



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

(21) BR 10 2012 025132-9 A2

(22) Data de Depósito: 02/10/2012  
(43) Data da Publicação: 19/08/2014  
(RPI 2276)



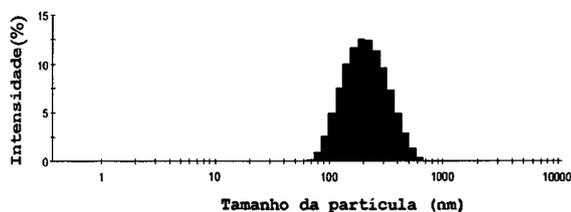
(51) Int.Cl.:  
A61K 9/51  
A61K 39/44  
A61P 35/00  
A61P 37/00  
B82Y 5/00

(54) Título: COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA NANOMÉTRICA E SEUS USOS

(73) Titular(es): FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP, UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFTGS

(72) Inventor(es): ADRIANA RAFFIN POHLMANN, ANDREA QUEIROZ MARANHÃO, DULCINEIA SAES PARRA ABDALLA, EDUARDO ANDRÉ BENDER, MARCELA FROTA CAVALCANTI, MARCIA DUARTE ADORNE, SILVIA STANISCUASKI GUTERRÉS, SORAYA MEGUMI KAZUMA

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA NANOMÉTRICA E SEUS USOS Composição farmacêutica contendo um nanofármaco capaz de reconhecer uma fração do LDL, excipientes e, opcionalmente, uma segunda molécula ativa, útil na prevenção e no diagnóstico de doenças cuja fisiopatologia envolva a resposta imuno-inflamatória como, por exemplo, aterosclerose, câncer, diabetes, artrite reumatóide, asma, doenças inflamatórias intestinais, infecções bacterianas e parasitárias, dentre outras



**COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA NANOMÉTRICA E SEUS USOS****CAMPO DA INVENÇÃO**

Esta invenção pertence ao campo da nano biotecnologia ou nano medicina. Especificamente, refere-se a uma  
5 composição farmacêutica nanométrica e seus usos na prevenção e no diagnóstico de doenças cuja fisiopatologia envolva a resposta imuno-inflamatória.

**ESTADO DA TÉCNICA**

A LDL ou lipoproteína de baixa densidade faz parte do  
10 grupo de lipoproteínas plasmáticas, ou seja, partículas formadas por uma parte central de lipídios hidrofóbicos, uma monocamada anfipática de fosfolípidos e apolipoproteínas que circundam os primeiros (revisado por Siqueira; Abdalla; Ferreira, 2006). Sua síntese é obtida a  
15 partir da hidrólise da VLDL, produzida e secretada pelo fígado, em uma etapa posterior à formação da IDL (lipoproteína de densidade intermediária) (Itabe, 2008). É uma partícula esférica com um diâmetro médio de, aproximadamente, 22 nm. Sua principal apolipoproteína é a  
20 apo B-100 (peptídeo de cadeia única com 500 kDa), possuindo ainda traços de apo-E (apolipoproteína E), e possui meia-vida plasmática de aproximadamente dois a três dias (revisado por Siqueira, Abdalla & Ferreira, 2006). É a principal responsável pelo transporte do colesterol sérico,  
25 possibilitado por sua ligação a receptores de LDL presentes na membrana plasmática, e pelo seu fornecimento a tecidos periféricos, regulando sua síntese nesses locais (Braunwald, 1999).

A LDL tem importante atuação nas doenças  
30 cardiovasculares, sendo considerada o principal fator de

risco para o seu desenvolvimento, quando em níveis elevados. A lipoproteína encontra-se ainda diretamente envolvida na aterogênese através da indução da formação de um fenótipo inflamatório, que atua na parede arterial (De Castellarnau *et al*, 2006), a partir de modificações espontâneas que podem ocorrer na íntima arterial ou na circulação sanguínea (Kovanen & Pentikäinen, 2003). Essas modificações na LDL nativa (LDL<sub>n</sub>) têm a capacidade de induzir a agregação das partículas de LDL<sub>m</sub> (LDL modificada), o que pode propiciar o acúmulo de lipídios na íntima arterial e o início de um processo aterogênico (Jayaraman; Gantz; Gursky, 2007; Molavi; Metha, 2004).

A LDL nativa pode sofrer diferentes tipos de modificações, podendo variar quanto ao tamanho, à carga elétrica, à estrutura e à composição (Hevonoja *et al*, 2000). *In vivo*, a LDL<sub>n</sub> pode ser modificada através de reações de oxidação, gerando a LDL oxidada (LDL<sub>ox</sub>), glicação, nitração e carbamilação (revisado por Faulin, Cavalcante & Abdalla, 2009) e *in vitro* gerando LDL acetilada (Tao *et al*, 2009). O grau dessas modificações pode variar de extensas oxidações a modificações mínimas, como a LDL eletronegativa [LDL(-)].

A LDL<sub>ox</sub> é a mais estudada dentro do contexto das lipoproteínas modificadas na aterosclerose, podendo ser formada por diferentes produtos de oxidação e em diversos graus de modificação e tendo sido encontrada em placas ateroscleróticas tanto em modelos animais como em humanos (Yla Herttuala, 1989), especialmente em pacientes com doença arterial coronariana (Suzuki *et al*, 2002). Pode também ser gerada *in vitro*, por exposição a íons de Cobre

(Stocker; Keaney, 2004), e tanto modificações oxidativas *in vitro* quanto *in vivo* podem induzir a fragmentação da apoB-100 (Matsuura; Hughes; Khamashta, 2008). Quando comparada à LDLn, se destacam sua ávida captação por receptores *scavenger*, promovendo o aumento do acúmulo de colesterol e a formação de células espumosas (Stocker; Keaney, 2004), a citotoxicidade aumentada e a atividade quimiotática para monócitos circulantes (Steinberg, 1989) e linfócitos T (McMurray; Parthasarathy; Steinberg, 1993), ocasionando a constante oxidação de LDL, por contínuo recrutamento de células inflamatórias (Stocker; Keaney, 2004). Foi ainda evidenciada, há quase duas décadas, por Stiko-Rahm et al (1992) uma ação favorecedora à progressão da aterosclerose, uma vez que a LDLox estimula a proliferação de células musculares lisas, além de apresentar imunogenicidade através da produção de autoanticorpos (Salonen et al, 1992).

Um outro exemplo de LDLm é a LDL glicada que pode ser obtida a partir de reações de glicação envolvendo a adição de um grupo aldeído, a partir da glicose por exemplo, a uma amina reativa na apoB-100 e está presente em altas concentrações em indivíduos diabéticos em relação a indivíduos sem o distúrbio metabólico (revisado por Faulin; Cavalcante; Abdalla, 2009).

A atenção deste trabalho é voltada para a LDL(-), que foi identificada através de cromatografia de troca iônica de plasma humano em estudo promovido por Avogaro et al, em 1988.

A LDL(-) é uma fração da LDL que possui uma carga mais negativa - que pode ser proporcionada por sua diferença de

composição - do que a LDL não modificada, a LDL nativa. A LDL(-) contém maior quantidade de óxidos de colesterol e dienos conjugados e níveis diminuídos de  $\alpha$ -tocoferol em comparação à LDLn (Chang et al, 1997), além de possuir um conteúdo aumentado de apolipoproteínas C-III e E, ácido siálico e ácidos graxos não-esterificados, de acordo com Sánchez-Quesada et al (2003), e maior susceptibilidade à oxidação (Cazzolato et al, 1991). Outra característica importante, é que a apo B-100 da LDL(-) possui uma modificação conformacional (Parasassi et al., 2001), dificultando seu reconhecimento pelo receptor B/E, por diminuição da sua afinidade de ligação ao receptor de LDL. Isso implica na possibilidade de aumento do tempo de circulação dessa lipoproteína, tornando-a mais prejudicial em relação a outras formas modificadas.

