

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

(21) **PI0801477-9 A2**



\* B R P I 0 8 0 1 4 7 7 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 13/05/2008  
(43) Data da Publicação: 12/01/2010  
(RPI 2036)

**(51) Int.Cl.:**  
C07H 11/00 (2010.01)  
A61K 31/715 (2010.01)  
A61K 31/737 (2010.01)  
A61K 36/02 (2010.01)  
A61P 7/02 (2010.01)

(54) Título: **GALACTANA SULFATADA COM ATIVIDADE ANTITROMBÓTICA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, SEUS USOS E MÉTODO PARA TRATAMENTO OU PROFILAXIA DE TROMBOSE ARTERIAL OU VENOSA**

(73) Titular(es): S.A. Delta do Prata

(72) Inventor(es): Fábio Rabelo Melo, Paulo Antonio de Souza Mourão

(57) Resumo: GALACTANA SULFATADA COM ATIVIDADE ANTITROMBÓTICA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, SEUS USOS E MÉTODO PARA TRATAMENTO OU PROFILAXIA DE TROMBOSE ARTERIAL OU VENOSA. A presente invenção refere-se a galactanas sulfatadas de baixo peso molecular, preferivelmente obtidas de alga vermelha, que não apresentam efeito sobre a ativação do fator XII da cascata de coagulação, apresentando, porém, atividade heparinóide antitrombótica. As galactanas sulfatadas da presente invenção podem ser obtidas a partir de algas vermelhas, particularmente as algas do gênero *Botryocladia*, em especial as algas *Botryocladia occidentalis*. A presente invenção também se refere a uma composição farmacêutica que compreende tais galactanas sulfatadas e ao uso das mesmas no tratamento ou profilaxia de trombose arterial ou venosa em um ser humano ou animal, podendo ser administradas por via intravenosa ou subcutânea. Outro aspecto da presente invenção se refere ao uso de uma galactana sulfatada como substituto de heparina no tratamento ou profilaxia de trombose arterial ou venosa em ser humano ou animal, bem como ao método para tratamento ou profilaxia de trombose arterial ou venosa utilizando tais galactanas sulfatadas



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "GALACTANA SULFATADA COM ATIVIDADE ANTITROMBÓTICA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, SEUS USOS E MÉTODO PARA TRATAMENTO OU PROFILAXIA DE TROMBOSE ARTERIAL OU VENOSA".

5 Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a galactanas sulfatadas de baixo peso molecular, preferivelmente obtidas de alga vermelha, que não apresentam efeito sobre a ativação do fator XII da cascata de coagulação, apresentando, porém, atividade antitrombótica semelhante à heparina.

10 As galactanas sulfatadas da presente invenção apresentam diversas vantagens frente às heparinas disponíveis no mercado, em particular as heparinas de baixo peso molecular, dentre elas: a) são tão ou mais ativas quanto a heparina de baixo peso molecular em modelos de trombose; b) inibem a trombose com pouco efeito anticoagulante; c) não causam sangramento; d) podem ser obtidas a partir de algas e não de animais, como é o  
15 caso das heparinas disponíveis no mercado, reduzindo assim o custo de produção e diminuindo os riscos de contaminação; e) sua administração pode ser feita tanto através da via intravenosa, como da via subcutânea; e f) em doses baixas, apresenta uma atuação seletiva em modelos de trombose  
20 venosa e, em doses altas, apresenta também uma atuação no modelo de trombose arterial.

Antecedentes da Invenção

As principais doenças que são fatais para seres humanos envolvem coração e vasos sanguíneos e, conseqüentemente, trombose (Fareed  
25 J, Hoppensteadt DA. *Heparins in the new millennium: Will unfractionated heparin survive?* Semin Thromb Hemost 2000; 26: 87-88). Uma vez estabelecido o diagnóstico de tromboembolismo venoso, é necessária uma imediata ação antitrombótica para prevenir o crescimento do trombo e reduzir o risco de embolismo pulmonar. Os pacientes que apresentam tromboembolia  
30 recorrente (por exemplo, pacientes com Síndrome de Trousseau), podem beneficiar-se da administração de heparina a longo prazo e de maneira profilática. A heparina é também utilizada no tratamento inicial de pacientes com

angina instável ou infarto agudo do miocárdio, durante e após angioplastia coronariana ou colocação de *stent* e durante cirurgia que exige derivação cardiopulmonar. A heparina também é utilizada no tratamento de pacientes com coagulação intravascular disseminada. Por fim, a heparina é utilizada  
5 ainda como método profilático em procedimentos invasivos, como por exemplo, cateterismos.

A heparina tem sido utilizada por mais de 50 anos e é atualmente o segundo fármaco natural mais usado no mundo. A potente ação anticoagulante da heparina é conseguida principalmente através da potencialização da ação inibitória da antitrombina e do co-fator II da heparina, os principais inibidores das enzimas da coagulação, em particular trombina e fator Xa (Beguin S, Lindhout T, Hemker HC. *The effect of trace amounts of tissue factor on thrombin generation in platelet rich plasma, its inhibition by heparin.* Thromb Haemostasis 1989; 61: 25-29).  
10

O uso da heparina em seres humanos está associado a uma série de efeitos colaterais, incluindo trombocitopenia, hemorragia, ineficiência de ação em deficiências congênitas ou adquiridas de antitrombina e incapacidade de inibir trombina ligada à fibrina. Com frequência, ocorrem anormalidades das provas de função hepática em pacientes que recebem  
15 heparina por via intravenosa ou subcutânea. Observam-se elevações discretas nas atividades das transaminases hepáticas no plasma, sem aumento nos níveis de bilirrubina ou atividade da fosfatase alcalina. A heparina pode ainda inibir a síntese de aldosterona pelas glândulas supra-renais mesmo quando se administram doses baixas.  
20

A heparina é principalmente extraída da mucosa intestinal de porco ou de pulmão bovino, onde ocorre em baixa concentração. A incidência de doenças relacionadas a príon em mamíferos e a crescente necessidade de terapia antitrombótica indicam que são necessárias fontes alternativas de compostos anticoagulantes e antitrombóticos.  
25

A heparina não é o único polissacarídeo capaz de promover inativação da trombina por antitrombina. Uma variedade de galactanas e fuca-  
30 nas sulfatadas de algas e invertebrados marinhos também promovem o

mesmo efeito inibitório, como revelado nas seguintes publicações: Farias WRL, Valente AP, Pereira MS e Mourão PAS. *Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans - Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae Botryocladia occidentalis and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates*. J Biol Chem 2000; 275: 29299-29307; Pereira MS, Melo FR, Mourão PAS. *Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans?* Glycobiology 2002; 12: 573-580; e Pereira MS, Mulloy B, Mourão PAS. *Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans - Comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae*. J Biol Chem 1999; 274: 7656-7667.

Alguns documentos de patente estão relacionados à obtenção de composições contendo polissacarídeos com atividade heparinóide. No entanto, nenhum deles ensina nem sugere as galactanas sulfatadas da presente invenção.

A patente EP 475.383 B1 refere-se a uma composição de polissacarídeo com atividade heparinóide obtida a partir de algas verdes, particularmente da família *Codiaceae*, gênero *Codium*. Também se refere a um processo para a preparação da referida composição e a uma composição anticoagulante contendo, como princípio ativo, o referido polissacarídeo. Entretanto, o polissacarídeo ali revelado não possui propriedades antitrombóticas. Trata-se apenas de um agente anticoagulante.

A publicação WO 2007/028256 refere-se ao uso de polissacarídeos como fucanas e galactanas na inibição da liberação de mediadores inflamatórios obtidos a partir de algas marrons e vermelhas, particularmente *Ascophyllum nodosum* e *Asparagopsis armata*. Trata-se de uma mistura de fucanas e galactanas com atividade antiinflamatória, ao contrário da presente invenção que trata de galactanas sulfatadas com atividade heparinóide.

O pedido de patente brasileiro PI 9808008-3 (correspondente ao WO 98/40081) revela uma composição oligossacarídica com atividade anticoagulante e antitrombótica obtida a partir de levedura, particularmente *Pi-*

*chia holstii*, bem como método de tratamento e uso da referida composição. Na verdade, trata-se de oligossacarídeos preparados através de síntese química (sulfatação química) sem qualquer comprovação de atividade antitrombótica *in vivo*.

5 Os pedidos de patente brasileiros PI 9710739-5, PI 9907025-1 e PI 0114007-8 (correspondentes a WO 98/03554, WO 99/36443 e WO 02/24754, respectivamente) descrevem diversos polissacarídeos sintéticos com atividades anticoagulantes e antitrombóticas da heparina, bem como composições farmacêuticas contendo os mesmos. Trata-se de polissacarí-  
10 deos sintéticos com propriedades semelhantes às da heparina, inclusive no que se refere aos seus efeitos colateriais, como sangramento.

#### A Busca por um Antitrombótico Substituto da Heparina

De acordo com S. Alban em seu artigo *The 'precautionary principle' as a guide for future drug development* (European Journal of Clinical In-  
15 vestigation (2005) 35 (Suppl. I), 33-44), atualmente a heparina é o produto medicinal derivado de suíno mais amplamente utilizado no mundo e ainda é o fármaco mais aplicado para profilaxia e terapia de doenças tromboembólicas. Neste contexto, heparina compreende a heparina não fracionada e as várias heparinas de baixo peso molecular.

20 Hoje em dia, questiona-se a segurança viral da heparina extraída de porcos. Em linha com as recentes decisões oficiais direcionadas à precaução em relação a fármacos derivados de animais, há diversas razões que tornam desejável a obtenção de uma alternativa para as heparinas.

