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

(21) BR 102015015356-2 A2

(22) Data do Depósito: 25/06/2015

(43) Data da Publicação: 03/01/2017

(54) Título: COMPOSIÇÃO E FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA PARA TRATAMENTO OCULAR NÃO INVASIVO, E SEUS USOS

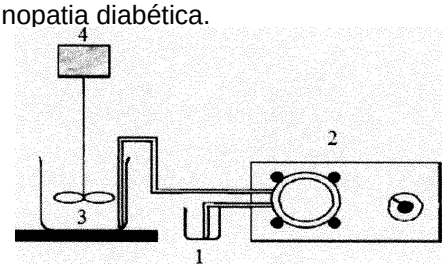
(51) Int. Cl.: A61K 31/445; A61K 9/127; C07D 211/94; A61P 27/02

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

(72) Inventor(es): JACQUELINE MENDONÇA LOPES DE FARIA; MARIA HELENA ANDRADE SANTANA; MARIANA APARECIDA BRUNINI ROSALES; ALINE BORELLI ALONSO

(74) Procurador(es): LUCIANA ALBOCCINO BARBOSA CATALANO

(57) Resumo: A presente invenção refere-se à composição e formulação não invasiva tópica ocular composta de lipossomas de tamanho nanométrico encapsulando tempol para uso nas fases precoces da retinopatia diabética. O uso tópico da formulação de tempol em lipossomas foi capaz de prevenir marcadores precoces de retinopatia diabética (nitrotirosina e GFAP) e conseqüentemente promover efeitos protetores na retina funcional observado pelo eletroretinograma em modelo experimental de retinopatia diabética.



COMPOSIÇÃO E FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA PARA TRATAMENTO OCULAR NÃO INVASIVO, E SEUS USOS

Campo da invenção:

[1] A presente invenção trata de uma composição e formulação farmacêutica para prevenção e tratamento ocular não invasivo, sendo a invenção aplicada na medicina, mais especificamente no campo da oftalmologia. É um objeto adicional o uso.

Fundamentos da invenção:

[2] Os tratamentos atuais disponíveis para a retinopatia diabética (RD) são invasivos, como a fotocoagulação a laser, injeções intravítrea de drogas anti-angiogênicas e vitrectomia. No entanto a formulação de um colírio que seja capaz de permear as barreiras oculares atingindo a retina, prevenindo ou até mesmo tratando as alterações causadas pela RD se faz necessário.

[3] O documento JP2011246464A apresenta uma composição de lipossomas altamente estáveis e capazes de carrear seguramente um fármaco para o segmento posterior do olho, na forma farmacêutica de colírio. Esses lipossomas devem ter os seguintes componentes funcionais: um fosfolipídio estrutural de alta temperatura de transição de fases, (gel-líquido cristalino) uma substância que reforce a membrana lipossomal, e um composto selante que é fármaco não esteroidal com ação antinflamatória. Os lipossomas possuem diâmetro médio menor ou igual a 1 micrometro ou podem ser cobertos com um polímero e/ou conterem composto carregado positiva ou negativamente sobre a superfície. Observe-se que na tecnologia descrita no mencionado documento, o processo de produção dos lipossomas não é escalonável, o que não garante que as propriedades sejam mantidas quando se necessitar produzir maiores volumes, mesmo para ensaios pré-

clínicos. A invenção proposta apresenta como uma primeira vantagem o fato da composição lipossomal ser mais simples, compreendendo somente um componente sendo o processo de preparação dos lipossomas simples e escalonável, passível de implementação no setor industrial. Além disso, o uso tópico do tempol nanoestruturado em lipossomas de EPC + Tempol nas fases precoces da RD e os experimentos funcionais e histológicos em modelo de RD experimental comprovam o efeito protetor na retina.

[4] O documento US2011/0008421A1 trata de lipossomas rígidos, compostos de três classes de componentes: fosfolipídio estrutural, substância com carga negativa e substância reforçadora da membrana lipossomal. A classe de fosfolipídio, compreende no mínimo 1 fosfolipídio de 12 a 18 átomos de carbono. A substância reforçadora deve ter um esqueleto esteroidal. A estrutura lipossomal deve ter temperatura de transição de fases (gel-líquido cristalino) maior que 20°C, e diâmetro médio sub-micrométrico (igual ou inferior a 600nm). Os lipossomas também são capazes de encapsular fármacos hidrofílicos ou hidrofóbicos para o tratamento de várias doenças. A tecnologia baseia-se no fato de que, para atingir o segmento posterior do olho, a estrutura dos lipossomas deve ser rígida. São estabelecidas uma medida de rigidez e uma faixa ampla aceitável que é função da altura da partícula adsorvida sobre o substrato e do diâmetro médio da partícula. Essas propriedades são dependentes da composição dos lipossomas. A forma farmacêutica é a de gotas para instilação nos olhos (colírio). Ressalte-se que o processo de produção dos lipossomas não é escalonável, o que não garante que as propriedades sejam mantidas quando se necessitar produzir maiores volumes, mesmo para ensaios pré-clínicos. A invenção

proposta apresenta como vantagem o fato de compreender uma composição lipossomal mais simples com somente um componente (EPC) que, por possuir baixa temperatura de transição de fases, produz lipossomas flexíveis sendo o processo de preparação dos lipossomas simples e escalonável, passível de implementação no setor industrial.

[5] O documento US2013/216606A1 descreve formulações de lipossomas para tratamento ocular cuja doença é glaucoma. Os lipossomas são compostos de no mínimo um lipídio, um esterol, um esfingolipídio, dentre outros lipídios, e um composto da classe das prostaglandinas cuja função é diminuir a pressão intraocular. Os lipossomas são do tipo SUVs ou LUVs, cuja faixa de tamanhos vai de 20 a 300nm. A formulação pode conter um ou vários lipídios. Ressalte-se que os lipossomas restringem-se ao transporte de composto do tipo prostaglandina e liberá-lo de modo sustentado. Ainda, o processo de produção dos lipossomas não é escalonável, não garantindo que as propriedades sejam mantidas quando se necessitar produzir maiores volumes, mesmo para ensaios pré-clínicos. A invenção proposta difere do citado documento tanto na composição lipídica (a invenção usa somente EPC como lipídio), quanto no fármaco encapsulado e na doença a ser tratada. Os lipossomas da presente invenção carream o fármaco Tempol cuja função é a de proteger a retina através da prevenção do estresse oxidativo nas fases precoces da retinopatia diabética (RD). A proposta invenção diferencia-se, ainda, pois o processo de produção dos lipossomas é controlado e escalonável, o que significa ser passível de transposição de escala para maiores volumes, mantendo as propriedades dos lipossomas. A transposição de escala facilita a implementação do processo no setor industrial.