Essa LDL pode ser formada endogenamente através de diversos processos, tais como: oxidação, acetilação, glicação não-enzimática, enriquecimento em ácidos graxos não-esterificados, modificações enzimáticas por fosfolipases, reações cruzadas com hemoglobina e outros mecanismos ainda em estudo (Sánchez-Quesada et al., 2004). A LDL(-) pode ser determinada em eletroforese em gel de agarose, uma vez que possui uma migração eletroforética aumentada em relação à LDLn e diminuída em relação à LDLox (De Castellarnau et al., 2000).

Evidências acumuladas ao longo dos últimos 20 anos têm estabelecido que essa LDL eletronegativa desempenha um papel-chave na aterosclerose (Sánchez-Quesada et al., 2004), uma vez que as modificações sofridas por esta partícula são capazes de induzir o acúmulo de ésteres de

colesterol em macrófagos e a subsequente formação de células espumosas (Sánchez-Quesada et al., 2002). Além disso, estudos *in vivo* demonstraram a presença de LDL(-) no plasma de camundongos (Grosso et al., 2008), coelhos (Damasceno, 2001) e humanos (Sevanian et al., 1997) com lesões ateroscleróticas. Dentro desse contexto, diversos estudos demonstraram que as concentrações plasmáticas da LDL(-) em indivíduos normolipêmicos representam apenas cerca de 1 a 10% da concentração de LDL total, mas encontram-se aumentadas em indivíduos com doenças como diabetes tipo 1 e 2 (Sánchez-Quesada et al., 1996 e 2001), na hipercolesterolemia familiar (Sánchez-Quesada et al., 1999) e em pacientes renais crônicos sob tratamento de hemodiálise (Lobo et al., 2008).

Estudos realizados por De Castellarnau et al. (2006) em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) determinaram que a LDL(-) apresenta citotoxicidade para células endoteliais, induz a expressão de citocinas (Sánchez-Quesada et al., 2002), como IL-1 (Arman et al., 2008), IL-8 (De Castellarnau et al., 2000) e a proteína-1 quimiotática para monócitos (MCP-1) (Sanchez-Quesada et al., 2003), assim como, moléculas de adesão como a VCAM-1, induzida pela ação  $TNF\alpha$ , e ICAM-1 (Hansson, 2001). A LDL(-) induz ainda a liberação do fator estimulador de colônias de macrófagos e do fator de crescimento B derivado de plaquetas (PDGF-B) (De Castellarnau et al., 2006) e inibe a síntese de óxido nítrico pela eNOS (Óxido nítrico sintase endotelial) (Berliner et al., 1995).

A LDL(-), portanto, está envolvida na formação de células espumosas e exerce um efeito inflamatório múltiplo

em células endoteliais, uma vez que estimula a produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que desempenham importantes papéis em vários estágios do desenvolvimento da aterosclerose, como o recrutamento  
5 leucocitário e a proliferação celular (Pedrosa et al., 2010). Nesse sentido, o estudo da LDL(-) é fundamental para uma compreensão completa e eficaz do processo aterosclerótico.

São conhecidos diversos anticorpos contra auto  
10 anticorpos que reconhecem a LDL oxidada (LDLox) e são utilizados no monitoramento do perfil lipídico de indivíduos (Sanches, Leticia B. et al. J. pediatr.;84(3):258-263, maio-junho 2008). Também já foram descritos anticorpos monoclonais anti-LDLox, anti-LDL  
15 peroxidado e anti-LDL eletronegativa. O PI0203233-3 trata de um anti LDL eletronegativa [LDL(-)].

Entretanto, o estado da técnica carece de métodos efetivos contra a formação da placa aterosclerótica que utilize anticorpos anti LDL, ou anticorpos anti-frações da  
20 LDL.

#### **OBJETIVO DA INVENÇÃO**

A invenção trata de uma composição farmacêutica contendo um nanofármaco capaz de reconhecer uma fração da LDL, excipientes farmacologicamente aceitáveis e,  
25 opcionalmente um segundo agente ativo; para o tratamento de doenças e enfermidades cuja fisiopatologia envolva a resposta imuno-inflamatória, inibindo o desenvolvimento e a progressão das lesões ateroscleróticas.

#### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A invenção trata de uma composição farmacêutica contendo um nanofármaco capaz de reconhecer uma fração da LDL, excipientes farmacêuticamente aceitáveis e, opcionalmente um segundo agente ativo; para o tratamento de 5 doenças e enfermidades cuja fisiopatologia envolva a resposta imuno-inflamatória.

Outro objetivo da invenção trata do uso de uma composição farmacêutica contendo um nanofármaco capaz de reconhecer uma fração do LDL em métodos diagnósticos, 10 monitoramento e/ou tratamento de doenças e enfermidades cuja fisiopatologia envolva a resposta imuno-inflamatória.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

Para se obter uma total e completa visualização da composição farmacêutica, contendo um nanofármaco capaz de 15 reconhecer uma fração do LDL objeto da presente invenção, acompanham os desenhos, aos quais se faz referências conforme segue abaixo.

A figura 1 representa a distribuição do tamanho das partículas composição de nanofármaco scFv com 20 hexahistidina.

A figura 2 representa a distribuição do tamanho das partículas obtido por difração a laser de diferentes concentrações do anticorpo [scFv 2C7 anti-LDL(-)] antes e após a adição de lipoproteína [LDL(-) e LDLn] *in vitro*.

25 A figura 3 apresenta o Gráfico da indução de morte celular X concentração do nanofármaco scFv.

A figura 4 apresenta o Gráfico em colunas representando análise morfométrica da área da lesão inicial da artéria aorta de camundongo: (A) imunização passiva de 30 camundongos entre 3 e 4 meses de idade; (B) imunização

passiva de camundongos entre 2 meses e meio e 3 meses de idade. Os camundongos são deficientes para o gene do receptor de LDL.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

5 A composição farmacêutica consistida de um nanofármaco capaz de reconhecer uma fração do LDL, excipientes e, opcionalmente, uma segunda molécula ativa.

Para fins desta invenção, anticorpo(s) e fragmento(s) de anticorpo(s) são considerados sinônimos e são empregados  
10 de forma indistinta neste relatório.

O nanofármaco desta invenção é um anticorpo anti-LDL eletronegativa ligado por coordenação às paredes da nanocápsula multiparedes com íons metálicos. Preferencialmente, o anticorpo anti-LDL(-) é o scFv 2C7  
15 anti-LDL(-), descrito no pedido de patente PI0203233-3 e aqui incorporado por referência; e a nanocápsula multiparedes é conforme descrito no PI1106193-6.

Foi verificado que o diâmetro ideal das partículas é aquele que representa a maior concentração de anticorpo  
20 complexada à parede da nanocápsula e que mantém um diâmetro total da partícula, na escala nano, que apresenta a maior eficácia possível. Preferencialmente, o diâmetro médio do nanofármaco scFv fica contido na faixa entre 100 a 350 nm. Com este diâmetro médio, o nanofármaco pode circular  
25 livremente pelo sistema circulatório sem ser reconhecido pelo sistema de defesa do organismo.

