



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

(11) (21) **PI 0303598-0 A**



(22) Data de Depósito: 13/10/2003  
(43) Data de Publicação: 31/05/2005  
(RPI 1795)

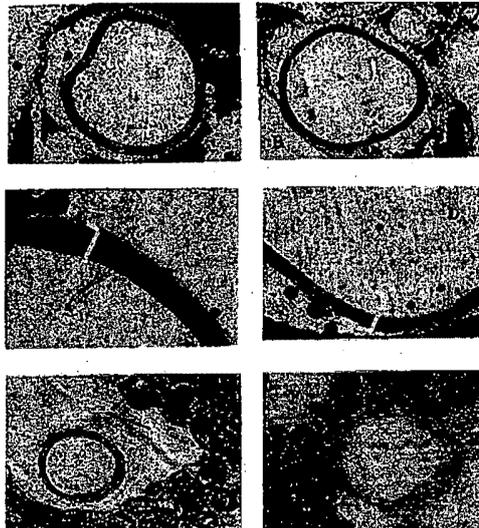
(51) Int. Cl.<sup>7</sup>.:  
A61K 31/557  
A61P 9/10

(54) Título: **COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS À BASE DE PROSTAGLANDINAS CICLOPENTENÔNICAS VEICULADAS EM LIPOSSOMOS E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DAS COMPOSIÇÕES**

(71) Depositante(s): Universidade Federal do Rio Grande do Sul (BR/RS)

(72) Inventor(es): Paulo Ivo Homem de Bittencourt Júnior

(57) Resumo: "COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS À BASE DE PROSTAGLANDINAS CICLOPENTENÔNICAS VEICULADAS EM LIPOSSOMOS E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DAS COMPOSIÇÕES". É descrita uma composição farmacêutica à base de prostaglandinas ciclopentenônicas veiculadas em lipossomos e o processo de preparação da composição, dita composição que compreende um liofilizado de lipossomos negativos ou lipoproteínas artificiais, anticorpos mono ou policlonais contra o VCAM-1, prostaglandinas ciclopentenônicas, antibióticos e um veículo farmacêuticamente aceitável. As composições farmacêuticas descritas são úteis no tratamento e prevenção da aterosclerose e de doenças cardiovasculares.



**COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS À BASE DE  
PROSTAGLANDINAS CICLOPENTENÔNICAS VEICULADAS EM  
LIPOSSOMOS E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DAS  
COMPOSIÇÕES**

**5 CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção diz respeito a composições farmacêuticas à base de prostaglandinas ciclopentenônicas veiculadas em lipossomos e processo de preparação das composições. Mais especificamente a presente invenção diz respeito a novas composições farmacêuticas  
10 úteis no tratamento e prevenção da aterosclerose e de doenças cardiovasculares.

**FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

As doenças cardiovasculares são causa líder de morbidade e mortalidade no mundo ocidental.

15 Segundo relatórios da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 1997, as doenças cardiovasculares foram responsáveis por cerca de 30% de todas as mortes que ocorreram no mundo, o que corresponde a quase 15 milhões de óbitos por ano, sendo que a maioria (9 milhões) é proveniente dos países em desenvolvimento (BRANDÃO,  
20 2000). A mortalidade por doença arterial coronariana (DAC) e acidente vascular encefálico (AVE), corresponde a 80% dos óbitos por doenças cardiovasculares (BRANDÃO, 2000). Isoladamente, os acidentes vasculares cerebrais (AVC) causaram, em 1997, cerca de 25% dos óbitos de causas vasculares. Entretanto, se somado infarto  
25 do miocárdio com doença isquêmica do coração, manifestações da mesma doença, a aterosclerose coronária foi responsável por 33% das mortes.

Os países em desenvolvimento, entre eles o Brasil, apresentam

um número de mortes por doenças cardiovasculares duas vezes maior do que os países desenvolvidos. Em 1950, 40% dos óbitos no Brasil eram decorrentes de doenças infecto-contagiosas e apenas 12% decorrentes de doenças cardiovasculares, porém no ano de 5 1990 os índices tornaram-se menores que 10% para as moléstias infecto-contagiosas e 34,5% para as doenças cardiovasculares, tornando aparente a inversão de suas proporções (Silvestre, J.A; Kalache, A; Ramos, L e col. 1996). Dentre estas últimas, a cardiopatia isquêmica, o acidente vascular cerebral, a insuficiência cardíaca e a 10 hipertensão arterial sistêmica, são as mais significativas (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 1990). Além disso, conforme dados do DATASUS, (1997), as doenças cardiovasculares constituem a maior causa de mortalidade no Brasil, superando as causas externas, as neoplasias e as doenças pulmonares. De acordo com LOTUFO 15 (1996), representam 300.000 óbitos por ano ou 820 por dia, tornando assim evidentes as necessidades de ações para a detecção e prevenção relacionadas às afecções desse sistema. (Celso Ferreira; Bráulio Luna Filho; Leonor ESA Pinto; Francisco AH Fonseca; Guilhermina Mendes, Mônica T. Ito, Rui Povia. Estudo de prevenção 20 de doenças cardiovasculares para servidores da Unifesp-2000 (Estudo PrevServ-UNIFESP- 2000)

No Brasil, as doenças cardiovasculares situam-se como a mais importante causa de morte: 27% dos óbitos ocorridos em 1994 decorreram de problemas de coração. As doenças cardiovasculares 25 apresentam elevado número de mortalidade prematura em adultos e mesmo quando não são mortais, levam com freqüência à invalidez parcial ou total do indivíduo, com graves repercussões para a pessoa acometida, sua família e a sociedade. Dados do Ministério da Saúde

evidenciam que do total de 809.799 óbitos registrados em 1984, 209.288 foram de origem cardiovascular, sendo que, 20% dos óbitos de adultos jovens entre os 20 a 49 anos de idade e 41,2% , entre aqueles na faixa dos 50 ou mais anos (BRASIL, 1988).

5 Conforme dados de 1994, do CENEPI/Fundação Nacional de Saúde, sobre a mortalidade no Brasil, 11,6% das mortes por doença cardiovascular ocorrem dos 30 aos 49 anos e 35,7% dos 50 aos 69 anos. Em todas as regiões brasileiras, as mortes por doença isquêmica do coração na faixa de 30 e 49 anos representam valores  
10 superiores a 11% do total de óbitos, exceto na região Sul (9,9%), considerada mais desenvolvida.

As doenças cardiovasculares são responsáveis por 1.150.000 internações/ano, com um custo aproximado de R\$ 475 milhões, nos quais não estão inclusos os gastos com procedimentos de alta  
15 complexidade. De outra parte, a hipertensão arterial está relacionada a cerca de 25% dos casos de diálise por insuficiência renal crônica terminal, 80% dos casos de acidente vascular encefálico e 60% dos infartos do miocárdio. Além do custo financeiro, é alto o custo social. Dados do Instituto Nacional de Seguridade Social - INSS -  
20 demonstram que 40% das aposentadorias precoces estão relacionadas às doenças do aparelho cardiovascular (Ministério da Saúde, Brasil, 2001).

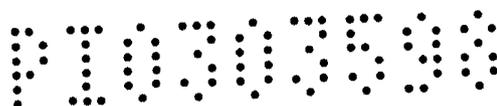
De acordo com L. Husten (Global epidemic of cardio-vascular diseases predicted. Lancet 1998; 352:1530-42), nas próximas  
25 décadas os países menos desenvolvidos sofrerão uma verdadeira epidemia de doenças cardiovasculares, resultado de um aumento dos fatores de risco decorrentes de melhores condições econômicas e do aumento da expectativa de vida.

Doenças cardiovasculares ocasionadas pela aterosclerose em artérias do coração e cérebro não apresentam tratamento para a regressão definitiva da doença, particularmente os casos de dislipidemias familiares congênitas.

5 A aterosclerose é uma doença dos vasos sanguíneos que se caracteriza pelo acúmulo de lípidos nas paredes da artéria, que pode levar à obstrução para passagem do sangue. Nos estágios finais da doença, formam-se placas chamadas *ateromas*, que tornam os vasos menos elásticos, mais rígidos e suscetíveis ao rompimento e  
10 formação de coágulos que levam à obstrução do fluxo sanguíneo para o órgão.

Os riscos de doença aterosclerótica aumentam progressivamente com o aumento dos níveis de colesterol ligado às lipoproteínas de baixa densidade plasmáticas (LDL) e está inversamente relacionado  
15 ao nível do colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (HDL). As LDL causam lesão ao endotélio e o músculo liso subjacente, especialmente após sofrer oxidação ou glicosilação (como no *diabetes mellitus*). Sua migração pelo endotélio e posterior internalização por macrófagos desencadeia uma cascata inflamatória responsável pela  
20 progressão da lesão vascular.

Outra doença cardiovascular, a hipercolesterolemia familiar, é uma condição hereditária dominante que resulta em níveis elevados de colesterol total e de LDL-colesterol, podendo ser homozigótica ou heterozigótica, e resultando em infartos do miocárdio em idade  
25 prematura. Esta doença é relativamente comum, afetando um em cada 500 indivíduos. A principal manifestação clínica desta doença é um distúrbio aterosclerótico cardiovascular acelerado. Entre os pacientes que sofreram infarto do miocárdio antes dos 60 anos, a



incidência de hipercolesterolemia familiar é de um em cada 20. A doença é caracterizada pela elevação do colesterol no soro, estando em uma faixa de 300-600 mg/dL e uma elevada taxa de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), normalmente maior do que 200 mg/dL.

5 Pacientes com hipercolesterolemia familiar possuem freqüentemente sintomas visíveis como um sinal da elevação dos lipídios.