Após a descontinuação do uso de heparina bovina como resul-  
25 tado do problema da encefalopatia espongiforme bovina ou doença da vaca louca, todas as heparinas utilizadas na Europa e na América do Norte passaram a ser isoladas da mucosa intestinal de porcos. Porém, há uma escassez considerável de matéria-prima. Segundo S. Alban, são necessárias anualmente mucosas de mais de 200 milhões de porcos para a produção de  
30 heparina para tratar mais de 20 milhões de pessoas ao redor do mundo. Nos Estados Unidos, na Alemanha e na França, 312 milhões de doses de heparina foram aplicadas em 2003, sendo que a porcentagem de heparina de

baixo peso molecular somou 40%, 79% e 86%, respectivamente. A necessidade é crescente, já que a heparina é utilizada em cada vez mais países, em um número crescente de indicações e durante períodos cada vez mais longos. Por exemplo, o volume de vendas de heparina na Alemanha aumentou de 45 milhões de Euros em 1986 para 150 milhões de Euros em 2002 (correspondentes a 87 milhões de doses-padrão) e as vendas de doses de heparina nos Estados Unidos aumentaram de 129 milhões em 2002 para 139 milhões de doses em 2003. Desta forma, para a produção de heparina de baixo peso molecular, é preciso cada vez mais heparina não fracionada.

Outro ponto importante é o fato de que o produto natural heparina é uma mistura polidispersa de moléculas que apresentam amplas variações em sua composição e suas preparações geralmente contêm dermatam sulfato em quantidades variáveis. A respectiva composição de uma preparação de heparina é dependente dos processos individuais de fabricação. Diversos parâmetros, que variam desde a subespécie de porco utilizada, as condições de criação animal, o processo de extração e a purificação final da heparina, influenciam a constituição final do produto. Como consequência, há grandes diferenças entre as diversas preparações de heparina, bem como consideráveis variações por lote, o que resulta em diferenças em suas atividades biológicas.

As atividades biológicas compreendem não apenas a aceleração da inibição da trombina e fator Xa mediada por antitrombina ou co-fator II da heparina. A heparina exibe também uma ampla gama de efeitos biológicos, muitos deles indesejáveis. Portanto, a heparina não é um fármaco de ação específica, e sim um biomodulador multivalente.

Com o desenvolvimento das heparinas de baixo peso molecular, algumas das desvantagens das heparinas não fracionadas foram superadas. As heparinas de baixo peso molecular tem efeito anticoagulante reduzido em comparação com as heparinas não fracionadas, evitando sangramento excessivo. Além disso, as heparinas de baixo peso molecular podem ser administradas por via subcutânea, ao passo que as heparinas não fracionadas são administradas por via intravenosa, o que torna o seu uso dependente de

monitoramento constante. Outra vantagem das heparinas de baixo peso molecular é o seu maior tempo de permanência no organismo em comparação com o das heparinas não fracionadas.

5 No entanto, com relação à segurança e à eficácia, nenhuma dessas heparinas pode ser considerada como ótima.

Portanto, a presente invenção tem por objetivo prover galactanas sulfatadas capazes de atuar como antitrombóticos alternativos ou substitutos da heparina, apresentando desempenho aperfeiçoado e características vantajosas em relação às heparinas disponíveis no mercado, em particular  
10 às heparinas de baixo peso molecular.

As galactanas sulfatadas da presente invenção são obtidas a partir de algas vermelhas, particularmente as algas do gênero *Botryocladia*, em especial as algas da espécie *Botryocladia occidentalis* e não apresentam os problemas de contaminação e segurança mencionados acima, caracterís-  
15 ticos das heparinas. Além da vantagem de ser obtida a partir de algas e não de animais, existe ainda a vantagem econômica. O rendimento aproximado da galactana sulfatada da presente invenção é de cerca de 2% com relação ao peso seco inicial da alga da qual ela foi extraída. Esse alto rendimento significa redução do custo final do produto, em comparação com as hepari-  
20 nas disponíveis no mercado. Some-se a isso o fato de que as algas vermelhas, particularmente as algas do gênero *Botryocladia*, em especial as algas da espécie *Botryocladia occidentalis*, são de fácil cultivo e reprodução.

Ao analisar as Figuras 3A e 3B, é possível notar que os custos relacionados à concentração do princípio ativo utilizado são reduzidos em  
25 pelo menos 75%. De acordo com o gráfico, é necessário apenas 0,25 mg/kg da galactana sulfatada da presente invenção para alcançar aproximadamente 80% de atividade antitrombótica, enquanto que, para chegar a aproximadamente 70% de atividade antitrombótica, é necessário 1,00 mg/kg de heparina de baixo peso molecular. Pode-se afirmar, assim, que a galactana sulfa-  
30 tada da presente invenção apresenta uma potência pelo menos 4 vezes maior em relação à heparina de baixo peso molecular.

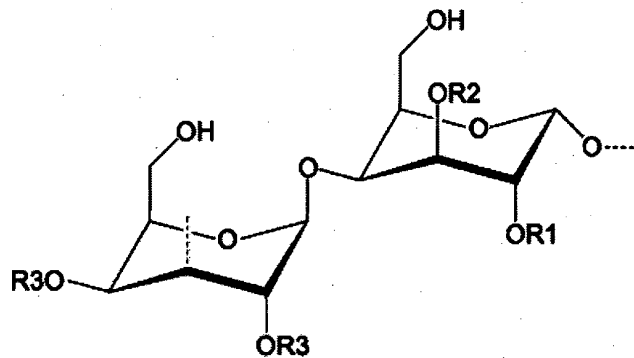
Portanto, além das vantagens econômicas e sanitárias, as galactanas sulfatadas da presente invenção apresentam ainda as seguintes vantagens frente às heparinas disponíveis no mercado: a) são tão ou mais ativas quanto a heparina de baixo peso molecular no modelo de trombose; b) inibem a trombose com pouco efeito anticoagulante; c) não causam sangramento; d) podem ser obtidas a partir de algas e não de animais, como é o caso das heparinas disponíveis no mercado, reduzindo assim o custo de produção diminuindo os riscos de contaminação; e) sua administração pode ser feita tanto através da via intravenosa, como da via subcutânea; e f) em doses baixas, apresenta uma atuação seletiva em modelos de trombose venosa e, em doses altas, apresenta uma atuação preferencial em modelos de trombose arterial.

Outra vantagem que deve ser levada em consideração é que as galactanas sulfatadas da presente invenção apresentam um tempo de permanência no organismo equivalente àquele das heparinas de baixo peso molecular.

#### Estrutura das Galactanas Sulfatadas da Presente Invenção

A galactana sulfatada da presente invenção pode ser obtida a partir da alga vermelha *Botryocladia occidentalis* e apresenta uma estrutura de repetição composta de  $-4-\alpha\text{-D-Galp-1}\rightarrow 3-\beta\text{-D-Galp-1}\rightarrow$ . Além de seu padrão de sulfatação variável, essa molécula apresenta resíduos de D-galactose 2,3-di-O-sulfatada (aproximadamente um terço do total das unidades de  $\alpha$ -galactose).

A galactana sulfatada da presente invenção, que pode ser obtida a partir da alga marinha *Botryocladia occidentalis*, apresenta a seguinte estrutura de repetição:



onde:

R1, R2 e R3 = H ou  $\text{SO}_3^-$ ;

R1 como  $\text{SO}_3^- \geq 66\%$ ; e

R2 como  $\text{SO}_3^- \geq 33\%$ .

5           Esse polissacarídeo tem uma estrutura de repetição (-4- $\alpha$ -D-Gal-1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-Gal-1 $\rightarrow$ ), com um padrão de sulfatação variável. Aproximadamente um terço das unidades  $\alpha$  é 2,3-dissulfatado e o outro um terço é 2-sulfatado.

10           A ação anticoagulante da galactana sulfatada da presente invenção, mais reduzida do que aquela observada para a heparina de baixo peso molecular, está relacionada com a presença dos resíduos de galactose 2,3-dissulfatada. Quanto mais à direita do gráfico, menor a atividade anticoagulante (Figura 2). Nas figuras 1B e 2, a galactana sulfatada da presente invenção apresenta uma ação coagulante significativamente menor do que a  
15 da heparina de baixo peso molecular.

          Quando testadas em ensaios com inibidores da coagulação usando trombina como a protease-alvo, a galactana sulfatada nativa e a heparina não fracionada mostram atividades similares, sem importar se anti-trombina ou co-fator II da heparina foi usado como inibidor (Figura 2A e 2C).  
20 Em contraste, em ensaios onde fator Xa substitui trombina, a galactana sulfatada nativa requer uma concentração significativamente maior para atingir o mesmo efeito inibitório da heparina não fracionada (Figura 2B). Além disso, foi demonstrado que a formação do complexo inibidor trombina-antitrombina formado na presença da galactana sulfatada nativa difere da-  
25 quele formado na presença de heparina (Melo FR, Pereira MS, Foguel D e

Mourão PAS. *Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides - Different mechanisms for heparin and sulfated galactans*. J Biol Chem 2004; 279: 20824-20835).

#### Objetivos da Invenção

5                   A galactana sulfatada nativa de *Botryocladia* apresenta efeito antitrombótico quando testada em um modelo experimental de trombose. No entanto, a curva de dose-resposta obtida para a galactana sulfatada é diferente daquela da heparina não fracionada, uma vez que apresenta um efeito antitrombótico potente em doses baixas, mas em doses altas esta ação desaparece (Figura 3A)(Farias WRL, Nazareth RA, Mourão PAS. *Dual effects of sulfated D-galactans from the red algae Botryocladia occidentalis preventing thrombosis and inducing platelet aggregation*. Thromb Haemostasis 2001; 86: 1540-1546). O alto peso molecular da galactana sulfatada nativa ( $\geq 100$  kDa), em contraste com preparações de heparina não fracionada e heparina de baixo peso molecular (~14 e ~5 kDa, respectivamente), torna a comparação entre elas difícil. Ainda, o zimogênio do fator XII pode ser ativado por contato com cargas negativas, tal como o sulfato de dextrana. Deste modo, o alto teor de sulfato da galactana sulfatada nativa pode ativar o fator XII, comprometendo sua ação anticoagulante. Com o objetivo de comparar a ação biológica da galactana sulfatada com aquela da heparina não fracionada e heparina de baixo peso molecular, foram preparados fragmentos de baixo peso molecular a partir da galactana nativa, com tamanhos similares àqueles da heparina não fracionada e heparina de baixo peso molecular (Figura 1A). Os resultados indicam que a redução do peso molecular da galactana sulfatada minimiza seu efeito anticoagulante (Figuras 1B e 2), mas também elimina seu efeito indesejado sobre a ativação do fator XII (Figura 4). É importante notar que a fração entre 2 a 10 kDa, particularmente ~5 kDa, tem uma ação anticoagulante pobre (Figuras 1B e 2). Quando esses fragmentos foram testados em um modelo de trombose venosa, a fração de ~14 kDa mostrou o mesmo efeito duplo observado para a galactana sulfatada nativa (Figuras 3B). Surpreendentemente, a fração entre 2 a 10 kDa, particularmente ~5 kDa, retém o efeito antitrombótico em doses altas e

é capaz de prevenir trombose em ambos modelos venoso e arterial (Figuras 3B e D). Diante disto, é possível afirmar que o efeito da galactana sulfatada da presente invenção é modulado pela sua dose. Assim, em doses baixas, sua ação é seletiva na trombose venosa, enquanto que em doses altas é também evidenciado um efeito na trombose arterial (Figura 3B e D). Além disso, não aumenta o tempo de sangramento (Figura 6).