A concentração do nanofármaco scFv por ml da composição fica compreendida entre 0,03 a 150 µg/ml contendo entre 0,01 µg scFv /100 nanopartículas a 5 µg scFv  
30 /1000 nanopartículas. Preferencialmente, a concentração do

nanofármaco na composição é compreendida entre 0,1 µg/ml a 50 µg/ml contendo entre 0,1 µg scFv/100 nanopartículas a 5 µg scFv/100 nanopartículas.

O nanofármaco scFv reconhece e se liga a fração LDL(-) existente no plasma sanguíneo e/ou nas placas de ateroma, formando um complexo nanofármaco + LDL(-) circulante que devido ao fato de apresentar um tamanho médio compreendido entre 200 a 550 nm torna-se um alvo ideal para internalização pelos macrófagos presentes nos tecidos via receptores *scavenger* ou receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos (PAMPs).

O nanofármaco scFv aumenta de forma significativa a eficiência dos fragmentos de anticorpos isolados, uma vez que promove um aumento do tamanho da partícula pela formação de um complexo coordenadamente ligado com a nanocápsula e, assim, aumenta o seu tempo de residência na circulação e no organismo. Dessa forma, a composição farmacêutica contendo o nanofármaco é útil, devido à sua baixa imunogenicidade visto que não diminuem a viabilidade celular e inibem autofagia celular, além disso, apresentam meia-vida adequada na circulação, melhor controle no reconhecimento molecular de LDL(-), remoção mais eficiente dos imunocomplexos pelo sistema imunológico e direcionamento sítio-dirigido de fármacos para os macrófagos, inibindo o desenvolvimento e a progressão das lesões ateroscleróticas.

Camundongos geneticamente deficientes do receptor de LDL tratados com a composição farmacêutica compreendendo o nanofármaco scFv da presente invenção apresentaram pequenas alterações hepáticas, principalmente devido à presença de

gotículas de lipídios no citoplasma das células hepáticas e pequenos infiltrados inflamatórios, fato que mostra a baixa toxicidade *in vivo* desta composição.

A tabela 1 abaixo demonstra que o tratamento com a  
5 composição farmacêutica compreendendo entre 0,03 a 150  $\mu\text{g/ml}$  do nanofármaco scFv contendo entre 0,01 $\mu\text{g}$  scFv /100 nanopartículas a 5 $\mu\text{g}$  scFv /1000 nanopartículas, tem menor efeito sobre a ingestão de alimentos do que o tratamento realizado com os controles.

10

<b>Grupo</b>	<b>Consumo Médio semanal de ração</b>
Controle (PBS)	17,1477 $\pm$ 0,9962
Nanocápsulas MCMN	15,2596 $\pm$ 0,6549
scFv 2C7 anti-LDL(-)	15,6675 $\pm$ 0,5297
Nanofármaco scFv	16,2993 $\pm$ 0,9648
indometacina	17,4554 $\pm$ 3,9337

Tabela 1: influência do nanofármaco na ingestão de alimentos.

Portanto, devido a seu diâmetro médio e concentração, as propriedades terapêuticas da composição farmacêutica  
15 consistida do nanofármaco são superiores quando comparadas às propriedades verificadas no anticorpo scFv isolado, bem como às propriedades da nanocápsula isolada.

A presente composição farmacêutica consiste em um nanofármaco scFv, pode ser usada no tratamento de doenças  
20 cuja fisiopatologia envolva a resposta imuno-inflamatória. Nestas doenças, as células do sistema imune, denominadas macrófagos, desempenham uma função crucial na resposta imune inata e adquirida, incluindo o processo inflamatório. A presente composição farmacêutica pode ser usada no

tratamento de doenças pertencentes ao grupo formado por: aterosclerose, câncer, diabetes, artrite reumatóide, asma, doenças inflamatórias intestinais, infecções bacterianas e parasitárias, dentre outras.

5        Esta composição farmacêutica pode ainda, de forma opcional compreender uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma segunda molécula ativa contida no interior do nanofármaco, tornando a segunda molécula ativa mais acessível aos macrófagos residentes em diversos tecidos via  
10        circulação sanguínea.

      A segunda molécula ativa pode ser adicionada a uma concentração entre 0,001 µg/ml a 2 mg/ml pertence ao grupo constituído por: anti-inflamatórios, anti-proliferativos e anti-angiogênicos, inibidores mitóticos, antifolatos ou um  
15        anti-inflamatório esteroideal ou não esteroideal. A segunda molécula ativa auxilia na inibição da inflamação, na proliferação celular a formação de novos vasos sanguíneos (neoangiogênese). Neste último caso, ressalta-se que as  
20        composições farmacêuticas contendo os nanofármacos scFv quando ligados à LDL(-) provavelmente são internalizadas pelas células endoteliais, via receptor LOX-1, o que justifica a modulação do processo da neoangiogênese, que é crucial para a progressão tanto da aterosclerose como dos tumores, assim como na desestabilização das placas  
25        ateroscleróticas.

      Preferencialmente a segunda molécula ativa opcional pertence ao grupo compreendido por: doxorubicina, fluoruracil, cisplatina, daunorrubicina, paclitaxel, raloxifeno, etoposídeo, diclofenaco, dexametasona,  
30        indometacina, metotrexato, rapamicina, hexahistidina,

tacrolimus, e seus derivados; sendo adicionada nas concentrações compreendida entre 0.10 µg/ml a 0.50 µg/ml e 0,2 mg/ml a 1,8 mg/ml.

Assim, a composição farmacêutica que consiste de uma  
5 quantidade adequada do nanofármaco scFv desta invenção, e  
opcionalmente uma segunda molécula ativa, são úteis no  
tratamento, diagnóstico e prevenção de doenças cuja  
fisiopatologia envolva a resposta imuno-inflamatória.  
Nestas doenças, células do sistema imune, denominadas  
10 macrófagos, desempenham função crucial na resposta imune  
inata e adquirida, incluindo o processo inflamatório,  
pertencentes ao grupo compreendido por: aterosclerose,  
câncer, diabetes, artrite reumatóide, asma, doenças  
inflamatórias intestinais, infecções bacterianas e  
15 parasitárias, dentre outras.

Os excipientes que podem ser empregados nesta  
composição são qualquer excipiente pertencente à área das  
técnicas farmacêutica, comumente empregados na produção de  
composições farmacêuticas preventivas ou curativas e /ou  
20 medicamentos nas diferentes formas farmacêuticas possíveis.

Dentre os excipientes farmacêuticamente aceitáveis  
utilizados nesta invenção podemos citar os diluentes,  
dispersantes, reguladores de pH, conservantes, corantes,  
flavorizantes, estabilizantes, carreadores e etc.

25 Foi demonstrado que anticorpos monoclonais (MAbs)  
anti-LDL(-) isolados, podem ser utilizados em uma  
estratégia terapêutica para prevenção e modulação da  
aterosclerose. No entanto, o uso destes anticorpos  
monoclonais (MAbs) anti-LDL(-) é limitado devido à possível  
30 imunogenicidade dos anticorpos completos, e pela

possibilidade de intensificar uma resposta imunológica pró-aterogênciã a partir da ação do domínio Fc, que recruta funções efetoras citotóxicas através de complemento e/ou receptores Fc $\gamma$  (receptores Fc para gamma globulina) presentes em células como macrófagos.