Atualmente, diversas terapias e fármacos são utilizados no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares e da aterosclerose. Porém, não há nenhuma formulação ou técnica que  
10 consiga reduzir e curar as lesões ateroscleróticas em estado avançado. As terapias atualmente empregadas baseiam-se no efeito preventivo de dietas com baixos teores de gorduras saturadas associadas à manipulação farmacológica das concentrações plasmáticas de colesterol ou diminuição na relação colesterol  
15 total/colesterol-HDL. Também existem estudos onde se utilizam suplementações com antioxidantes, tendo em vista que a propagação da doença vascular aterosclerótica é essencialmente devido ao estresse oxidativo que ocorre na parede vascular e a alta taxa de proliferação celular observada na parede vascular.

20 As prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs), por sua vez, apresentam importante potencial para o tratamento de doenças cardiovasculares, uma vez que as CP-PGs são altamente antiproliferativas e promovem a citoproteção tecidual, bloqueando o processo de divisão celular enquanto induzem a expressão de  
25 proteínas antioxidantes e outras proteínas de estresse que conferem resistência a lesões de origem oxidativa.

Prostaglandinas (PGs) constituem uma grande família de autacóides, ou seja, substâncias endógenas com caráter de

“hormônio de ação local”, de ocorrência natural em todos os tecidos de mamíferos. Muitas prostaglandinas têm participação fisiológica importante na redução da pressão arterial e homeostase cardiovascular, assim como são moduladoras de processos inflamatórios, resposta imunológica, crescimento celular, proteção da mucosa gástrica, ciclo ovulatório e trabalho de parto (HOMEM DE BITTENCOURT, 1998. Autacóides derivados de lipídeos: eicosanóides e PAF).

As PGs compreendem uma grande família de ácidos graxos de vinte carbonos, são de origem natural e estão presentes em virtualmente todos os fluidos e tecidos biológicos de mamíferos. As PGs são sintetizadas *in vivo* a partir de ácidos graxos essenciais, como o ácido eicosatrienóico, araquidônico e eicosapentaenóico.

A nomenclatura química das PGs é feita com base no anel ciclopentano (de cinco membros que todas possuem, com exceção da tromboxana, que possui 6 componentes). Assim, tem-se PGs dos tipos A (PGA), B (PGB) até J (PGJ). O número total de insaturações nas cadeias laterais é assinalado com um índice abaixo da letra característica do anel. Por exemplo:  $PGE_2$ ,  $PGI_3$  e  $PGA_1$ .

As PGs apresentam estruturas químicas muito semelhantes, apesar da enorme variedade de efeitos biológicos. As primeiras PGs descobertas foram a  $PGE_2$ , uma substância altamente dolorígenica que é produzida quando ocorre lesão tecidual e que ativa os neurônios da dor, causando forte algesia, e a  $PGF_{2\alpha}$ , uma prostaglandina ligada à indução de trabalho de parto e que participa da regulação do ciclo estral (menstrual). Com a descoberta do mecanismo de ação da aspirina, que bloqueia a produção destas prostaglandinas, os estudos sobre ciclo menstrual, inflamação e dor



ganharam grande impulso. O campo da farmacologia da dor foi um dos mais beneficiados, já que antiinflamatórios bloqueadores da biossíntese de prostaglandinas bloqueiam também a dor inflamatória e a febre. Posteriormente, na década de 1970, duas importantes  
5 prostaglandinas ligadas ao sistema cardiovascular foram isoladas: a prostaciclina ( $PGI_2$ ), produzida pelas células endoteliais vasculares com efeito vasodilatador e antiagregante plaquetário, e a tromboxana  $A_2$  ( $TXA_2$ ), produzida pelas plaquetas e possuindo potente efeito vasoconstritor e agregante plaquetário.

10 Já as prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs) foram tidas como artefatos de preparação durante muitos anos, até que na década de 1990 ficou demonstrado que eram produzidas *in vivo* em humanos e animais experimentais. São conhecidos dois tipos de CP-PGs de origem natural, as da família J (e.g.  $PGJ_2$ ,  $\Delta^{12}$ - $PGJ_2$  e 15-  
15 desóxi- $\Delta^{12,14}$ - $PGJ_2$ ), derivada das PGs do tipo D, e as da família A (e.g.  $PGA_1$ ,  $PGA_2$  e  $PGA_3$ ), derivadas das PGs do tipo E. Apesar da semelhança química entre as duas famílias e do fato de guardarem uma série de propriedades químicas e biológicas em comum, existem importantes diferenças entre essas duas classes de prostaglandinas.  
20 Por exemplo, ambas são indutoras da síntese de proteínas de choque térmico (HSP, do Inglês, *heat shock proteins*), o que confere um caráter citoprotetor às duas famílias. Entretanto, as prostaglandinas da família A não são capazes de ativar o fator nuclear PPAR- $\gamma$ , que é pró-aterogênico, enquanto que as da família J são potentes ativadores  
25 do PPAR- $\gamma$ , descartando, portanto, qualquer possibilidade terapêutica para as mesmas no contexto aqui apresentado.

CP-PGs da família A são antivirais, apresentando potente e feito

antiproliferativo, inclusive contra o HIV, além de participarem da regulação do ritmo de filtração glomerular renal, de reduzirem a pressão arterial sistêmica e de reagirem com a glutatona e outros grupamentos tiol (-SH) intracelulares.

5 O uso das CP-PGs promove a ativação de *heat shock factors* (HSF), fatores nucleares que ativam a via das HSP, que são citoprotetoras, impedem a desnaturação de proteínas intracelulares e desligam o fator nuclear NF- $\kappa$ B, que é um dos principais envolvidos na doença inflamatória vascular da aterosclerose.

10 Prostaglandinas ciclopentenônicas são citoprotetoras, modulam o estado redox e redirecionam o metabolismo lipídico celular de forma a impedir o acúmulo de lípidos. Entretanto, as CP-PGs são citostáticas, não podendo ser administradas diretamente na corrente sangüínea na forma livre.

15 As prostaglandinas derivadas da família D (PGJ,  $\Delta^{12}$ -PGJ e 15-desóxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ) a tivam a s duas vias metabólicas: a d as HSP e a dos PPAR. Um dos membros da família dos PPAR, o PPAR- $\gamma$ , é um conhecido indutor da expressão de proteínas pró-aterogênicas, como por exemplo o receptor de LDL oxidada CD36. O papel dos PPAR, na  
20 aterosclerose, não está esclarecido, fazendo com que apenas as CP-PGs da família A possam ser utilizadas no tratamento de doenças cardiovasculares obstrutivas.

As prostaglandinas ciclopentenônicas, devido ao fato da potente  
ação antiproliferativa e aos efeitos sobre o ritmo de filtração  
25 glomerular renal, não podem ser administradas por injeção diretamente na circulação do ser vivo, já que isso causaria efeitos colaterais semelhantes aos observados na quimioterapia convencional

com drogas anticâncer, com redução da proliferação de todas as células de divisão rápida, gerando queda de cabelo, problemas intestinais e hematopoéticos, entre outros.

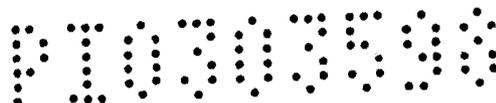
5 Tendo em vista que as CP-PGs são ácidos graxos, a incorporação destes lípides em lipossomos é uma estratégia muito útil quando se necessita veicular uma gordura, como as CP-PGs, que são insolúveis em água.

10 A patente BR1100677 ensina um protocolo para otimizar a encapsulação de drogas lipofílicas em lipossomos de maneira a reduzir a taxa de liberação inespecífica das drogas *in vivo* quando administradas na forma de lipossomos. Em virtude de os lipossomos serem preparados com fosfolípidos e colesterol, os mesmos constituintes das membranas plasmáticas de todas as células, as CP-PGs poderiam ser levadas para qualquer tecido e, tendo em vista que 15 os lipossomos são captados com grande avides pelo fígado, a ação farmacológica não seria a desejada.

A patente US4149007 descreve a síntese de análogos de prostaglandinas fenil-substituídos que possuem atividade farmacológica específica sem os efeitos colaterais apresentados pelas 20 prostaglandinas naturais.

A patente US4517202 descreve a síntese de derivados substituídos de prostaglandinas contendo cadeias normais e ramificadas com ligação alquilena de carbono  $\beta$  contendo dois ou três átomos de carbono e substituintes ao anel bisciclopentano.

25 Verifica-se assim que as publicações disponíveis não descrevem nem sugerem, nem isoladamente nem em combinação, o uso de prostaglandinas ciclopentenônicas veiculadas em lipossomos ou lipoproteínas artificiais, para o tratamento e prevenção de doenças



cardiovasculares.

Portanto, a literatura técnica apresenta diversas soluções para o tratamento de doenças cardiovasculares, mas ainda existe a necessidade de minimizar custos, reduzir a toxicidade e melhorar a margem de segurança farmacodinâmica. Deste modo a literatura aberta não descreve nem sugere uma composição farmacêutica à base de prostaglandina ciclopentenônica veiculada em lipossomos ou lipoproteínas artificiais, conforme descrito e reivindicado no presente pedido.

## 10 **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

De um modo geral a presente invenção compreende novas composições farmacêuticas à base de prostaglandinas veiculadas em lipossomos, ditas composições úteis para o tratamento e prevenção da aterosclerose e de doenças cardiovasculares, bem como o processo de preparação das composições.

A composição farmacêutica para o tratamento e prevenção da aterosclerose e de doenças cardiovasculares, de acordo com a invenção, compreende:

- a) liofilizado de lipossomos negativos ou lipoproteínas artificiais
- 20 b) anticorpos mono ou policlonais contra o VCAM-1
- c) prostaglandinas ciclopentenônicas
- d) antibióticos
- e) um veículo farmacêuticamente aceitável

É objeto da presente invenção fornecer composições farmacêuticas para o tratamento e prevenção da aterosclerose e de doenças cardiovasculares, ditas composições contendo uma proporção de prostaglandina ciclopentenônica.

A presente invenção provê ainda composição farmacêutica à base

de prostaglandina ciclopentenônica encapsulada em lipossomos negativos, que encaminham as prostaglandinas exclusivamente para as lesões endoteliais.

