg

20       O follow-up dos animais decorreu por um período até 14 dias (tempo médio necessário para a cicatrização das feridas neste modelo animal). A avaliação decorreu por meio de fotografia digital da ferida e análise subsequente da imagem. A Figura 7 mostra os valores globais da evolução da percentagem de redução 25 da ferida nos grupos de tratamento, comparativamente com o grupo de controlo. Tal como observado no gráfico, a ferida melhor foi

observada com bemiparina, tendo sido obtido no final do tratamento um valor de redução da área ferida superior a 60%.

#### Avaliação macroscópica

Tal como observado macroscopicamente, observaram-se 5 diferenças consideráveis em todos os grupos (de controlo, bemiparina, fondaparinux e heparina cárnea não-fracionada (NFH)), distinguindo-se um comportamento diferente após o sétimo dia de observação.

Enquanto no grupo de controlo se observa, ao sétimo dia, 10 que não é produzido qualquer tecido de granulação (a base da ferida apresenta-se clara e brilhante), em contrapartida pode ver-se como os grupos tratados apresentam uma clara diferença na qualidade da cicatriz, no mesmo dia de tratamento, observando-se na ferida uma camada coberta com tecido de granulação. Este 15 facto diferenciador marca o ritmo do processo e a qualidade da cicatrização, uma vez que o tecido de granulação é responsável pela regeneração e a cicatrização do tecido, para além de proteger o animal de eventuais infeções, dado ser muito rico em fibroblastos, vãos capilares e colagénio.

#### Avaliação histopatológica.

Os animais foram sacrificados no dia após a última administração (dia 15) e extraiu-se a área onde tinha sido feita a ferida. A porção posterior da área contendo a ferida foi guardada em formol para processamento histológico posterior 25 (coloração com hematoxilina-eosina).

Os resultados basearam-se na classificação atribuída pelo método de Greenhalgh *et al.* (1990). A cada bloco foi atribuída uma classificação histológica, de 1 a 15, em que 1 significa uma ferida não curada e 15 significa uma ferida totalmente epitelizada. A classificação baseia-se no grau de invasão 30 celular, na formação de tecido de granulação, na vascularização e na epitelização.

As classificações histopatológicas obtidas para os diferentes grupos estão indicadas na tabela abaixo:

Tratamento	Classifica	Grau
Controlo diabético	6,7	III
Animal diabético tratado com	8,7	III
Animal diabético tratado com	8,6	III
Animal diabético tratado com	9,4	IV

Os três grupos tratados obtiveram geralmente uma melhor classificação histológica do que o grupo de controlo, pelo menos dois pontos acima da última. Apesar do facto de a cicatrização em todos os grupos (de controlo e de tratamento) se caracterizar

5 pela presença de tecido de granulação moderadamente espesso, a diferença entre eles reside na maior presença de células inflamatórias, conforme acontece no caso do grupo de controlo, comparativamente à maior presença de fibroblastos e à deposição de fibras de colagénio, como é o caso dos grupos tratados. Isto  
10 indica que, no caso do grupo de controlo, o processo de cicatrização está numa fase inicial, o que explica o ritmo mais lento de cura demonstrado nos estudos de redução da área da ferida. No âmbito dos tratamentos, as amostras de pele pertencentes aos grupos tratados com bemiparina e NFH  
15 apresentaram um ritmo de reparação cicatricial um pouco mais rápido, com tecido de granulação mais desenvolvido, maior presença de fibroblastos e neovascularização dérmica.

O grupo tratado com NFH é diferente em termos de classificação histológica, estando incluído no grau IV, o que  
20 indica uma qualidade de cura mais elevada comparativamente aos outros grupos. O tecido de granulação formado é mais espesso, predominando os fibroblastos, com extensa deposição de fibra de colagénio. O epitélio cobre parcial ou totalmente a ferida.

Dos resultados obtidos, tanto pela determinação da área da  
25 ferida, como pela avaliação histopatológica, pode concluir-se que os melhores produtos ensaiados são bemiparina e NFH. A bemiparina tem uma taxa de cura superior, enquanto no caso do NFH a cicatrização é mais lenta, mas a qualidade do tecido formado é superior.

30 Exemplo 5:

Ulceração do ratinho C57BL/KS.Cg-m Leprdb +/+ m, medição do

grau de cicatrização e avaliação histológica. Estudo do efeito de cura de um NFH e de uma LMWH em animais não-diabéticos. Determinação da potencial aplicação de heparinas no tratamento de úlceras crónicas em doentes não-diabéticos, por via oral, 5 subcutânea e tópica.

O rato C57BL/KS.Cg-m Lepr<sup>db</sup> +/+ é o análogo não-diabético do rato utilizado no exemplo anterior.

No primeiro dia do ensaio, os animais foram anestesiados (ketamina + xilazina, 100 + 10 mg/kg, i.m.). O dorso do animal 10 foi raspado, a área foi limpa com desinfetante e a localização da ferida marcada com um molde, para que a respetiva posição fosse a mesma em todos os animais.

A ferida foi feita por incisão circular com um diâmetro de aproximadamente 1,5cm, e a pele da região dorsal média foi 15 removida. Foi depois aplicado um penso semipermeável sobre a ferida. Após a intervenção, administrhou-se 1 ml de soro fisiológico por animal, por via intraperitoneal.

Durante os 7 dias após a intervenção, foram administrados analgésicos (paracetamol, 1 mg/ml), através da água de beber.

20 A área da ferida foi calculada como a percentagem de redução da mesma para avaliar o seu grau de cura, por meio da fórmula estandardizada:

$$\% \text{ cura} = \frac{(A_{\text{baseline}} - A_{\text{tempo}})}{(A_{\text{baseline}})} \times 100$$

A medição efetuada imediatamente após a intervenção ou 25 incisão foi utilizada como a área da baseline. No dia seguinte e ao longo de um total de 14 dias foram administrados aos animais os tratamentos atribuídos.

ESTUDO DA RELAÇÃO DA ATIVIDADE INIBIDORA DO FATOR XA DO GLICOSAMINOGLICANO E DO SEU PODER DE CICATRIZAÇÃO POR VIA 30 SUBCUTÂNEA.

No dia seguinte, e durante um total de 14 dias, foram administrados aos animais 10ml/kg, por via subcutânea, no dorso de cada animal, evitando a área da ferida.

Para esse fim, os animais foram previamente distribuídos de forma homogénea, consoante o seu peso corporal, pelos seguintes grupos de tratamento:

Tratamento	Dose
Controlo não-diabético	-
Animal diabético tratado com bemiparina	1000 U.I. Xa/kg
Na	
Animal diabético tratado com fondaparinux Ca	600 U.I. Xa/kg
Animal diabético tratado com heparina	10 mg/kg
BP06408-66/28-A	

O *follow-up* dos animais decorreu por um período até 21 dias. A avaliação foi efetuada por fotografia digital da ferida e subsequente análise das imagens.

A Figura 8 mostra a evolução dos ratinhos de controlo não-diabéticos comparativamente aos ratinhos tratados com heparina cálcica. A área da ferida foi representada à direita de cada animal.

A Figura 9 mostra a evolução da percentagem de cicatrização da ferida ao longo do tempo.

Os animais não tratados não-diabéticos atingiram níveis de redução da ferida superiores a 90% após o dia 14. O tratamento com bemiparina sódica não melhora a taxa de cura. No entanto, os animais tratados com heparina cálcica melhoram essa taxa, em relação ao grupo de controlo, atingindo 90% de cura no dia 11.

#### Avaliação macroscópica

Os três grupos de animais apresentam um processo de cura normal, com as feridas apresentando-se saradas no dia 21. No entanto, parece que no grupo de ratinhos tratados com heparina cálcica, o processo se acelerou, uma vez que, no dia 11, a ferida se apresentava seca e fechada e, no dia 21, já se encontrava coberta de pelo.

#### Avaliação histopatológica

Os animais foram sacrificados no dia 21 do estudo e a área

da pele onde a ferida foi causada foi guardada em formol, para avaliação histopatológica (coloração de hematoxilina-eosina).