Além da utilização de anticorpos monoclonais, também têm sido gerados anticorpos humanizados e fragmentos de anticorpos ativos, como o scFv (*single chain fragment variable*). Experimentos tratando macrófagos RAW 264.7 com LDL(-) na presença do scFv 2C7 anti-LDL(-), demonstraram que o scFv reduz a formação de células espumosas, que constituem o início da lesão aterosclerótica. Um possível obstáculo a esta estratégia é o fato da meia-vida do scFv ser relativamente baixa comparada ao anticorpo completo, devido ao seu menor tamanho e elevado *clearance* na circulação sanguínea.

Portanto, conforme aqui demonstrado, o uso tanto dos MAbs como dos anticorpo humanizados sozinhos, não é eficiente para serem adotados em terapias de tratamento e prevenção de doenças relacionadas ao acúmulo do LDL.

Desta forma, preferencialmente, a composição farmacêutica da presente invenção pode ser usada na produção de composições diagnósticas, preventivas ou curativas das lesões ateroscleróticas e inflamatórias anteriormente descritas.

Embora a invenção tenha sido amplamente descrita, é óbvio para aqueles versados na técnica que várias alterações e modificações podem ser feitas sem que as referidas alterações não estejam cobertas pelo escopo da invenção.

Exemplos:

Exemplo 1: Perfil granulométrico típico da composição farmacêutica compreendendo nanofármacos scFv 2C7 anti-LDL(-) e hexahistidina.

5 Os perfis granulométricos, diâmetros médios (z-average) e índice de polidispersão (PDI) da composição farmacêutica compreendendo nanofármacos scFv 2C7 anti-LDL(-) com hexahistidina (Nano - scFv) foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons empregando-se um  
10 equipamento Zetasizer ZS (Malvern Instruments), após diluição apropriada das amostras (20 microlitros de cada formulação diluídos em 10 mL de água ultrapura). Em paralelo, as amostras de Nano - scFv contendo indometacina ou metotrexato foram analisadas quanto aos seus diâmetros  
15 médios após diluição apropriada. Cada amostra diluída foi inserida diretamente na cubeta de análise para a realização das medidas, sem qualquer processo de purificação para evitar alteração das características das amostras. As análises foram executadas utilizando-se 3 diferentes lotes  
20 de fabricação de cada formulação. Os valores de cada lote foram obtidos considerando a triplicata de análises de cada lote. Cada uma destas análises consistiu de 10 medidas analisadas pelo Software Zetasizer Dispersion Technology (version 4.00, 2002, Malverns Instruments ltd). Desse modo,  
25 o desvio padrão foi calculado pelos valores médios obtidos entre cada lote.

Um perfil granulométrico típico da composição farmacêutica compreendendo nanofármacos scFv 2C7 anti-LDL(-) (Nano-scFv) e hexahistidina é mostrado na Figura 1. Essas  
30 nanocápsulas funcionalizadas apresentam diâmetros de

partículas entre 1 e 1000 nm, preferencialmente entre 50 e 800 nm. O diâmetro médio é característico entre 30 e 500 nm, preferencialmente, entre 70 e 300 nm, mais preferencialmente ainda, entre 100 e 200 nm. Por outro lado, as Nano-scFv contendo fármacos apresentam diâmetros de partículas entre 1 e 2000 nm, preferencialmente entre 50 e 900 nm. Os diâmetros médios característicos situam-se entre 50 e 1000 nm, preferencialmente entre 100 e 900 nm. A figura 1 é um gráfico que apresenta o perfil granulométrico da composição da presente invenção.

A Tabela 2 abaixo mostra os valores de diâmetros médios obtidos pelo método baseado em cumulativos (z-average) e o índice de polidispersão das amostras preparadas com indometacina ou metotrexato, respectivamente Nano-scFv mais indometacina e Nano-scFv mais metotrexato. Os dados de diâmetros médios determinados pelo método CONTIN considerando intensidade, volume e número também são mostrados na Tabela 2, sendo que o pico 1 de cada amostra corresponde ao único pico monomodal de cada perfil granulométrico, ou seja correspondendo a 100% das partículas em cada amostra. A comparação dos diâmetros médios por intensidade, volume e número demonstra a alta homogeneidade de tamanhos de partículas, corroborando com os dados de índice de polidispersão, que indicam perfis granulométricos estreitos com alta qualidade nanotecnológica.

Diâmetro das partículas

Formulação	Média Z- (nm)	PDI	Intensidade		Volume		Número	
			Pico 1 (nm)	Largura (nm)	Pico 1 (nm)	Largura (nm)	Pico 1 (nm)	Largura (nm)
Nano-scFv-I	730 ±	0,2	683 ±	220 ± 53	852 ± 21	280 ± 4	724 ± 124	209 ± 40

	177		98					
Nano-	562	0,2	615	211 ±37	807	245 ±	484 ±	223 ±
scFv-M	±		±		±	50	202	34
	231		161		168			

Tabela 2. Valores médios de distribuição de tamanho obtidos pela técnica de PCS.

Exemplo 2: Reconhecimento molecular de LDL eletronegativa [LDL(-)] pela reação interfacial com nanofármaco scFv 2C7 anti-LDL(-) e hexahistidina.

A composição farmacêutica de nanofármacos multiparede complexadas com íons metálicos funcionalizadas com o fragmento scFv 2C7 anti-LDL(-) e hexahistidina é apta a reconhecer LDL(-). O reconhecimento molecular é específico para LDL(-), quando comparado com o ensaio com LDL nativa. O ensaio é realizado com a adição de soluções de LDL- ou de LDL nativa, dois tipos de lipoproteínas de baixa densidade, diretamente nas composições farmacêuticas de nanocápsulas multiparede complexadas com íons metálicos funcionalizadas com o fragmento scFv anti-LDL(-) 2C7 e hexahistidina. Em cubetas plásticas foram individualmente adicionados 25 microlitros de cada composição farmacêutica contendo concentrações variadas de 25, 50 ou 100 microgramas por mililitro do scFv em 25 microlitros de solução de LDL- preparada a 362 microgramas por mililitro ou de LDL nativa preparada a 690 microgramas por mililitro. Com o auxílio de um pipetador automático, cada amostra foi cuidadosamente homogeneizada (10x) e posteriormente incubada na temperatura de 25 °C por 2 minutos antes das análises em Zetasizer. Estes ensaios foram realizados em triplicata.

A caracterização dos perfis granulométricos e dos diâmetros médios de partículas por espectroscopia de correlação de fótons empregando-se um equipamento Zetasizer

ZS (Malvern Instruments), após diluição apropriada das amostras (20 microlitros de cada formulação foram diluídos em 10 mL de água ultrapura), mostrou o aumento de diâmetro médio exclusivamente para a reação interfacial com LDL(-),  
5 indicando que LDL(-) foi reconhecida molecularmente pela composição farmacêutica contendo o nanofármaco scFv; enquanto que a manutenção do diâmetro médio de partículas após a adição da solução de LDL nativa demonstra que não há ligação com esta lipoproteína de baixa densidade (Figura  
10 2). Quanto maior a concentração da composição Nano-scFv maior o diâmetro médio de partículas após a reação interfacial com LDL(-).

A figura 2 apresenta o Diâmetro médio das partículas antes (Nano-scFv-25, Nano-scFv-50 e Nano-scFv-100) e após  
15 adição das soluções de lipoproteína de baixa densidade: LDL(-) e LDL nativa.