Portanto, o objetivo principal da presente invenção é prover galactanas sulfatadas de baixo peso molecular com efeito antitrombótico capazes de inibir a trombose com pouco efeito anticoagulante, sem os efeitos colaterais resultantes da utilização das heparinas disponíveis no mercado.

A redução do tamanho molecular tem um papel central na dissociação do efeito duplo observado na formação patogênica do trombo *in vivo*. A presente invenção revela que fragmentos entre 2 a 10 kDa, particularmente ~5 kDa, de tais galactanas sulfatadas são fármacos promissores em terapias antitrombóticas com risco baixo ou nenhum de sangramento excessivo.

#### Breve Descrição das Figuras

A Figuras 1A e 1B referem-se ao tamanho e à ação anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados. Na Figura 1A, a galactana sulfatada nativa, duas frações de peso molecular reduzido da mesma (~14kDa (III) e ~5kDa (IV)), heparina não fracionada (UFH) e heparina de baixo peso molecular (LMWH) foram separadas através de PAGE. As massas moleculares dos fragmentos de baixo peso molecular da galactana sulfatada foram determinadas através de comparação com a mobilidade eletroforética dos compostos-padrão (posições mostradas à direita). Na Figura 1B, amostras de plasma humano citratado foram incubadas com concentrações diferentes de heparina não fracionada (□), heparina de baixo peso molecular (■), galactana sulfatada nativa (▲), fragmento de ~14 kDa (○) e fragmento de ~5 kDa (●) e usadas para medir o aPTT (tempo de tromboplastina parcial ativada) [média ± erro-padrão da média (EPM), n=3]. Para efeitos de clareza, apenas uma barra de EPM é mostrada para cada ponto.

A Figura 2 mostra a dependência da concentração de polissacarídeos sulfatados para inativação da trombina (A e C) ou fator Xa (B) por an-

titrombina (A e B) ou co-fator II de heparina (C). Antitrombina (10 nM) ou co-fator II de heparina (15 nM) foram incubados com trombina (2 nM) ou fator Xa (2 nM) na presença de várias concentrações de heparina não fracionada (□), heparina de baixo peso molecular (■), galactana sulfatada nativa (▲),  
5 fragmento de ~14 kDa (○) e fragmento de ~5 kDa (●). Após 60 segundos, a atividade amidolítica da trombina e fator Xa foi determinada com um substrato cromogênico específico para cada uma das proteases ( $A_{405nm}/min$ ) [média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM),  $n=3$ ]. Nenhuma inibição foi observada quando trombina ou fator Xa foi incubado com polissacarídeo sulfatado sozinho,  
10 mesmo acima da faixa de concentração testada.

A Figura 3 demonstra o efeito antitrombótico dos polissacarídeos sulfatados. Ensaio foram realizados em ratos com doses diferentes de heparina não fracionada (□), heparina de baixo peso molecular (■), galactana sulfatada nativa (▲), fragmento de ~14 kDa (○) e fragmento de ~5 kDa (●)  
15 (média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM),  $n=3$ ). (A e B) Modelo de trombose induzida por estase na veia cava de ratos. A média de peso do trombo para cada dose foi expressa como porcentagem do peso na ausência de polissacarídeo; (C) Trombose no modelo de shunt arteriovenoso. A média de peso do trombo para cada dose foi expressa como porcentagem do peso do trombo na ausência de polissacarídeo; (D) Modelo de trombose arterial induzida por irradiação a laser na artéria carótida. Os resultados foram expressos como o tempo médio para a completa oclusão da artéria.  
20

A Figura 4 refere-se à ativação de fator XII em plasma humano incubado com heparina não fracionada (□), galactana sulfatada nativa (▲),  
25 fragmento de ~14 kDa (○) e fragmento de ~5 kDa (●). Após 60 segundos de incubação a 37°C, 0,3 mM de substrato cromogênico para caliceína de plasma foi adicionado. O aumento da absorbância a 405 nm foi expresso em mili densidade óptica/ min (média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM),  $n=3$ ).

A Figura 5 mostra a atividade anticoagulante baseada no tempo de recalcificação. (A) Amostras de plasma humano citratado foram incubadas com concentrações diferentes de heparina não fracionada (□), galactana sulfatada nativa (▲), fragmento de ~14 kDa (○) e fragmento de ~5 kDa (●) e  
30

usadas para medir o tempo de recalcificação (média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM), n=3); (B) Amostras de sangue de rato foram coletadas 10 minutos após administração intravascular de diferentes doses dos polissacarídeos sulfatados, o plasma foi separado e usado para medir o tempo de recalcificação *ex vivo* (média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM), n=4). A atividade anti-coagulante foi expressa como  $T_1/T_0$ , que é a razão entre o tempo de coagulação na presença ou ausência de polissacarídeo sulfatado. A linha tracejada ( $T_1/T_0 = 1$ ) indica a ausência de efeito do polissacarídeo sobre coagulação.

10 A Figura 6 refere-se ao efeito no sangramento. Heparina não fracionada ( $\square$ ), heparina de baixo peso molecular ( $\blacksquare$ ), galactana sulfatada nativa ( $\blacktriangle$ ), e fragmento de  $\sim 5$  kDa ( $\bullet$ ) foram infundidos em ratos. Após 5 minutos, as caudas dos ratos foram cortadas 3 mm a partir da ponta e imersas em 40 ml de água destilada em temperatura ambiente. A perda de san-  
15 gue foi determinada 60 minutos depois, através da medição da hemoglobina na água. Os resultados foram expressos em  $\mu$ l de sangue perdido (média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM), n=4). Para efeitos de clareza, apenas uma barra de EPM é mostrada para cada ponto.

#### Descrição da Invenção

20 A presente invenção refere-se a galactanas sulfatadas com atividade antitrombótica, apresentando baixo peso molecular e compreendendo a estrutura de repetição ( $-4-\alpha\text{-D-Galp-1}\rightarrow 3-\beta\text{-D-Galp-1}\rightarrow$ ), sendo que o total das unidades  $\alpha$  compreendem resíduos de  $\alpha\text{-D-galactopiranosose 2,3-di-O-sulfatada}$  e/ou resíduos de  $\alpha\text{-D-galactopiranosose 2-O-sulfatada}$ .

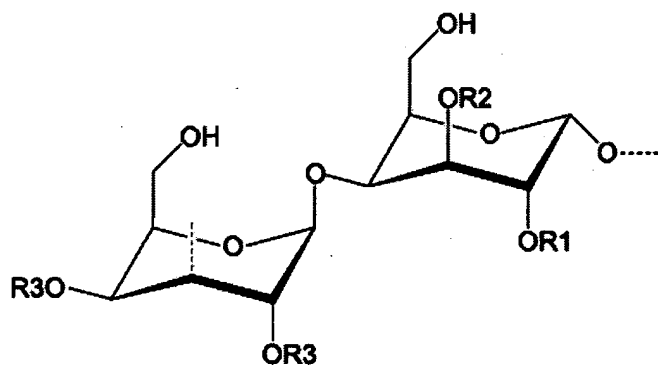
25 Preferencialmente, as galactanas sulfatadas da presente invenção possuem peso molecular na faixa de 2 a 10 kDa, particularmente 5 kDa.

As galactanas sulfatadas da presente invenção podem ser obtidas a partir de algas vermelhas, particularmente as algas do gênero *Botryocladia*, em especial as algas *Botryocladia occidentalis*.

30 Particularmente, o total das unidades  $\alpha$  das galactanas sulfatadas da presente invenção compreendem pelo menos um terço de resíduos

de  $\alpha$ -D-galactopiranosose 2,3-di-O-sulfatada e pelo menos um terço de resíduos de  $\alpha$ -D-galactopiranosose 2-O-sulfatada.

Preferencialmente, a estrutura de repetição das galactanas sulfatadas da presente invenção apresenta a fórmula:



5 onde:

R1, R2 e R3 = H ou  $\text{SO}_3^-$ ;

R1 como  $\text{SO}_3^- \geq 66\%$ ; e

R2 como  $\text{SO}_3^- \geq 33\%$ .

10 As galactanas sulfatadas da presente invenção são úteis no tratamento de trombose arterial ou venosa em ser humano ou animal. Elas são particularmente úteis no tratamento de trombose venosa e podem ser administradas por via intravenosa ou subcutânea ao ser humano ou animal.

15 A presente invenção também se refere a uma composição farmacêutica que compreende as galactanas sulfatadas descritas acima, juntamente com um veículo farmacologicamente aceitável, como por exemplo solução fisiológica de NaCl a 0,15 M ou qualquer outro veículo conhecido por um técnico no assunto que seja compatível com a composição farmacêutica da presente invenção. Tal composição farmacêutica é útil no tratamento de trombose arterial ou venosa em ser humano ou animal, particularmente trombose venosa, e pode ser administrada por via intravenosa ou  
20 subcutânea ao ser humano ou animal.

25 Outro aspecto da presente invenção refere-se ao uso das galactanas sulfatadas descritas acima no tratamento ou profilaxia da trombose arterial ou venosa em ser humano ou animal, particularmente trombose venosa. A administração pode ser feita por via intravenosa ou subcutânea ao

humano ou animal.