A presente invenção provê ainda a incorporação de  
5 prostaglandinas ciclopentenônicas em lipoproteínas artificiais.

A presente invenção provê a inclusão de anticorpos específicos contra a molécula de adesão vascular tipo 1 (VCAM-1).

Ainda, a presente invenção provê uma composição farmacêutica profilática, no caso de pacientes portadores de dislipidemias familiares,  
10 diabetes descompensado e histórico familiar de infarto agudo do miocárdio, hipertensão arterial e derrame cerebral; e curativa, em casos de diagnóstico conclusivo feito por imagem, como cineangiocoronariografia e ecodopplercardiograma computadorizado, aterosclerose pós-transplante, especialmente renal ou cardíaco, e  
15 angina de peito.

### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

A FIGURA 1 anexa ilustra o direcionamento específico de prostaglandinas ciclopentenônicas às lesões endoteliais.

A FIGURA 2 é uma representação gráfica da incorporação de  
20 acetato [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] em colesterol ( $\text{nmol}/10^6$  células), a fim de investigar o mecanismo de diminuição do colesterol total por prostaglandina ciclopentenônica.

A FIGURA 3 é uma representação gráfica da incorporação de colesterol [ $4\text{-}^{14}\text{C}$ ] em ésteres de colesterol ( $\text{pmol}/10^6$  células), a fim de  
25 traçar a entrada e o destino intracelular de éster de colesterol.

A FIGURA 4 é uma representação gráfica da incorporação de colesterol [ $4\text{-}^{14}\text{C}$ ] no pool de colesterol livre celular ( $\text{pmol}/10^6$  células), a fim de traçar o caminho do éster de colesterol na célula.

A FIGURA 5 é uma representação gráfica da incorporação de oleato de colesterol [2,3-<sup>3</sup>H] no pool de colesterol livre celular (pmol/10<sup>6</sup> células), a fim de traçar o caminho do colesterol a éster de colesterol

5 A FIGURA 6 é uma representação gráfica da incorporação de oleato de colesterol [2,3-<sup>3</sup>H] em ésteres de colesterol (pmol/10<sup>6</sup> células), a fim de traçar o caminho metabólico do colesterol.

A FIGURA 7 é uma representação gráfica da quantidade de colesterol restante em células marcadas com colesterol [4-<sup>14</sup>C] após  
10 24 horas em cultura (pmol/10<sup>6</sup> células).

A FIGURA 8 é uma representação gráfica da quantidade de colesterol exportada para o sobrenadante em células marcadas com colesterol [4-<sup>14</sup>C] após 24 horas em cultura (pmol/10<sup>6</sup> células).

A FIGURA 9 ilustra o conteúdo de colesterol em células  
15 espumosas em cultura tratada com prostaglandinas.

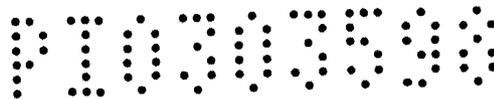
A FIGURA 10 anexa é uma fotomicrografia óptica de um corte histológico de bifurcação de artéria renal de animal doente sem tratamento.

A FIGURA 11 anexa é uma fotomicrografia óptica de um corte  
20 histológico de bifurcação de artéria renal de animal doente tratado.

A FIGURA 12 apresenta uma reprodução de fotografia comparativa da espessura das paredes arteriais dos animais tratados com a composição de prostaglandinas após duas semanas de tratamento.

## 25 **DESCRIÇÃO DETALHADA**

Para as finalidades da presente invenção, tem-se as seguintes conceituações:



a) estado redox é o balanço entre as substâncias redutoras (com caráter antioxidante) e oxidantes em tecidos e células.

b) VCAM-1 é uma molécula de adesão vascular tipo 1, uma proteína tipicamente expressa por células endoteliais submetidas à estresse celular (cisalhamento, hiperlipidemia, estresse oxidativo).

c) colesterol livre é o colesterol não esterificado na forma de ésteres de colesterol.

A presente invenção compreende a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento e prevenção da aterosclerose e de doenças cardiovasculares, dita composição que compreende lipossomos negativos ou lipoproteínas artificiais preparadas com adição de anticorpos monoclonais contra o VCAM-1 e prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs) veiculadas nos lipossomos ou lipoproteínas artificiais.

No modelo proposto, as CP-PGs são veiculadas em lipossomos com superfície externa negativa podendo ser veiculadas em lipoproteínas artificiais. Tanto os lipossomos com superfície externa negativa como as lipoproteínas artificiais são preparados com a adição de anticorpos mono ou policlonais contra o VCAM-1.

Os lipossomos negativos são utilizados por oferecerem repulsão eletrostática quando da aproximação com as membranas plasmáticas, que são bastante negativas graças à presença de ácidos, como, por exemplo, o siálico, em sua superfície externa.

A especificidade da composição foi garantida com a inclusão de anticorpos específicos contra a molécula de adesão vascular (VCAM-1), que é expressa apenas por células endoteliais submetidas à injúria oxidativa.

Dessa forma, as prostaglandinas ciclopentenônicas, encapsuladas

nos lipossomos negativos ou nas lipoproteínas artificiais, são endereçadas exclusivamente para as lesões endoteliais, justamente onde ocorre o desenvolvimento do processo aterosclerótico. Conforme apresentado na Figura 1 em anexo, um agente citostático e  
5 citoprotetor é levado para as células endoteliais, prevenindo e/ou induzindo a regressão da doença vascular já instalada.

Para avaliar o nível de colesterol em células espumosas tratadas com prostaglandinas, foram realizadas duas etapas de testes.

Na primeira etapa, foi feito o cultivo das células (macrófagos  
10 peritoneais residentes de rato) em meio RPMI1640 com 10% (v/v) de soro fetal bovino na presença de LDL oxidada (5  $\mu$ M final) por 72 horas, a fim de se promover a transformação dos macrófagos em células espumosas.

Na segunda etapa, as células (macrófagos peritoneais residentes  
15 de rato já transformados em células espumosas) foram cultivadas por 72 horas adicionais na ausência (controle) ou presença de diferentes prostaglandinas em várias concentrações. Realizadas a primeira e a segunda etapas, o colesterol total foi extraído das células para análise colorimétrico-enzimática pela técnica de colesterol oxidase (Abell, LL;  
20 Levy, BB; Brodie, BB; Kendall, FE, J. Biol. Chem., 195:357, 1952; Trinder, P, Ann. Clin. Biochem., 6:24, 1969), sendo os resultados apresentados na Tabela 1 abaixo.

---

TABELA 1: Conteúdo de colesterol em células espumosas em cultura tratada com prostaglandinas

| Grupo    | Tratamento                             | COLESTEROL TOTAL<br>( $\mu\text{g}/10^6$ células)<br>média $\pm$ E.P.M. | PORCENTAGEM<br>DE VARIAÇÃO<br>EM RELAÇÃO<br>AO CONTROLE |
|----------|--|---|---|
| Ox - LDL | Controle                               | 4,51 $\pm$ 0,47   | -   |
|          | PGI <sub>2</sub> 1 $\mu\text{M}$       | 3,89 $\pm$ 0,02   | -13,8%  |
|          | PGE <sub>2</sub> 1 $\mu\text{M}$       | 3,81 $\pm$ 0,59   | -15,5%  |
|          | PGA <sub>2</sub> 1 $\mu\text{M}$       | 3,85 $\pm$ 0,30   | -14,7%  |
|          | PGA <sub>2</sub> 20 $\mu\text{M}$      | 3,91 $\pm$ 0,77   | -13,4%  |
|          | 15d-PGJ <sub>2</sub> 1,5 $\mu\text{M}$ | 4,95 $\pm$ 0,19   | +9,6%   |

Os dados da Tabela 1 mostram que o tratamento com as PGs do tipo I, E e A promoveram uma sensível e significativa redução na quantidade de colesterol total em células espumosas com apenas 72 h de tratamento. Como se vê, a prostaglandina derivada da série D, 15-desóxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub>, aqui representada por 15d-PGJ<sub>2</sub>, apesar de pertencer à família das prostaglandinas ciclopentenônicas, tem efeito oposto, aumentando a quantidade de colesterol total em cerca de 10%. A opção pelas PGs da série A, em detrimento das outras séries foi o fato de que apenas as PGAs apresentam efeitos sobre o estado redox celular, atividade antiproliferativa (*sine qua non* para uma preparação antiaterosclerose) e ação citoprotetora mediada pela indução de proteínas de choque térmico (HSP). Provavelmente por isso, apenas as PGAs apresentam efeitos histologicamente demonstráveis, conforme pode ser visualizado nas Figuras 9 a 12.

A partir dos estudos sobre as rotas tomadas pelo colesterol e ésteres de colesterol dentro das células espumosas, conforme as Figuras 2 a 8, foi possível estabelecer-se que a redução na

quantidade de colesterol total intracelular foi devida a uma menor síntese de colesterol a partir do acetil-CoA, menor captação (de colesterol e ésteres de colesterol) a partir do meio extracelular, além da maior taxa de exportação para o meio extracelular. Some-se a isso o fato de que as prostaglandinas do tipo A levam a uma menor taxa do característico ciclo de esterificação e hidrólise de ésteres de colesterol. Esses dados, obtidos através de estudos isotópicos (com precursores marcados com  $^{14}\text{C}$  ou  $^3\text{H}$ ) podem ser confirmados pela análise da síntese *de novo* de colesterol a partir de acetil-CoA, conforme apresentado na Figura 2, incorporação de colesterol marcado em ésteres de colesterol, conforme apresentado na Figura 3, captação de colesterol marcado e incorporação no *pool* de colesterol livre intracelular, conforme apresentado na Figura 4, incorporação de oleato de colesterol em colesterol livre, conforme apresentado na Figura 5, incorporação de oleato de colesterol em ésteres de colesterol intracelulares, conforme apresentado na Figura 6 e, finalmente, através de estudos de captação e exportação de colesterol, conforme Figuras 7 e 8.