A cada secção foi atribuída uma classificação histológica, na gama de grau I até grau V, em que I significa a ferida não curada e V significa a ferida completamente epitelizada. A classificação baseia-se no grau de invasão celular, na formação de tecido de granulação, na vascularização e epitelização.

Grau	Pontuação	Descrição
I	1-3	Acumulação celular nula a mínima, ausência de tecido de granulação ou de
II	4-6	Tecido de granulação fino e imaturo, dominado por células inflamatórias, mas com poucos fibroblastos, capilares ou deposição
III	7-9	Tecido de granulação moderadamente espesso. Pode variar pelo facto de ser dominado por células inflamatórias, até uma maior presença de fibroblastos e deposição de
IV	10-12	Tecido de granulação espesso e vascular, dominado por fibroblastos e extensa deposição de colagénio, em que o epitélio
V	13-15	Área correspondente à ferida totalmente epitelizada, sem ter, mais ou menos,

As pontuações histopatológicas obtidas para os diferentes grupos estão indicadas na Tabela 8.

10

Tabela 8

Tratamento	Grau
Controlo não-diabético	11,7
Animal não-diabético tratado com	8
Animal não-diabético tratado com	15
Animal não-diabético tratado com	12,8

15

O estudo morfológico das secções correspondentes às amostras de pele demonstrou a evolução normal do processo de reparação cicatricial em todos os grupos. Em todos os grupos tratados, o tecido de granulação está totalmente formado, obtendo o tratamento com heparina cálcica a melhor pontuação, já que, neste caso, se observa uma estrutura celular completamente

nova, pela restituição à situação original. Além disso, no caso dos animais não-diabéticos, a pontuação obtida com a amostra do produto BP06408-66/28A, em estudo, que mal tem a presença do pentassacarídeo na sua estrutura, é especialmente boa, com uma 5 estrutura celular completa e um muito alto grau de epitelização, o que, uma vez mais, demonstra que não é necessária uma maior atividade inibidora do fator Xa para o tratamento das úlceras crónicas, já que não há qualquer relação com um melhor efeito sobre a cicatrização.

10 A Figura 10 mostra microfotografias das secções das feridas após coloração com hematoxilina-eosina. A. Controlo não-diabético. B. Animal não-diabético tratado com bemiparina sódica. C. Animal não-diabético tratado com heparina cálcica.

Os resultados obtidos foram os seguintes:

15 A. Reepitelização completa. Não se observam alterações.

B. Reepitelização completa. Infiltrado ligeiramente inflamatório, neutrófilos polimorfonucleares na derme. Presença moderada de células multinucleares gigantes na derme. Presença moderada de fibroblastos na derme. Neovascularização moderada na 20 derme.

C. Estrutura celular totalmente regenerada.

Dos resultados obtidos pela determinação da área da ferida e da avaliação histopatológica, pode concluir-se que o tratamento com heparina cálcica tem um efeito benéfico sobre a 25 cura dos animais não-diabéticos, menor tempo de cicatrização e a estrutura celular totalmente regenerada, seguida dos resultados obtidos com o produto BP06408-66/28-A na fase de investigação. Por conseguinte, os glicosaminoglicanos objeto da presente invenção podem ser utilizados para tratar outras úlceras 30 crónicas diferentes das úlceras do pé diabético.

Sem querer ser levado pelos exemplos acima descritos, devido aos resultados obtidos, assim como ao comportamento observado nos animais, acreditamos que é muito provável que a presente invenção funcione para outros polissacarídeos, 35 ramificados ou não ramificados, como os polissulfatos de

pentosano, os betaglucanos, os sulfatos de condroitina, os sulfatos de dermatano, os carraginanos, os alginatos, os arabinoxilanos, os galactomananos e os glucomananos, entre outros.

REIVINDICAÇÕES

1. Uma composição farmacêutica, composta por heparinas de baixo ou muito baixo peso molecular, para utilização no tratamento das úlceras crónicas, **caracterizado por** a semivida da heparina no plasma se situar entre 2,3 e 6,9 horas e a dose diária média da heparina entre 5. 400 e 10.000 U.I./dia.
2. Uma composição farmacêutica para utilização segundo a reivindicação 1, em que a dose diária média é selecionada de forma inversamente proporcional à semivida no plasma.
3. Uma composição farmacêutica para utilização segundo a reivindicação 2 acima, em que, quando a semivida da heparina no plasma se situa entre 6,5 e 6,9, a dose diária média é de cerca de 5.400 U.I./dia.
4. Uma composição farmacêutica para utilização segundo a reivindicação 2 acima, em que, quando a semivida da heparina no plasma se situa entre 4,0 e 4,4, a dose diária média é de cerca de 7.600 U.I./dia.
5. Uma composição farmacêutica para utilização segundo a reivindicação 2 acima, em que, quando a semivida da heparina no plasma é de cerca de 3,0, a dose diária média é de cerca de 10.000 U.I./dia.
6. Uma composição farmacêutica para utilização segundo a reivindicação 2 acima, em que, quando a semivida da heparina no plasma se situa entre 2,3 e 2,8, a dose diária média é de cerca de 10.000 U.I./dia.
7. Uma composição para utilização segundo qualquer das reivindicações 1-6 anteriores, em que a úlcera crónica é uma úlcera do pé diabético.

8. A composição para utilização segundo qualquer das reivindicações 1-6 anteriores, em que a úlcera crónica é uma úlcera de pressão.

5

9. A composição para utilização segundo qualquer das reivindicações 1-8 anteriores, em que a heparina de baixo peso molecular é administrada por via intravenosa.

10 10. A composição para utilização segundo qualquer das reivindicações 1-8 anteriores, em que a heparina de baixo peso molecular é administrada por via subcutânea.

15 11. A composição para utilização segundo qualquer das reivindicações 1-8 anteriores, em que a heparina de baixo peso molecular é administrada por via oral.

20 12. A composição para utilização segundo qualquer das reivindicações 1-8 anteriores, em que a heparina de baixo peso molecular é administrada por via tópica.

13. A utilização de uma composição segundo qualquer das reivindicações 1-12 anteriores no fabrico de um medicamento para o tratamento da úlcera crónica.

25

14. A utilização segundo a reivindicação 13, em que a úlcera crónica é uma úlcera do pé diabético.

30 15. A utilização segundo a reivindicação 13, em que a úlcera crónica é uma úlcera de pressão.

RESUMO

**COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COM GLICOSAMINOGLICANOS E SUA  
UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DAS ÚLCERAS CRÓNICAS**

5        A invenção refere-se a uma composição de glicosaminoglicanos para o tratamento da úlcera do pé diabético. Refere-se mais especificamente a heparinas de baixo peso molecular (HBPM) e heparinas de muito baixo peso molecular (HMBPM), para o tratamento das úlceras crónicas, em especial as úlceras do pé diabético, e mais especificamente para o fabrico de um medicamento destinado ao tratamento das úlceras crónicas, e em especial das úlceras do pé diabético e das úlceras de pressão.

