



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020011964-8 A2



(22) Data do Depósito: 15/06/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 10/05/2022

(54) **Título:** COMPOSIÇÃO DE HEPARINA NÃO FRACIONADA DE ALTO PESO MOLECULAR PARA AÇÃO ANTIVIRAL

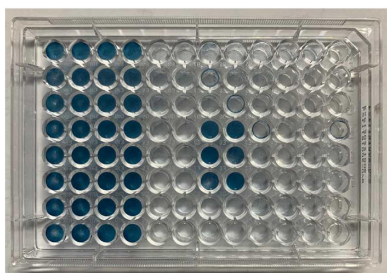
(51) **Int. Cl.:** A61K 31/727; A61P 31/14.

(52) **CPC:** A61K 31/727; A61P 31/14.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) **Inventor(es):** ANDREI MOROZ; EDISON LUIZ DURIGON; LENIZE DA SILVA RODRIGUES; MARCONE LIMA SOBREIRA; MARIA INÊS DE MOURA CAMPOS PARDINI; MATHEUS BERTANHA; RAFAEL RAHAL GUARAGNA MACHADO.

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÃO DE HEPARINA NÃO FRACIONADA DE ALTO PESO MOLECULAR PARA AÇÃO ANTIVIRAL. Trata-se de composição de heparina não fracionada de alto peso molecular cujo mecanismo farmacológico compreende um agente modulador na infecção por SARSCoV-2 tendo ação em proteínas de adesão e inibindo a clivagem viral. O uso da composição de heparina não fracionada de alto peso molecular compõe a diminuição da carga viral entre 90 a 100% em cópias virais/mL.



## **COMPOSIÇÃO DE HEPARINA NÃO FRACIONADA DE ALTO PESO MOLECULAR PARA AÇÃO ANTIVIRAL**

### **CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO**

**[001]** A presente patente de invenção trata de composição de heparina não fracionada de alto peso molecular para ação antiviral, especificamente, no tratamento da COVID-19 onde no presente invento, é aplicada como segundo uso, uma vez que, demonstra não só novidade, inventividade decorrente de inúmeras pesquisas e testes, bem como aplicação industrial, como efeito antiviral associado a efeito antitrombótico e baixa citotoxicidade às células humanas.

### **HISTÓRICO DA INVENÇÃO**

**[002]** Como é de conhecimento, as composições de heparina de alto peso molecular já estão descritas na literatura como vislumbrado no documento de nº. BR 10.2014.027804-4 que trata de processo de desenvolvimento de heparina não fracionada de alto peso molecular, heparina não fracionada de alto peso molecular e usos da mesma, produzida por filtração por peso molecular em tubo de concentração e purificações moleculares utilizando heparina não fracionada (HNF) que possui um "pool" de moléculas de variados pesos moleculares (5000 a 33000 Da) e então elimina a fração de baixo peso, pois o filtro elimina as moléculas menores que 10000Da, restando heparina de alto peso molecular. Supracitado documento relata o novo uso da mesma para tratamento, controle, e prevenção de câncer metastático.

**[003]** No artigo 'Capila I, Linhardt RJ. *Heparin-protein interactions. Angew Chem Int Ed Engl*' 2002; 41:391-412. é apresentada todas as interações entre heparinas e heparan sulfato com as células e seu potencial antiviral, inibidor de adesão celular, regulador de inúmeras funções celulares. Há evidências recentes de que o tratamento com heparina reduz as metástases tumorais em camundongos, inibindo as interações das plaquetas mediadas por P-selectina com ligantes de mucina nas superfícies celulares do carcinoma.

**[004]** No artigo de Catani R., Bertini Júnior A., Pessa CJN, Gomes WJ, Lourenço DM, Nader HB, Dietrich CP, Branco JNR, Buffolo E. - "*High molecular weight heparin. An alternative in extracorporeal circulation surgery: an experimental study*" - Ver. Bras. Cir.

