

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2007.02.13</b>	(73) Titular(es): <b>MERCK EPROVA AG</b> <b>IM LATERNENACKER 5 8200 SCHAFFHAUSEN</b> <b>CH</b>
(30) Prioridade(s):	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2008.08.29</b>	(72) Inventor(es): <b>RUDOLF MOSER</b> <b>CH</b> <b>CIPRIOTA CHARALAMBOS ANTONIADES</b> <b>GR</b> <b>CHEERAG SHIRODARIA</b> <b>GB</b> <b>KEITH M. CHANNON</b> <b>GB</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2009.02.05</b> <b>31/2009</b>	(74) Mandatário: <b>JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO</b> <b>R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE FOLATOS PARA A PREVENÇÃO E O TRATAMENTO DE DOENÇAS VASCULARES**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO TEM POR OBJECTO A UTILIZAÇÃO DE FOLATOS PARA A PREVENÇÃO E/OU O TRATAMENTO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES, TAIS COMO ATEROESCLEROSE E, EM PARTICULAR, PARA A MODULAÇÃO DA SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL (SONE) (ENOS NA TERMINOLOGIA INGLESA). A PRESENTE INVENÇÃO TEM AINDA POR OBJECTO PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS QUE CONSISTEM NOS REFERIDOS FOLATOS E NUM VEÍCULO ACEITÁVEL SOB O PONTO DE VISTA FARMACÊUTICO, EVENTUALMENTE EM COMBINAÇÃO COM OUTROS AGENTES ACTIVOS SOB O PONTO DE VISTA FARMACÊUTICO, ASSIM COMO PROCESSOS TERAPÊUTICOS QUE UTILIZAM OS REFERIDOS FOLATOS OU AS SUAS PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS.

## RESUMO

### UTILIZAÇÃO DE FOLATOS PARA A PREVENÇÃO E O TRATAMENTO DE DOENÇAS VASCULARES

A presente invenção tem por objecto a utilização de folatos para a prevenção e/ou o tratamento de doenças cardiovasculares, tais como aterosclerose e, em particular, para a modulação da sintase do óxido nítrico endotelial (SONe) (eNOS na terminologia inglesa). A presente invenção tem ainda por objecto preparações farmacêuticas que consistem nos referidos folatos e num veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico, eventualmente em combinação com outros agentes activos sob o ponto de vista farmacêutico, assim como processos terapêuticos que utilizam os referidos folatos ou as suas preparações farmacêuticas.

## DESCRIÇÃO

### UTILIZAÇÃO DE FOLATOS PARA A PREVENÇÃO E O TRATAMENTO DE DOENÇAS VASCULARES

#### **Âmbito da invenção**

A presente invenção tem por objecto a utilização de folatos para a prevenção e/ou o tratamento de doenças cardiovasculares, tais como aterosclerose e, em particular, para a modulação da sintase do óxido nítrico endotelial (SONe). A presente invenção tem ainda por objecto preparações farmacêuticas que consistem nos referidos folatos e um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico, eventualmente em combinação com outros agentes activos sob o ponto de vista farmacêutico, assim como processos terapêuticos que utilizam os referidos folatos ou as suas preparações farmacêuticas.

#### **Antecedentes da invenção**

O óxido nítrico (NO) é uma molécula de sinalização importante. Ela relaxa as células do músculo liso vascular para dilatar os vasos sanguíneos. Também inibe uma variedade de acontecimentos patológicos tais como a activação de plaquetas e a indução de proteínas inflamatórias. A perda de NO leva ao aparecimento de pressão sanguínea alta e a doenças vasculares ateroscleróticas.

As sintases do óxido nítrico (SON) são um grupo de enzimas (EC 1.14.13.39) responsáveis pela síntese do NO a partir do átomo de azoto terminal da L-arginina, na presença de  $O_2$  e dos co-factores do fosfato do dinucleótido de nicotinamida e adenina (FDNA, NADPH na terminologia inglesa),

dinucleótido de flavina e adenina (DFA), mononucleótido de flavina (MNF), heme, tetra-hidrobiopterina (BH<sub>4</sub>). A SON endotelial (SONe) gera NO nos vasos sanguíneos e está envolvida na regulação da função vascular (figura 9).

A produção de espécies reactivas de oxigénio (ERO, ROS na literatura inglesa de "reactive oxygen species") está aumentada, entre outras, nas doenças cardiovasculares e pulmonares. Uma consequência importante da produção excessiva de ERO é a inactivação oxidante de NO. Por exemplo, um radical de superóxido reage rapidamente com NO para formar peroxinitrito, resultando numa perda imediata de NO. As ERO podem oxidar BH<sub>4</sub>, um co-factor essencial para a SONE. Esta resposta leva a uma condição em que a SONE produz superóxido tanto quanto NO (figura 10). Este fenómeno de "desacoplamento" da SONE provavelmente prolonga o stress oxidante.