Conforme apresentado na Figura 9 em anexo, as células espumosas tratadas com prostaglandinas mostram uma excelente redução na quantidade de lípidos intracelulares (amarelo-alaranjado na coloração lipofílica do Sudan III). Observe-se que, particularmente, a PGA na concentração mais baixa ( $1\ \mu\text{M}$ ) apresentou o melhor efeito, particularmente porque a mesma PGA em concentrações mais elevadas ( $10\ \mu\text{M}$ , por exemplo) apresenta efeito citotóxico, onde as células começam um processo de ruptura de integridade do citoesqueleto que pode ser observado nas fotomicrografias ópticas, Figuras 10 e 11.

### 1. Preparo da composição:

Para o preparo da composição, é adicionada uma solução isotônica salina tamponada com fosfato, tal como *Phosphate-Buffered Saline* (PBS), de acordo com a composição apresentada na Tabela 2.

5 TABELA 2: Composição da solução isotônica salina tamponada com fosfato.

| Componente                                | Concentração (mM) | Quantidade para um litro |
|---|-------------------|--------------------------|
| NaCl                                      | 136,8             | 8,000g                   |
| KCl                                       | 2,7               | 200mg                    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (anidro)  | 0,9               | 120mg                    |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anidro) | 6,4               | 1,710g                   |
| Água ultrapura                            |                   | q.s.p                    |

A solução isotônica salina tamponada com fosfato, conforme apresentado na Tabela 2, tem o pH é acertado para 7,40 com HCl concentrado (11N, grau analítico) ou solução de NaOH (10N, grau analítico) antes de completar o volume para um litro. Em seguida, a  
10 solução é esterilizada por autoclavagem entre 120°C e 125°C por, pelo menos, 30 minutos.

Após a autoclavagem, são adicionados os antibióticos à temperatura ambiente, na proporção de 10ml de mistura estéril reconstituída de antibióticos para cada litro de solução isotônica salina  
15 tamponada com fosfato, sendo a concentração final de antibiótico apresentada na Tabela 3.

---

TABELA 3: Concentrações de antibiótico

| Componente     | Concentração |
|----------------|--------------|
| Penicilina     | 100U/ml      |
| Estreptomicina | 100µg/ml     |
| Anfotericina B | 0,25 µg/ml   |

Para o preparo do liofilizado de lipossomos, são misturadas partes iguais de soluções clorofórmicas contendo os componentes apresentados na Tabela 4, de maneira a obter-se  
 5 uma mistura contendo de 50-120 micromols de lípides totais.

TABELA 4: Proporções de lípides utilizados no preparo dos lipossomos

| Componentes                   | Concentração (mM) |
|-------------------------------|-------------------|
| L- $\alpha$ -Fosfatidilcolina | 40,65 a 141,3     |
| Fosfato de dicetila           | 8,13 a 56,26      |
| Colesterol                    | 8,13 a 84,78      |

A seguir, a mistura de lípides apresentada na Tabela 4, ainda em clorofórmio, é seca sob vácuo em evaporador  
 10 centrífugo com corrente de nitrogênio para evitar-se a oxidação das espécies lipídicas presentes. Alíquotas contendo entre 50 e 200 µmol de lípides totais são ressuspensas diretamente nos frascos de origem com 3 a 9ml de PBS contendo antibióticos, a fim de obter uma suspensão de concentração 13 a 45 µmol/ml de  
 15 lípides totais.

Em seguida, os lipossomos são sonificados em sonificador de haste por 30 a 40 minutos em banho de gelo para a obtenção de partículas homogêneas com raio aproximado de 100 a 500 nm.

A seguir, são transferidos de 300 a 850µl da solução de  
 20 prostaglandina da família A, em acetato de metila ou etanol

10mg/ml, para um tubo cônico de centrifugação de 15ml estéril em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar de segurança biológica classe IIA, sendo a alíquota de prostaglandina da família A submetida a uma corrente de 5 nitrogênio gasoso para a remoção do solvente por evaporação forçada.

A seguir, são coletados 4,5ml da suspensão de lipossomos já sonicada, sendo misturado a este volume uma alíquota de prostaglandina da família A contida no tubo de centrifugação. A 10 mistura dos lipossomos e da prostaglandina da família A é agitada por 1 a 5 minutos em homogeneizador de tubos tipo Vórtex, de maneira a dissolver todo o conteúdo de prostaglandina retido nas paredes do tubo na preparação lipossomal.

15 A seguir, a preparação é sonicada em sonicador de haste por 30 a 40 minutos em banho de gelo.

Após a etapa de homogeneização, são adicionados à preparação de lipossomos com prostaglandina, 4,41ml de PBS com antibióticos e 90µl de anticorpo anti-VCAM-1. Esta mistura é 20 agitada entre 10 e 120 segundos em homogeneizador de tubos tipo Vórtex e depois novamente sonicada por 30 a 40 minutos em banho de gelo.

A Tabela 5 abaixo ilustra os componentes e proporções utilizadas na preparação da formulação de lipossomos contendo 25 prostaglandinas.

---

TABELA 5: componentes e proporções utilizadas na preparação da formulação de lipossomos contendo prostaglandinas.

| Componente                       | Quantidade por ml           |
|----------------------------------|-----------------------------|
| PGA                              | 300 $\mu$ g a 1mg           |
| Anticorpo anti-VCAM-1            | 1 a 5 $\mu$ g               |
| L- $\alpha$ -Fosfatidilcolina    | 5 a 10 $\mu$ mol            |
| Fosfato de dicetila              | 1 a 4 $\mu$ mol             |
| Colesterol                       | 1 a 6 $\mu$ mol             |
| NaCl                             | 136,8 $\mu$ mol (8mg)       |
| KCl                              | 2,7 $\mu$ mol (200 $\mu$ g) |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 0,9 $\mu$ mol (120 $\mu$ g) |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 6.4 $\mu$ mol (1,71mg)      |
| Penicilina                       | 100U                        |
| Estreptomicina                   | 100 $\mu$ g                 |
| Anfotericina B                   | 0,25 $\mu$ g                |
| Água ultrapura                   | q.s.p                       |
| Lípides totais                   | 7,9 a 23 $\mu$ mol          |

A composição de lipossomos contendo prostaglandinas ciclopentenônicas da família A deve ser refrigerada até o momento de sua utilização.

Alternativamente, a esterilização das preparações pode ser realizada por radiação gama em baixa intensidade ou filtração em membranas de polietersulfona de baixa ligação inespecífica.

## 2. Avaliação do perfil farmacodinâmico da composição:

### 2.1 Animais

Foram utilizados camundongos geneticamente modificados (Knockout) para receptores de LDL. Estes animais, por não captarem

as partículas de LDL através dos receptores convencionais, acumulam grandes quantidades de colesterol na circulação. Como o clearance das partículas de LDL nestes animais só pode ser realizado por receptores do tipo scavenger, presentes especialmente em monócitos/macrófagos e células endoteliais, as LDL acabam por oxidar-se, constituindo-se no principal componente de iniciação da doença vascular aterosclerótica. Os camundongos da linhagem B6129SLDr<sup>tm1-Her</sup>, cujas matrizes foram compradas junto ao The Jackson Laboratory (USA), foram obtidos inicialmente a partir da deleção química do gene codificado para os receptores de LDL nativa e, depois, cruzados por vinte gerações até se obterem camundongos praticamente isogênicos. Enquanto camundongos normais apresentam uma colesterolemia de cerca de 80mg/dL, estes animais já nascem apresentando colesterol plasmático total de 200mg/dL, podendo alcançar até 2000mg/dL quando tratados com dietas suplementadas com colesterol, na proporção de 1%*m/m* na ração.

### **3. Ensaios de toxicidade da composição**

#### **3.1 Determinação da dose letal mediana**

Para a determinação da dose letal mediana das substâncias, doses compreendidas entre 1 mg/kg/dia a 50 mg/kg/dia foram administradas a dois grupos de camundongos de 20g/dia, durante 14 dias em animais mantidos em dieta hipercolesterolemiantes desde o desmame, a fim de selecionar a faixa de dose mais adequada.

Para um grupo de camundongos, aqui denominado GRUPO A, foi administrada a substância pela via intraperitoneal e para o segundo grupo, aqui denominado GRUPO B, foi administrada a substância pela via intracardíaca.

TABELA 6: Efeito da composição administrada a dois grupos de

camundongos, por 14 dias, em doses de 1 mg/kg/dia a 50 mg/kg/dia:

| Administração da<br>composição | Percentual de mortes             |                                |
|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
|                                | Grupo A<br>(via intraperitoneal) | Grupo B<br>(via intracardiaca) |
| 1 mg/kg/dia                    | 0%                               | 50%                            |
| 3 mg/kg/dia                    | 0%                               | 75%                            |
| 25 mg/kg/dia                   | 50%                              | 100%                           |
| 50 mg/kg/dia                   | 100%                             | 100%                           |

Os dados apresentados na Tabela 6 acima demonstram que doses compreendidas entre 1 mg/kg/dia e 3 mg/kg/dia apresentaram menor índice de mortalidade, praticamente nulo, evidenciando a baixa toxicidade da preparação quando dentro desta faixa de trabalho. Já as mesmas preparações veiculadas intracardiamente promovem morte em quantidade apreciável dos animais, mesmo em doses baixas.

A administração de prostaglandinas ciclopentenônicas com  $^3\text{H}$  e preparações com lipossomos negativos ou lipoproteínas artificiais, ambos preparados pela adição de anticorpos contra VCAM-1, indicam que 64,7% da prostaglandina ciclopentenônica é levada para o endotélio aórtico, enquanto preparações sem os anticorpos direcionam apenas 34,6% para o endotélio aórtico.

A Figura 10 em anexo apresenta um tecido corado pela técnica da hematoxilina-eosina (HE) de artéria renal de animal doente, obtido de camundongo alimentado com colesterol por três meses e sem nenhum tratamento. Comparado à Figura 11, é visível o aparecimento de células imunológicas na íntima (1) e o espessamento com intensa atividade sintética na média (2), o que implica em perda de elasticidade e propensão à ruptura dos vasos.