### Exemplo 3: Produção da composição farmacêutica.

Uma solução de acetona (25 mL) contendo 0,1 g de poli( $\epsilon$ -caprolactona), 0,04 g de monoestearato de sorbitano,  
20 0,120 g de triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico é adicionada de 10 mL de uma solução etanólica contendo 0,03 g de Lipoid S 75®. Esta solução orgânica é injetada em uma fase aquosa (62,5 mL) contendo 0,080 g de polissorbato 80 sob agitação moderada. A mistura é, então, evaporada sob  
25 pressão reduzida a 40 °C em evaporador rotativo até aproximadamente 10 mL, posteriormente ajustados com água ultrapura em frasco volumétrico a 10 mL. Esta suspensão coloidal é adicionada, na proporção de 9:1 (v/v), de uma solução aquosa de quitosana a 0,3% (m/v) acidificada com  
30 ácido acético a 1% (v/v), mantida sob agitação moderada a

25 °C por 4 horas. Sob agitação magnética (500 rpm) na temperatura ambiente, a formulação de nanocápsulas multiparede (MN) é, então, adicionada de uma solução aquosa de acetato de zinco, preparada pela adição de 28 mg de acetato de zinco dissolvidos em 10 mL de água ultrapura sob agitação de 1 h a 37 °C. As formulações com diferentes concentrações de Zn<sup>2+</sup> são obtidas pela variação de volume da solução de acetato de zinco. Após 1 min, a formulação é adicionada de uma solução aquosa de fragmento scFv anti-LDL(-) 2C7 com hexahistidina preparada na concentração de 1.453 microgramas por mililitro. Diferentes formulações são obtidas pela adição de diferentes volumes desta solução sobre a formulação de nanocápsulas.

Uma solução de acetona (25 mL) contendo 0,005 g de indometacina, 0,1 g de poli(ε-caprolactona), 0,04 g de monoestearato de sorbitano, 0,120 g de triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico é adicionada de 10 mL de uma solução etanólica contendo 0,09 g de Lipoid S 75®. Esta solução orgânica é injetada em uma fase aquosa (62,5 mL) contendo 0,080 g de polissorbato 80 sob agitação moderada. A mistura é, então, evaporada sob pressão reduzida a 40 °C em evaporador rotativo até aproximadamente 10 mL, posteriormente ajustados com água ultrapura em frasco volumétrico a 10 mL. Esta suspensão coloidal é adicionada, na proporção de 9:1 (v/v), de uma solução aquosa de quitosana a 1% (m/v) acidificada com ácido acético a 2% (v/v), mantida sob agitação moderada a 25 °C por 4 horas. Sob agitação magnética (500 rpm) na temperatura ambiente, a formulação de nanocápsulas multiparede (MN) é, então, adicionada da solução aquosa de acetato de zinco na

proporção de 9,75:0,25 (v/v). Após 1 min, a formulação é adicionada de uma solução aquosa de fragmento scFv anti-LDL(-) 2C7 com hexahistidina preparada na concentração de 331 microgramas por mililitro.

5 Uma solução de acetona (25 mL) contendo 0,001 g de metotrexato, 0,1 g de poli( $\epsilon$ -caprolactona), 0,04 g de monoestearato de sorbitano, 0,120 g de triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico é adicionada de 10 mL de uma  
10 solução etanólica contendo 0,09 g de Lipoid S 75®. Esta solução orgânica é injetada em uma fase aquosa (62,5 mL) contendo 0,080 g de polissorbato 80 sob agitação moderada. A mistura é, então, evaporada sob pressão reduzida a 40 °C em evaporador rotativo até aproximadamente 10 mL, posteriormente ajustados com água ultrapura em frasco  
15 volumétrico a 10 mL. Esta suspensão coloidal é adicionada, na proporção de 9:1 (v/v), de uma solução aquosa de quitosana a 1% (m/v) acidificada com ácido acético a 2% (v/v), mantida sob agitação moderada a 25 °C por 4 horas. Sob agitação magnética (500 rpm) na temperatura ambiente, a  
20 formulação de nanocápsulas multiparede (MN) é, então, adicionada da solução aquosa de acetato de zinco na proporção de 9,75:0,25 (v/v). Após 1 min, a formulação é adicionada de uma solução aquosa de fragmento scFv anti-LDL(-) 2C7 com hexahistidina preparada na concentração de  
25 331 microgramas por mililitro.

Exemplo 4: Viabilidade celular da linhagem de macrófagos RAW 264.7 e HUVEC da linhagem CRL-1730, ATCC.

Na sequência, ensaios in vitro foram realizados a fim de avaliar a viabilidade celular da linhagem de macrófagos  
30 RAW 264.7 e HUVEC da linhagem CRL-1730, ATCC. A viabilidade

celular foi determinada por dois diferentes métodos: MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio), como descrito previamente por Denizot & Lang (1986), e citometria de fluxo por ensaio com Anexina V e Iodeto de Propídeo. Ambos os ensaios de viabilidade celular com nanofármacos foram realizados com as partículas intermediárias preparadas empregando-se apenas as duas e três etapas iniciais da formação das nanocápsulas. Uma das amostras é composta de nanofármacos revestidas de quitosana (nanocápsulas PCL), enquanto que a segunda amostra é preparada até a terceira etapa de síntese, apresentando os íons  $Zn^{+2}$  complexados (nanocápsulas MN). As concentrações de nanopartículas foram obtidas a partir de diluições seriadas provenientes de uma solução de concentração inicial de  $10^9$  partículas/mL ( $10^9$  partículas/mL;  $5 \times 10^8$  partículas/mL;  $2,5 \times 10^8$  partículas/mL;  $1,25 \times 10^8$  partículas/mL;  $6,25 \times 10^7$  partículas/mL;  $3,125 \times 10^7$  partículas/mL;  $1,56 \times 10^7$  partículas/mL;  $7,8 \times 10^6$  partículas/mL;  $3,9 \times 10^6$  partículas/mL;. Para o scFv anti-LDL(-) e para os nanofármacos foram utilizadas as concentrações: 200  $\mu\text{g/mL}$ ; 100  $\mu\text{g/mL}$ ; 50  $\mu\text{g/mL}$ ; 25  $\mu\text{g/mL}$ ; 12,5  $\mu\text{g/mL}$ ; 6,25  $\mu\text{g/mL}$ ; 3,125  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,5625  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,78125  $\mu\text{g/mL}$  e 0,390  $\mu\text{g/mL}$ , figura 3.

No ensaio de MTT, ambas as formulações intermediárias de nanopartículas apresentaram viabilidade celular de pelo menos 80% em relação à linhagem RAW 264.7 em todas as concentrações testadas, qualificando-as para serem utilizadas na obtenção do nanofármaco scFv anti-LDL(-) e esta última empregada nos ensaios de captação de LDL(-) in vivo e demonstrando que as nanopartículas provavelmente

também não devem causar prejuízo às células dos animais que serão utilizados em etapas posteriores desse estudo. O ensaio realizado em linhagem HUVEC também mostrou resultados bastante satisfatórios, tendo os dois tipos de nanopartículas intermediárias apresentado no mínimo cerca de 90% de viabilidade celular. Os experimentos envolvendo tratamento com o scFv 2C7 anti-LDL(-) identificaram que para ambas as linhagens celulares concentrações menores do que 6,25 µg/mL de scFV anti-LDL (-) conferiam cerca de 80% de viabilidade às células tratadas. A composição composta pelo nanofármaco (Nano-scFv), por sua vez, demonstrou valores menores que 20% de morte celular na concentração de 25 µg de scFv/mL de formulação no mesmo ensaio.