[6] O documento WO2005/051328A2 se refere à

administração direta aos olhos (injetáveis, colírios, inserts, lentes de contato, gel e outras formas líquidas) de hidroxilaminas (derivados de nitróxidos) para doenças oftalmológicas tais como degeneração macular relacionada à idade (DMRI), glaucoma, retinopatias, uveites, entre outras. É defendido que as hidroxilaminas são preferíveis aos nitróxidos como agentes terapêuticos baseados na ausência de toxicidade. A invenção proposta difere do documento mencionado principalmente pelo fato de utilizar o tempol na forma oxidada e não reduzida (Tempol-H) nanoestruturado na prevenção dos sintomas precoces da RD. Além disso, a tecnologia proposta possui a vantagem de não ser um método invasivo para os pacientes.

[7] O documento US7825134 apresenta uma formulação de colírio com hidroxilaminas (Tempol-H) para o tratamento principalmente de catarata, mas também abrange outras desordens oculares como DMRI, retinopatias, glaucoma, entre outras. A tecnologia proposta é mais simples uma vez que não houve a necessidade de reduzir o tempol. Além disso, a incorporação do fármaco em nanopartículas auxilia a sua penetração ocular.

[8] Seria útil se o estado da técnica propusesse uma composição e formulação farmacêutica que fosse capaz de prevenir e tratar de forma não invasiva compreendendo tempol oxidado e EPC.

Breve descrição da invenção:

[9] A presente invenção trata de uma composição e formulação farmacêutica para prevenção e tratamento ocular não invasivo, sendo a invenção aplicada na medicina, mais especificamente no campo da oftalmologia. É um objeto adicional o uso.

[10] A composição farmacêutica ocular compreende os

seguintes componentes:

- tempol oxidado com concentração de 1mM encapsulado em lipossomas convencionais flexíveis com diâmetro médio variável entre 50 e 200nm, preferencialmente entre 50 e 100nm; compreendem fosfolipídios com temperatura de transição de fases abaixo da temperatura corpórea, preferencialmente fosfatidilcolina de ovo (EPC) com concentração variável entre 1 e 20mM, preferencialmente 2mM;
- veículo composto de solução salina.

[11] A formulação preferencial compreende:

- tempol oxidado com concentração de 1mM em lipossomas convencionais flexíveis com diâmetro médio de 60 nm, compreendem fosfatidilcolina de ovo (EPC) com concentração de 2 mM; e
- solução salina q.s.p.

Breve descrição das figuras:

[12] Figura 1: Esquema do aparato experimental para a produção de lipossomas pré-formados por meio de processo que utiliza agitação mecânica de alto nível de cisalhamento, sendo 1) reservatório contendo suspensão lipídica (EPC); 2) bomba peristáltica; 3) tanque contendo tempol diluído em solução salina; 4) agitador mecânico do tipo Ultra-Turrax®.

[13] Figura 2: Teste de citotoxicidade do tempol nas concentrações de 1 – 10mM na linhagem celular humana do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19) realizado através do método de *thiazolyl blue tetrazolium bromide* (MTT) após 72 minutos da adição.

[14] Figura 3: Teste de viabilidade celular em ARPE-19 para determinar citotoxicidade das diferentes formulações de nanopartículas de tempol (NT) enumeradas de 1 a 5 (NT 1 a 5) realizado através do método de *thiazolyl blue tetrazolium bromide* (MTT) após 2 horas da adição. Foram testadas as

amostras com pH final após o preparo ou ajustado para 7,4 com ácido clorídrico.

[15] Figura 4: Representação do ensaio de permeabilidade das nanopartículas de tempol através da monocamada de ARPE-19 obtida no sistema *Transwell Insert* (HTS, Costar; Corning Inc, NY, USA). Após 5 dias de crescimento celular para a formação da monocamada (100% de confluência), as formulações foram adicionadas na porção apical. Após 2 horas as amostras de meio foram coletadas na porção basal e apical. O tempol presente nas amostras foi detectado por meio de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR).

[13] Figura 5: Identificação de tempol por meio de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) nas amostras coletadas no ensaio de permeabilidade celular. Os espectros representam a forma característica triplete do nitróxido tempol. As amostras foram denominadas de 1 à 5 de acordo com a concentração de lipídios e método de obtenção das nanopartículas (NT1 à NT5). O eixo X corresponde ao magnetismo em Gauss, que estabelece a relação entre o fluxo de campo elétrico que passa através de uma superfície fechada com a carga elétrica que existe dentro do volume limitado por esta superfície; e o eixo Y é a absorção em unidade arbitrária. Legenda: 1A: amostra coletada na parte apical de células tratadas com NT1; 2A: amostra coletada na parte apical de células tratadas com NT2; 3A: amostra coletada na parte apical de células tratadas com NT3; 4A: amostra coletada na parte apical de células tratadas com NT4; 5A: amostra coletada na parte apical de células tratadas com NT5; 1B: amostra coletada na parte basal de células tratadas com NT1; 2B: amostra coletada na parte basal de células tratadas com NT2; 3B: amostra coletada na parte basal de

células tratadas com NT3; 4B: amostra coletada na parte basal de células tratadas com NT4; 5B: amostra coletada na parte basal de células tratadas com NT5.