Cardiovasc 2001; 16:160-170 é relatado que isolou-se uma heparina de alto peso molecular (HAPM - peso modal de 25.000 Da), com 11 % de frações de HBPM (< 7.000 Daltons), para experiências "*in vitro*" e "*in vivo*", e comparou-se seu resultado como anticoagulante com a HNF (peso modal de 15.000 Daltons), com 21% de frações de HBPM. Os resultados mostraram atividade específica anticoagulante, por massa, superior quando comparada com a HNF tanto "*in vitro*", 273 ui/mg contra 181 ui/mg e TTPA mais elevado nas várias diluições, como "*in vivo*", em cães, durante CEC, comprovado pelo TCA, TTPA e heparinemia. A vida média da HNF foi de 60 minutos e acima de 90 minutos para a HAPM, na situação de experimentação. Conclui-se que a HAPM possa ser utilizada em seres humanos, para averiguação da sua melhor neutralização pela protamina e menor incidência de hemorragia intraoperatória.

**[005]** No artigo "*Pourianfar HR, Poh CL, Fecondo J, Grollo L. In vitro evaluation of the antiviral activity of heparan sulfate mimetic compounds against Enterovirus 71.*" Virus Res 2012; 169:22-29, revela que o enterovírus 71 (EV71) é o agente causador da febre aftosa (HFMD) e também pode causar complicações neurológicas fatais para as quais atualmente não há vacina ou medicamento antiviral aprovado. Apesar das sugestões de que os compostos do tipo sulfato de heparano (HS) sejam antivirais eficazes contra vários vírus, nenhuma pesquisa foi realizada para examinar seus efeitos no EV71. Portanto, este estudo teve como objetivo investigar o efeito anti-EV71 *in vitro* de miméticos do HS (heparina, sulfato de heparano e polissulfato de pentosano). Os resultados revelaram que todos os compostos exibiram ações antivirais significativas ( $p < 0,05$ ) contra o EV71 em concentrações inferiores a 250 µg/mL, em comparação ao controle de vírus e controle positivo, ribavirina. Entre os compostos, a heparina exibiu a atividade antiviral mais potente, pois 7,81 µg/mL impediram a infecção em mais de 90% ( $p < 0,05$ ). Os ensaios para estudar o modo de ação revelaram que todos os compostos eram capazes de exercer atividade antiviral através do impedimento da ligação viral às células. Além disso, alguns dos compostos podem inibir a replicação viral quando adicionados às células 1 h antes da infecção, mas nenhum reduziu significativamente a penetração viral. No geral, esta pesquisa revelou que os compostos miméticos do HS podem inibir a infecção pelo EV71 e que o HS pode estar envolvido nas interações das

células hospedeiras do EV71, pois a ligação do vírus às células hospedeiras foi significativamente prejudicada pelos compostos do tipo HS, mas não pela ribavirina. Assim, são necessárias investigações adicionais para descobrir os mecanismos moleculares subjacentes à ação anti-EV71 de compostos do tipo HS. Nossos experimentos também corroboram com essa hipótese.

**[006]** Com o advento da pandemia de COVID-19 que já causou milhões de casos confirmados e óbitos em todo o mundo, autópsias de pacientes com COVID-19 revelaram trombos na microvasculatura, sugerindo coagulação intravascular como uma característica proeminente da falência de órgãos nesses pacientes. Curiosamente, no COVID-19, a complacência pulmonar é preservada, apesar da hipoxemia grave, corroborando a hipótese de que a incompatibilidade da perfusão pode desempenhar um papel significativo no desenvolvimento de insuficiência respiratória '*Heparin therapy improving hypoxia in COVID-19 patients - a case series. preprint doi:* <https://doi.org/10.1101/2020.04.15.20067017> .