A galactana sulfatada da presente invenção é um fármaco que atua em concentrações distintas em eventos de trombose venosa e arterial. Assim, as faixas de concentrações utilizadas nos métodos de tratamento ou profilaxia de trombose venosa e de trombose arterial são diferentes. A faixa de concentração da galactana sulfatada da presente invenção a ser administrada para o tratamento ou profilaxia de trombose venosa é de aproximadamente 0,05 a 5 mg/kg de peso corporal, preferencialmente, aproximadamente 0,25 mg/kg de peso corporal (vide Figura 3B). A faixa de concentração da galactana sulfatada da presente invenção a ser administrada para o tratamento ou profilaxia de trombose arterial é de aproximadamente 2 a 10 mg/kg de peso corporal, preferencialmente, aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal (vide Figura 3D).

Portanto, a presente invenção também se refere a um método para tratamento ou profilaxia de trombose venosa em humano ou animal, compreendendo administrar 0,05 a 5 mg/kg de peso corporal, preferencialmente 0,25 mg/kg de peso corporal, da galactana sulfatada descrita acima ao dito ser humano ou animal.

Além disso, a presente invenção também se refere a um método para tratamento ou profilaxia de trombose arterial, em ser humano ou animal, compreendendo administrar 2 a 10 mg/kg de peso corporal, preferencialmente 5 mg/kg de peso corporal, da galactana sulfatada descrita acima ao dito ser humano ou animal.

Em ambos os métodos, a administração é feita preferivelmente por via intravenosa ou subcutânea.

A presente invenção também está direcionada ao uso das galactanas sulfatadas descritas acima na preparação de uma composição farmacêutica útil no tratamento ou profilaxia da trombose arterial ou venosa em ser humano ou animal, particularmente trombose venosa.

Outro aspecto da presente invenção refere-se ao uso da galactana sulfatada descrita acima como substituto da heparina, no tratamento ou profilaxia da trombose arterial ou venosa em um ser humano ou animal.

### Descrição Detalhada da Invenção

O estudo de novos polissacarídeos com ações anticoagulante e antitrombótica é concentrado em dois pontos. Um deles envolve a pesquisa por novos compostos com ação potente e persistente e sem efeitos colaterais. O outro ponto é o uso desses compostos como ferramentas para elucidar os mecanismos moleculares e celulares envolvidos nos eventos de trombose. Com esses objetivos, a presente invenção provê uma galactana sulfatada nativa e fragmentos desse polissacarídeo com pesos moleculares similares aos da heparina não fracionada e da heparina de baixo peso molecular. Em particular, as unidades  $\alpha$ -galactose 2,3-dissulfatada estão ainda presentes nos fragmentos de baixo peso molecular. Acredita-se que tais unidades constituem o motivo estrutural que confere uma atividade anticoagulante alta à galactana sulfatada intacta.

A galactana sulfatada nativa e a heparina não fracionada têm potências anticoagulantes similares na presença de trombina (Figura 2A e C). Os modos com que a heparina não fracionada e a galactana sulfatada nativa auxiliam na inativação da trombina mediada por antitrombina são bem diferentes entre si. A principal diferença entre os dois polissacarídeos neste contexto se encontra nas diferentes afinidades que eles apresentam para trombina (galactana sulfatada nativa > heparina não fracionada) e para antitrombina (heparina não fracionada > galactana sulfatada nativa). Interessantemente, quando os dados na Figura 2A são expressos em uma base molar, os efeitos inibitórios exercidos pelos dois polissacarídeos são similares e a curva de inibição de trombina da galactana sulfatada nativa quase se sobrepõe àquela da heparina não fracionada. Quando os fragmentos de baixo peso molecular da galactana sulfatada foram testados, foi observada uma diminuição significativa no efeito inibitório sobre a atividade da trombina e do fator Xa exercido por antitrombina ou co-fator II da heparina (Figura 2), especialmente quando os resultados foram expressos em uma base molar. Ainda, os fragmentos de baixo peso molecular apresentaram uma redução da atividade anticoagulante similar, independentemente da protease ou do

inibidor utilizado. Esses resultados indicam que a redução no tamanho molecular causa o mesmo efeito nos diferentes ensaios.

A trombose arterial acontece em regiões de estresse de cisalhamento moderado, principalmente através da adesão e agregação de plaquetas na superfície luminal de vasos danificados. Em contraste, a trombose venosa é principalmente associada com a coagulação sanguínea e os conseqüentes depósitos de fibrina e eritrócitos em regiões de estase ou de estresse de cisalhamento baixo. A presente invenção testou o efeito da galactana sulfatada nativa e seus fragmentos de baixo peso molecular usando três modelos experimentais de trombose. A galactana sulfatada nativa tem um efeito antitrombótico potente sobre trombose venosa em doses baixas, é menos ativa no modelo arterial e é inativa no shunt arteriovenoso (Figura 3). Em modelos arteriovenoso e arterial de trombose (Figuras 3C e D), o efeito antitrombótico observado para heparina não fracionada é claramente associado com sua ação inibidora da agregação plaquetária. A galactana sulfatada nativa de *B. occidentalis* não tem nenhum efeito inibitório sobre agregação plaquetária humana ou de rato induzida por trombina, quando testada em concentrações de até 0,15 mg/mL e apresentou certa eficácia na inibição de trombose arterial. O efeito dos polissacarídeos sulfatados sobre a trombose venosa foi baseado na avaliação da formação do trombo e é principalmente associada com sua ação anticoagulante. O efeito duplo da galactana sulfatada nativa no modelo de trombose venosa foi associado com sua capacidade de ativar o fator XII e esta ação leva a um efeito diferente da galactana sulfatada nativa em ensaios anticoagulantes e antitrombóticos.

A formação do trombo está intimamente relacionada com o início da cascata de coagulação para finalmente produzir fibrina. A protease fator VIIa presente no plasma, em conjunto com a proteína de membrana fator tecidual são de importância central neste processo. Outros mecanismos também podem contribuir para formação de fibrina *in vivo*, como o que induz a ativação do fator XII da coagulação. O antigo conceito de que essa via é irrelevante para coagulação *in vivo* foi recentemente mudado através da demonstração de que camundongos sem fator XII são protegidos contra trom-

boembolismo induzido por colágeno e epinefrina. A ativação do fator XII pode acontecer na superfície negativamente carregada das plaquetas ativadas. O aspecto mais importante das constatações *in vivo* é a possibilidade de que o fator XII possa estar envolvido na formação de trombo (patológica), mas não na hemostasia (fisiológica), uma vez que o tempo de sangramento em camundongos *knockout* são normais.

Surpreendentemente, quando o peso molecular da galactana sulfatada foi reduzido, o efeito antitrombótico no modelo venoso foi restaurado (Figura 3B). A redução da atividade antitrombótica dos fragmentos no modelo arterial (Figura 3D) pode estar associada com a redução da atividade anticoagulante (Figura 2). No entanto, a ação antitrombótica venosa da galactana sulfatada nativa está associada com um equilíbrio entre as atividades anticoagulante e pró-coagulante. Em doses baixas, a atividade anticoagulante predomina e, em doses altas, essa ação é superada pela ativação do fator XII, resultando em uma atividade pró-coagulante. A dissociação dessas ações foi observada nos experimentos com o fragmento de ~5 kDa, que exibe um efeito antitrombótico máximo em doses similares às da galactana sulfatada nativa, retendo esta ação em doses altas (Figura 3B).

A ativação do fator XII em plasma normal envolve uma lenta autodigestão e autoativação do fator XII nativo ligado a uma superfície carregada negativamente, seguido por uma digestão mais rápida do fator XII pela calicreína. Foi demonstrado que cerebrosídeos sulfato (sulfatídeos) provêm uma superfície muito eficaz para o acontecimento da reação durante ativação por contato. Uma ação similar foi também observada na presença de sulfato de dextrana com peso molecular acima de 8 kDa. A redução do tamanho da galactana sulfatada nativa também reduz sua ação sobre o fator XII, de modo que o fragmento de ~5 kDa não apresentou esta ação (Figura 4). Para avaliar o efeito duplo da galactana sulfatada nativa, como também a ação dos fragmentos de baixo peso molecular, foram realizados ensaios de recalcificação *in vivo* e *ex vivo* (Figuras 5A e B). Os resultados mostraram-se de acordo com aqueles observados anteriormente (Figuras 3B e 4). Uma

demonstração adicional de que a galactana sulfatada nativa ativa o fator XII, pode ser obtida usando plasma deficiente deste co-fator.

Embora a galactana sulfatada ative o fator XII, ela não afeta significativamente o sistema calicreína-cininogênio, assim como observado pela administração intravascular do polissacarídeo, que não foi capaz de alterar a pressão sangüínea do rato.

O efeito de sangramento geralmente resulta da modificação da coagulação sangüínea induzida pelo polissacarídeo. Um aumento dos valores de aPTT no plasma está geralmente correlacionado com um efeito de aumento do sangramento. O modelo de sangramento da cauda do rato foi utilizado para comparar o efeito hemorrágico dos polissacarídeos. Surpreendentemente, a galactana sulfatada nativa e seu fragmento de ~5 kDa não tiveram efeito hemorrágico (Figura 6). A heparina não fracionada aumentou significativamente a perda de sangue quando injetada na dose de 1,0 mg/kg de peso corporal, a mesma dose na qual ela tem uma ação antitrombótica máxima no modelo venoso. A galactana sulfatada e seus fragmentos na faixa de 2 a 10 kDa, particularmente ~5 kDa, não modificaram a perda de sangue mesmo na dose de 2,0 mg/kg de peso corporal, possivelmente devido à ausência de efeito inibitório sobre a agregação plaquetária.

Em suma, embora a galactana sulfatada nativa pareça ser incapaz de ser utilizada para prevenir a trombose venosa, a presente invenção demonstra que a redução do tamanho molecular tem um papel central na dissociação do efeito duplo observado na formação patogênica do trombo *in vivo*. Portanto, a presente invenção estabelece o fragmento de baixo peso molecular, preferencialmente entre 2 e 10 kDa, particularmente ~5 kDa, como um novo fármaco promissor para uso em terapias antitrombóticas com risco baixo ou nenhum de sangramento excessivo.