O stress oxidante desempenha um papel importante na patogénese das doenças cardiovasculares, tal como aterosclerose, através dos efeitos das ERO na biodisponibilidade do NO e através das interacções com numerosas vias de sinalização sensíveis ao potencial redox. Embora a retenção das ERO tenha sido proposta como uma estratégia terapêutica para atacar o stress oxidante nas doenças cardiovasculares e em particular na aterosclerose, os resultados dos ensaios clínicos utilizando "antioxidantes" simples têm sido decepcionantes (Griendling, K. K. e FitzGerald G. A., *Circulation*, 2003; 108: 2034).

Os folatos são co-factores essenciais nas reacções de transferência de um carbono e estão envolvidos em sínteses chave nas células de vegetais, de animais e de seres humanos, particularmente na bio-síntese do ADN e no ciclo de

metilação. Como fármacos, os folatos têm sido utilizados até agora predominantemente como o sal de cálcio do ácido 5-formil-5,6,7,8-tetra-hidrofólico (leucovorina) ou do ácido 5-metil-5,6,7,8-tetra-hidrofólico (metafolina) para o tratamento da anemia megaloblástica, como um antídoto para aumentar a compatibilidade dos antagonistas de folato, particularmente de aminopterina e metotrexato na terapia do cancro ("salvamento anti-folato"), para aumentar o efeito terapêutico das pirimidinas fluoradas e para o tratamento de doenças auto-imunitárias tais como psoríase, para aumentar a compatibilidade de certas substâncias anti-parasíticas, por exemplo, trimetoprim-sulfametoxazole e para a redução da toxicidade de dideazatetra-hidrofolatos em quimioterapia.

Além disso, tem havido vários estudos que relacionam o ácido fólico com a função endotelial, em que os resultados continuam a ser de natureza conflituaosa, indicando que os efeitos e o mecanismo exactos do ácido fólico e dos seus derivados na função endotelial são ainda desconhecidos. Por exemplo, tem sido sugerido que os níveis de homocisteína total (Hcit) (Wald D. S. et al., *BMJ*, 2002; 325: 1202) e de folato (Bunout, D. et al., *Nutrition*, 2000; 16: 434) no plasma podem estar relacionados com o risco cardiovascular (Wald D. S. e tal., *BMJ*, 2002; 325: 1202) e com a disfunção endotelial (Doshi S. N. et al., *Circulation*, 2002; 105: 22, Hyndman M. E. et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 282: H2167, Verhaar M. C. et al., *Circulation*, 1999; 100: 335). Contudo, os estudos que sugerem que diminuindo Hcit com ácido fólico pode-se retardar a progressão da aterosclerose, não foram confirmados (Lange H. et al., *N Eng J Med*. 2004; 350: 2673). De facto, relatórios recentes de ensaios mais alargados em pacientes com ataque cardíaco (Toole J. F. et al., *JAMA*, 2004; 291: 565-575), enfarte do miocárdio (Bona K. H. et al., *N Engl J. Med*. 2006; 354: 1578) ou doença da

artéria coronária (DAC) estável (*N Engl J Med.* 2006; 354: 1567) verificaram que o tratamento com ácido fólico não melhora os resultados clínicos. Estudos mais recentes têm sugerido que o ácido fólico, através da sua forma em circulação de 5-metiltetra-hidrofolato (5-MTHF), pode ter propriedades antioxidantes e exercem efeitos biológicos nas células vasculares que não estão directamente relacionadas com alterações da HcIt no plasma (Doshi S. N. et al., *Circulation*, 2002; 105: 22). Outros estudos anteriores têm sugerido que os folatos podem ter efeitos na função endotelial mediada por NO, tal como alterações na regulação da SONE mediada pelo co-factor de SONE, tetra-hidrobiopterina (BH<sub>4</sub>, Stroes E. S. et al., *Circulation*, 1998; 97: 237; Hyndman, M. E. et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 282: H2167). Além disso, tem havido vários estudos no domínio da nutrição que relatam efeitos benéficos de várias preparações de vitaminas contendo ácido fólico em combinação com vários outros suplementos, isto é, tal como vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, E e outras. Estas preparações foram normalmente desenvolvidas para o tratamento de pacientes com as respectivas deficiências nutricionais que estão, como consequência, em risco de terem várias doenças, tal como condições neuropsiquiátricas, vasculares renais e hematológicas (patente de invenção norte-americana US 6.207.651).