Na Figura 11, o tecido corado pela técnica da hematoxilina-eosina

(HE), foi obtido de camundongo alimentado com colesterol por três meses, tratado com injeções intraperitoneais diárias de 3mg/kg de prostaglandina ciclopentenônica por duas semanas. A seta evidencia a não-infiltração de células imunológicas na íntima nem o  
5 espessamento com intensa atividade sintética na média (2).

Nas figuras 10 e 11, as chaves indicadas nas duas figuras têm o mesmo tamanho e evidenciam a nítida redução na espessura das paredes arteriais dos animais doentes tratados com a formulação. A  
10 Figura 12 apresenta a visível redução da espessura das paredes arteriais.

### **3.2 Testes de toxicidade sangüínea**

Para os testes de toxicidade sanguínea foi utilizada a técnica de coloração de Romanowsky.

Nos esfregaços de sangue corados por Romanowsky não foi  
15 observada nenhuma alteração nas proporções ou na morfologia das células sangüíneas.

### **3.3 Forma de administração**

Foram testadas em camundongos a administração por via intraperitoneal e intracardíaca. Testes estão sendo realizados por via  
20 intramuscular e via endovenosa.

## REIVINDICAÇÕES

1. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA caracterizada por compreender:

5 a) uma proporção de liofilizado de lipossomos negativos ou lipoproteínas artificias,

b) uma proporção de anticorpos mono ou policlonais contra o VCAM-1,

c) uma proporção farmacologicamente ativa de prostaglandinas ciclopentenônicas,

10 d) uma proporção de antibióticos,

e) um veículo farmaceuticamente aceitável.

2. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser a prostaglandina ciclopentenônica veiculada nos lipossomos negativos ou lipoproteínas artificias.

15

3. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser prostaglandina ciclopentenônica da família A.

4. PROCESSO DE PREPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO reivindicada em 1 caracterizado porque compreende as etapas de:

20

a) sonicar os liofilizados de lipossomos em sonicador de haste por 30 a 40 minutos em banho de gelo;

b) submeter a solução de prostaglandina da família A, em acetato de metila ou etanol 10mg/ml, a uma corrente de nitrogênio gasoso para a remoção do solvente por evaporação forçada;

25

c) misturar a suspensão de lipossomos a uma alíquota de

prostaglandina da família A e agitar por 1 a 5 minutos em homogeneizador de tubos tipo Vórtex;

d)sonicar a mistura em sonicador de haste por 30 a 40 minutos em banho de gelo.

5 e)adicionar a solução isotônica salina tamponada com fosfato com antibióticos e o anticorpo anti-VCAM-1, agitando entre 10 e 120 segundos em homogeneizador de tubos tipo Vórtex e depois sonicando por 30 a 40 minutos em banho de gelo.

10 **5.** PROCESSO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato dos antibióticos serem penicilina, estreptomicina e anfotericina B.

15 **6.** PROCESSO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato da esterilização das preparações ser realizada por radiação gama em baixa intensidade.

**7.** PROCESSO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de a esterilização das preparações ser mediante filtração em membranas de polietersulfona de baixa ligação inespecífica.

20 **8.** Uso da composição à base de prostaglandinas ciclopentenônicas veiculadas em lipossomos na preparação de medicamentos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser para o tratamento e prevenção da aterosclerose e de doenças cardiovasculares.

25 **9.** Uso da composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser para o tratamento de lesões ateroscleróticas em estado avançado.

**10.** Uso da composição à base de prostaglandinas

- 5 ciclopentenônicas veiculadas em lipossomos na preparação de medicamentos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser profilática no caso de pacientes portadores de dislipidemias familiares, diabetes descompensado e histórico familiar de infarto agudo do miocárdio, hipertensão arterial e derrame cerebral.
- 10 **11.** Uso da composição à base de prostaglandinas ciclopentenônicas veiculadas em lipossomos na preparação de medicamentos caracterizado por ser curativa nos casos de diagnóstico conclusivo feito por imagem, como cineangiocoronariografia e ecodopplercardiograma computadorizado, aterosclerose pós-transplante, especialmente renal ou cardíaco, e angina de peito.
- 15 **12.** Uso da composição à base de prostaglandinas ciclopentenônicas veiculadas em lipossomos na preparação de medicamentos, de acordo com as reivindicações 1 a 11, caracterizado por ser formulada em uma composição administrada por qualquer uma das vias intracardíaca, intraperitoneal, intramuscular e endovenosa.