A fim de confirmar a viabilidade celular encontrada no ensaio por MTT e investigar o mecanismo pelo qual essa se encontra diminuída ao tratar as células com o scFv e a composição com nanofármaco scFv, realizamos ensaios de apoptose, necrose, autofagia e ciclo celular por citometria de fluxo.

No ensaio de apoptose e necrose, células de ambas as linhagens foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações de soluções contendo nanocápsulas PCL, nanocápsulas MN, scFv 2C7 anti-LDL(-) e composição com nanofármaco scFv. Foi utilizado o kit para detecção de apoptose e necrose (APOAF<sup>®</sup>) e o protocolo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. A Anexina V (0,625 µg/mL) foi observada em filtro para FITC e o Iodeto de Propídeo (2,5 µg/mL) em filtro para PerCP. Foram observados 10000 eventos. Os resultados obtidos nos ensaios de

citometria de fluxo mostraram-se semelhantes aos resultantes do ensaio por MTT. Em relação aos macrófagos RAW e a linhagem HUVEC, as nanocápsulas PCL não exerceram qualquer influência sobre sua viabilidade, como esperado, uma vez que sua composição não indica possibilidade de causar prejuízo às células. As nanocápsulas MN, também não mostraram diferenças significativas em relação ao controle de macrófagos e ao controle de HUVEC. Quanto ao scFv 2C7 anti-LDL(-), concentrações superiores a 6,25 µg/mL apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle, demonstrando uma variação de 50 a 30% de morte celular (apoptose + apoptose tardia + necrose) em relação ao controle de macrófagos. O scFv 2C7 anti-LDL(-) não demonstrou morte celular estatisticamente significativa em relação ao controle de HUVEC em nenhuma das concentrações testadas. A composição farmacêutica compreendendo o nanofármaco scFv apresentou diferença estatística significativa em concentrações a partir de 6,25 µg/mL em relação ao controle de células RAW e não exerceu qualquer influência sobre a viabilidade de HUVEC.

A figura 3 é a representação gráfica da porcentagem de morte celular (apoptose + apoptose tardia + necrose) de macrófagos RAW 264.7 após 24 horas de tratamento com composição com nanofármaco scFv:  $1 \times 10^5$  macrófagos RAW 264.7 foram tratados com concentrações diversas da composição farmacêutica compreendendo o nanofármaco scFv a partir de uma solução inicial de 100 µg/mL em placas de cultura de 48 poços.

Na linhagem HUVEC não foi demonstrada diferença estatística significativa em qualquer concentração em

relação ao controle. Ambos os resultados sugerem uma possível citotoxicidade dos tratamentos apenas aos macrófagos RAW, células importantes na patogênese da aterosclerose. O mesmo não é observado na linhagem HUVEC, demonstrando que a formulação não seria prejudicial às células do endotélio.

No ensaio de autofagia, seguiu-se o mesmo protocolo de tratamento do ensaio de apoptose e necrose. Como controle positivo (indução de autofagia) utilizamos um tampão Krebs Ringer (NaCl 118 mM, KCl 4,61 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,19 mM, MgSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,76 mM e NaHCO<sub>3</sub> 25 mM) de modo a carenciar de forma excessiva o meio de cultivo das células, e como controle negativo (inibição de autofagia), foi utilizado 10 nM de Bafilomicina, capaz de prevenir a fusão do autofagossomo ao lisossomo. Nesse ensaio, adicionamos 1 µg/mL de Alaranjado de Acridina, um corante fluorogênico acidotrópico capaz de marcar o citoplasma e o núcleo celulares sem alterações com fluorescência verde (FITC) e com fluorescência vermelha (PerCP-CY5) as mesmas organelas em ambiente ácido como na presença de autofagossomos, caracterizando um processo de autofagia, por poço e incubamos em temperatura ambiente por 15 minutos antes da leitura no citômetro. É importante o entendimento de que esse ensaio é completamente qualitativo. Foram observados 10.000 eventos. O ensaio foi realizado com a linhagem de macrófagos RAW 264.7. Os dados demonstraram que aparentemente ambas as nanocápsulas PCL e MN utilizadas nos macrófagos não interferiram no processo de autofagia, seja induzindo ou inibindo-o. O scFv pareceu inibir o processo de autofagia em relação ao controle, assim como composição

farmacêutica compreendendo o nanofármaco scFv. No entanto, a composição com nanofármaco scFv apresentou uma inibição visualmente menor do que a observada nas células tratadas apenas com scFv 2C7 anti-LDL(-), o que pode indicar a possibilidade de a presença das nanopartículas no nanofármaco scFv tornar o scFv 2C7 anti-LDL(-) mais estável ou menos reativo.

Para observação do ciclo celular, foram utilizadas as concentrações específicas:  $10^4$  nanocápsulas/mL PCL,  $10^4$  nanocápsulas/mL MN, 6,25  $\mu\text{g/mL}$  de scFv 2C7 anti-LDL(-) e 6,25  $\mu\text{g/mL}$  de composição com nanofármaco scFv. Nesse estudo foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de tampão de lise (0,1 % de Citrato de Sódio e 0,1 % de Triton) aos tubos, 20  $\mu\text{L}$  (10 mg/mL) de RNase A e 2  $\mu\text{L}$  (1 mg/mL) de Iodeto de Propídeo (Sigma). Foram observados 10.000 eventos. Os resultados não demonstraram qualquer modificação no ciclo das células na presença de qualquer dos tratamentos utilizados em relação ao controle.

Exemplo 5: Avaliação da segurança da composição farmacêutica.

Para a avaliação da segurança em relação à toxicidade do scFv anti-LDL eletronegativa e dos nanofármacos, separadamente foram utilizados 30 camundongos geneticamente deficientes para receptor LDLR(-/-) machos com 12 semanas de idade média, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em salas estéreis e termostatizadas do biotério em condições apropriadas, com livre acesso à ração e água e com ciclos alternados de luz e escuridão durante todo o experimento.

Este protocolo foi baseado no método descrito pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através do "Guideline for testing of chemicals (OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development)" nº 423 de 17 de 5 Dezembro de 2001. A toxicidade foi determinada a partir da administração de diferentes doses das soluções em questão, por via intravenosa (veia da cauda) em grupos de 3 animais. Os grupos foram distribuídos de forma a abranger: um grupo controle, no qual não foi administrada qualquer solução; um 10 grupo veículo, contendo apenas o veículo utilizado; 4 grupos apenas com scFv 2C7anti-LDL(-) em doses variadas (2,5 mg/Kg, 5,0 mg/Kg, 10 mg/Kg e 25 mg/Kg); e 4 grupos apenas com a composição farmacêutica compreendendo o nanofármaco scFv em diferentes doses (2,5 mg/Kg, 5,0 mg/Kg, 15 10 mg/Kg e 25 mg/Kg. Os animais foram avaliados durante o período de 48 horas, após o qual o número de mortes foi registrado. Além desse fator, foram avaliadas as seguintes condições após uma, 3, 6, 9, 18, 24 e 48 horas da administração das soluções: pêlos eriçados, dispnéia, 20 tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sonolência e coma. Os animais que sobreviveram receberam doses semanais das soluções em questão durante 3 semanas, a fim de avaliar os parâmetros bioquímicos ao final do protocolo. Dessa forma, foi coletado soro de todos os 25 animais avaliados 48 horas após a primeira administração e 48 horas após a quarta e última administração para dosagem dos seguintes parâmetros bioquímicos: Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato transaminase (AST). Foram observados aumentos relevantes da primeira para a 30 última dose administradas nas avaliações de ambas as

enzimas. De acordo com os valores normais de ambas as enzimas para camundongos (AST =  $196 \pm 132,6$ ; ALT =  $99 \pm 86,3$ ) (Laptick et al., 2009), observa-se que todos os grupos aparentemente não tiveram alteração em sua função hepática.