**[007]** O dímero D elevado é um preditor de gravidade e mortalidade em pacientes com COVID-19 e o uso de heparina (Heparina de Baixo Peso Molecular – Enoxaparina 0,5mg/kg a cada 24h em casos moderados e 0,5mg/kg de 12/12h em casos com piora clínica ou graves) durante a internação hospitalar tem sido associado à diminuição da mortalidade. Este estudo brasileiro foi realizado com uma série de 27 casos consecutivos de pacientes com Covid-19 em São Paulo - Brasil (não é um estudo controlado). Resultados: A relação PaO<sub>2</sub> / FiO<sub>2</sub> aumentou significativamente nas 72 horas após o início da anticoagulação, de 254 (± 90) para 325 (± 80), p = 0,013, e mais da metade dos pacientes receberam alta em casa em um tempo médio de 7,3 (± 4,0) dias. Metade dos pacientes sob ventilação mecânica foi extubada em 10,3 (± 1,5) dias. Os demais pacientes apresentaram melhora progressiva e não houve complicações hemorrágicas ou eventos fatais.

**[008]** Da mesma forma no artigo '*COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-up*'. JAC 27284 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.04.031>. (Paper) é possível vislumbrar que a doença de coronavírus 2019 (COVID-19), uma doença respiratória viral causada pela

grave síndrome respiratória aguda coronavírus 2 (SARS-CoV-2), pode predispor pacientes à trombose, tanto arterial quanto venosa, isso devido a inflamação excessiva, ativação plaquetária, disfunção endotelial e estase. Além disso, pacientes portadores de doença tromboembólica arterial ou venosa podem se contaminar com COVID-19, o que pode requerer manutenção ou implementação de terapia antitrombótica, o que leva a escolha dos melhores anticoagulantes nesta situação. Esta revisão sobre patogênese, epidemiologia, manejo e resultados de pacientes com COVID-19 que desenvolvem trombose venosa ou arterial e com doenças trombóticas preexistentes que desenvolveram COVID-19 ou mesmo aqueles que precisam de prevenção ou tratamento de sua doença trombótica durante a pandemia de COVID-19.

**[009]** Em suma, no artigo '*Lang J, Yang N, Deng J, et al. Inhibition of SARS pseudovirus cell entry by lactoferrin binding to heparan sulfate proteoglycans. PLoS One*'. 2011;6(8):e23710. doi:10.1371/journal.pone.0023710 foi relatado que a lactoferrina (LF) participa da resposta imune do hospedeiro contra a invasão do Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV), aumentando a atividade das células NK e estimulando a agregação e adesão de neutrófilos. Investiga ainda o papel do LF na entrada do pseudovírus SARS nas células HEK293E / ACE2-Myc. Os resultados revelam que a LF inibe a infecção por pseudovírus por SARS de maneira dependente da dose. Análises posteriores sugeriram que o LF foi capaz de bloquear a ligação da proteína spike às células hospedeiras a 4 ° C, indicando que o LF exercia sua função inibidora no estágio de ligação viral. No entanto, a LF não interrompeu a interação da proteína spike com a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), o receptor funcional da SARS-CoV. Estudos anteriores mostraram que a LF se coloca com os proteoglicanos de heparan sulfato de superfície celular amplamente distribuídos (HSPGs). O tratamento das células com heparinase ou heparina exógena impediu a ligação da proteína spike às células hospedeiras e inibiu a infecção por pseudovírus SARS, demonstrando que os HSPGs fornecem os locais de ligação para invasão de SARS-CoV na fase inicial de inserção.

**[010]** Diante de levantamentos do histórico de efeitos técnicos encontrados em heparinas de alto peso molecular e estado da técnica das composições para tratamento de COVID-19, não foram encontrados documentos que descrevem as heparinas de alto

peso molecular para tal aplicação, tampouco com os resultados obtidos nos estudos supracitados.

#### **TESTES 'IN VITRO' PARA O ESTABELECIMENTO DA AÇÃO ANTIVIRAL DA HEPARINA DE ALTO PESO MOLECULAR**

**[011] Técnica 'in vitro' padronizada para o estabelecimento da ação antiviral de potenciais medicamentos contra SARS-CoV-2.**

**[012]** Inicialmente, uma placa de cultura aderente de 96 poços (ver figura 1) é semeada com  $5 \times 10^4$  células/mL de Vero CCL-81, que consiste de uma linhagem oriunda de células de rim de macaco-verde africano (*Cercopithecus aethiops*), sendo a mesma amplamente utilizada para ensaios 'in vitro' com SARS-CoV-2. As células são mantidas em meio de cultura DMEM aditivado com 2% de soro fetal bovino (SFB) por 24-48h até alcançarem uma confluência de 80-90%.