Claramente, embora a utilização do ácido fólico se tenha expandido, o seu modo de acção permanece pouco claro. Apesar das visões conflituosas mencionadas antes sobre o mecanismo e os efeitos do ácido fólico, todos estes estudos têm mostrado que os próprios folatos parecem não ter um efeito directo nas funções endoteliais tal como a produção de ON in vitro por meio de SONE (Verhaar M. C. et al., *Circulation*, 1998; 97: 237) e os efeitos relatados antes foram observados exclusivamente utilizando folatos em combinação com outros

agentes activos, isto é, agentes que são conhecidos pela sua participação no acoplamento das SONE, tal como tetra-hidrobiopterina ( $BH_4$ ) ou um seu derivado, que de facto é um co-factor de ocorrência natural das três formas de SON e das hidroxilases aromáticas de aminoácidos e está envolvido em várias reacções bioquímicas e/ou o aminoácido arginina, que é o precursor do NO endógeno (patentes de invenção norte-americanas US 6.544.994; US 6.995.158)

Assim, há ainda uma falta de uma clara compreensão na sinalização redox nas paredes dos reactivos que, até à data, atrasaram o desenvolvimento de terapias "antioxidantes" eficientes e de agentes para a prevenção e/ou o tratamento de doenças cardiovasculares tal como aterosclerose.

Os requerentes verificaram agora, surpreendentemente, que, ao contrário do estado da técnica, os folatos na verdade têm um efeito directo nos mecanismos específicos de redox nas doenças cardiovasculares humanas tais como aterosclerose, indicando que não é necessária a presença de mais qualquer um agente activo para que os folatos desenvolvam toda a sua eficácia (naturalmente, se desejado, podem ainda estar incluídos um ou possivelmente mais agentes activos para se obterem efeitos separados ou sinérgicos). Em particular, verificou-se que os compostos de folato, mesmo na ausência de quaisquer outros agentes activos ou co-factores de SON tais como  $BH_4$  ou arginina e numa gama de concentração que é facilmente atingível in vivo, aumentam rapidamente a função endotelial mediada por NO, embora diminua a produção de superóxido por meio da prevenção da oxidação de tetra-hidrobiopterina ( $BH_4$ ) mediada por peroxinitrito e inverta o desacoplamento de SONE, aumentando o  $BH_4$  vascular, aumentando a relação de  $BH_4$ /biopterina total e a relação dímero:monómero de SONE, aumentando a actividade de SONE e além disso

possuindo efeitos "antioxidantes" mais específicos do que gerais na aterosclerose humana.

Assim, o folato actua como um composto intracelular específico e eficaz, útil na prevenção e/ou no tratamento de doenças cardiovasculares e, em particular, na aterosclerose.

### **Sumário da invenção**

Num primeiro aspecto da presente invenção, providenciaram-se novas utilizações de folatos para a produção de um medicamento contendo folato como agente activo para a prevenção e/ou o tratamento de doenças cardiovasculares tal como a aterosclerose.

Sem estar ligado a nenhuma teoria específica, os efeitos terapêuticos específicos foram conseguidos por modulação de sintase de óxido nítrico endotelial (SONe), possivelmente por meio da retenção de espécies reactivas de oxigénio (ERO), tal como peroxinitrito, que aumenta o BH<sub>4</sub> vascular e a relação BH<sub>4</sub>/biopterina total, além de inverter o desacoplamento de SONe, aumentar o BH<sub>4</sub> vascular, aumentar a relação de BH<sub>4</sub>/biopterina total e a relação dímero:monómero de SONe e aumentar directamente a actividade de SONe. Assim, numa gama de concentração que é facilmente atingível in vivo, o 5-metiltetra-hidrofolato (5-MTHF) melhorou rapidamente as respostas vasomotoras dependentes do endotélio, mediadas pelo NO e reduziu o superóxido vascular, tanto ex vivo como in vivo. Estas alterações não foram explicadas pela retenção directa do superóxido por meio do 5-MTHF in vitro ou pelas alterações da homocisteína total no plasma, in vivo. Adicionalmente, os efeitos terapêuticos foram alcançados pelos efeitos "antioxidantes" específicos dos folatos na aterosclerose humana.

Num enquadramento específico, os folatos incluem monoglutamato de ácido pteróico (ácido fólico), ácido di-hidrofólico, ácido 5-formiltetra-hidrofólico, ácido 5-metiltetra-hidrofólico, 5,10-metilenotetra-hidrofólico, ácido 5,10-meteniltetra-hidrofólico, 10-formiltetra-hidrofólico ou ácido tetra-hidrofólico, os seus poliglutamatos, os seus isómeros ópticos, particularmente os seus isómeros naturais opticamente puros e também as misturas de isómeros ópticos, particularmente as misturas racémicas, assim como os seus sais e ésteres aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico e similares, eventualmente em combinação com um ou mais agentes activos sob o ponto de vista farmacêutico.

Num outro aspecto da presente invenção, providencia-se uma preparação farmacêutica para o tratamento e/ou a prevenção de doenças cardiovasculares, caracterizada pelo facto de consistir em pelo menos um folato ou um seu sal ou éster aceitável sob o ponto de vista farmacêutico e pelo menos um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

Num outro aspecto da presente invenção, providenciam-se processos terapêuticos para a prevenção e/ou o tratamento de doenças cardiovasculares e, tal como aterosclerose, em particular pela modulação da sintase de óxido nítrico endotelial (SONe), melhorando respostas vasomotoras dependentes do endotélio, mediadas pelo ON, aumentando o  $BH_4$  vascular e a relação de  $BH_4$ /biopterina total, invertendo o desacoplamento de SONE, aumentando a relação de dímero:monómero de SONE, aumentando directamente a actividade de SONE e, além disso, reduzindo o superóxido vascular, possivelmente por meio da retenção das espécies reactivas de oxigénio (ERO), tal como o peroxinitrito.