[14] Figura 6: Eletrorretinograma dos animais estudados. Gráficos em barras representativos obtidos através da média ± desvio padrão dos valores de amplitude da "onda b" (A), tempo implícito da "onda b" (B) e o tempo de total de resposta da "onda a" até o pico de culminação da "onda b" (C) sob estímulos luminosos de 0db. No eletrorretinograma (D) é possível visualizar as variações entre os grupos. Legenda: Vermelho= WKY (rato normotenso); Azul Royal= SHR (rato hipertenso); Verde= SHR DM (rato hipertenso diabético); Azul Celeste= SHR DM NT4 (rato hipertenso diabético tratado com NT4); Lilás= SHR DM NT5 (rato hipertenso diabético tratado com NT5).

[15] Figura 7: Imunohistoquiímica para nitrotirosina em cortes de tecido de retina dos animais estudados. A formação de nitrotirosina pode ser observada em marrom nas regiões das plexiformes e no segmento dos fotorreceptores. *P=0,01 versos WKY e *P=0,005 versos SHR; #P=0,01 versos SHR DM. Legenda: camada de células ganglionares (CCG), camada plexiforme interna (CPI), camada nuclear interna (CNI), camada plexiforme externa (CPE), camada nuclear externa (CNE), segmento dos fotorreceptores (SF).

[16] Figura 8: Expressão da proteína GFAP. Figura representativa de uma banda de Western blot para GFAP (51 kDa) em lisado total do tecido retiniano dos grupos estudados. A actina (43 kDa) foi usada como controle interno de pipetagem. Legenda: WKY= controle normotenso; SHR= controle hipertenso; SHR-DM= hipertenso diabético; SHR-DM NT4= hipertenso diabético tratado com NT4; SHR-DM NT5= hipertenso diabético tratado com NT5.

Descrição detalhada da invenção

[17] A presente invenção descreve uma composição e formulação farmacêutica para prevenção e tratamento ocular não invasivo. É um objeto adicional o uso.

[18] A composição farmacêutica ocular compreende os seguintes componentes:

- tempol oxidado com concentração de 1mM encapsulado em lipossomas convencionais flexíveis com diâmetro médio variável entre 50 e 200nm, preferencialmente entre 50 e 100nm; compreendem fosfolipídios com temperatura de transição de fases abaixo da temperatura corpórea, preferencialmente fosfatidilcolina de ovo (EPC) com concentração variável entre 1 e 20mM, preferencialmente 2mM;
- veículo composto de solução salina.

[19] Além destes componentes, a composição da presente invenção ainda pode compreender componentes aditivos utilizados em colírios para proporcionar alguma característica desejável não alcançada com os componentes já citados que sejam compatíveis com os lipossomas, tais como, o ácido hialurônico para produzir viscosidade, agentes conservantes, tampões, espessantes, entre outros.

A formulação preferencial compreende:

- tempol oxidado com concentração de 1mM em lipossomas convencionais flexíveis com diâmetro médio de 60 nm, compreendem fosfatidilcolina de ovo (EPC) com concentração de 2 mM; e
- solução salina q.s.p.

[20] A composição e a formulação têm uso preventivo no tratamento de retinopatia diabética, podendo seu uso ser extrapolado para outras patologias oculares.

[21] Foram realizados testes das formulações *in vitro* em linhagem celular do epitélio pigmentado da retina, ARPE-19. O epitélio pigmentado da retina está possivelmente envolvido na farmacocinética de substâncias hidrofílicas oculares. As formulações preferenciais foram selecionadas de acordo com baixa citotoxicidade (morte celular ≤10%) e a capacidade de permeação. Posteriormente, a eficácia das formulações lipossomais selecionadas foi observada em ensaios *in vivo* em modelo experimental de RD.

[22] Foram desenvolvidas cinco formulações que diferiram nas concentrações do fosfolipídio, do diluente (etanol, solução salina ou meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)), e no método de associação do fosfolipídio ao tempol 1mM (adição gradual ou mistura conjunta). As formulações foram denominadas nanopartículas (NT) e enumeradas de 1 a 5 (NT 1 a 5). Posteriormente, essas formulações foram caracterizadas quanto à citotoxicidade, diâmetro médio e permeabilidade.

[23] <u>NT 1 e 2</u>

- Preparo da solução mãe de concentração 200 mM de fosfatidilcolina de ovo (EPC) *(Lipoid E80- Egg phospholipids with 80% phosphatidylcholine)* (19 gramas diluídos em 100 ml de etanol);
- Adição gradual de 10 ml da solução mãe de EPC ao tempol 1mM (17,25 mg) em solução salina (90 mL) (para os ensaios *in vivo*) ou em meio de cultura (DMEM) (para os ensaios *in vitro*). A concentração final de EPC na formulação foi 20mM e tempol 1mM. A adição foi feita por meio de bomba peristáltica à vazão 0,3 ml/s, com posterior homogeneização e redução de tamanhos dos lipossomas por meio de agitação mecânica de alto nível de cisalhamento (agitador do tipo

Ultra-Turrax) em rotação 24000 rpm por 15 minutos (figura 1);

- Repouso sob refrigeração (4-8°C) por no mínimo 4 horas;
- Etapa adicional de homogeneização e redução de tamanhos dos lipossomas através de passagem em microfluidizador de microcanais de cerâmica operando a alta pressão (Microfluidics®);
- Coleta da dispersão lipídica homogeneizada e divisão em duas partes para a etapa de ultra-filtração, sendo a primeira sem lavagem e a segunda seguida de lavagem com solução salina.

[24] NT 1 = Sem Lavagem: Ultra-filtração da dispersão de lipossomas em uma célula de ultra-filtração Amicon operando com membrana de tamanho de poros 30nm. Redução do volume em até 5% comparado ao inicial;

[25] NT 2 = Com Lavagem: Ultra-filtração da dispersão de lipossomas em uma célula de ultrafiltração Amicon operando com membrana de tamanho de poros 30nm. Redução do volume das partículas em até 5% comparado ao inicial. Posterior lavagem com solução salina.

- Estocagem das formulações a 4-8°C por no mínimo 12 horas antes do uso.
- O pH inicial foi mantido ou ajustado para 7,4 de acordo com os experimentos *in vitro*.