### Resultados Experimentais

#### *a) Polissacarídeos Sulfatados*

A galactana sulfatada foi extraída da alga vermelha *Botryocladia occidentalis* através de digestão com protease e purificada através de cromatografia de troca iônica. A pureza de cada fração foi verificada através de

eletroforese em gel de agarose e espectroscopia de RMN, conforme descrito em Melo FR, Pereira MS, Foguel D e Mourão PAS. *Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides - Different mechanisms for heparin and sulfated galactans*. J Biol Chem 2004; 279: 20824-20835. A heparina não fracionada referente ao quarto Padrão Internacional (85/502) e heparina de baixo peso molecular (66 IU/mg) de Padrão Internacional (85/600), foram ambas obtidas do *National Institute for Biological Standards and Control* (Potter Bar, UK).

b) *Preparação dos Fragmentos de Baixo Peso Molecular*

10 A galactana sulfatada nativa de *Botryocladia occidentalis* (40 mg) foi dissolvida em 1,0 ml de HCl a 0,1M e incubada a 60°C por 60 minutos, então neutralizada com 1,0 ml de NaOH a 0,1M. A galactana sulfatada parcialmente hidrolisada foi aplicada a uma coluna Sephacryl S-400/HR (220 x 0,75 cm), equilibrada com  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  a 0,2M, pH 7,0. A coluna foi eluída com a mesma solução a um fluxo de 28 ml/h; frações de 4 ml foram coletadas e testadas através de metacromasia usando azul de 1,9-dimetilmetileno e através da reação de fenol- $\text{H}_2\text{SO}_4$ . As várias frações foram agrupadas como quatro subfrações distintas e em seguida liofilizadas.

c) *PAGE*

20 As massas moleculares dos polissacarídeos sulfatados foram estimadas através de PAGE. Nesses experimentos, os polissacarídeos sulfatados (~10 µg de cada) foram aplicados a um gel de poliacrilamida de 1 mm de espessura a 6% em barbital de sódio a 0,02M, pH 8,6, e submetidos a corrida por 30 minutos a 100 V. Os géis foram corados com azul de toluidina a 0,1% em ácido acético e então lavados por ~4 horas em ácido acético a 1%. As massas moleculares dos fragmentos de baixo peso molecular da galactana sulfatada foram determinadas através de comparação com a mobilidade eletroforética dos compostos-padrão.

30 d) *Ação Anticoagulante Medida Através do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (aPTT)*

Os ensaios de coagulação foram realizados por aPTT através do método de Anderson (Wessler S, Reimer SM, Sheps Me. *Biologic assay*

*of thrombosis-inducing activity in human serum.* J Appl Physiol 1959; 14: 943-946) usando plasma humano citratado. Nesses ensaios, amostras de plasma (90 µl) foram misturadas com quantidades diferentes de polissacarídeo sulfatado em NaCl a 0,15M (10 µ) e aquecidas por 60 segundos a 37°C, e então 100 µl de reagente de aPTT preaquecido (caulim e uma mistura de extratos de fosfolípídeo de cérebro de coelho e soja) (Celite-Biolab) foram adicionados e incubados por 2 minutos a 37°C. CaCl<sub>2</sub> a 0,025 M preaquecido (100 µl) foi então adicionado e o aPTT foi registrado como o tempo necessário para a formação do coágulo em um coagulômetro (Amelung KC4A).

10 *e) Atividade Anticoagulante Baseada no Tempo de Recalcificação*

Ensaio de coagulação foram realizados em placas de 96 poços. Primeiro, amostras de plasma humano citratado (90 µl) foram misturadas com quantidades diferentes de polissacarídeos sulfatados em NaCl a 0,15M (10 µl) e aquecidas por 60 segundos a 37°C. Então, 100 µl de CaCl<sub>2</sub> a 0,25M foram adicionados e a transmitância a 405 nm foi registrada por 720 segundos (leitora de placa Thermo-max, Molecular Devices). O tempo para formação do coágulo foi registrado quando a transmitância atingiu 5%.

15 *f) Tempo de Recalcificação Ex-vivo*

Os ensaios de recalcificação foram realizados com plasma de rato. Ratos Wistar (de ambos os sexos, peso corporal de ~250 g) foram anestesiados com uma injeção intramuscular de 100 mg/kg de peso corporal de Ketamina (Cristália, São Paulo, Brasil) e 16 mg/kg de peso corporal de xilazina (Bayer AS, São Paulo, SP, Brasil). Foram seguidas as orientações institucionais para cuidado e experimentação com animal. A artéria carótida direita foi canulada; uma solução de polissacarídeo sulfatado foi injetada e deixada circular por 10 minutos. Amostras de sangue (~1,0 ml) foram coletadas em citrato de sódio a 2,8% (9 partes de sangue:1 parte de citrato). O plasma foi separado através de centrifugação (1.600 x g por 10 minutos), diluído em 3 volumes de tampão TS (Tris/HCl 0,02M, NaCl 0,15 M, pH 7,4), aquecido por 60 segundos a 37°C e então 100 µl de CaCl<sub>2</sub> a 0,2M foram adicionados. A transmitância a 405 nm foi registrada por 720 segundos. O

tempo para formação de coágulo foi registrado quando a transmitância atingiu 5%.

*g) Inibição da Trombina ou Fator Xa por Antitrombina e Co-fator II da Heparina na Presença de Polissacarídeos Sulfatados*

5 As incubações foram realizadas em placas de 96 cavidades. As concentrações finais de reagentes incluíam antitrombina 10 nM ou co-fator II da heparina a 15 nM, trombina ou fator Xa 2 a nM (Haematologic Technologies Inc., Vermont, USA) e 0-1.000 µg/ml de polissacarídeo sulfatado em 40 µl de tampão TS/PEG (Tris/HCl a 0,02M, NaCl a 0,15M e 1,0 mg/ml de polietileno glicol 8.000, pH 7,4). Trombina ou fator Xa foi adicionado por último para iniciar a reação. Após 60 segundos a 37°C, 25 µl de substrato cromogênico (S-2238 para trombina ou S-2222 para fator Xa) (Chromogenix AB, Mondal, Suécia) foram adicionados, e a absorbância a 405 nm foi registrada por 120 segundos. A taxa de mudança de absorbância foi proporcional à  
10 atividade da trombina ou fator Xa restante na incubação. Nenhuma inibição aconteceu em experimentos controle onde trombina ou fator Xa foi incubado com antitrombina ou co-fator II da heparina na ausência de polissacarídeo sulfatado. Ainda, nenhuma inibição foi observada quando trombina ou fator Xa foi incubado com polissacarídeo sulfatado sozinho, mesmo acima da faixa de concentrações testada.  
15  
20

*h) Ativação de Fator XII na Presença de Polissacarídeos Sulfatados*

Os ensaios para ativação de fator XII foram realizados em placas de 96 cavidades. Plasma humano citratado foi diluído em 3 volumes de tampão TS e amostras (40 µl) foram incubadas com concentrações diferentes de polissacarídeo sulfatado (30 µl). Após 60 segundos de incubação a  
25 37°C, foram adicionados 30 µL de substrato cromogênico (S-2302 a 0,3 mM) (Chromogenix AB, Mondal, Suécia) e a absorbância a 405 nm foi registrada por 300 segundos. O S-2302 é um substrato cromogênico para caliceína do plasma ativada por seu precursor pré-caliceína através da ação do fator XII  
30 ativado. O método para a determinação da atividade do fator XIIa é baseado na diferença em absorbância entre a p-nitroanilida formada e o substrato original. A taxa de formação de p-nitroanilida, isto é, o aumento em absor-

bância a 405 nm, é proporcional à atividade enzimática. Nenhuma ativação aconteceu em experimentos controle na ausência de polissacarídeo sulfatado.

Foi observado que o sulfato de dextrana ativa o fator XII quando testado no ensaio acima. O efeito está associado com o tamanho molecular do polissacarídeo. Apenas sulfato de dextrana com peso molecular acima de 8 kDa ativa o fator XII.

*i) Avaliação das Propriedades Antitrombóticas*

*Trombose Venosa*

A atividade antitrombótica em ratos, foi investigada com uso de tromboplastina de cérebro de coelho como estímulo trombogênico. Foram seguidas as orientações institucionais para cuidado e experimentação com animais. Ratos Wistar (ambos os sexos, peso corporal de ~250 g) foram anestesiados com uma mistura de ketamina e xilazina, como já descrito. A veia cava inferior foi cuidadosamente dissecada. Um segmento de 0,7 cm foi preparado começando logo abaixo da ramificação da veia renal direita e se estendendo até depois da veia renal esquerda, que foi ligada. Doses diferentes dos polissacarídeos sulfatados foram administradas intravenosamente 1 cm abaixo da sutura solta distal e deixada circular por 5 minutos. Então, tromboplastina de cérebro (Biolab-Merieux AS, Rio de Janeiro, Brasil) (5 mg/kg de peso corporal) foi lentamente injetada intravenosamente 1 cm abaixo da sutura solta distal e o segmento venoso foi fechado, primeiro a sutura proximal, depois a sutura distal. Após 20 minutos de estase, o trombo formado dentro do segmento ocluído foi cuidadosamente retirado, lavado com NaCl a 0,15M, posto em estufa por 1 hora a 60°C e pesado.