Num enquadramento específico, os processos terapêuticos compreendem a administração, a um indivíduo que que tenha necessidade, de um folato, tal como um monoglutamato de ácido pteróico (ácido fólico), ácido di-hidrofólico, ácido 5-formiltetra-hidrofólico, ácido 5-metiltetra-hidrofólico, 5,10-metilenotetra-hidrofólico, ácido 5,10-meteniltetra-hidrofólico, 10-formiltetra-hidrofólico ou ácido tetra-hidrofólico, os seus poliglutamatos, os seus isómeros ópticos, particularmente os seus isómeros naturais opticamente puros e também as misturas de isómeros ópticos, particularmente as misturas racémicas, assim como os seus sais e ésteres aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico ou uma preparação farmacêutica que consiste em pelo menos um folato ou um seu sal ou éster aceitável sob o ponto de vista farmacêutico e pelo menos um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

Outros enquadramentos envolvem a administração do folato em combinação com um ou mais agentes activos sob o ponto de vista farmacêutico.

Outros enquadramentos envolvem as vias de administração e as formas de dosagem do folato ou das suas preparações farmacêuticas.

Ainda outros enquadramentos podem incluir kits ou embalagens que compreendem um folato ou uma sua preparação farmacêutica eventualmente em combinação com um ou mais agentes activos sob o ponto de vista farmacêutico.

### **Breve descrição das figuras**

**Figura 1.** Estudos sobre a tensão isométrica em segmentos das veias safenas de 30 pacientes incubadas com concentrações

crescentes de 5-metiltetra-hidrofolato (5-MTHF) durante 45 minutos. AS relaxações iniciais foram idênticas entre os quatro grupos e estavam presentes como uma única curva. As relaxações dos vasos com os agonistas dependentes do endotélio acetilcolina (ACH, painel A) ou bradiquinina (BQ, painel B) não se alteram nos vasos de controlo, mas aumentam significativamente depois da incubação com 5-MTHF. As contracções absolutas em resposta à fenilefrina foram de  $7,9 \pm 0,8$  g na base e permaneceram inalteradas depois da incubação. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 vs a base.

**Figura 2.** A produção de superóxido e de peroxinitrito diminuíram significativamente depois da incubação com concentrações crescentes de 5-metiltetra-hidrofolato (5-MTHF), durante 45 minutos, nas duas veias safenas (VS, painel A, n = 32 e painel B n = 6) e nas artérias mamárias internas (AMI, painel C n = 23 e painel D n = 6), em comparação com os vasos de controlo (incubados com tampão) nos mesmos pacientes. Os valores estão expressos como a mediana (linha horizontal, percentis 25°-75° (caixa), intervalos (hastes)). \*P < 0,01 vs controlo.

**Figura 3.** Os segmentos das veias safenas obtidos ~45 minutos depois da infusão intravenosa de 5-metiltetra-hidrofolato (5-MTHF, 0,13 mg/kg de peso do corpo, n = 15) tinham respostas vasomotoras significativamente maiores tanto à acetilcolina (Ach, painel A) como à bradiquinina (BQ, painel B) comparados com os segmentos de pacientes que receberam placebo (n = 17). Não há diferenças significativas nas respostas vasomotoras ao nitroprussido (SNP) entre os pacientes que receberam 5-MTHF e os que receberam placebo. As pré-contracções absolutas à fenilefrina nestes vasos foram  $8,20 \pm 2,6$  g e  $7,21 \pm 1,31$  g nos grupos tratados com 5-MTHF e com placebo, respectivamente (P = NS). \*P < 0,05 vs. placebo.

**Figura 4.** A produção de superóxido a partir de segmentos intactos de vasos sanguíneos foi significativamente inferior nos pacientes passados ~45 minutos após a infusão intravenosa de 5-metiltetra-hidrofolato (5-MTHF, 0,13 mg/kg de peso do corpo, n = 15, barras brancas), comparada com a dos pacientes que receberam placebo (n = 25, barras cinzentas). As medições foram realizadas em amostras aos pares tanto de 19 veias savenas (VS) como das artérias mamárias internas (AMI) dos mesmos pacientes, utilizando quimioluminescência aumentada por 5 µg de lucigenina. Os valores estão expressos como a mediana (linha horizontal, percentis 25°-75° (caixa), intervalos (hastes). \*P < 0,01 vs placebo.