15

20

25

30

35

40

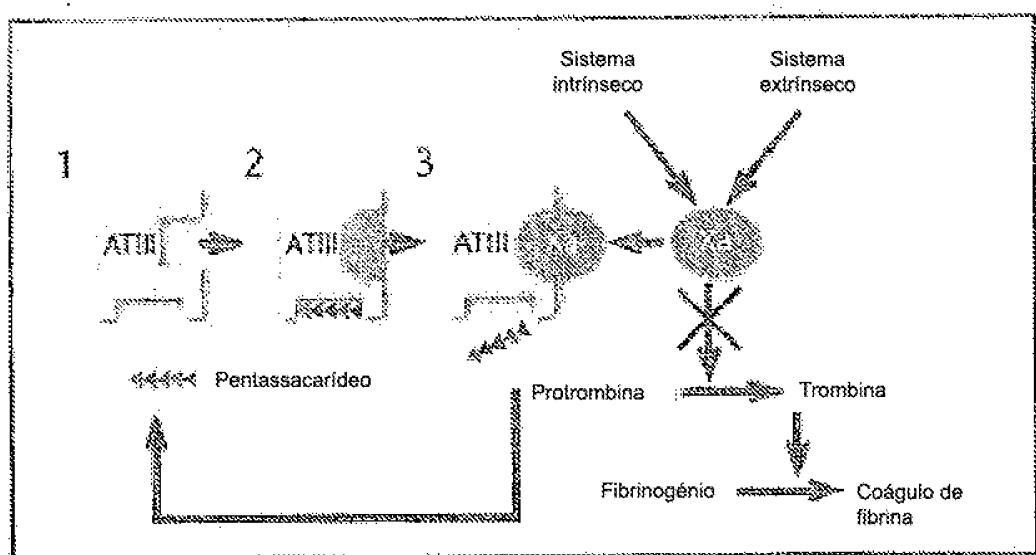
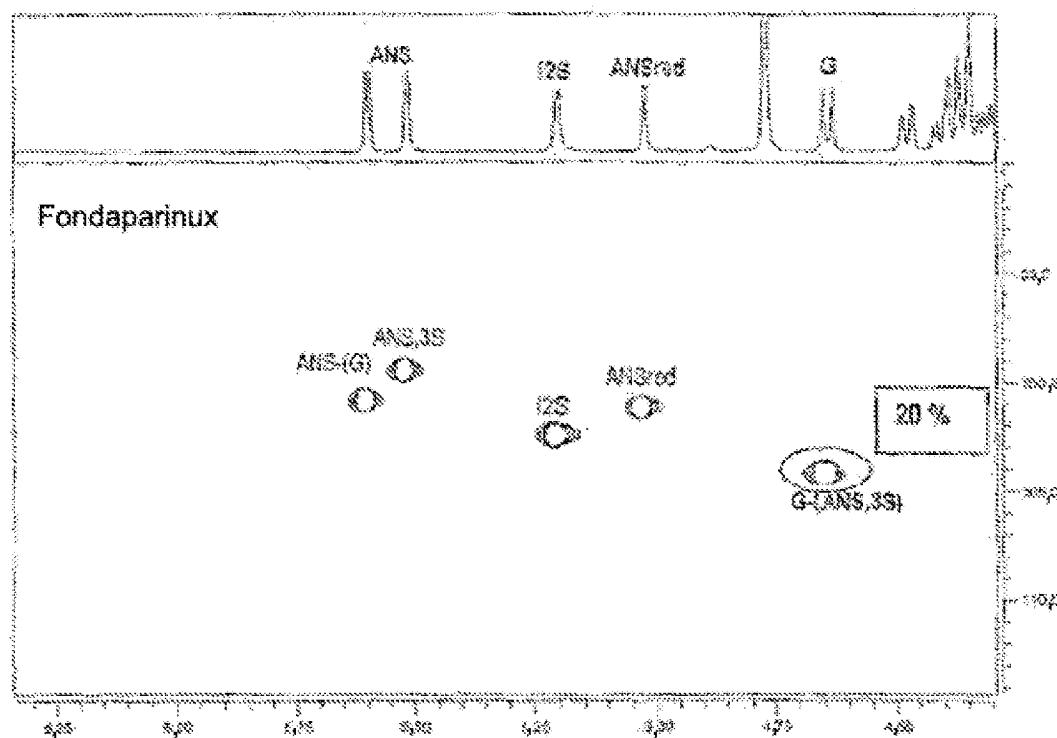
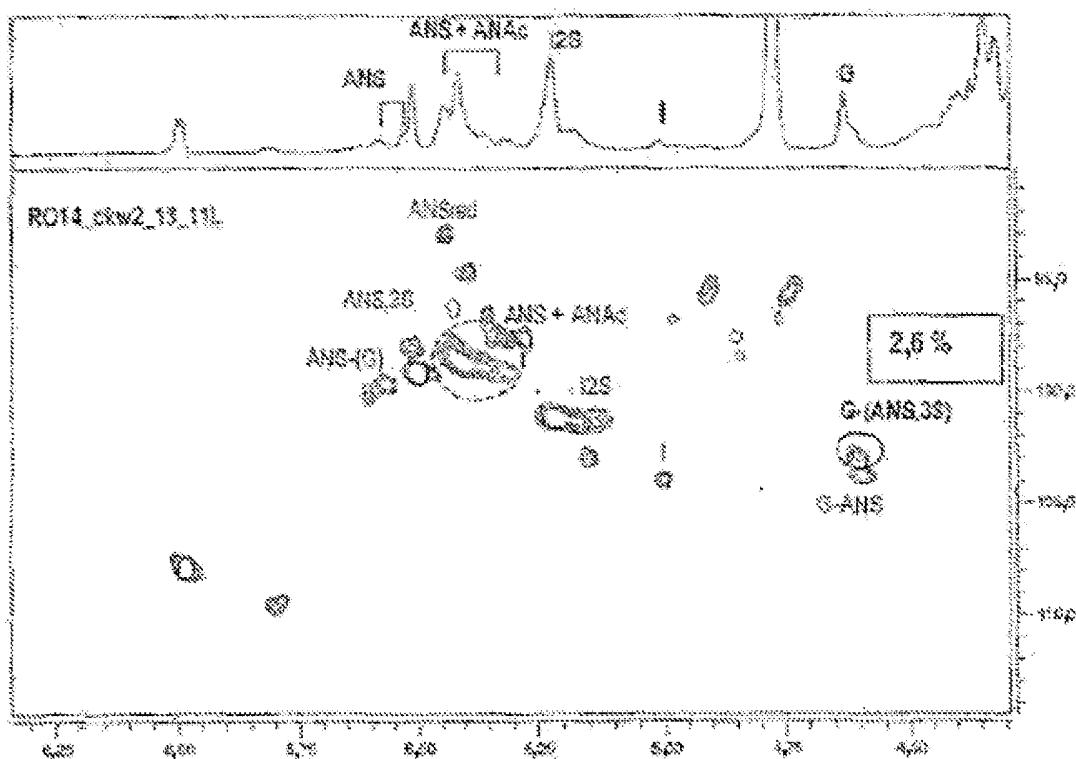
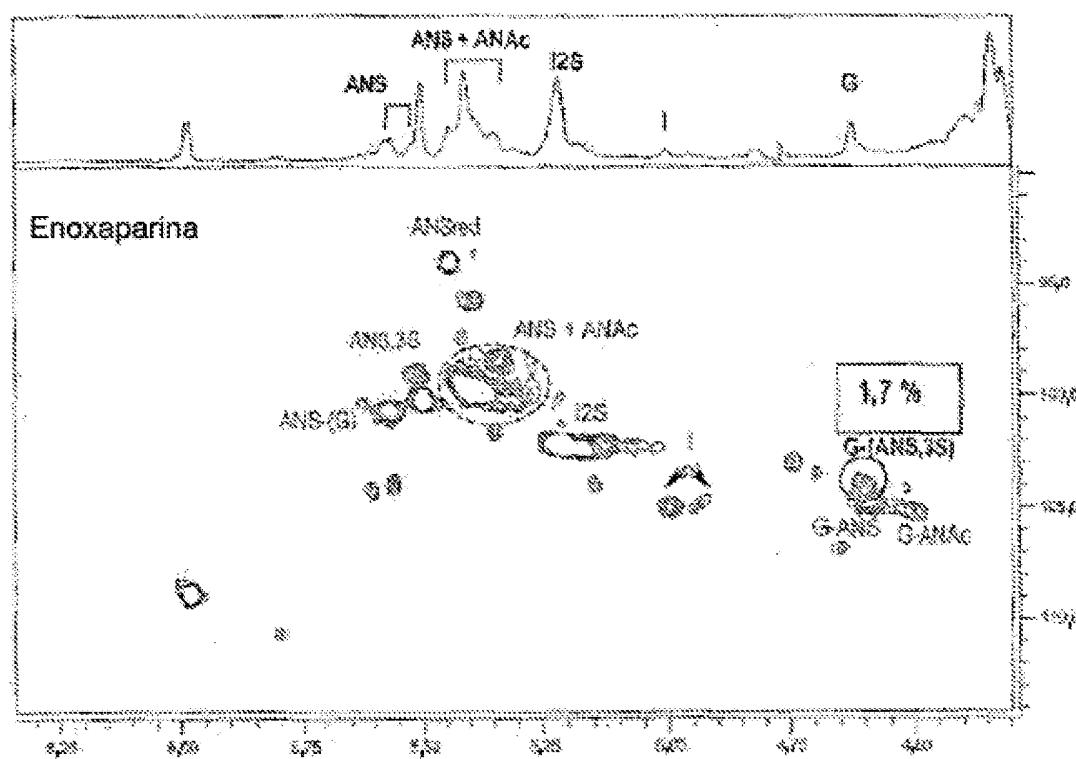