[26] NT 3

- Preparo da solução mãe de concentração 100 mM de EPC *(Lipoid E80- Egg phospholipids with 80% phosphatidylcholine)* (9,5g em 0,1 ml de etanol e 99,9 ml de solução salina (para os ensaios *in vivo*) ou meio de cultura DMEM (para os ensaios *in vitro*).
- Adição gradual de 1 ml da solução mãe de EPC ao tempol 1mM (17,25 mg) em solução salina (99 mL) (para os ensaios *in*

vivo) ou em meio de cultura DMEM (para os ensaios *in vitro*). A concentração final de EPC na formulação foi 1 mM e tempol 1mM. A adição foi feita por meio de bomba peristáltica à vazão 0,3 ml/s, com posterior homogeneização e redução de tamanhos dos lipossomas por meio de agitação mecânica de alto nível de cisalhamento (agitador do tipo Ultra-Turrax) em rotação 24000 rpm por 15 minutos (figura 1);

- Repouso sob refrigeração (4-8°C) por no mínimo 4 horas;
- Etapa adicional de homogeneização e redução de tamanhos dos lipossomas através de passagem em microfluidizador de microcanais de cerâmica operando a alta pressão (Microfluidics®);
- Estocagem da formulação a 4-8°C por no mínimo 12 horas antes do uso.
- O pH inicial foi mantido ou ajustado para 7,4 de acordo com os experimentos *in vitro*.

[27] NT 4

- Preparo da solução mãe de concentração 2000 mM de EPC *(Lipoid E80- Egg phospholipids with 80% phosphatidylcholine)* (1,9 g em 1 ml de etanol).
- Adição gradual de 0,1 ml da solução mãe de EPC ao tempol tempol 1mM (17,25 mg) em solução salina (99,9 mL) (para os ensaios *in vivo*) ou em meio de cultura DMEM (para os ensaios *in vitro*). A concentração final de EPC na formulação foi 2 mM e tempol 1mM. A adição foi feita por meio de bomba peristáltica à vazão 0,3 ml/s, com posterior homogeneização e redução de tamanhos dos lipossomas por meio de agitação mecânica de alto nível de cisalhamento (agitador do tipo Ultra-Turrax) em rotação 24000 rpm por 15 minutos (figura 1);
- Repouso sob refrigeração (4-8°C) por no mínimo 4 horas;
- Etapa adicional de homogeneização e redução de tamanhos

dos lipossomas através de passagem em microfluidizador de microcanais de cerâmica operando a alta pressão (Microfluidics®);

- Estocagem da formulação a 4-8°C por no mínimo 12 horas antes do uso.
- O pH inicial foi mantido ou ajustado para 7,4 de acordo com os experimentos *in vitro*.

[28] NT 5

- Preparo da solução mãe de concentração 1000 mM de EPC *(Lipoid E80- Egg phospholipids with 80% phosphatidylcholine)* (9,5g em 9,9 ml de DMEM + 0,1 ml de etanol para os ensaios *in vitro* ou 9,9 ml de solução salina + 0,1 ml de etanol para os ensaios *in vivo*);
- Mistura de 1 ml da solução mãe de EPC com tempol1mM (17,25 mg) diluído em solução salina (99 mL) solução salina (para os ensaios *in vivo*) ou com meio de cultura DMEM (para os ensaios *in vitro*). A concentração final de EPC na formulação foi 10,99 mM e tempol 1mM. Homogeneização e redução de tamanhos dos lipossomas por meio de agitação mecânica de alto nível de cisalhamento (agitador do tipo Ultra-Turrax) em rotação 24000 rpm por 15 minutos (figura 1);
- Repouso sob refrigeração (4-8°C) por no mínimo 4 horas;
- Etapa adicional de homogeneização e redução de tamanhos dos lipossomas através de passagem em microfluidizador de microcanais de cerâmica operando a alta pressão (Microfluidics®);
- Estocagem da formulação a 4-8°C por no mínimo 12 horas antes do uso.
- O pH inicial foi mantido ou ajustado para 7,4 de acordo com os experimentos *in vitro*.

[29] O teste de viabilidade celular em cultura ARPE-19 através do método de *thiazolyl blue tetrazolium bromide* (MTT)

demonstrou ausência de citotoxicidade do tempol nas concentrações de 1-10 mM durante 2 horas de exposição (figura 2). As formulações foram submetidas ao teste de citotoxicidade através do método de MTT após 2 horas da adição. As amostras NT2 pH=7,4; NT3 pH=8,7; NT4 pH=8,6 e 7,4; NT5 pH=8,7 apresentaram citotoxicidade inferior a 10%, ou seja, apropriada para os estudos *in vitro* (figura 3).

[30] O tamanho dos lipossomas encapsulando tempol obtidos nos diferentes processos das formulações selecionadas pelo teste de citotoxicidade, foi caracterizado por meio do seu diâmetro médio hidrodinâmico, medido por meio de espalhamento de luz utilizando laser de alta potência, em equipamento Zetasizer®. Todas as formulações atingiram dimensões nanométricas (tabela 1).

Tabela 1. Diâmetro médio hidrodinâmico dos lipossomas encapsulando tempol nas formulações NT2-NT5.

Amostras	**Leitura 1 (nm)**	**Leitura 2 (nm)**	**Leitura 3 (nm)**	**Média (nm)**
NT 2 - pH 7,4	63,24	63,7	62,81	63,25
NT 3 - pH 8,7	51,98	51,29	51,3	51,52
NT 4 - pH 8,6	57,98	59,39	59,59	58,98
NT 4 - pH 7,4	57,98	59,39	59,59	58,98
NT 5 - pH 8,7	54,91	54,75	53,53	54,39

[31] A permeação das nanopartículas de tempol foi verificada através da capacidade de atravessar a barreira externa da retina, ou seja, a monocamada de células do epitélio pigmentado da retina. Para este ensaio, as células ARPE-19 ($8x10^6$) foram semeadas em *inserts* com filtros de

poliéster transparente com poro de 0,4 µm e área de crescimento de 0,33 cm^2 (HTS, Costar; CorningInc, NY, USA) em placas de 24 wells (figura 4). Após 5 dias de crescimento celular para a formação da monocamada (100% de confluência), as formulações foram adicionadas na porção apical. Após 2 horas, as amostras de meio foram coletadas na porção basal. O tempol presente nas amostras foi detectado através do ensaio com espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) (figura 5). Dentre os tripletes observados, os maiores espectros obtidos na parte basal correspondem às formulações NT 4 e 5 (nas cores preto e vermelho). Portanto, baseado nestes experimentos, concluímos que os inventos NT4 e NT5 foram os mais eficazes, por apresentaram maior permeabilidade através da monocamada de células ARPE-19 (figura 5) e baixa citotoxicidade (figura 3).