**Figura 5.** Avaliou-se a retenção do superóxido por meio de 5-metiltetra-hidrofolato (5-MTHF) utilizando um sistema de xantina/oxidase de cantina (A). O 5-MTHF teve um efeito de retenção do superóxido fraco, mas apenas para concentrações > 10 µM, enquanto a vitamina C teve o efeito de retenção esperado, mesmo a concentrações baixas. Avaliou-se a retenção do peroxinitrito por meio de 5-MTHF ácido úrico utilizando SIN-1 (1 µM) (B). O 5-MTHF teve um forte efeito de retenção directa do peroxinitrito a concentrações tão baixas quanto 1 µM, comparável ao de concentrações iguais de ácido úrico. Os valores são média ± DPM (desvio padrão da média) de 3 experiências separadas. \*P < 0,01 vs vitamina C; † P < 0,05 e ‡ P < 0,01 vs 0 µM.

**Figura 6.** Efeito da infusão intravenosa de 5-metiltetra-hidrofolato (5-MTHF) na produção de superóxido derivada de SONE nas veias safenas (VS) e nas artérias mamárias internas (AMI). A geração de superóxido, medida por quimioluminescência aumentada por lucigenina 5 µM, diminuiu por meio do inibidor de SON L-NAME tanto nas VS como nas AMI (painel A) dos pacientes no grupo do placebo (barras cinzentas).

Contudo, O L-NAME aumentou significativamente a geração de superóxido nos vasos ~45 minutos depois da infusão intravenosa de 5-metiltetra-hidrofolato (5-MTHF) (barras brancas). A detecção in situ da heração de superóxido derivada do endotélio na VS (painéis B e C, n = 10), utilizando a fluorescência do di-hidroetídio, mostrou um aumento da produção de superóxido induzida por L-NAME a partir do endotélio vascular (setas) nos vasos de pacientes tratados com 5-MTHF (barras brancas) e uma diminuição nos vasos de pacientes tratados com placebo (barras cinzentas). \*P < 0,05; † P < 0,01 e ‡ P < 0,001 de 5-MTHF vs placebo.

**Figura 7.** Níveis de biopterina nos tecidos das veias safenas (VS) e nas artérias mamárias internas (AMI). As incubações ex vivo, durante 45 minutos, com 5-metiltetra-hidrofolato (5-MTHF; 1  $\mu$ M), aumentaram os níveis de tetra-hidro biopterina (BH<sub>4</sub>) (painel A) e a relação BH<sub>4</sub>/ biopterina total (BH<sub>4</sub>/BioT) (painel B) comparadas com o controlo, tanto nas VS (pares de n = 20) como nas AMI (pares de n = 12). Do mesmo modo, a BH<sub>4</sub> vascular (painel C) e a relação BH<sub>4</sub>/BioT (painel D) eram mais elevadas em 20 vasos obtidos ~45 minutos depois da infusão de 5-MTHF (0,13 mg/kg, n = 23 para a VS e n = 14 para as AMI), comparadas com as dos vasos de pacientes que receberam placebo (N = 19 para as VS e n = 19 para as AMI). Não há uma diferença significativa nas características demográficas ou na medicação entre os pacientes nos dois grupos. Barras cinzentas: controlo ou placebo; barras brancas; 5-MTHF; \*P < 0,05; \*\*P < 0,01 vs controlo ou placebo. O 5-MTHF (1  $\mu$ M) evitou a diminuição de BH<sub>4</sub> (painel E) e a relação (BH<sub>4</sub>/BioT) (painel F), induzida pela exposição de BH<sub>4</sub> a SIN-1 (2  $\mu$ M) durante 14 minutos. † P < 0,05 e ‡ P < 0,01 vs BH<sub>4</sub> sózinha; \*P < 0,05 e \*\* P < 0,01 vs BH<sub>4</sub>+SIN-1. A incubação ex-vivo de AMI (pares de n = 5) com 5-MTHF aumentou significativamente a relação de dímero:monómero de SONE, conforme avaliado por

imuno-mancha (painel G) depois da quantificação da intensidade da banda de SONE (painel H, \*P < 0,05 vs controlo).

**Figura 8.** A relação BH<sub>4</sub> vascular/ biopterina total (BH<sub>4</sub>/BioT) estava correlacionada com a alteração da produção de superóxido induzida por L-NAME tanto nas veias safenas (VS, r = 0,495, P = 0,002) como nas artérias mamárias internas (AMI, r = 0,621, P = 0,001) de pacientes que receberam quer placebo, quer 5-MTHF in vivo. Mostra-se a correlação combinada para as VS e as AMI. Pontos vermelhos abertos: AMI tratadas com placebo, pontos vermelhos a cheio: AMI tratadas com 5-MTHF; pontos pretos abertos: VS tratadas com placebo; pontos a cheio: VS tratadas com 5-MTHF.

**Figura 9.** Visão geral de uma reacção de L-arginina com NO e L-citrulina, catalisada por sintase de óxido nítrico endotelial (SONe).