*Trombose no Shunt Arteriovenoso*

A atividade antitrombótica no modelo do shunt arteriovenoso foi investigada conforme descrito por Umetzu T e Sanai K. *Effect of 1-methyl-2-mercapto-5-(3-pyridyl)-imidazole (KC-6141), an anti-aggregating compound on experimental thrombosis in rats*; *Thromb Haemost*, 1979; 39: 74-83. Ratos Wistar (ambos os sexos, peso corporal de ~250 g) foram anestesiados com uma mistura de Ketamina e xilazina, como já descrito. Através de uma inci-

são longitudinal na pele da traquéia ao longo da linha mediana, a veia jugular esquerda e a artéria carótida direita foram ligadas através de um shunt extracorpóreo consistindo em dois pedaços de 6 cm de tubo de polietileno (~1,3 mm de diâmetro interno). Um fio de seda com comprimento de 5 cm foi esticado no shunt, deixando 1 cm para fora do tubo. O shunt foi preenchido com uma solução de heparina não fracionada (0,05 mg/kg de peso corporal, que está abaixo da dose antitrombótica da heparina). Animais controle onde o shunt foi preenchido com solução salina, mostraram um trombo com peso similar ao controle com heparina não fracionada. Após 15 minutos de circulação do sangue através do shunt (e 20 minutos após administração intravascular do polissacarídeo sulfatado), o fluxo sanguíneo foi parado no lado arterial do tubo e o shunt extracorpóreo foi isolado. A partir deste segmento, o fio de seda revestido com o trombo foi cuidadosamente puxado pelo fio que permaneceu externo. O peso líquido do trombo foi imediatamente determinado.

#### *Trombose Arterial*

A trombose da artéria carótida foi induzida usando uma modificação do método de Eitzman (Eitzman DT, Westrick RJ, Nabel EG. *Plasminogen activator inhibitor-1 and vitronectin promote vascular thrombosis in mice*. Blood 2000; 95: 577-580). Ratos Wistar (ambos os sexos, peso corporal de ~250 g) foram anestesiados com uma mistura de ketamina e xilazina, conforme já descrito, e presos na posição de supino. A artéria carótida direita foi isolada através de uma incisão cervical na linha média e foi aplicada uma sonda de ultrassom para medição do fluxo (modelo 0,5 VB; Transonic Systems, Inc., Ithaca, Nova York, USA). Concentrações diferentes de polissacarídeos sulfatados foram lentamente injetadas na veia cava. Cinco minutos após a injeção dos polissacarídeos sulfatados, foi injetado corante rosa de bengala (80 mg/kg de peso corporal; Fisher Scientific Co., Fair Lawn, Nova Jersey, USA) e a artéria carótida foi iluminada com um feixe de laser de 540 nm, 1,5 mW (Melles Griot Inc., Carlsbad, Califórnia, USA) a uma distância de 5 cm. O fluxo na artéria carótida foi monitorado até ocorrer oclusão completa.

### j) Efeito de Sangramento

Ratos Wistar (ambos os sexos, peso corporal ~250 g) foram anestesiados com uma mistura de Ketamina e xilazina, conforme já descrito. A artéria carótida direita foi canulada e doses diferentes de polissacarídeos foram infundidas e deixadas circular por 5 minutos. A cauda dos ratos foi cortada 3 mm a partir da ponta e imersas em 40 ml de água destilada em temperatura ambiente. A perda de sangue foi determinada 60 minutos depois através da medição da hemoglobina na água usando um método espectrofotométrico (Zancan P, Mourão PAS. *Venous and arterial thrombosis in rat models: dissociation of the antithrombotic effects of glycosaminoglycans*. Blood Coagul Fibrin 2004; 15: 45-54). O volume de sangue foi deduzido a partir de uma curva-padrão com base na absorbância a 540 nm.

### k) Análises Estatísticas

Dados expressos como média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM) foram analisados pelo programa de computador Microcal Origin versão 3.5.

### Análise dos Resultados

#### a) Tamanho Molecular Versus Atividade Anticoagulante da Galactana Sulfatada

A galactana sulfatada nativa tem um peso molecular significativamente maior do que as preparações de heparina não fracionada (Figura 1A), e atividade anticoagulante similar quando testada através do aPTT (Figura 1B). Ambas têm atividade inibidora quando testadas em ensaios de inibição das protease de coagulação (Figura 2). Os dois compostos foram bastante similares para inibição da trombina mediada por antitrombina ou cofator II da heparina (Figuras 2A e C), embora a galactana sulfatada não seja capaz de atingir o mesmo efeito inibitório que heparina não fracionada para a inibição de fator Xa pela antitrombina (Figura 2B). No entanto, a evidente diferença em tamanho molecular entre heparina não fracionada e a galactana sulfatada nativa torna a comparação difícil. Então, foram preparados derivados da galactana sulfatada nativa com pesos moleculares próximos à heparina não fracionada e heparina de baixo peso molecular (Figura 1A), usando hidrólise ácida branda e separação através de gel filtração. Espec-

troscopia de  $^1\text{H}$  RMN mostrou que esses derivados têm a mesma estrutura química e padrão de sulfatação que a galactana nativa. A redução do peso molecular da galactana sulfatada nativa resulta em uma redução substancial na atividade anticoagulante (Figura 1B). No entanto, os fragmentos de ~14 e  
5 ~5 kDa também apresentam uma ação anticoagulante qualitativamente diferente quando comparados com heparina não fracionada e heparina de baixo peso molecular, respectivamente. A heparina não fracionada é mais ativa do que o fragmento de ~14 kDa em ambos ensaios (Figura 1B e Figura 2), enquanto heparina de baixo peso molecular é mais ativa do que o fragmento  
10 de ~5 kDa apenas nos ensaios de inibição das protease. Então, o fragmento de ~5 kDa provavelmente interage de uma maneira diferente da heparina de baixo peso molecular para atingir seu efeito inibitório.

*b) Ação da Galactana Sulfatada sobre Trombose Arterial e Venosa*

A galactana sulfatada intacta previne trombose em baixas concentrações no modelo venoso (Figura 3A), é inativa no shunt arteriovenoso (Figura 3C) e possui baixa atividade no modelo arterial (Figura 3D). Os efeitos antitrombóticos da galactana sulfatada nativa e heparina não fracionada no modelo venoso estão provavelmente associados com suas ações anticoagulantes, uma vez que trombose venosa é normalmente associada com  
15 ativação da coagulação sangüínea e a ação anticoagulante é preponderante neste modelo. A galactana sulfatada nativa não inibe agregação plaquetária, uma etapa crítica da trombose arterial desenvolvida por lesão endotelial, e na trombose arteriovenosa desenvolvida por contato com uma superfície irregular. No entanto, é difícil comparar modelos de trombose nas Figuras  
20 3A, C e D uma vez que a heparina não fracionada e a galactana sulfatada têm pesos moleculares muito diferentes. A estratégia foi testar os derivados de baixo peso molecular obtidos da galactana sulfatada nativa, próximos da heparina não fracionada e heparina de baixo peso molecular. Com uma redução no peso molecular, doses maiores foram requeridas para inibir trombose arterial (Figura 3D). Surpreendentemente, com o fragmento de ~5 KDa, o efeito duplo no modelo de trombose venosa visto com a galactana sulfatada intacta foi perdido (Figura 3B). A dissociação das ações anticoagulante e  
30

antitrombótica foi observada nos experimentos com o fragmento de ~5 kDa, que exibe um efeito antitrombótico máximo em doses similares às da galactana sulfatada nativa, retendo esta ação em doses altas.

c) *A Galactana Sulfatada Ativa Fator XII*

5                    Nos experimentos seguintes, a atenção foi concentrada na ativação do fator XII, uma vez que o fator XII é um componente do sistema de coagulação que é ativado por contato com superfícies negativas como sulfato de dextrana. Claramente, a galactana sulfatada nativa ativa o fator XII, mas a redução de tamanho diminui este efeito indesejado (Figura 4). É importante notar que o fragmento de ~5 kDa não foi capaz de ativar o fator XII mesmo em doses altas. No entanto, nem o ensaio da Figura 4 nem o ensaio de aPTT (Figura 1B) são completamente adequados para avaliação da ação da galactana sulfatada no sistema de coagulação. Em ensaios aPTT, altas concentrações de fosfolipídeos estão presentes e podem obstruir a ação de galactana sulfatada na ativação do fator XII. Como uma alternativa, foi utilizado um ensaio de tempo de recalcificação, sem adição de fosfolipídeos (Figura 5A). Claramente, a heparina não fracionada tem uma ação anticoagulante potente, enquanto a galactana sulfatada tem um efeito duplo (até ~8 µg/ml, um efeito anticoagulante, indicado por  $T_1/T_0 > 1$ ; acima de 8 µg/ml, um efeito pró-coagulante,  $T_1/T_0 < 1$ ). O fragmento de ~14kDa tem um efeito similar ao polissacarídeo nativo, mas em uma concentração diferente. Esses resultados estão de acordo com a proposta de que a galactana sulfatada nativa tem um efeito duplo sobre a coagulação, inibindo as proteases da coagulação em doses baixas e em doses altas predomina o efeito sobre a ativação do fator XII predomina.

25                    O experimento da Figura 5A não mostra uma relação direta entre o efeito sobre o fator XII *in vitro* e o efeito da galactana sulfatada sobre trombose venosa *in vivo* (Figura 3A). Para associar esses dois efeitos, a galactana sulfatada foi injetada intravenosamente, como em ensaios de trombose venosa. O sangue foi coletado e o tempo de recalcificação foi testado *ex vivo* (Figura 5B). O efeito duplo da galactana sulfatada foi claro, em contraste com aquele observado para heparina não fracionada. A galactana sul-

fatada exibiu um efeito anticoagulante nas mesmas concentrações observadas nos ensaio de trombose venosa, enquanto seu efeito pró-coagulante aconteceu em concentrações onde o efeito antitrombótico está ausente.

*d) Tempo de Sangramento*

- 5 Na Figura 6, foi medido o efeito dos polissacarídeos sulfatados sobre o tempo de sangramento. Neste modelo, a heparina não fracionada aumenta o tempo de sangramento significativamente, enquanto que a heparina de baixo peso molecular, a galactana sulfatada nativa e o fragmento de ~5 kDa não tiveram nenhum efeito. Em particular, a galactana sulfatada da
- 10 presente invenção (fragmento de ~5 kDa) apresentou resultados mais satisfatórios em relação à heparina de baixo peso molecular. Os dados também indicam que o mecanismo anticoagulante e a ação antitrombótica do efeito hemorrágico da galactana sulfatada da presente invenção estão dissociados.

## REIVINDICAÇÕES

1. Galactana sulfatada com atividade antitrombótica, caracterizada pelo fato de que apresenta baixo peso molecular e compreende a estrutura de repetição (-4- $\alpha$ -D-Galp-1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-Galp-1 $\rightarrow$ ), sendo que as unidades  $\alpha$  totais compreendem resíduos de  $\alpha$ -D-galactopiranosose 2,3-di-O-sulfatada e resíduos de  $\alpha$ -D-galactopiranosose 2-O-sulfatada.