FIGURA 1





**FIGURA 2C**



## FIGURA 2D

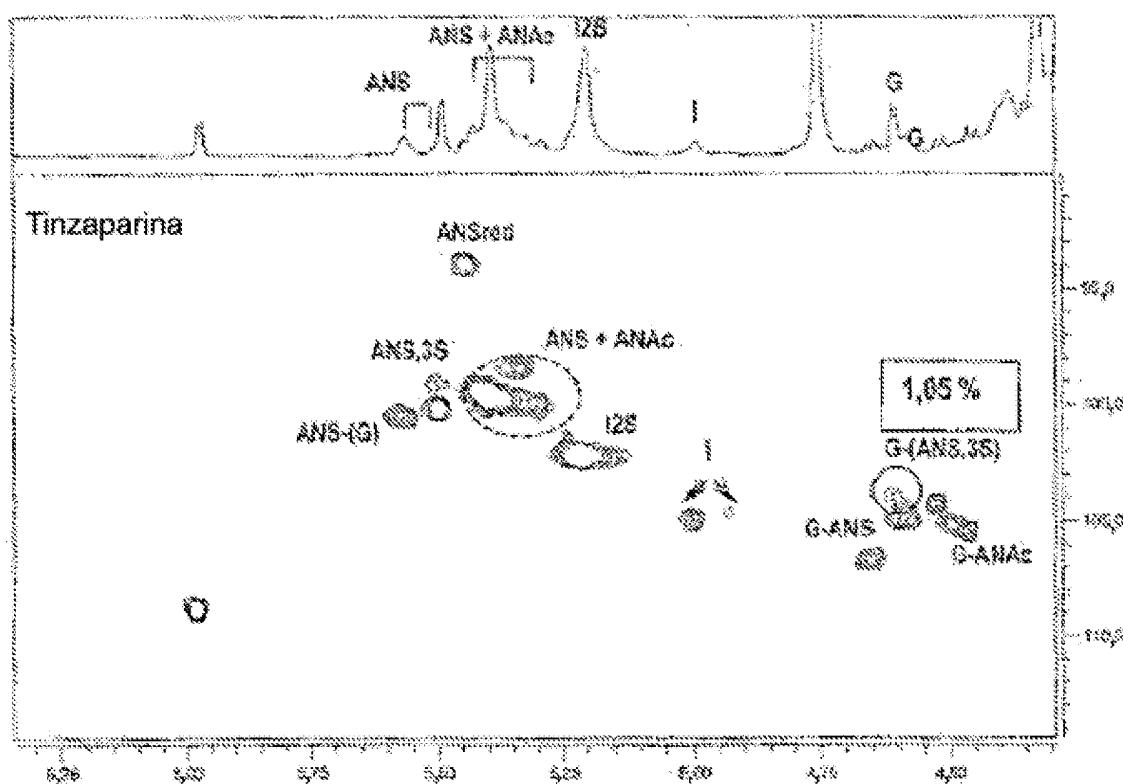


FIGURA 2E

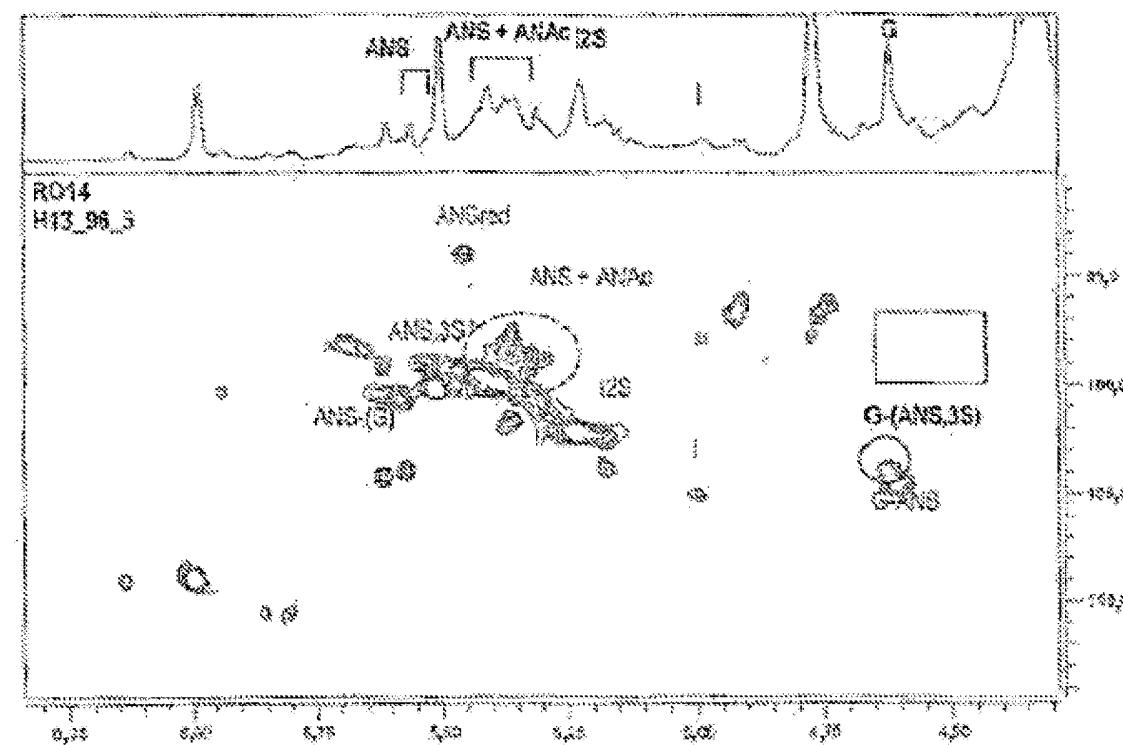