**Figura 10.** Produção de NO por meio de SONE, comparação com a via fisiológica (acoplamento de SONE) e via prejudicada (desacoplamento de SONE).

#### **Descrição detalhada da invenção**

A presente invenção tem por objecto a utilização de folatos para a prevenção e/ou o tratamento de doenças cardiovasculares, tais como aterosclerose e, em particular para a modulação de síntese de óxido nítrico endotelial (SONe).

No presente texto, as expressões "folato" ou "compostos de folato" estão relacionado tanto com monoglutamato de ácido pterico (ácido fólico) assim como com as formas reduzidas

tais como di-hidrofolatos e tetra-hidrofolatos, por exemplo, ácido 5-formiltetra-hidrofolico, ácido 5-metiltetra-hidrofolico, 5,10-metilenotetra-hidrofolico, ácido 5,10-meteniltetra-hidrofolico, 10-formiltetra-hidrofolico ou ácido tetra-hidrofolico, os seus poliglutamatos, os seus isómeros ópticos, particularmente os seus isómeros naturais opticamente puros e também as misturas de isómeros ópticos, particularmente as misturas racémicas, assim como os seus sais e ésteres aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico.

Os folatos preferidos incluem, tetra-hidrofolatos, particularmente as suas formas diastereoisoméricas naturais de tetra-hidrofolatos tais como ácido 5-formil-(6S)-tetra-hidrofolico, ácido 5-metil-(6S)-tetra-hidrofolico, ácido 5,10-metileno-(6R)-tetra-hidrofolico, ácido 5,10-metenil-(6R)-tetra-hidrofolico, ácido 10-formil-(6R)-tetra-hidrofolico, ácido 5-formimino-(6S)-tetra-hidrofolico ou ácido (6S)-tetra-hidrofolico ou os seus sais e ésteres aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico.

No presente texto, a expressão "aceitável sob o ponto de vista farmacêutico", tal como se utiliza em relação com os sais e ésteres deve incluir os significados tanto dos aceitáveis sob o ponto de vista farmacológico como os aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico. Os sais aceitáveis sob o ponto de vista farmacológico e farmacêutico como tal podem ser sais de metais alcalinos ou de metais alcalino-terrosos, preferencialmente sais de sódio, potássio, magnésio ou cálcio. Os ésteres aceitáveis sob o ponto de vista farmacológico e farmacêutico como tal podem ser ésteres de alquilo C1-C4, cicloalquilo C5 ou cicloalquilo C6, fenilo, alquil(C1-C4)fenilo, benzilo ou alquil(C1-C4)benzilo. Os ésteres podem ser monoésteres ou diésteres. Os diésteres podem ser homogêneos ou heterogêneos. Os mais preferidos de

todos são diésteres homogéneos tais como ésteres de dialquilo C1-C4, por exemplo, ésteres de dimetilo ou de dietilo.

No presente texto, a expressão "doença cardiovascular" inclui, preferencialmente, indicações causadas por stress oxidante, mais especificamente oxidação do co-factor endotelial tetra-hidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) por meio de espécies de oxigénio reactivas e inclui, preferencialmente, angina pectoris, doença coronária do coração, hipertensão, disfunção endotelial, aterosclerose e similares, mais preferencialmente aterosclerose.

No presente texto, a expressão "modulação de sintase de óxido nítrico endotelial (SONe)" está relacionada com a melhoria das respostas vasomotoras dependentes do endotélio mediadas por NO e a redução do superóxido vascular, tanto ex vivo como in vivo, por meio da captura de espécies reactivas de oxigénio (ERO), tal como peroxinitrito, aumentando o BH<sub>4</sub> vascular, aumentando a relação BH<sub>4</sub>/biopterina total, invertendo o desacoplamento da SONE, aumentando a relação dímero:monómero de SONE e o aumento directo da actividade de SONE.

A presente invenção tem ainda por objecto uma preparação farmacêutica para o tratamento e/ou a prevenção de doenças cardiovasculares, caracterizada pelo facto de consistir em pelo menos um folato ou um seu sal ou éster aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico e pelo menos um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

No presente texto, a expressão "preparação farmacêutica (da presente invenção)" ou "preparações (da invenção)" está relacionada com as formas entérica (por exemplo, oral, sublingual ou rectal), parentérica ou tópica (por exemplo,

transdérmica). As substâncias orgânicas ou inorgânicas que não reagem com o ingrediente activo podem ser utilizadas como veículos, por exemplo, água, óleo, álcool de benzilo, polietileno-glicol, triacetato de glicerol ou outros glicéridos de ácidos gordos, gelatina, lecitina, ciclodextrina, hidratos de carbono tal como lactobiose ou amido, estearato de magnésio, talco ou celulose. Os comprimidos, drageias, cápsulas, pós, xarope, concentrados ou rebuçados são utilizados preferencialmente para aplicação oral, os supositórios são utilizados preferencialmente para aplicação rectal e as soluções à base de água ou de óleo ou os liofilizados são utilizados preferencialmente para aplicação parentérica.