FIGURA 1

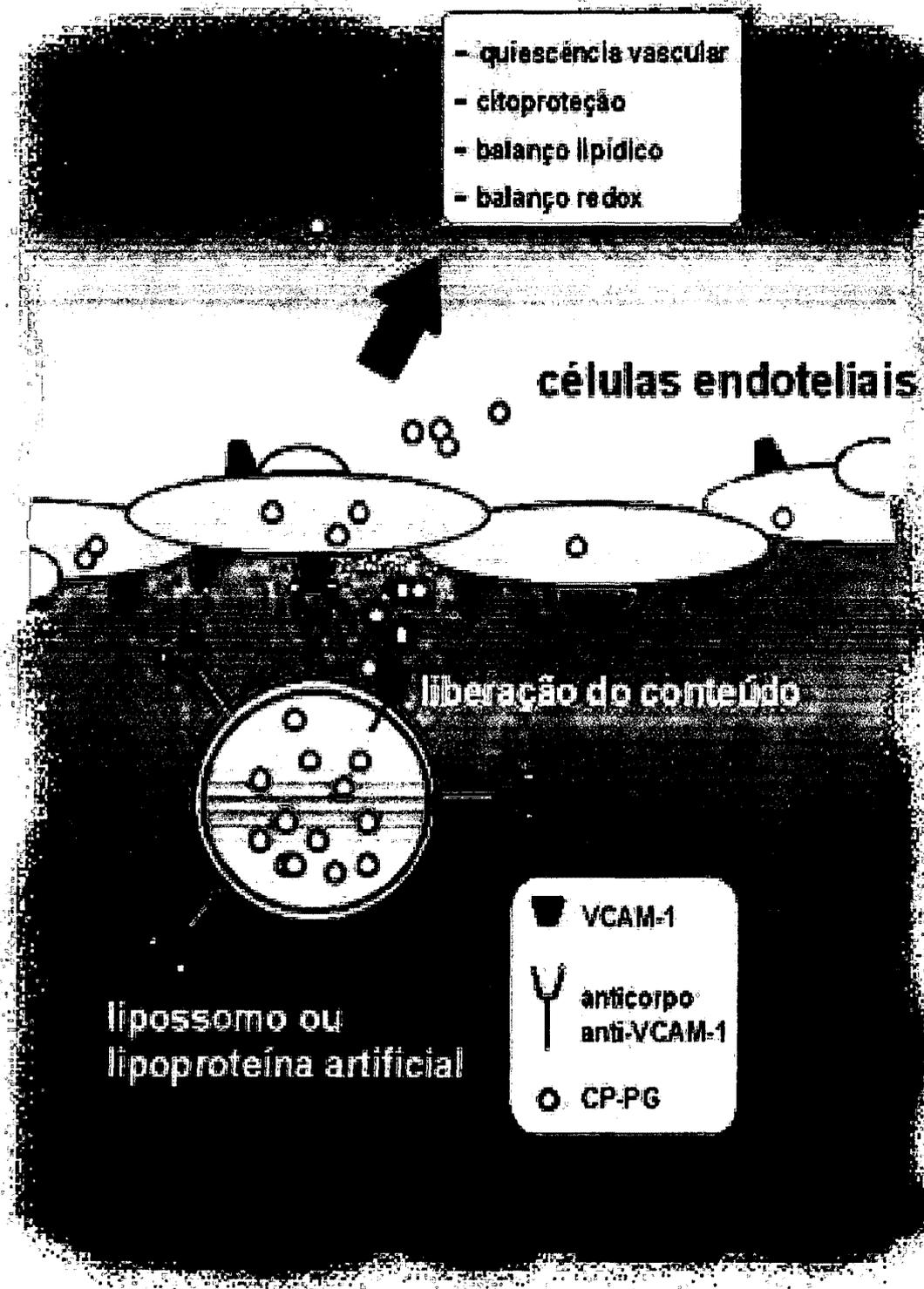


FIGURA 2

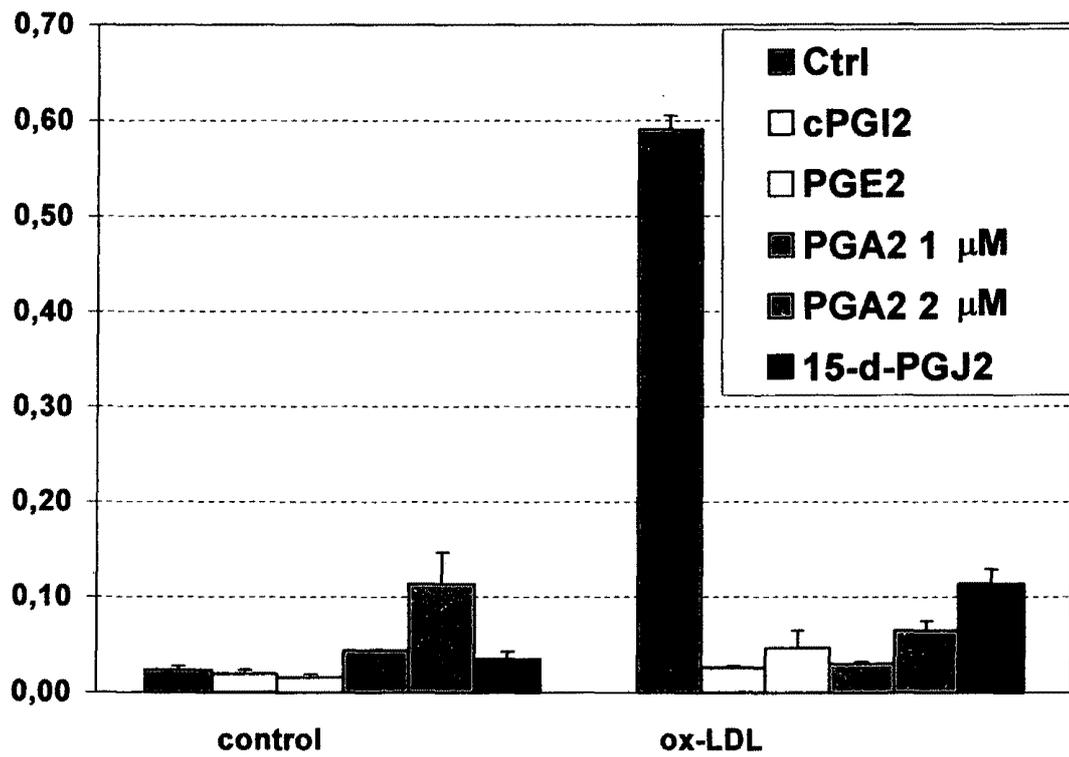


FIGURA 3

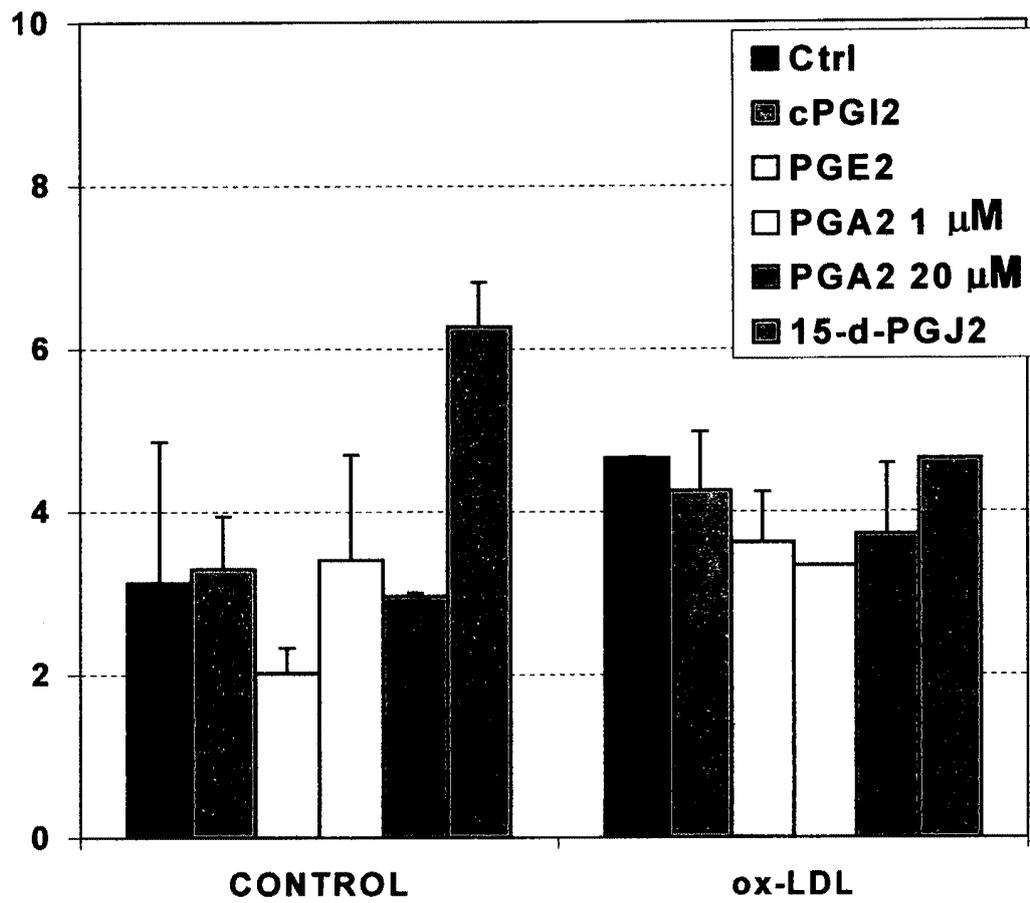


FIGURA 4

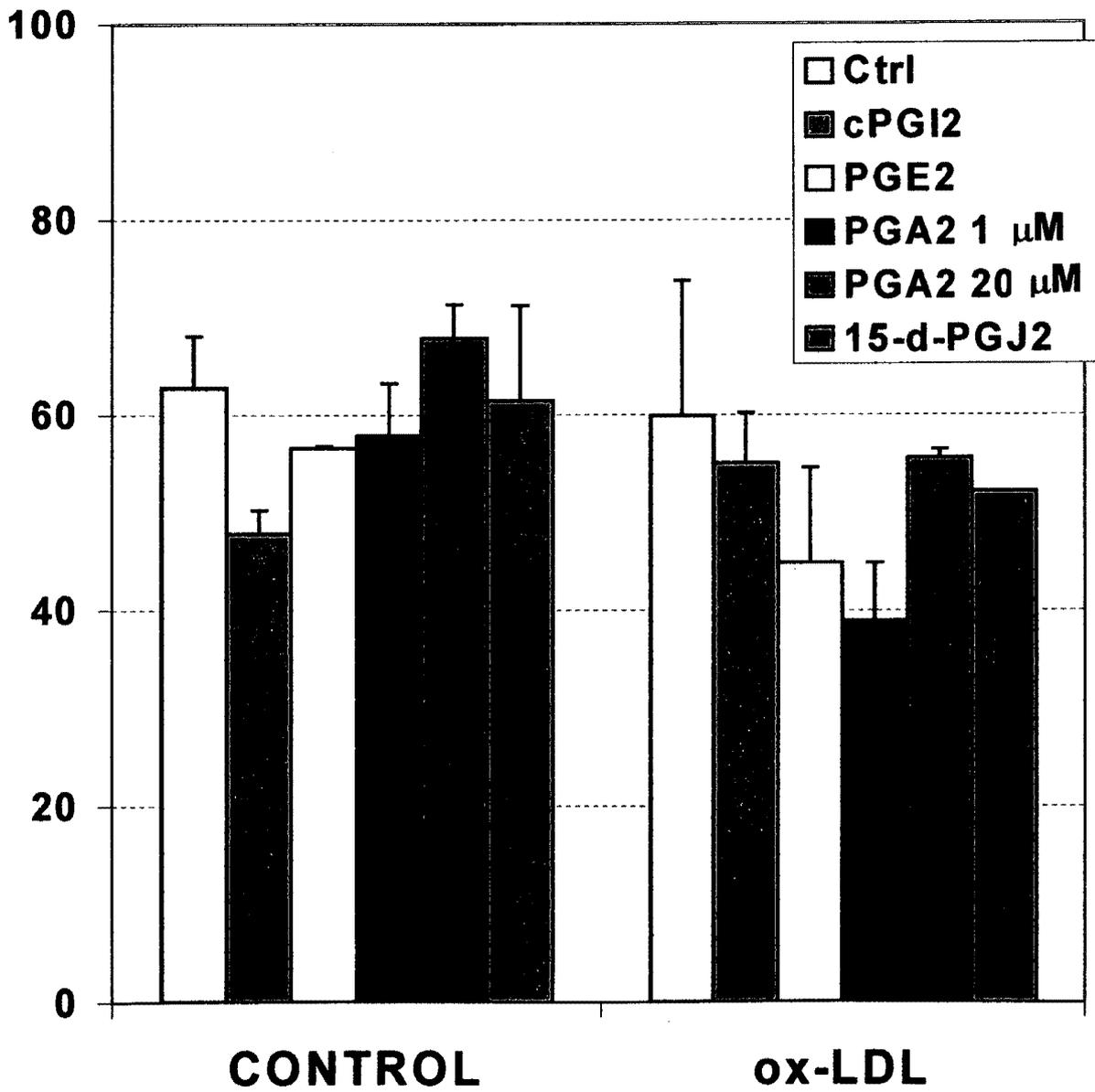


FIGURA 5

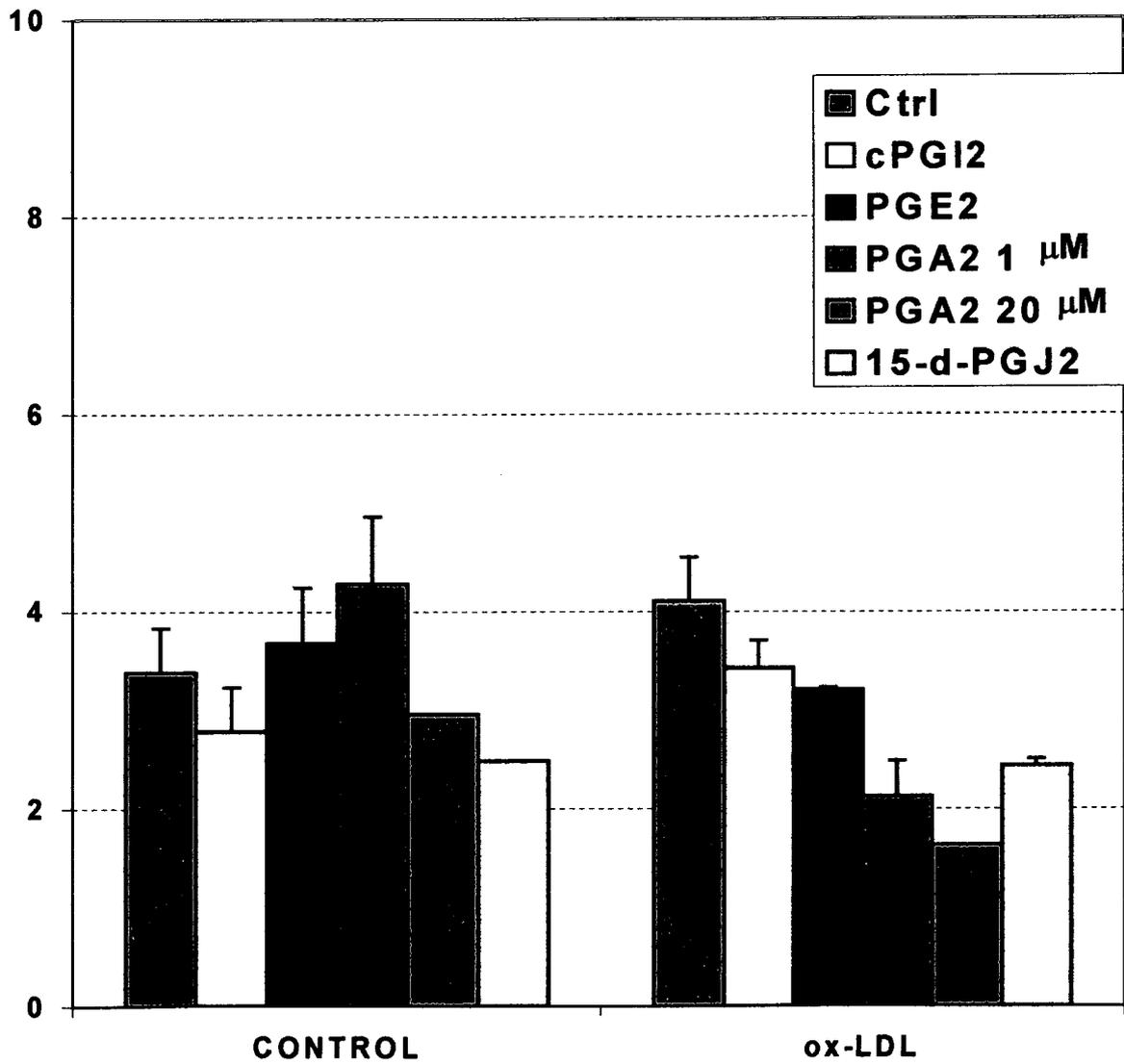


FIGURA 6

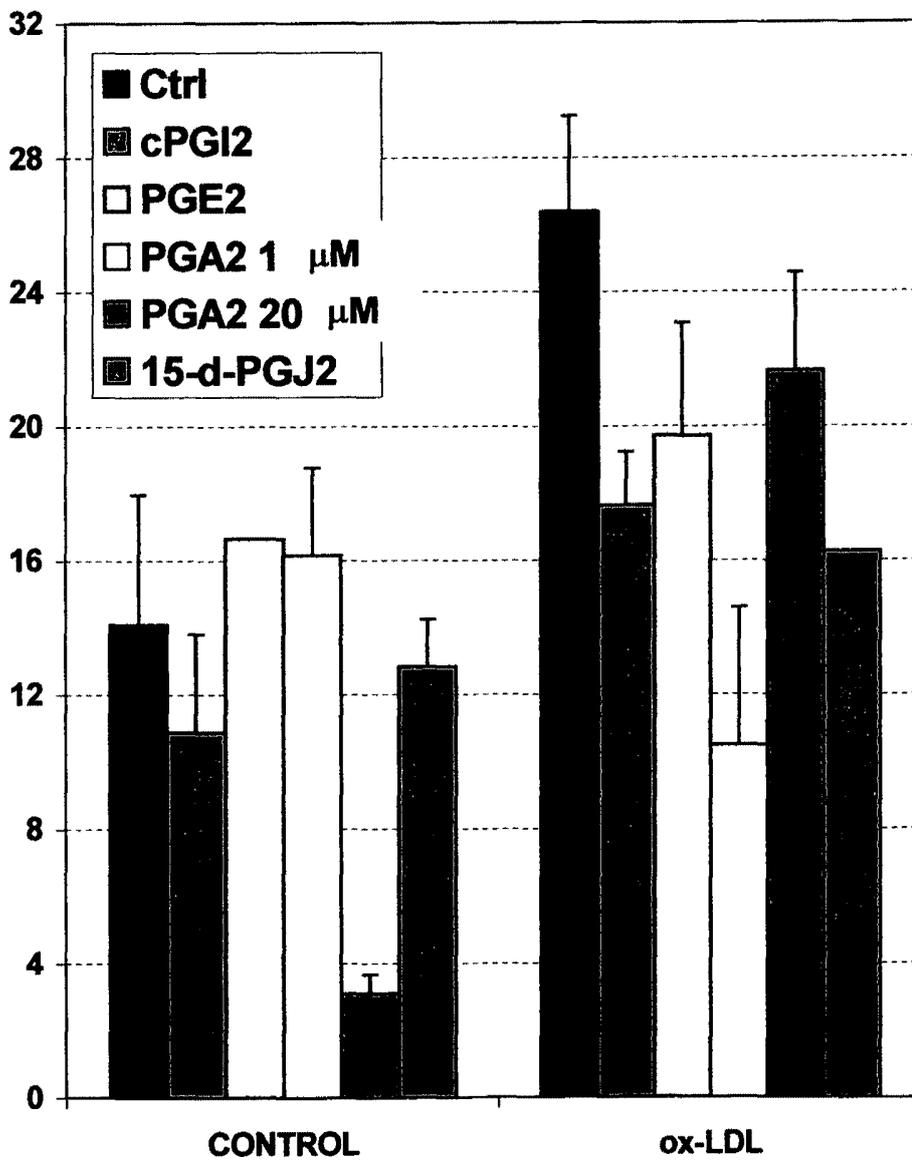


FIGURA 7

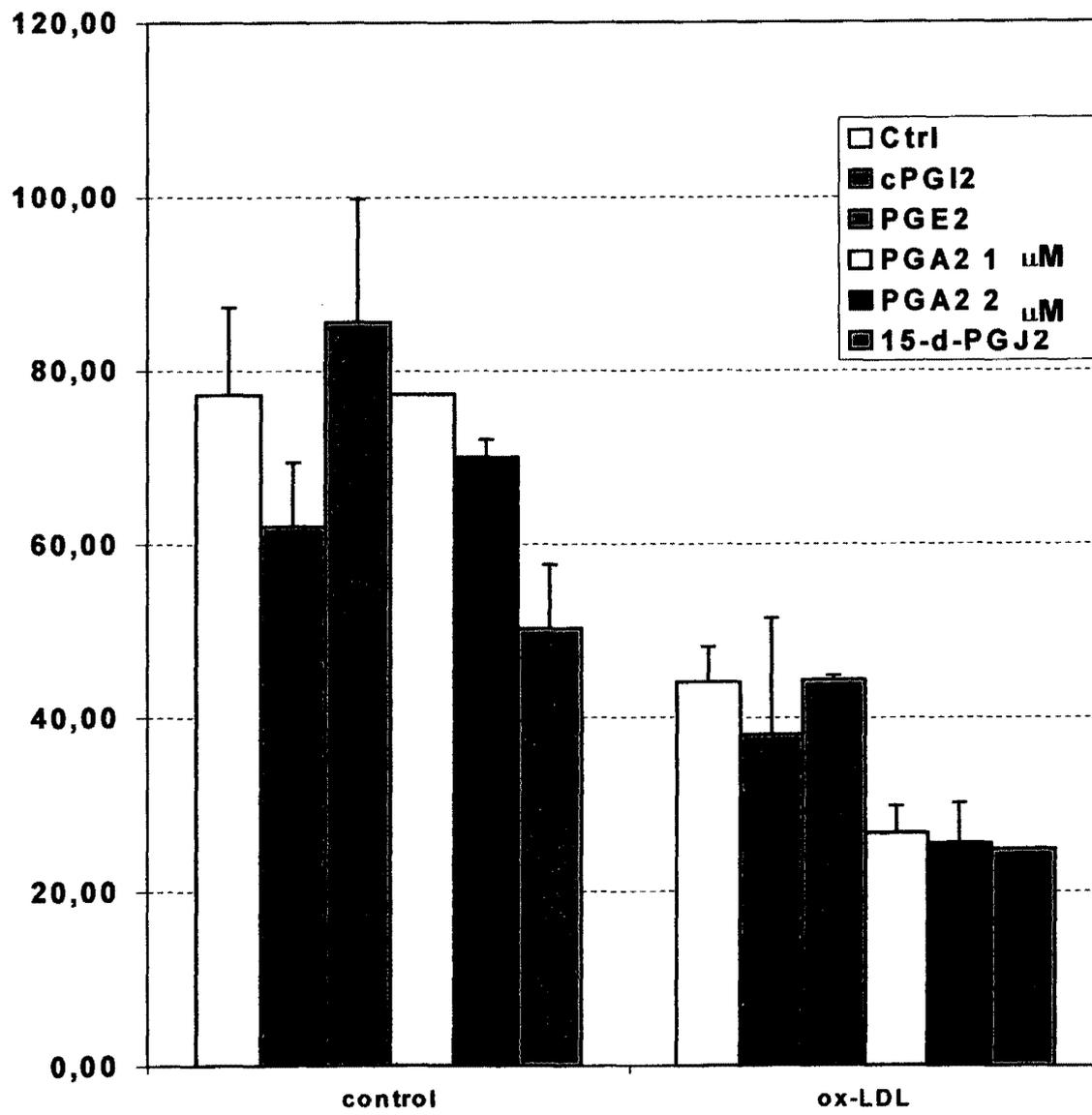


FIGURA 8

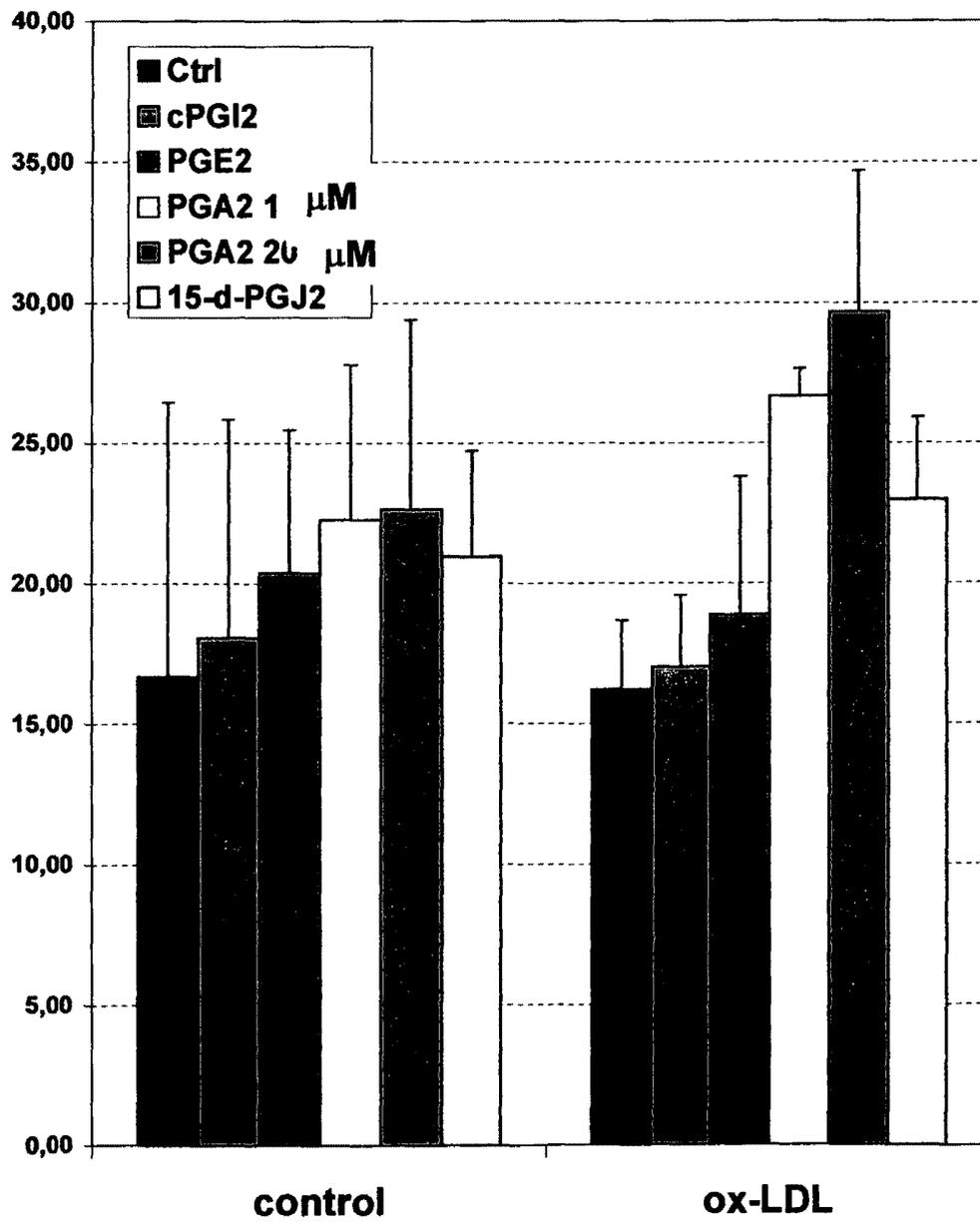


FIGURA 9

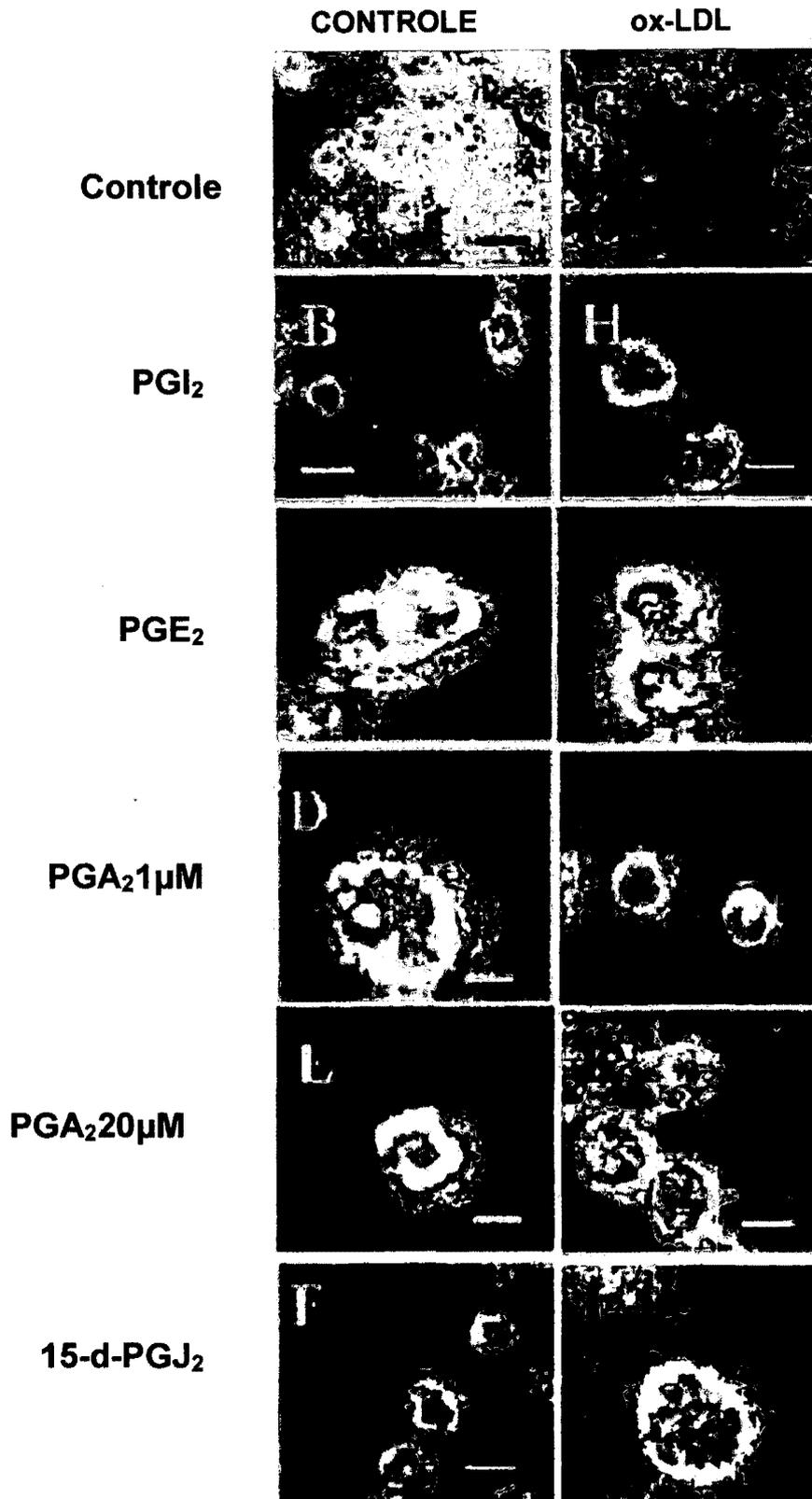