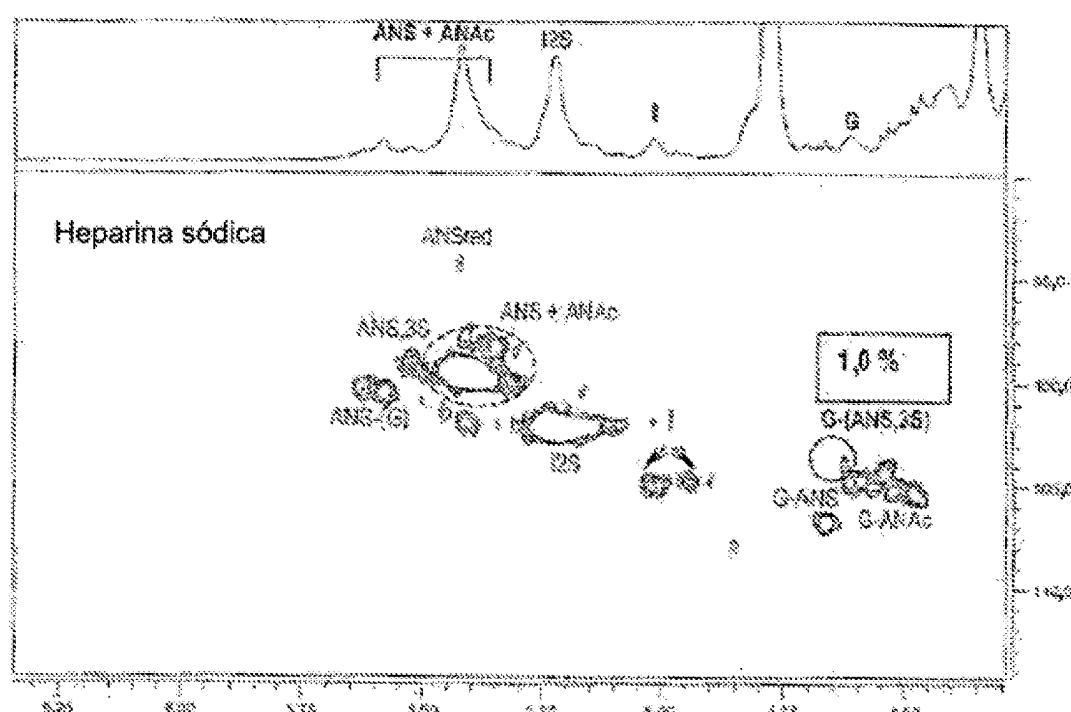
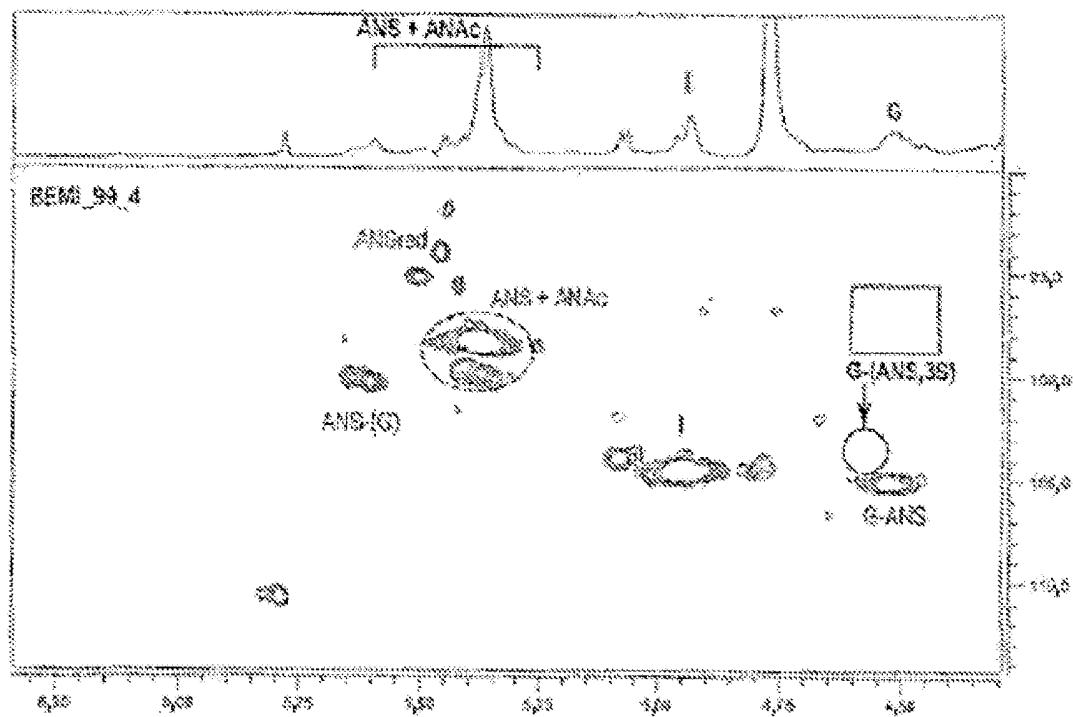
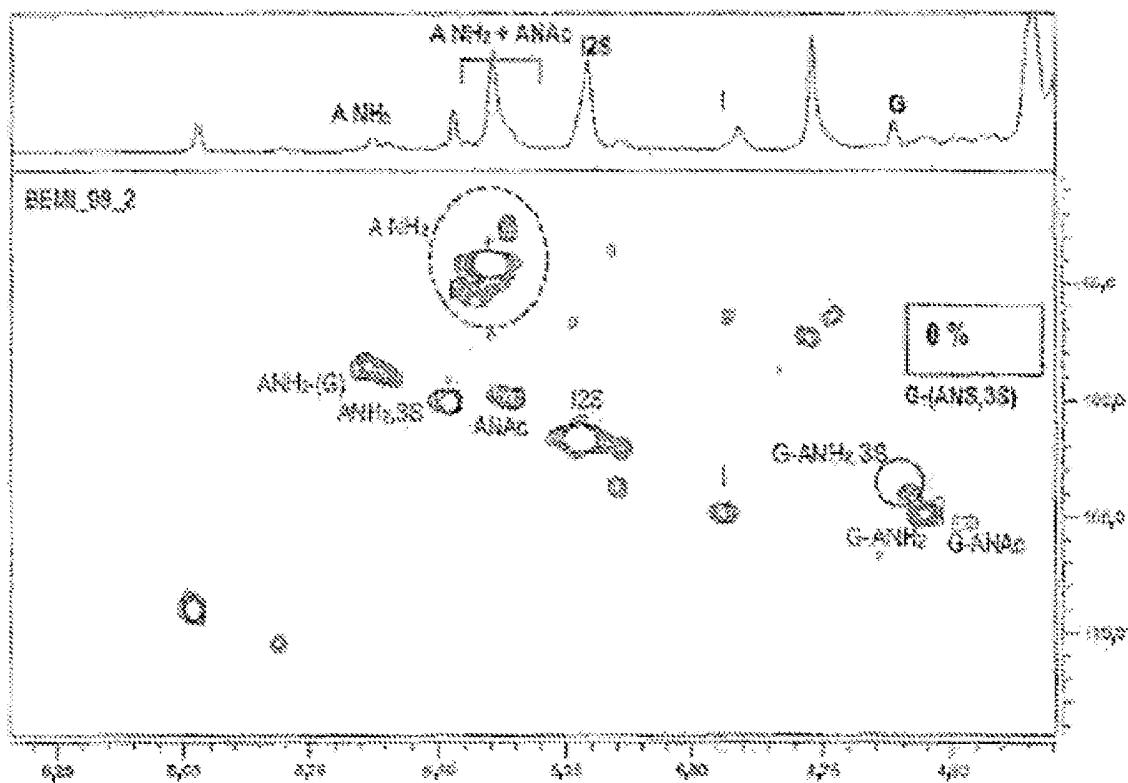
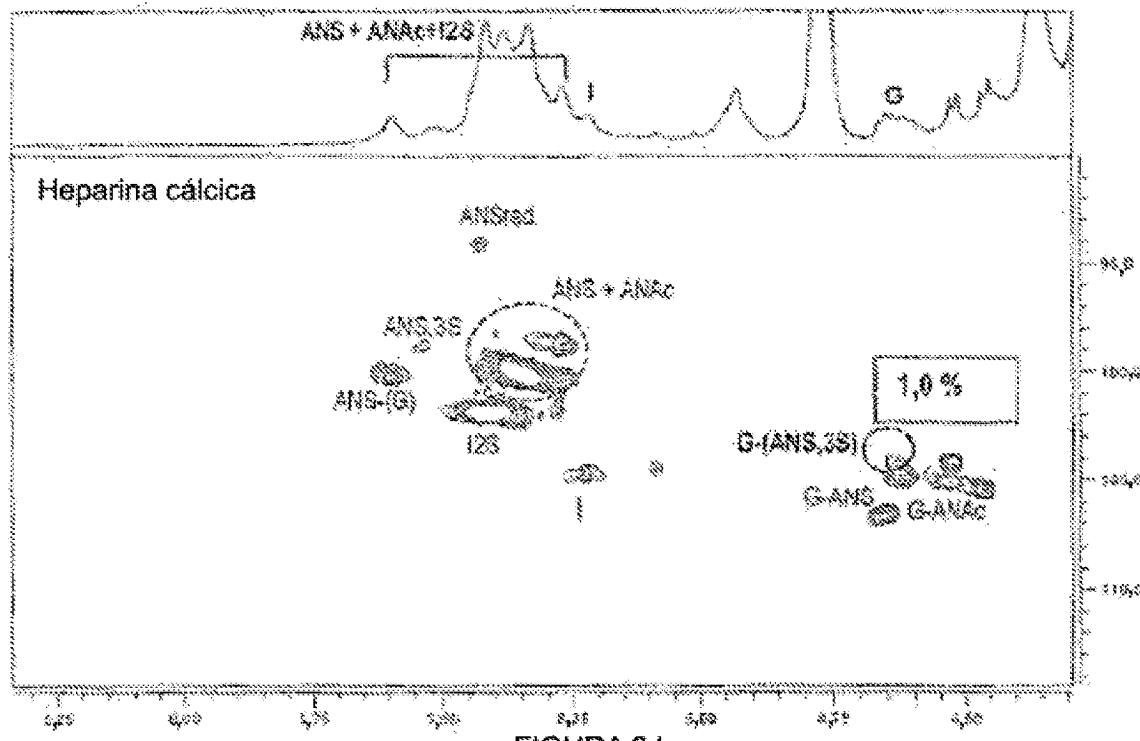