5 No entanto, após a administração da quarta dose, o grupo nanofármaco scFv com 25 mg/Kg de scFv (mostrou-se fora dos valores de referência encontrados na literatura, extrapolando aproximadamente 200 unidades/L para AST e 320 unidades/L para ALT. Pode-se dizer que o scFv 2C7 anti-

10 LDL(-) e a composição com nanofármaco scFv não foram tóxicas aos animais estudados. Além disso, foi realizada a análise histológica do fígado através de cortes aleatórios de 5  $\mu\text{m}$  do fígado dos animais utilizados. Nesse experimento, os cortes foram corados com Hematoxilina e

15 Eosina e observados em microscópio óptico Nikon, sendo as imagens obtidas pelo programa NIS-Elements AR<sup>(tm)</sup> version 3.10. As análises demonstraram que nos animais do grupo controle, ou seja, que não receberam qualquer tratamento, não houve indicação da existência de dano ou lesão celular

20 hepática. No entanto, todos os animais dos outros 9 grupos apresentaram regiões com infiltrado inflamatório, atingindo apenas uma pequena porção do fígado. Além disso, pelo menos um animal de cada grupo apresentou a formação de gotículas de lipídios. Um animal do grupo Veículo PBS apresentou

25 hepatite difusa e necrose, tendo sido essa última característica encontrada também em animais dos grupos scFv 2C7 anti-LDL(-) 10 mg/Kg e de composição com nanofármaco scFv 10 mg/Kg. Apenas um animal, dos 30 analisados, apresentou um grau severo de comprometimento hepático

30 (grupo scFv 2C7 anti-LDL(-) 25 mg/Kg).

Exemplo 6: Imunização passiva de camundongos nocautes

Em um terceiro momento do estudo, realizamos a imunização passiva de camundongos *knockout* para o gene do receptor da LDL (LDLR<sup>-/-</sup>). Foram utilizados 5 grupos (n/grupo=20) de camundongos que receberam via endovenosa aproximadamente 100µl dos seguintes tratamentos: PBS 1X (veículo), 2,5 x 10<sup>10</sup> partículas/Kg de MN, 5 mg/Kg de scFv 2C7 anti-LDL(-), 5 mg/Kg de composição com nanofármaco scFv 2C7 anti-LDL(-) e 1 mg/Kg de Indometacina, sendo esse último caracterizado como o controle positivo. O protocolo de tratamento utilizado foi o de lesão inicial, no qual as imunizações foram realizadas durante 4 semanas. Após a primeira imunização os animais receberam dieta normal. Uma semana depois dessa imunização, os animais receberam a segunda dose e passaram a receber a dieta hipercolesterolêmica (HC), aterogênica AIN93G com 0,5% de colesterol. Após uma semana, receberam a terceira dose e na semana seguinte a última dose. Foram realizadas ainda pesagens dos animais, antes de cada imunização, assim como da ração inicial e a final a cada semana, a fim de calcular o consumo semanal de cada grupo. Os animais foram eutanasiados ao final do tratamento e seu soro foi coletado para determinação bioquímica do perfil lipídico e das enzimas hepáticas. Foi retirado o coração para realização da análise morfométrica da lesão.

Foi observado que não houve qualquer diferença estatística tanto do peso médio quanto do consumo semanal de ração entre os grupos testados. Observou-se uma tendência à perda de peso durante o protocolo, após a introdução da dieta hipercolesterolêmica. A determinação

bioquímica do perfil lipídico e das enzimas hepáticas não demonstrou qualquer diferença significativa entre os grupos tratados e o controle.

Para a análise morfométrica da lesão, foram separados 5 8 animais de cada grupo que, após serem anestesiados com Xilasina e Cetamina, foram eutanasiados e o coração foi exposto e perfundido com salina 0,9%. A perfusão foi realizada via ventrículo esquerdo com salina para eliminação do sangue. O coração e a parte superior da aorta 10 (até o arco aórtico) foram removidos e deixados em solução salina por três horas para o relaxamento da musculatura. Posteriormente, foram colocados em 10% de formalina tamponada por 48 horas para fixação do tecido. A inclusão dos tecidos para corte em lâminas foi feita em três 15 soluções de diferentes concentrações de gelatina: inicialmente, solução a 5% de gelatina por três horas, depois a 10% por mais três horas e a 25% overnight, ocorrendo todas as etapas em banho-maria (temperatura entre 40-50 °C). Os ventrículos foram seccionados entre o ápice e 20 a base em um plano paralelo a uma linha definida pelas pontas laterais dos átrios. Os corações foram embebidos no composto OCT dentro da câmara de congelamento do criostato a -25 °C. Os cortes foram desprezados até a proximidade da região de interesse. Após identificar a aorta, cortes 25 consecutivos de 6 µm de espessura foram coletados em lâminas de microscopia silanizadas e cobertas com uma fina camada de gelatina. Os cortes coletados compreendem a região entre o sinus aórtico e o início da aorta, com uma extensão média de 250-300 µm, conforme Paigen et al. 30 (1987). Foram coletadas 15 lâminas, cada uma com 8 cortes,

para cada animal. As referências anatômicas para a identificação do início da região de coleta foram o formato arredondado da aorta e a presença de saliências em sua parede (constituem o início da formação das válvulas aórticas na raiz da aorta). Já o desaparecimento das válvulas indicou o fim da região de coleta. As lâminas foram nomeadas com letras de A a E, de acordo com o grupo ao qual pertenciam, numeradas em série, coradas com Oil Red-O e contra-coradas com Hematoxilina e Light Green. Após a coloração, o material foi codificado e submetido à análise morfométrica.

Os cortes foram analisados por microscópio óptico Nikon acoplado a uma câmera; a captura da imagem foi feita utilizando-se um computador e o programa NIS-Elements AR(tm) version 3.10. Foi utilizado o programa analisador de imagens Axio Vision® para a obtenção das medidas. Todos os cortes histológicos obtidos foram examinados com o objetivo de quantificar as lesões ateroscleróticas próximas as válvulas aórticas na raiz da aorta.

Os animais foram divididos em dois grupos em relação à idade: grupo 1 com idade entre 2 meses e meio e 3 meses e grupo 2 com idade entre 3 e 4 meses. Foi demonstrada diferença estatisticamente significativa (figura 4) em ambos os casos entre os grupos composição com nanofármaco scFv e Indometacina em relação ao controle quanto à redução da área da lesão.

Na figura 4 vemos o gráfico em colunas representando os grupos de tratamento, dentro do grupo 1, utilizados na imunização passiva de camundongos deficientes para o gene do receptor de LDL. Os grupos foram divididos em: PBS 1X

(veículo),  $2,5 \times 10^{10}$  partículas/Kg de MCMN, 5 mg/Kg de scFv 2C7 anti-LDL(-), 5 mg/Kg de composição com nanofármaco scFv 2C7 anti-LDL(-) ou 1 mg/Kg de Indometacina. Os cortes foram analisados no programa Axio Vision e as áreas obtidas das  
5 lesões encontradas foram analisadas no programa GraphPad Prisma 5 para Windows Versão 5.04.

**REIVINDICAÇÕES**

1 - Composição farmacêutica caracterizada por ser consistida de entre 0,03 a 150 µg/ml de um nanofármaco capaz de reconhecer uma fração do LDL, excipientes e, 5 opcionalmente, uma segunda molécula ativa.