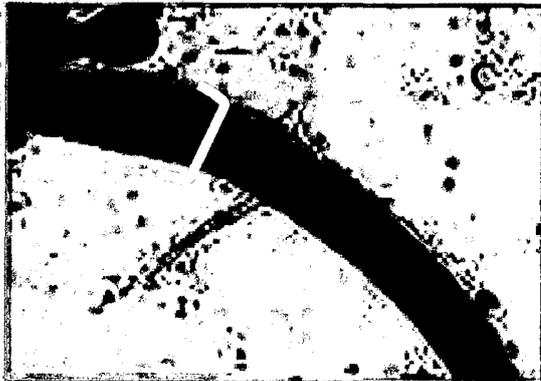
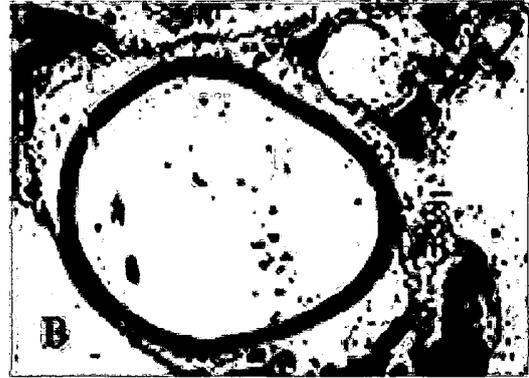
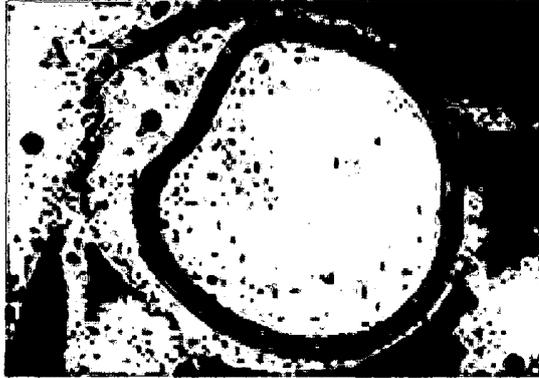
FIGURA 10



FIGURA 11



FIGURA 12



## RESUMO

### COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS À BASE DE PROSTAGLANDINAS CICLOPENTENÔNICAS VEICULADAS EM LIPOSSOMOS E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DAS COMPOSIÇÕES

5

É descrita uma composição farmacêutica à base de prostaglandinas ciclopentenônicas veiculadas em lipossomos e o processo de preparação da composição, dita composição que compreende um liofilizado de lipossomos negativos ou lipoproteínas artificiais, anticorpos mono ou policlonais contra o VCAM-1, prostaglandinas ciclopentenônicas, antibióticos e um veículo farmacêuticamente aceitável. As composições farmacêuticas descritas são úteis no tratamento e prevenção da aterosclerose e de doenças cardiovasculares.

10