**[013]** Neste momento, a placa de cultura está pronta para a infecção viral. Inicialmente, as células hospedeiras são incubadas com o medicamento (neste caso, a heparina de alto peso molecular em várias concentrações) por 1 hora. Em seguida é aplicada na mesma proporção (1:1) solução de vírus com MOI 0,02 por poço utilizando a cepa SARS-CoV-2/SP02/human/2020/BRA (MT350282). A mesma é mantida em incubação (adsorção viral) por 1 hora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, o sobrenadante é descartado e a solução teste contendo DMEM suplementado com SFB 2% sem medicamento (controle) e com medicamento (no caso, heparina de alto peso molecular em várias concentrações) é colocado no poço de cultura (100 µL por poço). Ressalta-se que, seguindo as recomendações da OMS, todas as etapas envolvendo a manipulação do SARS-CoV-2 foram realizadas no laboratório de biossegurança nível 3 (NB3+), localizado nas dependências do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo (ICB-USP).

**[014] Teste piloto "in vitro".**

**[015]** A heparina de alto peso molecular apresentou ação antiviral em um protocolo "in vitro" como teste de avaliação de fundamentação para a teoria de que as heparinas, incluindo esta deste estudo, apresentam papel modulador na infecção por SARS-CoV-2. Os resultados preliminares apontaram uma redução da carga viral em torno de 90%

neste modelo.

**[016]** O estudo utilizou placa de cultura celular com células de linhagem VERO infectadas com COVID-19 cepa brasileira, e tratadas com heparina não fracionada de alto peso molecular (100ug/mL) em comparação com heparina de baixo peso molecular (100ug/mL) por 3 dias. O ensaio foi realizado em duplicata uma única vez. Foi utilizado como controle meio de cultura sem o medicamento.

**[017]** Ao final do experimento observou-se que não ocorreu mortalidade das células hospedeiras após coloração com azul de tripano. Observa-se grande diferença visual entre os dois tratamentos, podendo-se inferir alguma atividade antiviral. Confirmação por RT-PCR demonstrou diferença de 90 a 100% de carga viral entre o grupo tratado com o medicamento heparina não fracionada de alto peso molecular em comparação com o grupo controle e com o grupo tratado com heparina de baixo peso molecular.

**[018]** Após 72h da infecção com a carga viral de controle com  $10^8$  cópias virais/mL, os resultados obtidos foram os seguintes:

- (i) heparina de alto peso molecular 250µg/mL com carga viral de  $3,6 \times 10^6$  cópias virais/mL;
- (ii) heparina de alto peso molecular 125µg/mL com carga viral de  $2,4 \times 10^6$  cópias virais/mL; e
- (iii) heparina de alto peso molecular 62,5µL/mL com carga viral de  $3,2 \times 10^6$  cópias virais/mL.

**[019]** Foi representada uma redução comparativa com o controle de 3 logs ou 9.9 Ct (*cycle threshold*).

#### **OBJETIVOS DA INVENÇÃO**

**[020]** Diante do exposto, é objetivo desta invenção apresentar a composição de heparina de alto peso molecular, mais especificamente voltada a seu segundo uso, em especial à ação antiviral contra cepa brasileira do vírus causador da doença COVID-19. associada a efeito antitrombótico e baixa citotoxicidade às células humanas, sendo, assim, uma importante solução médica suplementar para o controle de óbitos durante a pandemia.

#### **DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

[021] A complementar a presente descrição de modo a obter uma melhor compreensão das características do presente invento, acompanha a descrição, em anexo, uma imagem fotográfica, onde, de maneira exemplificada, embora não limitativa, se representou:

[022] a figura 1 representa uma imagem fotográfica e em vista superior da placa de cultura aderente.