As suspensões, emulsões ou implantes podem também ser utilizadas e os adesivos ou cremes podem ser utilizados para aplicação tópica.

As preparações para aplicação parentérica compreendem soluções esterilizadas para injeção, aquosas ou não aquosas dos compostos activos, que são preferencialmente isotónicas com o sangue do receptor.

Estas preparações podem ainda compreender estabilizantes, aditivos para a libertação controlada do composto activo sob o ponto de vista farmacêutico, antioxidantes, tampões, agentes bacterioestáticos e adjuvantes para a obtenção de uma solução isotónica. As suspensões esterilizadas aquosas e não aquosas podem compreender aditivos e espessantes em suspensão.

As preparações da presente invenção podem existir como uma embalagem de uma dose única ou como uma embalagem com doses múltiplas, por exemplo, como ampolas soldadas; podem

ser armazenadas como um produto liofilizado e, quando necessário, pode ser preparado para ser utilizado por adição de um líquido esterilizado, por exemplo, água ou uma solução de sal. Do mesmo modo podem utilizar-se pós esterilizados, grânulos ou comprimidos.

Apesar das preparações farmacêuticas preferidas conterem apenas folatos ou um seu sal ou éster aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico como agente activo, todas as preparações da presente invenção podem compreender, para além disso, um ou mais compostos activos sob o ponto de vista farmacêutico que actuam separadamente ou em sinergia com a preparação da presente invenção. Quando para além dos folatos compreendem outros compostos activos sob o ponto de vista farmacêutico, então as preparações preferidas compreendem apenas um ou mais compostos activos sob o ponto de vista farmacêutico. Em particular, trata-se de substâncias que estão directamente envolvidas no ciclo do folato ou que influenciam o ciclo do folato ou que têm um efeito anti-inflamatório adicional, tal como vitaminas, antioxidantes, captadores de radicais, biopterinas, redutores de lípidos, agentes imuno-supressores, substâncias anti-inflamatórias não esteroidais e/ou outros ingredientes activos.

As vitaminas preferidas incluem vitamina B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> ou ácido ascórbico, glutatona, acetilcisteína, betaína.

As biopterinas preferidas incluem biopterinas em todos os estádios de oxidação e as formas isoméricas de biopterina, especialmente L-eritrobiopterina, 7,8-di-hidrobiopterina e 5,6,7,8-tetra-hidrobiopterina, particularmente L-sepiapterina, D-neopterina, xantopterina e 6-hidroximetil-pterina.

Os antioxidantes preferidos incluem vitamina E ou beta-caroteno.

Os redutores de lípidos preferidos incluem derivados de ácido clofibríco (fibratos), por exemplo, clofibrato, bezafibrato, etofibrato, fenofibrato, gemfibrozil, resinas permutadores de iões, por exemplo, colestiramina ou colestipol, ácido nicotínico (e os seus derivados), por exemplo, acipimox, sitoesterina, inibidores de HMG-CoA-redutase, por exemplo, atorvastatina, lovastatina, pravastatina, simvastatina, fluvastatina, rosuvastatina ou cerivastatina e inibidores da absorção de colesterol, por exemplo, ezetimib.

Os agentes imuno-supressores preferidos incluem corticoesteroides, micofenolatos, mofetil, rapamicina, inibidores de calcineurina, anticorpos mono- e policlonais e factores de crescimento tais como eritropoietina ou FEC-GM (factor de estimulação de colónias de granulócitos e macrófagos, GM-CSF na terminologia inglesa).

As substâncias anti-inflamatórias não esteroidais preferidas incluem pentoxifilina, sulfasalazina, ouro, aspirina ácidos gordos de ómega 3, inibidores de agregação de trombócitos tais como inibidores dos receptores de glicoproteína IIb/IIIa, hormonas, flavinoides ou outros ácidos carboxílicos anti-inflamatórios não esteroidais tais como aspirina, salsalato, diflunisal ou ácido trisalicílico de colina e magnésio ou outros ácidos propiónicos anti-inflamatórios não esteroidais tais como ibuprofen, xaproxen, fenoprofen, cetoprofen, flurbiprofen ou oxaprozina ou outros derivados de ácido acético anti-inflamatórios não esteroidais tal como indometacina, tolmetina, sulindac, diclofenac ou etodolac ou outros fenamatos anti-inflamatórios não

esteroidais tais como meclofenamato ou ácido mefenâmico ou outros derivados de ácido enólico anti-inflamatórios não esteroidais tal como piroxicam ou fenilbutazona ou outras naftilcanonas tal como nabumetona, assim como inibidores de COX-2 tal como celecoxib ou rofecoxib. Esta classe de substâncias também inclui substâncias com um efeito anti-inflamatório tal como beta-bloqueadores, anticorpos anti-citocina, por exemplo anticorpo anti-FNT (factor de necrose de tumor) -alfa ou soluções de perfusão para a preservação de órgãos tal como Eurocollins, HTK ou solução da Universidade do Wisconsin (UW).