FIGURA 2F

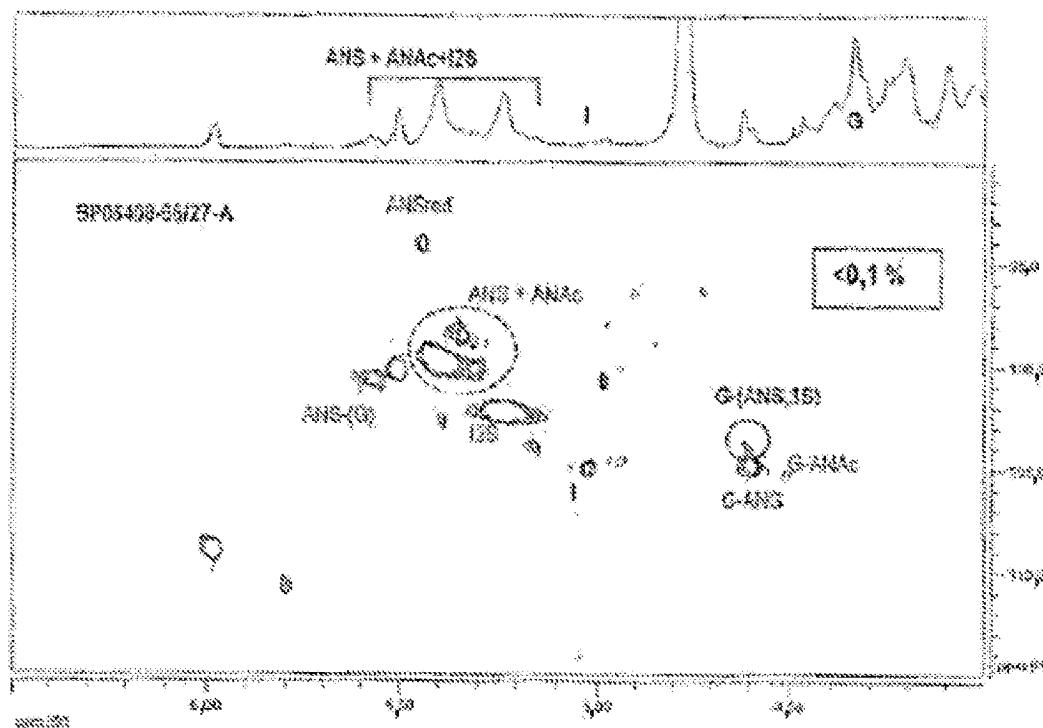




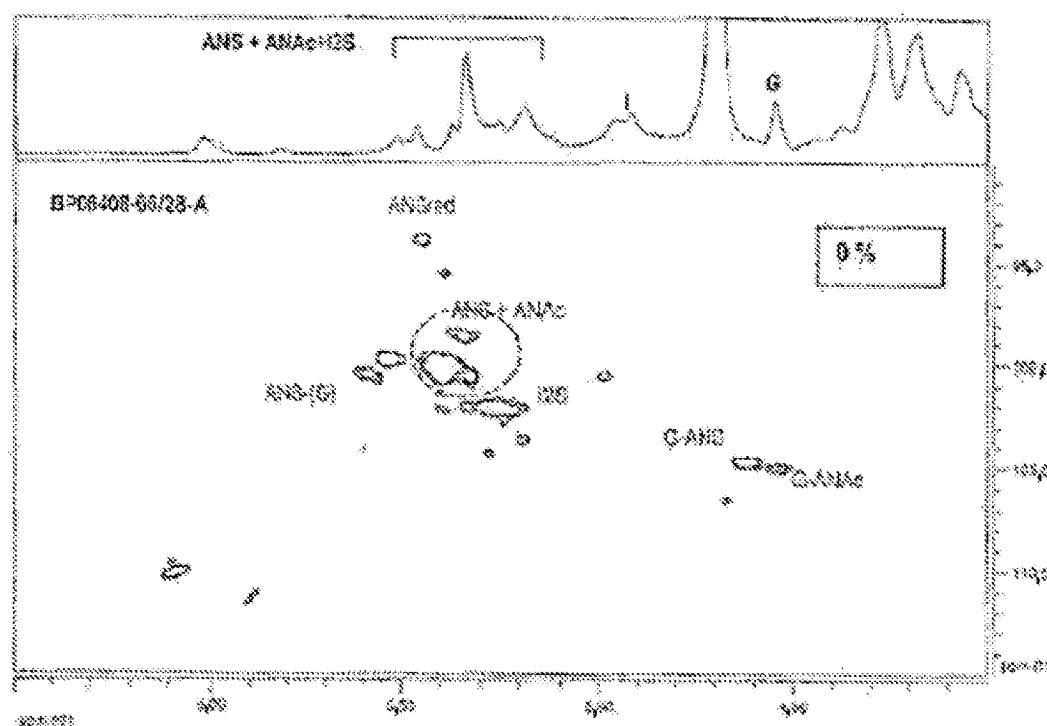
**FIGURA 21**



## **FIGURA 2J**



**FIGURA 2K**



**FIGURA 2L**

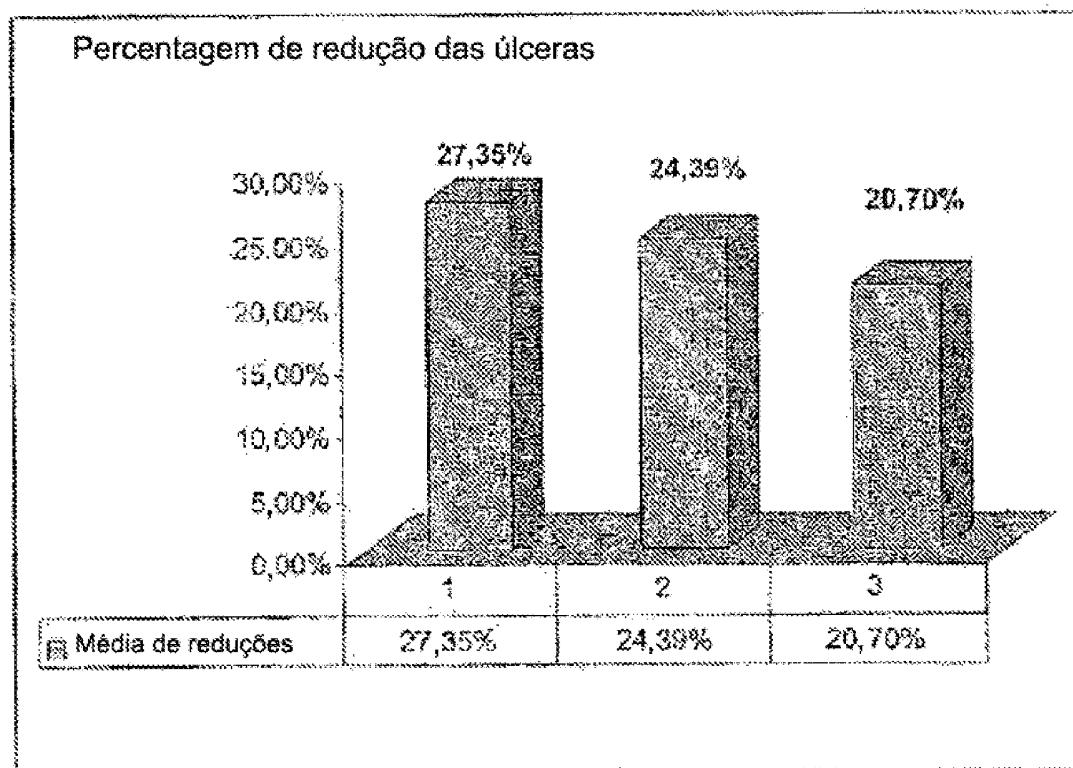