[32] As formulações de colírio NT4 e NT5 foram submetidas a ensaios *in vivo*. A única diferença no método de preparo destas soluções foi a substituição da diluição do tempol com meio DMEM pela solução salina. Para os testes de eficácia deste invento, foram utilizados ratos com 4 semanas de idade, espontaneamente hipertensos (SHR) submetidos ou não a indução do diabetes (DM) com estreptozotocina (50mg/kg) e seu controle normotenso (WKY) divididos nos seguintes grupos: WKY; SHR; SHR-DM; SHR-DM NT4; SHR-DM NT5. O tratamento com o colírio teve início após a confirmação do diabetes. Após 20 dias de tratamento, os animais foram submetidos à avaliação funcional da retina através do exame de eletrorretinografia e posteriormente sacrificado para obtenção de tecido de retina e extrato protéico. O objetivo foi reproduzir com este tratamento tópico, os parâmetros observados em trabalho do nosso grupo previamente publicado (Rosales et al., IOVS 2010), onde a injeção intraperitoneal

de tempol foi eficaz em reduzir os marcadores estruturais da RD como a expressão da proteína acídica fibrilar glial (GFAP) e aumento de formação de nitrotirosina. Os dados fisiológicos destes animais encontram-se na tabela 2.

Tabela 2. Dados fisiológicos dos animais estudados. Pressão arterial sistólica (PAS) e porcentagem de hemoglobina glicada total (HbA(%).

Grupos	**Peso Inicial (g)**	**Peso Final (g)**	**PAS (mmHg)**	**HbA1 (%)**
WKY (n=5)	128,6 ± 32,6	391,6 ± 33,1	163,4 ± 10,1	6,83 ± 2,15
SHR (n=3)	68,7 ± 9,2	244,4 ± 7,9	169,6 ± 9,1	9,07 ± 2,78
SHR DM (n=3)	74,3 ± 2,8	210,4 ± 24,1	162,6 ± 8,0	16,17 ± 4,55
SHR DM NT4 (n=3)	69,7 ± 3,1	164,6 ± 13,3	162,4 ± 9,8	17,10 ± 3,70
SHR DM NT5 (n=3)	68,0 ± 14,5	188,2 ± 20,6	147,6 ± 16,8	21,79 ± 3,53

Legenda: WKY: rato normotenso; SHR: rato hipertenso; SHR DM: rato hipertenso diabético; SHR DM NT4: rato hipertenso diabético tratado com nanopartícula de tempol 4; SHR DM NT5: rato hipertenso diabético tratado com nanopartícula de tempol 5.

[33] O eletrorretinograma (ERG) demonstrou uma disfunção retiniana detectado pela diminuição da amplitude da "onda b" nos animais SHR comparados aos animais WKY (P=0.0009), e nos animais SHR DM em relação ao seu controle SHR (P=0.05), ou seja, a deflexão positiva gerada pelas células de Muller que representa a atividade elétrica das células bipolares esteve reduzida (figura 6A e D). O tratamento dos animais SHR DM com o colírio NT4 preveniu esta alteração comparado ao SHR DM (P=0.05) (figura 6A e D). O tempo implícito de resposta da "onda b" e total foram maiores nos animais SHR DM em

relação aos controles (P<0.0003 e P<0.0004, respectivamente) e prevenidos com ambos os colírios NT4 e NT5 (P<0.003 e P<0.01, respectivamente) (figura 6B, C, D). O tratamento tópico com a formulação NT5 preveniu parcialmente a amplitude da "onda b" (figura 6A, D), porém sem significância estatística (P=0.1). Com estes resultados concluímos que as alterações na função retiniana nos animais DM foram prevenidas com o tratamento tópico de nanopartícula de tempol, em especial com a formulação NT4.

[34]Para verificarmos a presença do estresse oxidativo/nitrosativo neste modelo e o efeito do uso tópico das nanoparticulas de tempol, verificamos a formação de nitrotirosina através do método de imunohistoquímica, promovido pela reação de peroxinitrito ou dióxido de nitrogênio nos resíduos de tirosina da proteína. Como esperado, foi observado um aumento na positividade para nitrotirosina no grupo SHR DM comparado aos controles WKY e SHR (P≤0,01). Assim como os resultados do ERG, o tratamento com NT4 foi preventivo (P=0,01) e a NT5 demonstrou uma tendência (P=0,09), porém não significativa (figura 7).

[35] A avaliação de um marcador precoce de RD foi obtida através de ensaios de Western Blotting para verificação da expressão de GFAP. Os resultados preliminares demonstram um aumento na expressão de GFAP no grupo SHR DM em relação aos controles e o efeito protetor do tratamento com os colírios NT 4 e NT5 (figura 8).

[36] O uso tópico da NT4 foi capaz de prevenir marcadores precoces de RD (nitrotirosina e GFAP) e consequentemente promover efeitos protetores na retina funcional observado pelo ERG. No entanto, a formulação NT-5 apresentou tendências nos parâmetros avaliados.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica ocular **caracterizada por** compreender os seguintes componentes:

- tempol oxidado com concentração de 1mM encapsulado em lipossomas convencionais flexíveis com diâmetro médio variável entre 50 e 200nm, preferencialmente entre 50 e 100nm; compreendem fosfolipídios com temperatura de transição de fases abaixo da temperatura corpórea, preferencialmente fosfatidilcolina de ovo (EPC) com concentração variável entre 1 e 20mM, preferencialmente 2mM;
- veículo composto de solução salina.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** pode compreender componentes adicionais, tais como, ácido hialurônico, agentes conservantes, tampões, espessantes, entre outros.