2 - Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo nanofármaco ser um anticorpo anti-LDL eletronegativa ligado por coordenação às paredes da nanocápsula multiparedes com íons metálicos, que 10 apresenta um diâmetro médio contido na faixa entre 100 a 350 nm.

3 - Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela segunda molécula ativa ser adicionada a uma concentração entre 0,001 µg/ml a 2 15 mg/ml pertence ao grupo consistido de: anti-inflamatórios, anti-proliferativos e anti-angiogênicos, inibidores mitóticos, antifolatos ou um anti-inflamatório esteroideal ou não esteroideal.

4 - Composição farmacêutica, de acordo com a 20 reivindicação 3, caracterizada pela segunda molécula ativa pertencer ao grupo consistido de: doxorubicina, fluoruracil, cisplatina, daunorrubicina, paclitaxel, raloxifeno, etoposídeo, diclofenaco, dexametasona, indometacina, metotrexato, rapamicina, hexahistidina, 25 tacrolimus, e seus derivados.

5 - Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por ser útil na prevenção e no diagnóstico de doenças cuja fisiopatologia envolva a resposta imuno-inflamatória.

6 - Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por ser útil no tratamento e prevenção pertencentes de doenças pertencentes ao grupo compreendido de: aterosclerose, câncer, diabetes, artrite  
5 reumatóide, asma, doenças inflamatórias intestinais, infecções bacterianas e parasitárias, dentre outras.

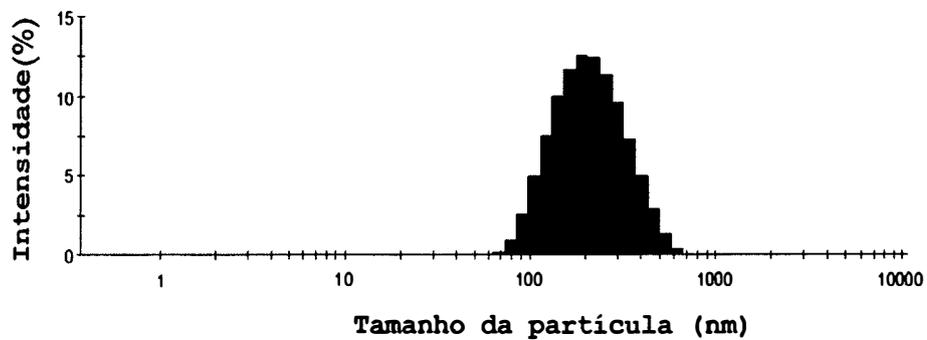


Figura 1

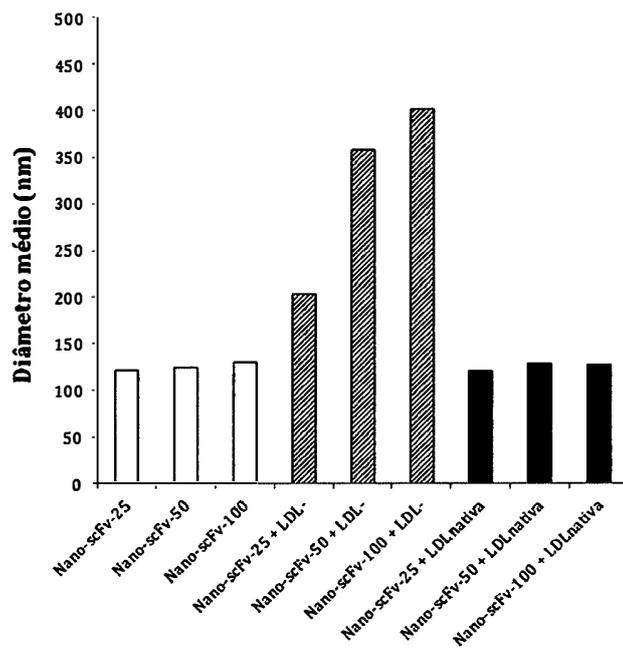


Figura 2

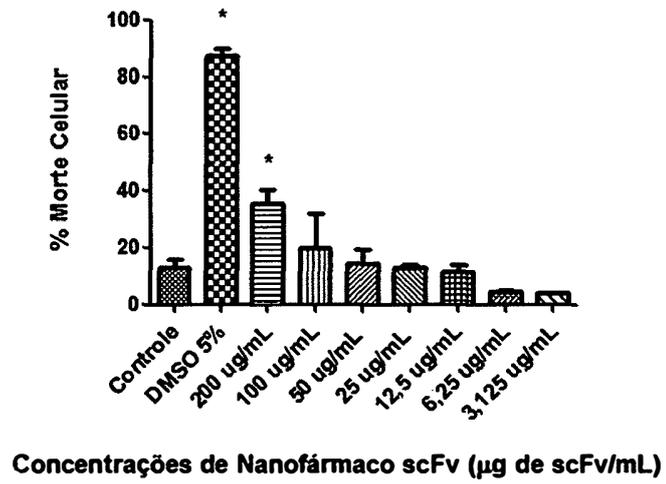


Figura 3

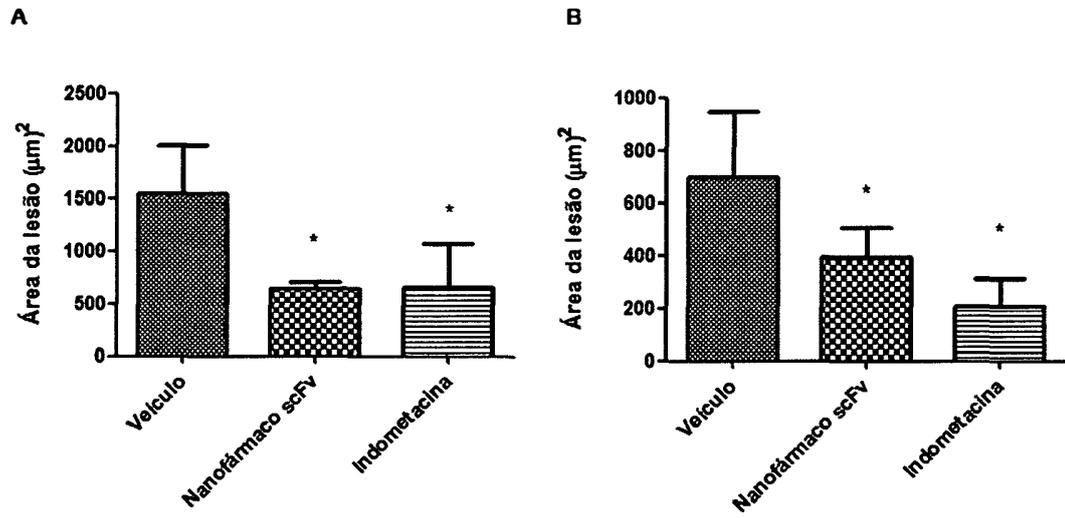


Figura 4

**COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA NANOMÉTRICA E SEUS USOS**

**RESUMO**

Composição farmacêutica contendo um nanofármaco capaz de reconhecer uma fração do LDL, excipientes e, 5 opcionalmente, uma segunda molécula ativa, útil na prevenção e no diagnóstico de doenças cuja fisiopatologia envolva a resposta imuno-inflamatória como, por exemplo, aterosclerose, câncer, diabetes, artrite reumatóide, asma, doenças inflamatórias intestinais, infecções bacterianas e 10 parasitárias, dentre outras.