FIGURA 3

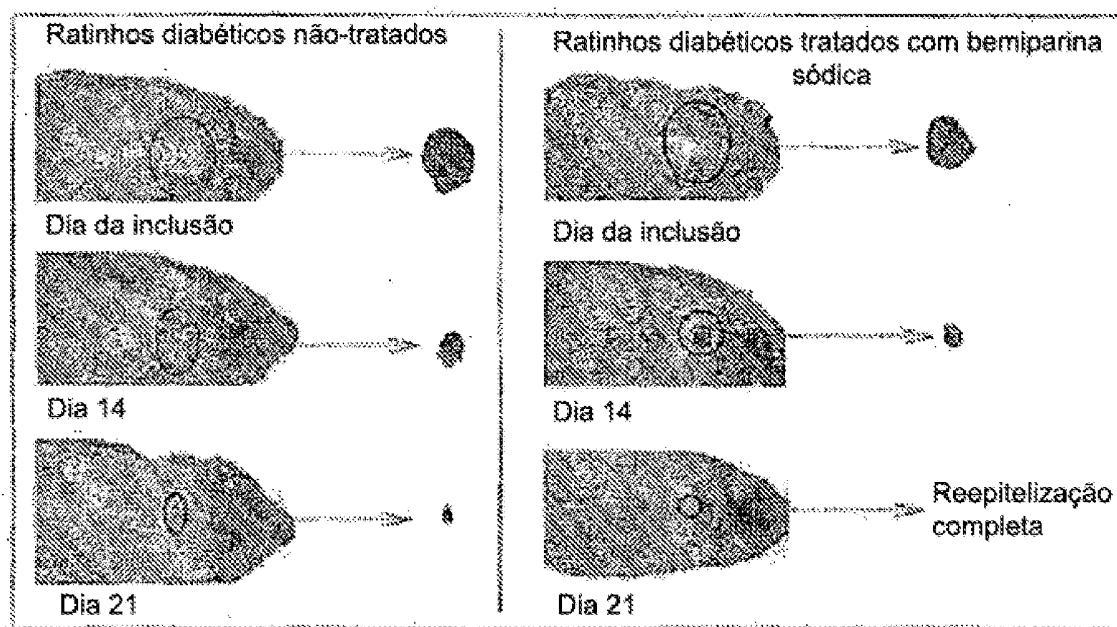


FIGURA 4

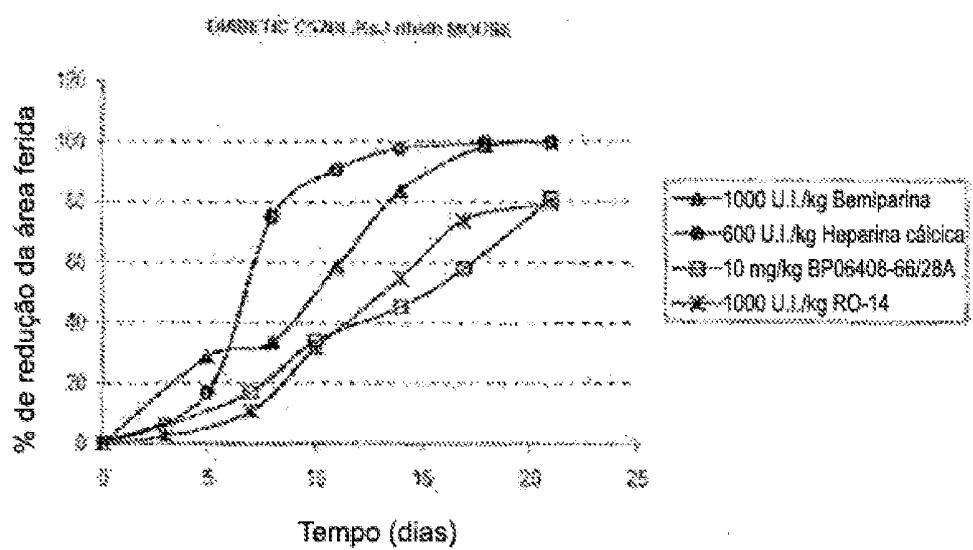
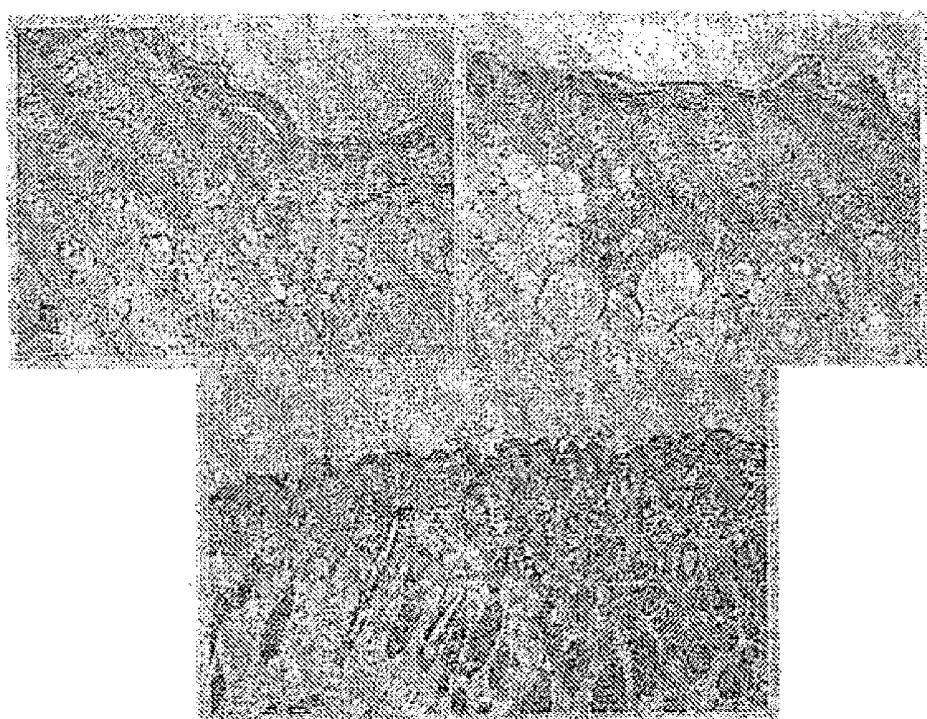
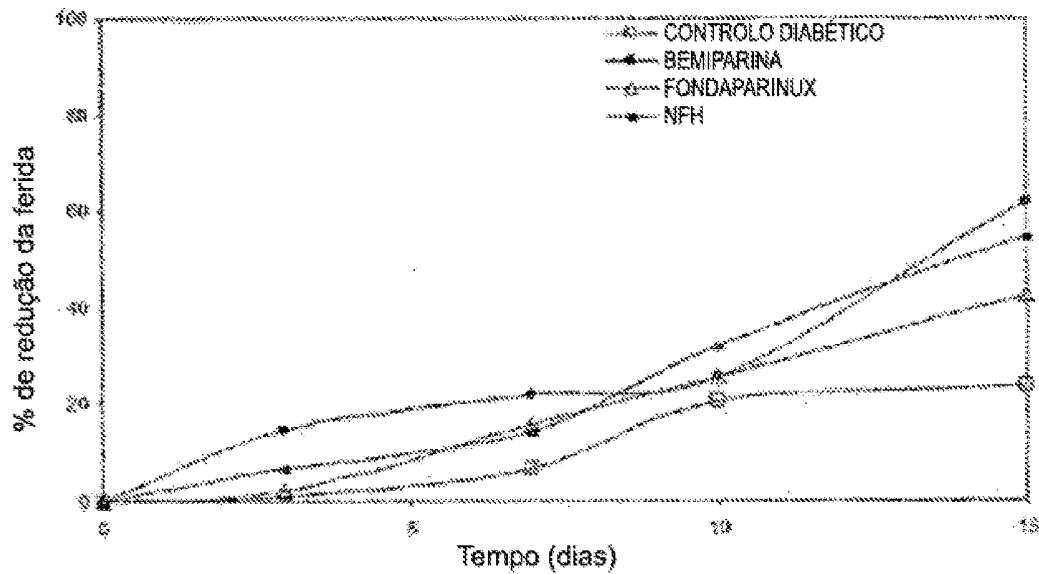