2. Galactana sulfatada de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o peso molecular está na faixa de 2 a 10 kDa.

3. Galactana sulfatada de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o peso molecular é de 5 kDa.

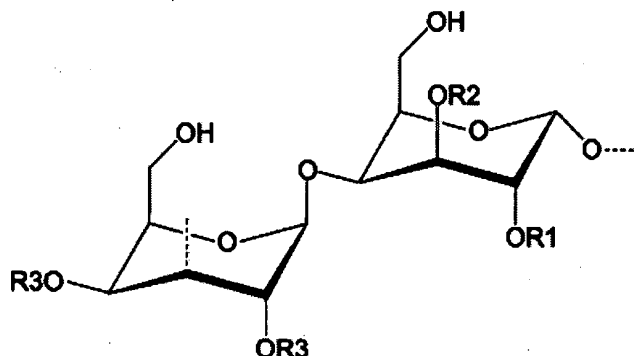
4. Galactana sulfatada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de ser obtida a partir de alga vermelha.

5. Galactana sulfatada de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a alga vermelha é do gênero *Botryocladia*.

6. Galactana sulfatada de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que a alga vermelha é *Botryocladia occidentalis*.

7. Galactana sulfatada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que as unidades  $\alpha$  totais compreendem pelo menos um terço de resíduos de  $\alpha$ -D-galactopiranosose 2,3-di-O-sulfatada e pelo menos um terço de resíduos de  $\alpha$ -D-galactopiranosose 2-O-sulfatada.

8. Galactana sulfatada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que a estrutura de repetição apresenta a fórmula:



em que

R1, R2 e R3 = H ou  $\text{SO}_3^-$ ;

R1 como  $\text{SO}_3^- \geq 66\%$ ; e

R2 como  $\text{SO}_3^- \geq 33\%$ .

5                    9. Galactana sulfatada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de ser utilizada no tratamento de trombose arterial ou venosa em um ser humano ou animal.

10                   10. Galactana sulfatada de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de ser administrada por via intravenosa ou subcutânea ao ser humano ou animal.

11. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende a galactana sulfatada como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

15                   12. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de ser utilizada no tratamento ou profilaxia de trombose arterial ou venosa em um ser humano ou animal.

13. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de ser administrada por via intravenosa ou subcutânea ao ser humano ou animal.

20                   14. Uso de uma galactana sulfatada como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de ser no tratamento ou profilaxia de trombose arterial ou venosa em um ser humano ou animal.

25                   15. Uso de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a galactana sulfatada é administrada por via intravenosa ou subcutânea ao ser humano ou animal.

16. Uso de uma galactana sulfatada como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma composição farmacêutica como definida em qualquer uma das reivindicações 11 a 13.

30                   17. Uso de uma galactana sulfatada como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de ser como um substituto de heparina no tratamento ou profilaxia de trombose arterial ou

venosa em um ser humano ou animal.

18. Método para tratamento ou profilaxia de trombose venosa em um ser humano ou animal, caracterizado pelo fato de que compreende administrar 0,05 a 5 mg/kg de peso corporal da galactana sulfatada como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10 ao dito ser humano ou animal.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que compreende administrar 0,25 mg/kg de peso corporal da galactana sulfatada como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10 ao dito ser humano ou animal.

20. Método para tratamento ou profilaxia de trombose arterial em um ser humano ou animal, caracterizado pelo fato de que compreende administrar 2 a 10 mg/kg de peso corporal da galactana sulfatada como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10 ao dito ser humano ou animal.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que compreende administrar 5 mg/kg de peso corporal da galactana sulfatada como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10 ao dito ser humano ou animal.

22. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 21, caracterizado pelo fato de que a administração é feita por via intravenosa ou subcutânea ao dito ser humano ou animal.