3. Formulação ocular **caracterizada por** compreender:

- tempol oxidado com concentração de 1mM em lipossomas convencionais flexíveis com diâmetro médio de 60 nm, compreendem fosfatidilcolina de ovo (EPC) com concentração de 2 mM; e
- solução salina q.s.p.

4. Uso da composição conforme definida nas reivindicações 1 e 2 **caracterizado por** ser utilizada no tratamento de retinopatia diabética e outras patologias oculares.

5. Uso da formulação conforme definida na reivindicação 4 **caracterizado por** ser utilizada no tratamento de retinopatia diabética e outras patologias oculares.

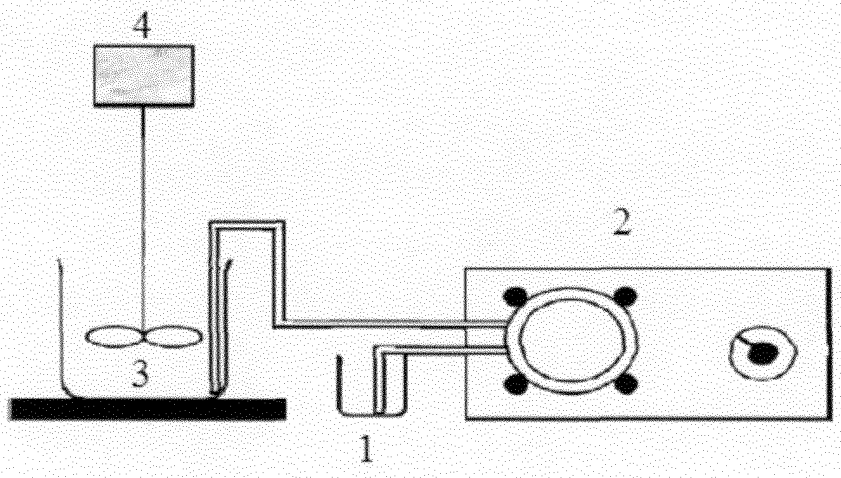


Figura 1

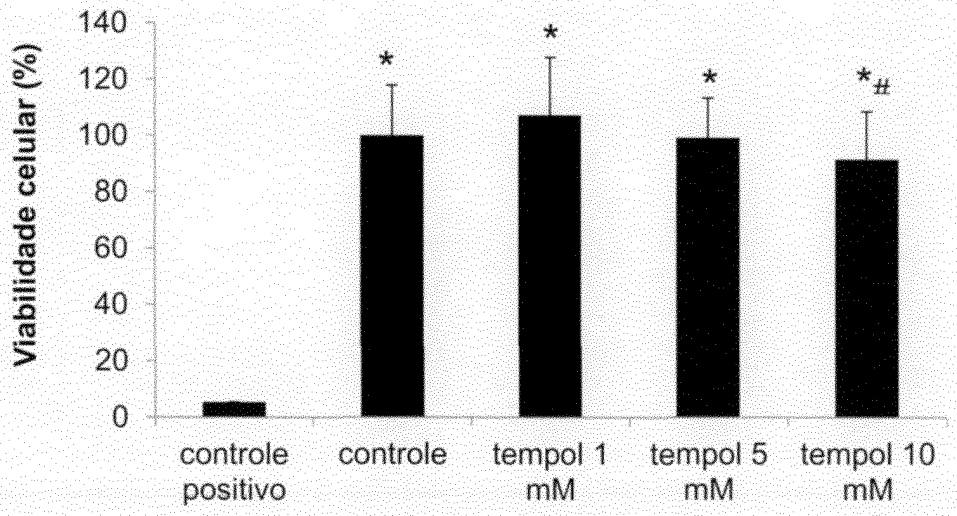


Figura 2

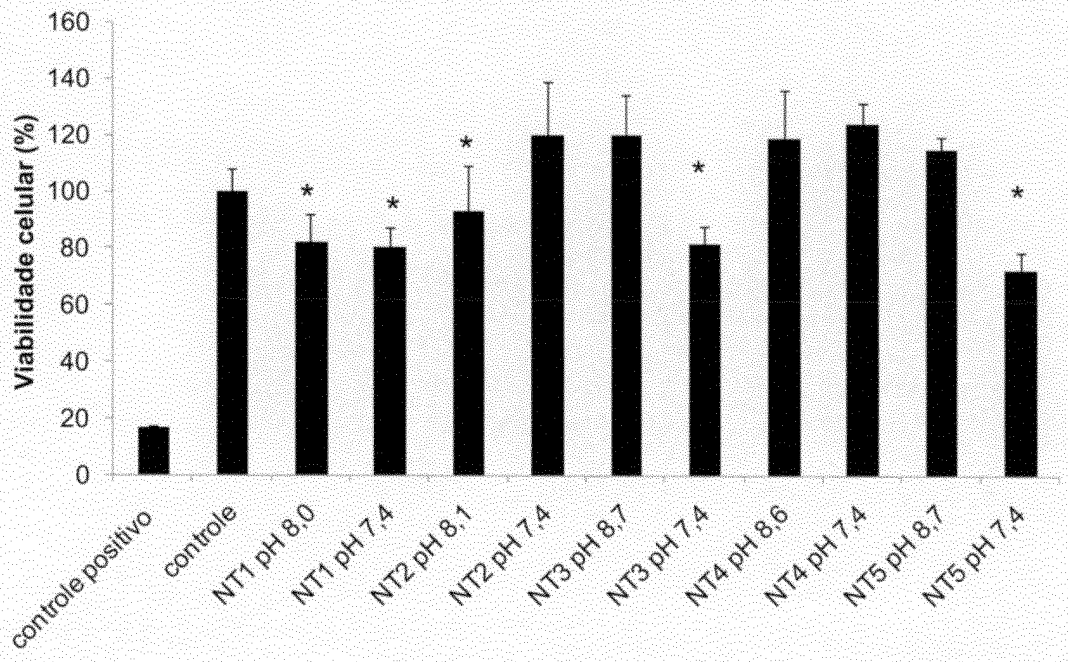


Figura 3

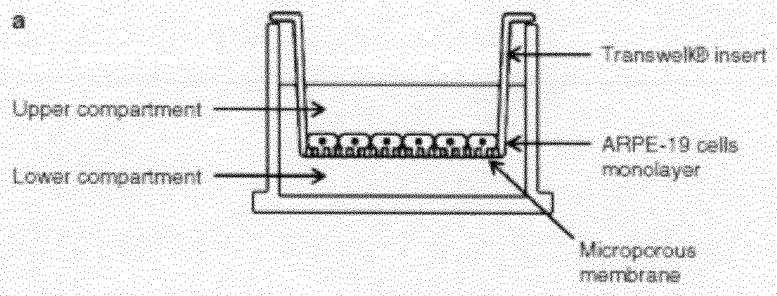
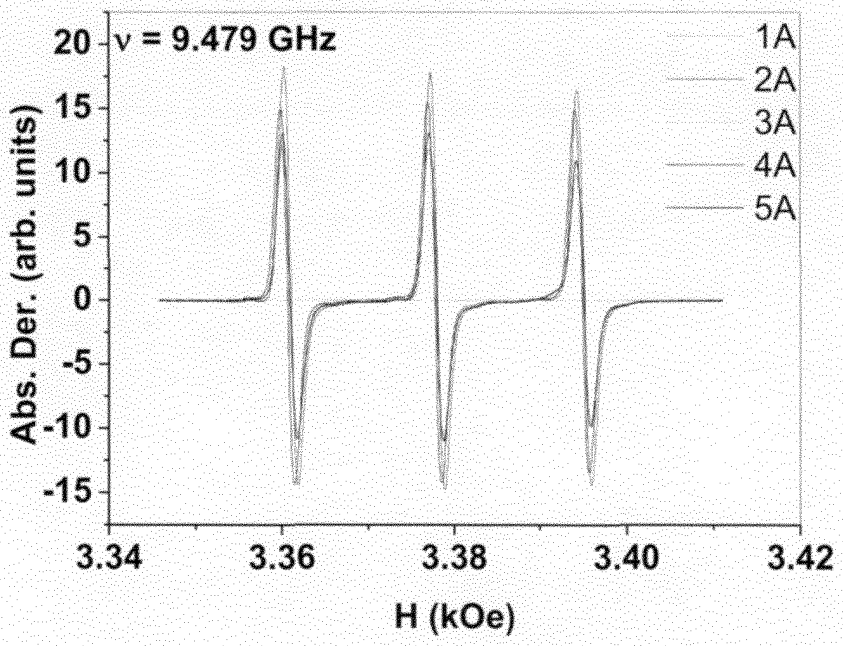


Figura 4


ν = 9.479 GHz
1A
2A
3A
4A
5A
Abs. Der. (arb. units)
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
3.34
3.36
3.38
3.40
3.42
H (kOe)

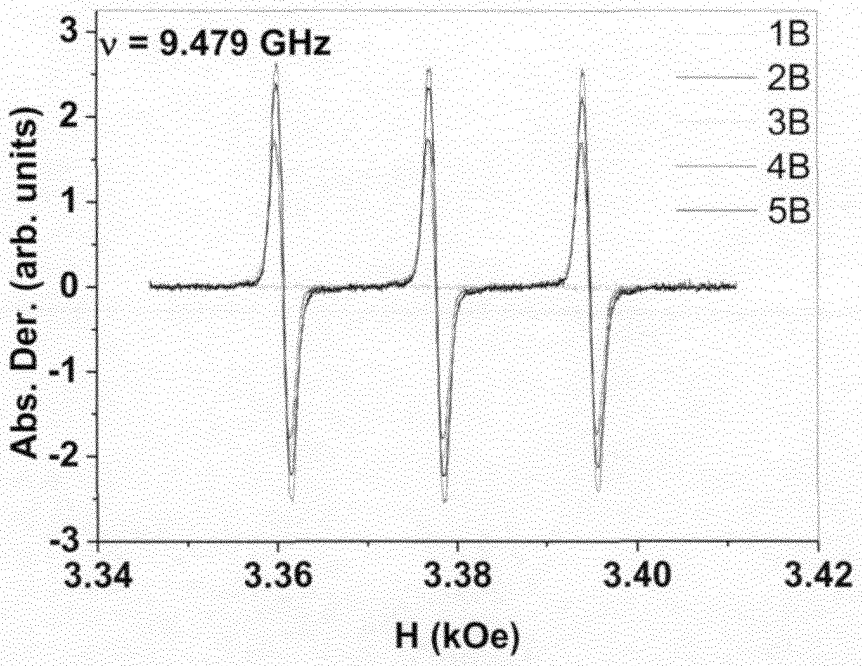

ν = 9.479 GHz
1B
2B
3B
4B
5B
Abs. Der. (arb. units)
3
2
1
0
-1
-2
-3
3.34
3.36
3.38
3.40
3.42
H (kOe)