FIGURA 5



**FIGURA 6**



**FIGURA 7**

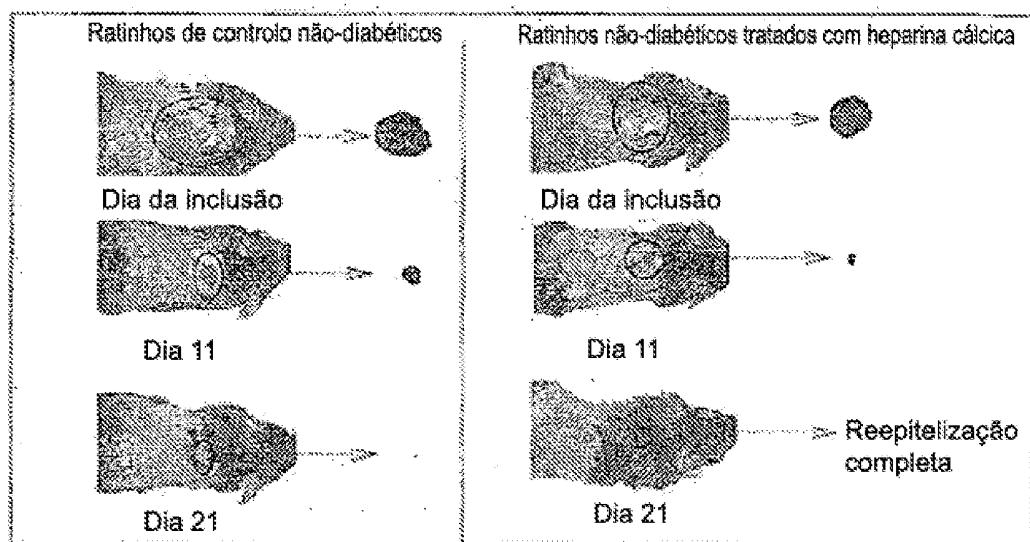


FIGURA 8

## RATINHOS NÃO-DIABÉTICOS C57BL/KsJ-db/db

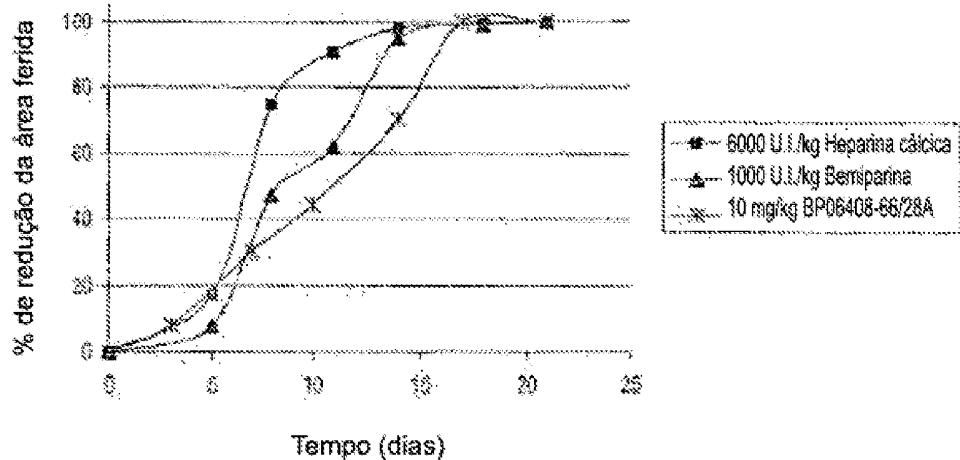


FIGURA 9

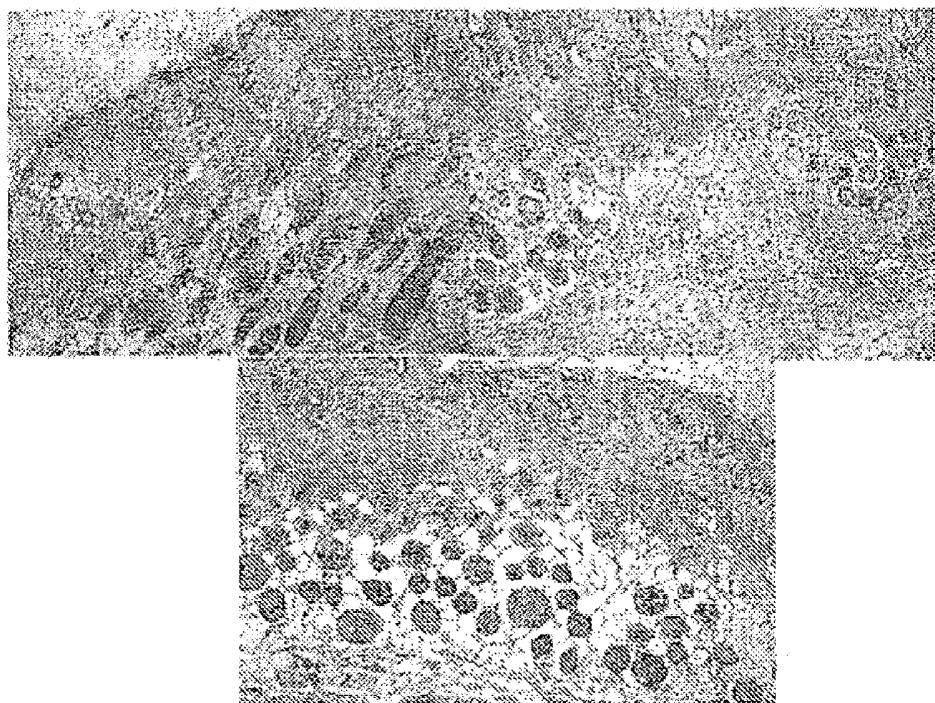


FIGURA 10

RATO WISTAR DIABETIZADO

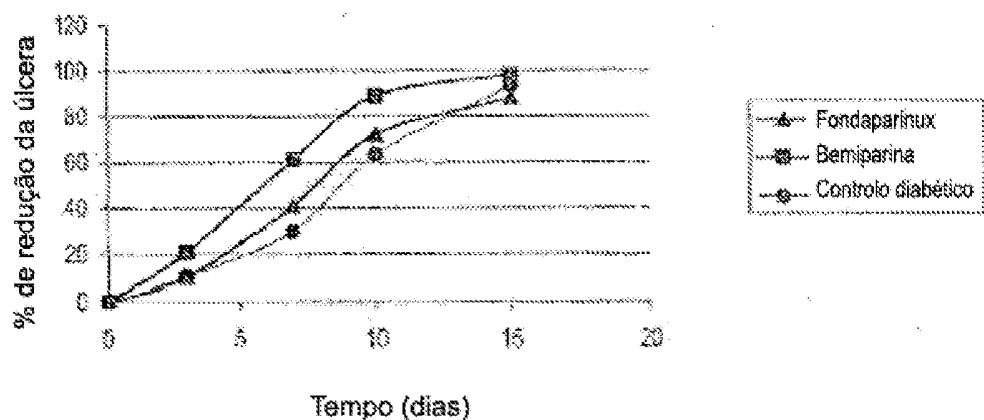


FIGURA 11