### **DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO**

[023] A presente patente de invenção se refere à “COMPOSIÇÃO DE HEPARINA NÃO FRACIONADA DE ALTO PESO MOLECULAR PARA AÇÃO ANTIVIRAL E RESPECTIVO USO”, foi especialmente desenvolvida para atuar no efeito técnico terapêutico contra o COVID-19. O uso da composição de heparina não fracionada de alto peso molecular da presente invenção apresenta diminuição da carga viral de 90 a 100% sem promover citotoxicidade, podendo apontar para um possível alvo terapêutico com dupla função, antiviral e antitrombótica. O mecanismo farmacológico de funcionamento do alcance de heparina de alto peso molecular contra o coronavírus 2019, ora desenvolvido, apresentou ação em proteínas de adesão ou clivagem viral.

[024] Tomando por base após 72h da infecção com a carga viral de controle com 108 cópias virais/mL, os resultados obtidos foram os seguintes:

- Heparina de alto peso molecular 250µg/mL com carga viral de  $3,6 \times 10^6$  cópias virais/mL;
- Heparina de alto peso molecular 125µg/mL com carga viral de  $2,4 \times 10^6$  cópias virais/mL;
- Heparina de alto peso molecular 62,5µg/mL com carga viral de  $3,2 \times 10^6$  cópias virais/mL.

[025] Adicionalmente, informa-se que foram realizados levantamentos do histórico de efeitos técnicos encontrados em heparinas de alto peso molecular e estado da técnica das composições para tratamento de COVID19 e não foram encontrados documentos que descrevem as heparinas de alto peso molecular para tal aplicação, tampouco com os resultados obtidos no desenvolvimento supracitado.

[026] É certo que quando o presente invento for colocado em prática, poderão ser introduzidas modificações, sem que isso implique afastar-se dos princípios fundamentais que estão claramente substanciados no quadro reivindicatório, ficando assim entendido que a terminologia empregada não teve a finalidade de limitação.

#### Referências

1. Gillim-Ross L, Taylor J, Scholl DR, Ridenour J, Masters PS, Wentworth DE. Discovery of novel human and animal cells infected by the severe acute respiratory syndrome coronavirus by replication-specific multiplex reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 2004;42(7):3196–206.
2. Chu H, Chan JF, Yuen TT, Shuai H, Yuan S, Wang Y, et al. Comparative tropism , replication kinetics , and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations , transmissibility , and laboratory studies of COVID-19 : an observational study. *The Lancet Microbe* [Internet]. 2020;5247(20). Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30004-5](http://dx.doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30004-5)
3. Harcourt J, Tamin A, Lu X, Kamili S, Sakthivel SK, Murray J et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from patient with 2019 novel coronavirus disease, United States. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(6).
4. Kaye M, Druce J, Tran T, Kostecky R, Chibo D, Morris J, et al. SARS-associated Coronavirus Replication in Cell Lines. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(1):128–33.
5. World Health Organization (WHO). *Manual de segurança biológica em laboratório*. World Health Organization (WHO) Geneva: WHO, 2004. Disponível em: 2004; acessado em <https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/BisLabManual3rdwebp ort.pdf?ua=1>. Acesso em: 10/05/2020.