Figura 5

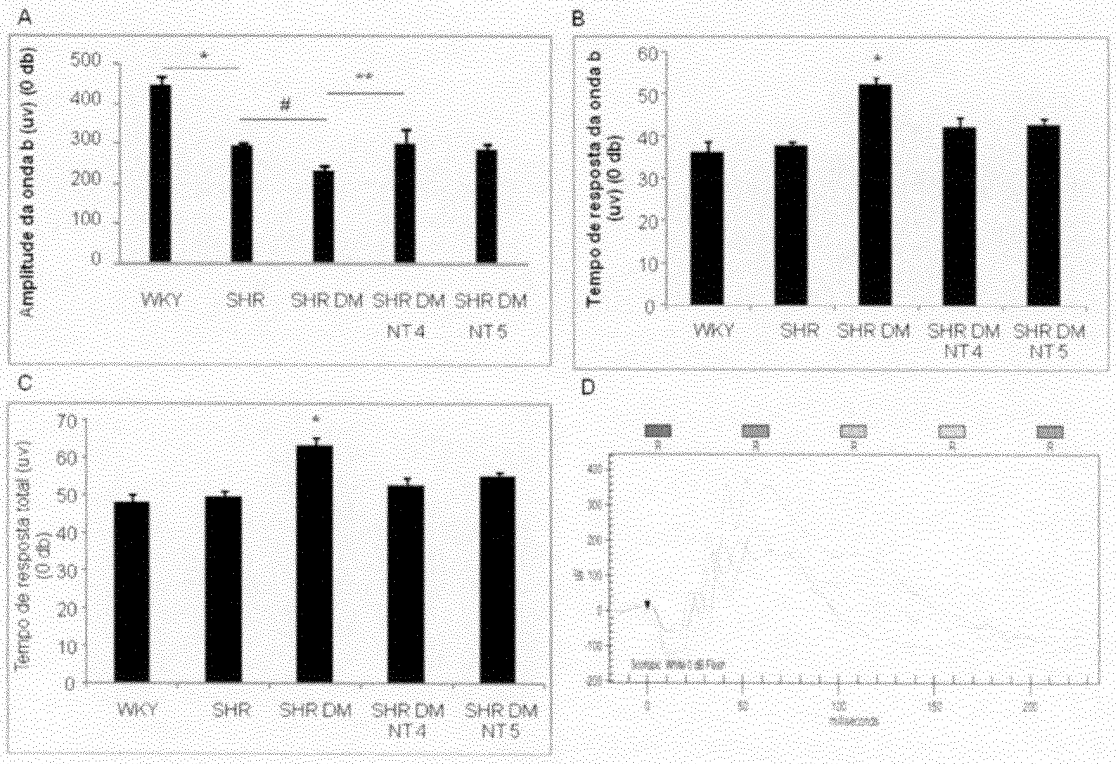


Figura 6

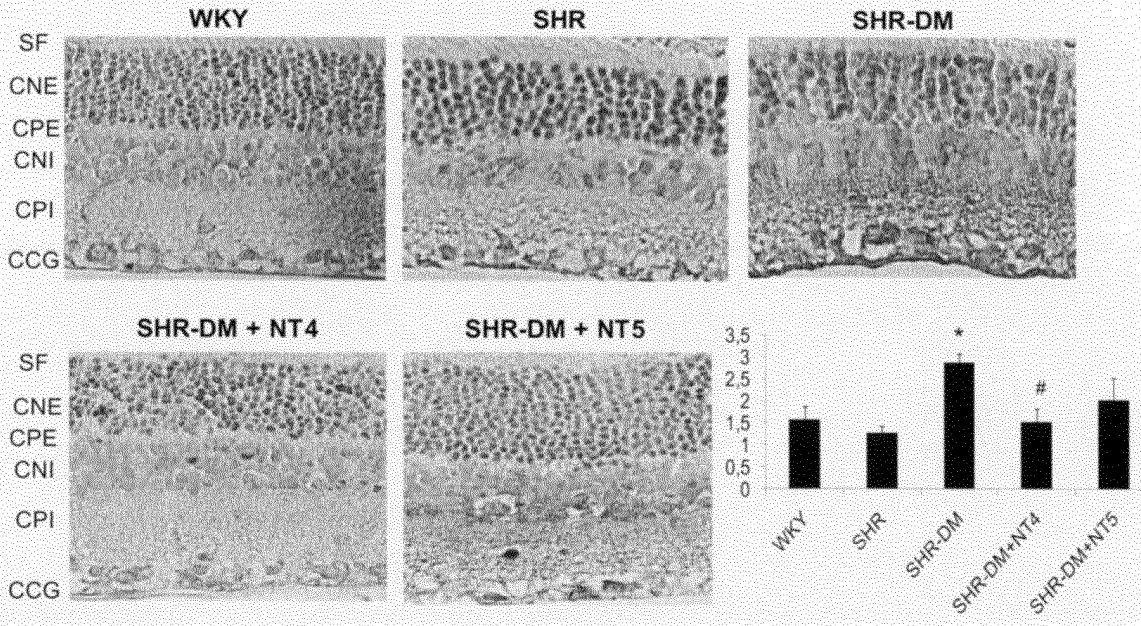


Figura 7

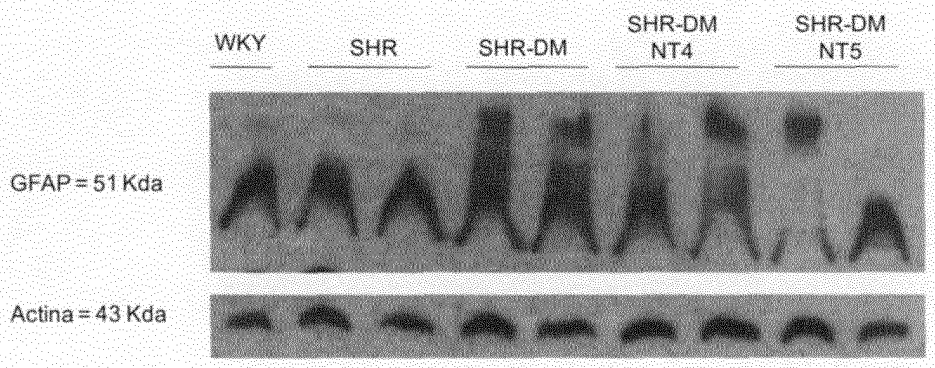


Figura 8

RESUMO

COMPOSIÇÃO E FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA PARA TRATAMENTO OCULAR NÃO INVASIVO, E SEUS USOS

A presente invenção refere-se à composição e formulação não invasiva tópica ocular composta de lipossomas de tamanho nanométrico encapsulando tempol para uso nas fases precoces da retinopatia diabética. O uso tópico da formulação de tempol em lipossomas foi capaz de prevenir marcadores precoces de retinopatia diabética (nitrotirosina e GFAP) e conseqüentemente promover efeitos protetores na retina funcional observado pelo eletroretinograma em modelo experimental de retinopatia diabética.