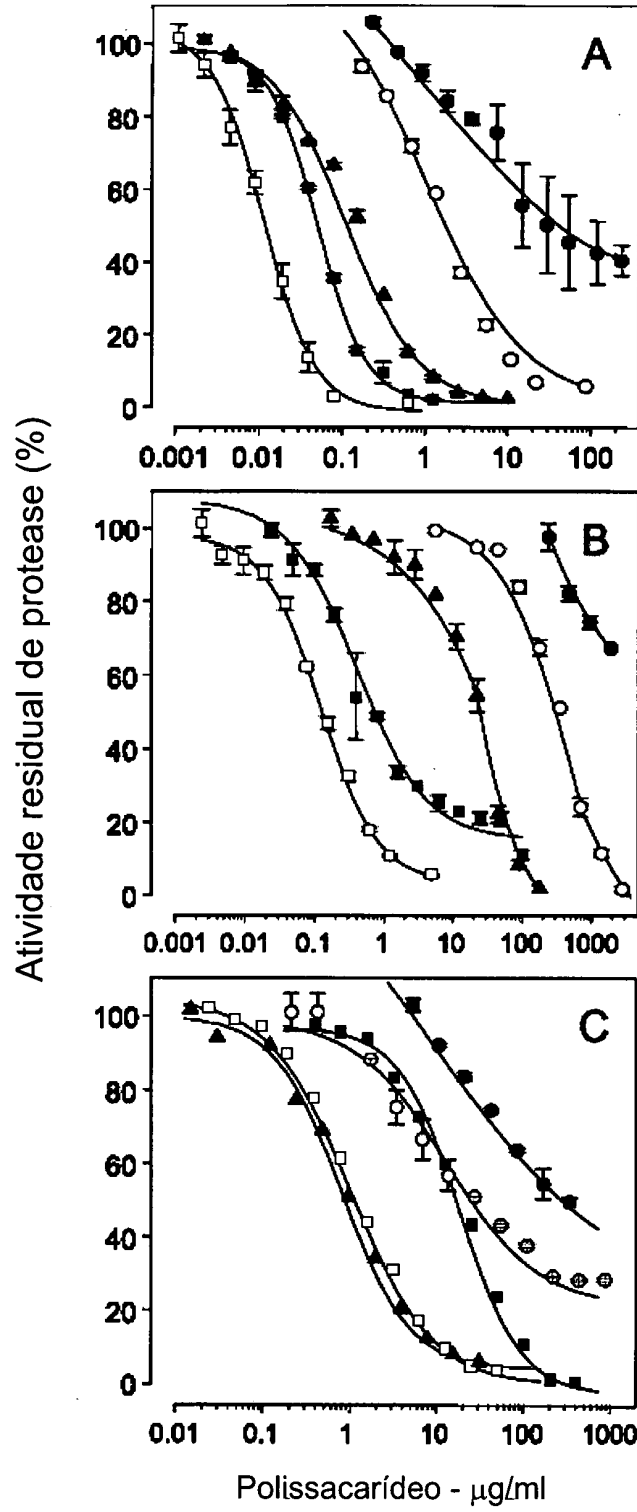


FIG 2

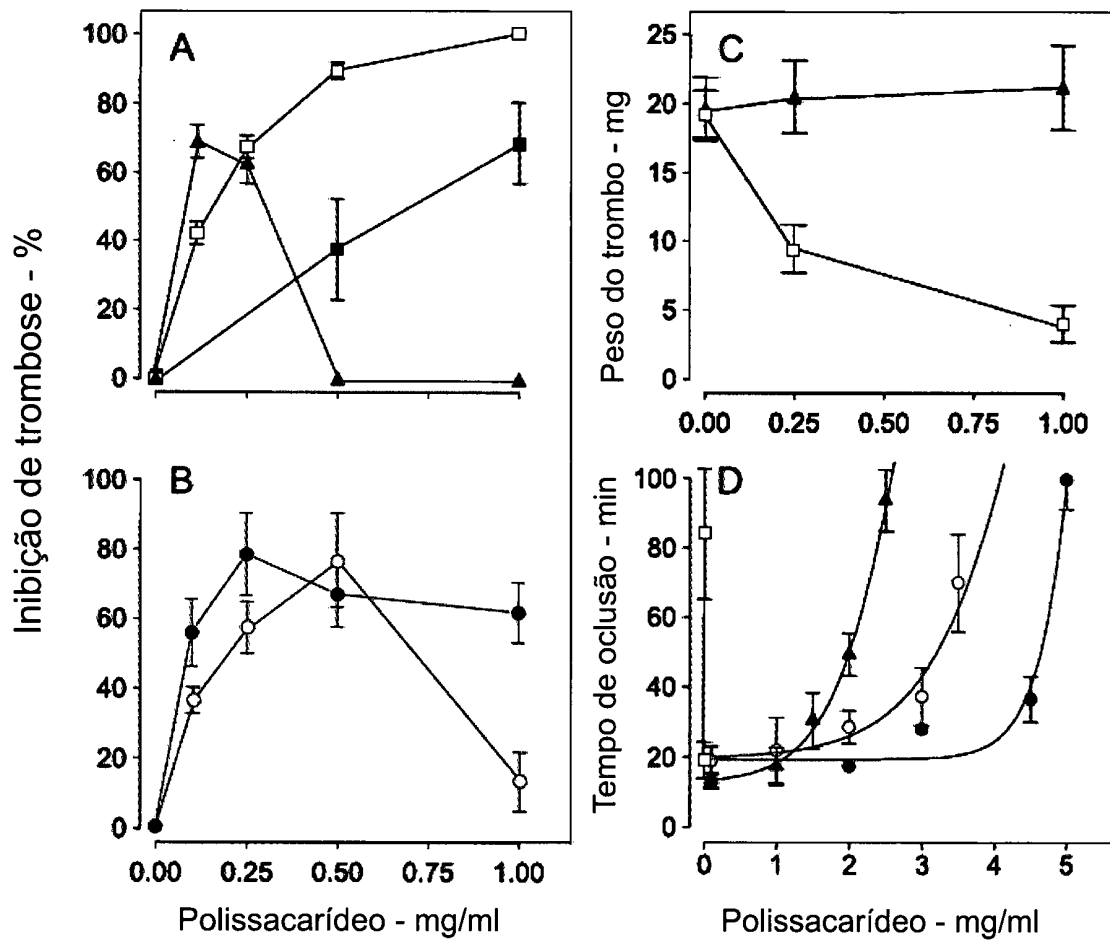


FIG 3

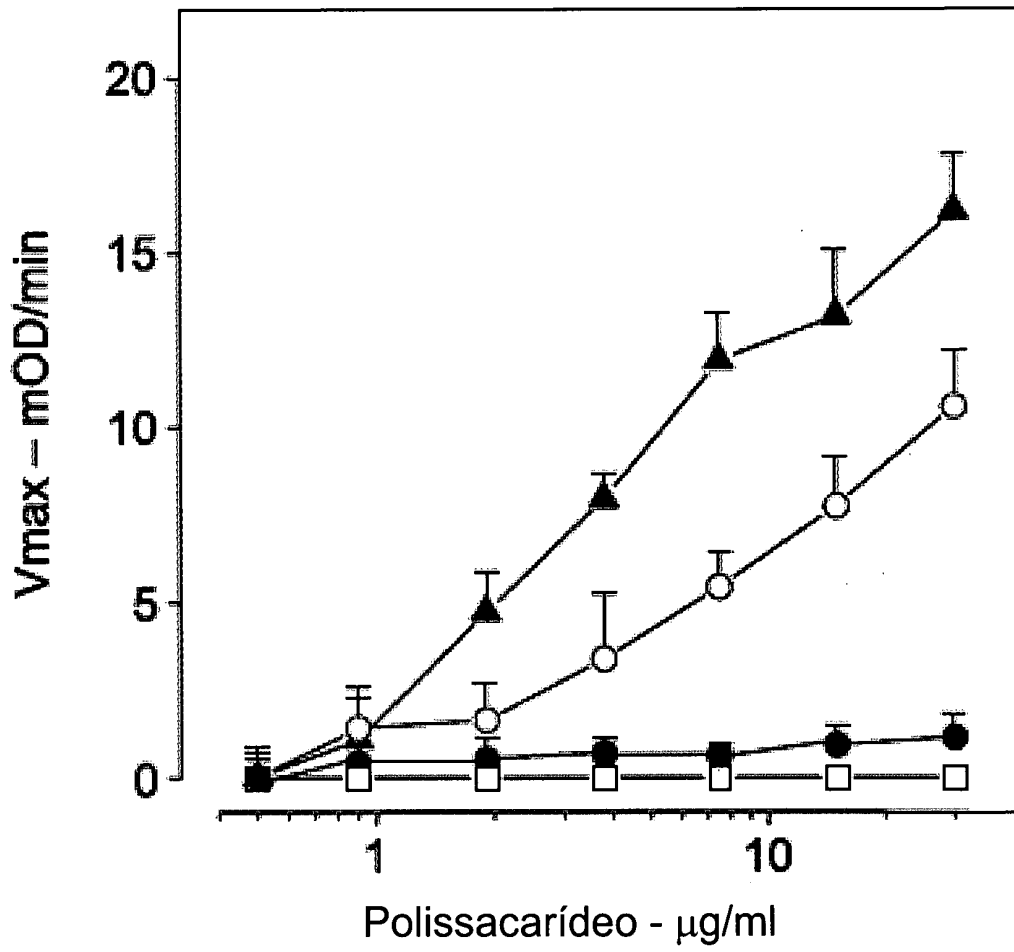


FIG 4

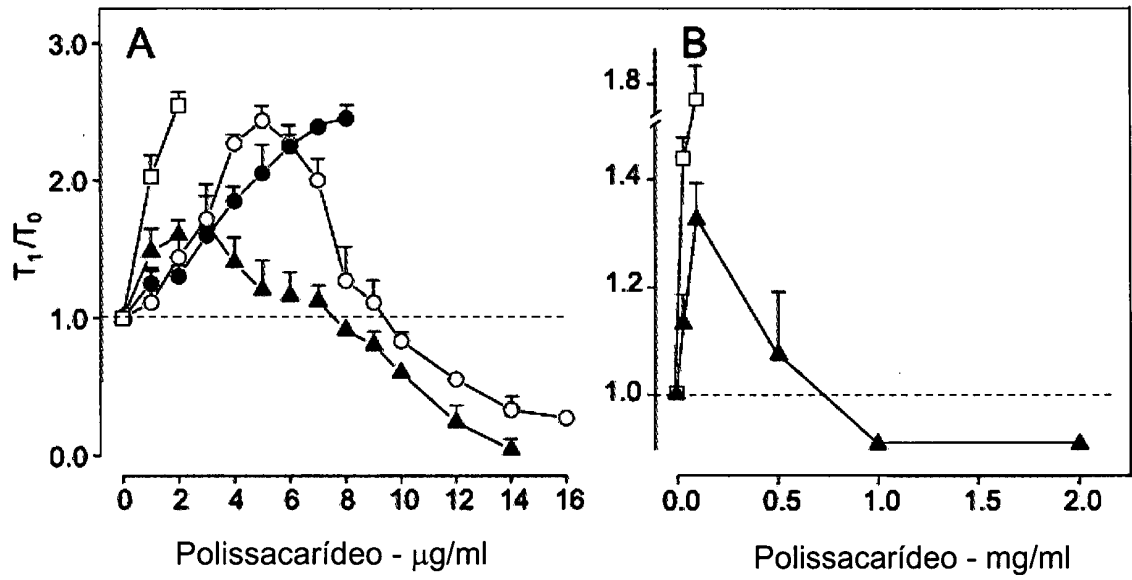


FIG 5

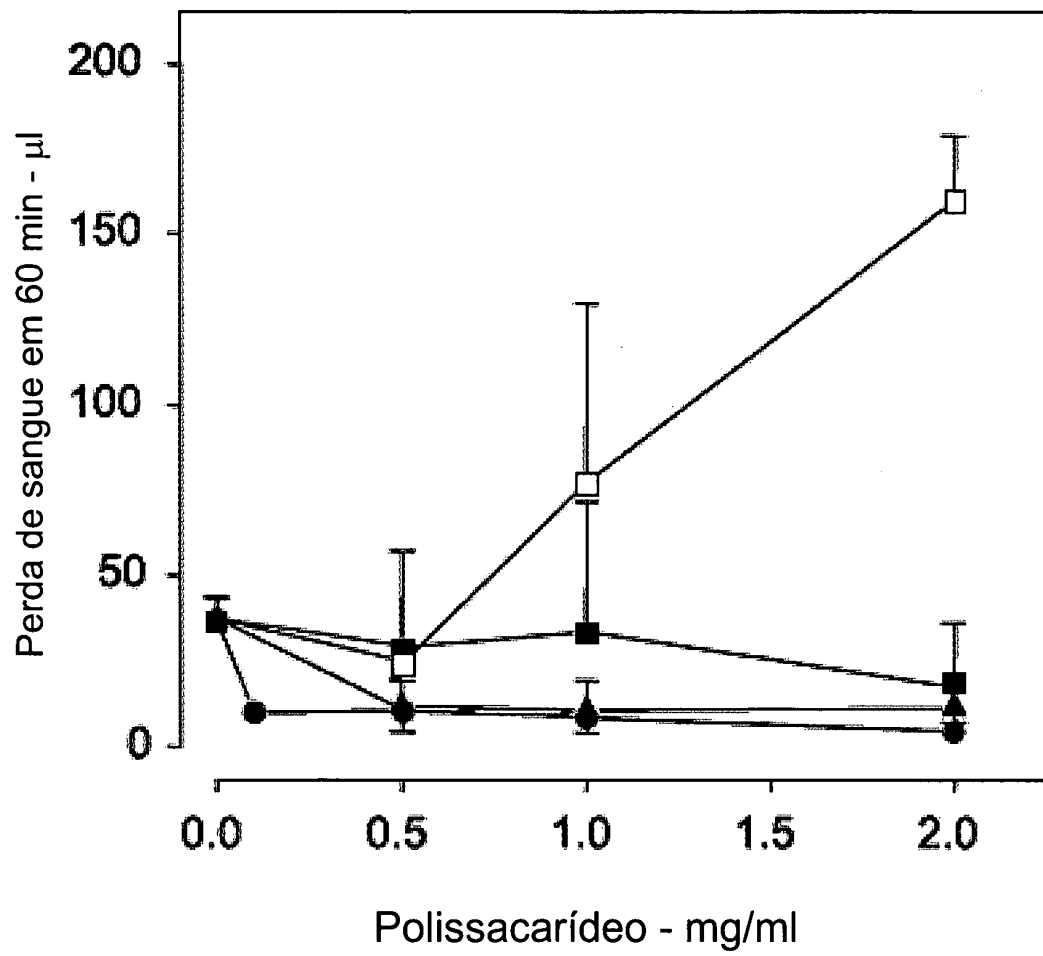


FIG 6

**RESUMO**

Patente de Invenção: "GALACTANA SULFATADA COM ATIVIDADE ANTITROMBÓTICA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, SEUS USOS E MÉTODO PARA TRATAMENTO OU PROFILAXIA DE TROMBOSE ARTERIAL OU VENOSA".

A presente invenção refere-se a galactanas sulfatadas de baixo peso molecular, preferivelmente obtidas de alga vermelha, que não apresentam efeito sobre a ativação do fator XII da cascata de coagulação, apresentando, porém, atividade heparinóide antitrombótica. As galactanas sulfatadas da presente invenção podem ser obtidas a partir de algas vermelhas, particularmente as algas do gênero *Botryocladia*, em especial as algas *Botryocladia occidentalis*.

A presente invenção também se refere a uma composição farmacêutica que compreende tais galactanas sulfatadas e ao uso das mesmas no tratamento ou profilaxia de trombose arterial ou venosa em um ser humano ou animal, podendo ser administradas por via intravenosa ou subcutânea.

Outro aspecto da presente invenção se refere ao uso de uma galactana sulfatada como substituto de heparina no tratamento ou profilaxia de trombose arterial ou venosa em ser humano ou animal, bem como ao método para tratamento ou profilaxia de trombose arterial ou venosa utilizando tais galactanas sulfatadas.