REIVINDICAÇÕES

- 1) **“COMPOSIÇÃO DE HEPARINA NÃO FRACIONADA DE ALTO PESO MOLECULAR PARA AÇÃO ANTIVIRAL”**, caracterizado por mecanismo farmacológico do alcance da heparina não fracionada de alto peso molecular compreender um agente modulador na infecção por SARS-CoV-2 tendo ação em proteínas de adesão e inibindo a clivagem viral.
- 2) **“COMPOSIÇÃO DE HEPARINA NÃO FRACIONADA DE ALTO PESO MOLECULAR PARA AÇÃO ANTIVIRAL”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ação em proteínas de adesão pela heparina não fracionada de alto peso molecular apresentar diminuição da carga viral na faixa de 90 a 100% em cópias virais/mL causadoras da doença COVID-19.
- 3) **“COMPOSIÇÃO DE HEPARINA NÃO FRACIONADA DE ALTO PESO MOLECULAR PARA AÇÃO ANTIVIRAL”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por heparina de alto peso molecular de 250µg/mL apresentar carga viral de  $3,6 \times 10^6$  cópias virais/mL.
- 4) **“COMPOSIÇÃO DE HEPARINA NÃO FRACIONADA DE ALTO PESO MOLECULAR PARA AÇÃO ANTIVIRAL”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por heparina de alto peso molecular de 125µg/mL apresentar carga viral de  $2,4 \times 10^6$  cópias virais/mL.
- 5) **“COMPOSIÇÃO DE HEPARINA NÃO FRACIONADA DE ALTO PESO MOLECULAR PARA AÇÃO ANTIVIRAL”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por heparina de alto peso molecular de 62,5µg/mL apresentar carga viral de  $3,2 \times 10^6$  cópias virais/mL.
- 6) **“USO DA HEPARINA NÃO FRACIONADA DE ALTO PESO MOLECULAR”**, de acordo com a reivindicações 1 e 2, caracterizado por uso da heparina não fracionada de alto peso molecular prever ação antiviral no tratamento da COVID-19 associado ao efeito antitrombótico e baixa citotoxicidade às células humanas.

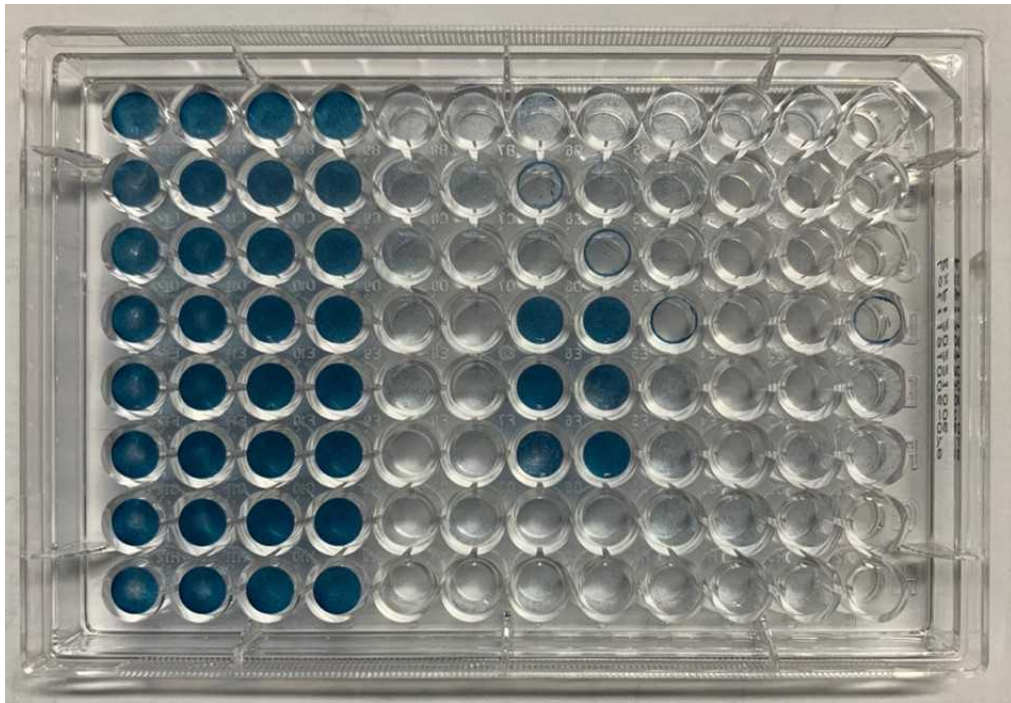


FIG. 1

RESUMO

**“COMPOSIÇÃO DE HEPARINA NÃO FRACIONADA DE ALTO PESO MOLECULAR PARA AÇÃO ANTIVIRAL”.**

Trata-se de composição de heparina não fracionada de alto peso molecular cujo mecanismo farmacológico compreende um agente modulador na infecção por SARS-CoV-2 tendo ação em proteínas de adesão e inibindo a clivagem viral. O uso da composição de heparina não fracionada de alto peso molecular compõe a diminuição da carga viral entre 90 a 100% em cópias virais/mL.