As preparações mais preferidas quando, para além dos folatos, ainda compreendem um ou mais compostos activos sob o ponto de vista farmacêutico, são preparações farmacêuticas que consistem em pelo menos um folato ou um seu sal ou éster aceitável sob o ponto de vista farmacêutico em combinação com aspirina ou ácido ascórbico e pelo menos um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

A presente invenção também tem por objecto processos para o tratamento e/ou a prevenção de doenças cardiovasculares, compreendendo a administração, a um indivíduo que necessita desse tratamento ou prevenção, de uma quantidade efectiva sob o ponto de vista terapêutico de pelo menos um folato ou um seu sal ou éster aceitável sob o ponto de vista farmacêutico ou uma preparação farmacêutica que consiste em pelo menos um folato ou um seu sal ou éster aceitável sob o ponto de vista farmacêutico e pelo menos um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

A preparação compreende entre 0,001 mg e 1000 mg do ingrediente activo por dose. Para a prevenção, utilizam-se preparações que contêm, preferencialmente, entre 5 µg e 1000

µg de ingrediente activo por dose. Para a prevenção, utilizam-se preparações que contêm, preferencialmente, entre 5 µg e 1000 µg de ingrediente activo por dose. Para a terapia, utilizam-se preparações que contêm, preferencialmente, entre 0,1 mg e 200 mg do ingrediente activo por dose. A dosagem depende da forma de terapia, da forma de aplicação da preparação, da via de administração e da idade, peso, nutrição e estado do paciente. O tratamento pode começar com uma dose mais baixa, abaixo da quantidade óptima e pode aumentar de modo a atingir o efeito óptimo. As dosagens utilizadas na prevenção variam preferencialmente entre 5 µg e 1000 µg por dia, particularmente entre 100 µg e 1000 µg por dia. As dosagens óptimas em terapia variam entre 0,1 mg e 100 mg por dia, particularmente entre 0,5 mg e 5 mg por dia.

Com base na descrição precedente, um especialista nesta matéria pode imediatamente deduzir os elementos cruciais da presente invenção e, sem sair da ideia básica e do âmbito da presente invenção, pode fazer alterações e acrescentos e pode por isso adaptar a presente invenção a diferentes requisitos e condições.

A descrição completa de todos os pedidos de patentes de invenção, patentes e publicações que são citadas no presente texto estão por isso aqui incluídas como referência. Os exemplos que se seguem podem ser realizados com um sucesso semelhante por substituição os produtos descritos de forma genérica ou específica e/ou das condições processuais da presente invenção por aqueles a quem se dão os exemplos que se seguem. Os enquadramentos específicos que se seguem são dados puramente a título de exemplo e não devem ser considerados, de nenhuma forma, como limitativos da parte restante da descrição.

## Exemplos

### **Processos**

**Pacientes.** Estudaram-se 117 pacientes com doenças da artéria coronária que sofrem por rotina uma cirurgia de enxerto de um bypass numa artéria coronária (EBAC) no John Radcliffe Hospital, Oxford, RU (61 incluídos na parte do estudo ex vivo e 56 na parte do estudo in vivo). Os critérios de exclusão foram a existência de qualquer doença inflamatória, infecciosa, do fígado ou renal ou qualquer malignidade. Os pacientes que receberam fármacos anti-inflamatórios não esteroidais, assim como qualquer suplemento dietético (tal como ácido fólico ou vitaminas antioxidantes) também foram excluídos. Não há diferenças significativas nas características demográficas ou no HcIt inicial no plasma entre os grupos de tratamento (dados não mostrados). O protocolo do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética de Investigação local e cada paciente deu o seu consentimento informado por escrito.

**Recolha de vasos e estudos ex vivo.** Recolheram-se amostras das VS (n = 38) e das AMI (n = 46) de um total de 61 pacientes, durante a operação de EBAC, como foi previamente descrito (Channon K. M., *Trends Cardiovasc Med* 2004; 14: 323-327; Guzik T. J. et al., *Circulation* 2002; 105: 1656-1662). Transferiram-se segmentos de vasos para o laboratório no prazo de 30 minutos, num tampão de Krebs-Henseleit arrefecido com gelo. Fez-se a incubação de segmentos de VS e de AMI com 5-MTHF (0-100  $\mu$ M) em tampão de Krebs-Henseleit durante 45 minutos antes dos ensaios da função endotelial, produção de superóxido/peroxinitrito, conversão de arginina/citrulina marcada com rádio, análise de mancha de Western ou níveis de 5-MTHF e de biopterina no tecido.

**Estudos in vivo.** Pacientes (n = 56) que sofreram EBAC participaram num estudo duplamente cego, controlado por um placebo, em que receberam uma infusão intravenosa quer de 5-MTHF (Merck Eprova, Suíça) ou placebo, administrados antes do EBAC. Administrou-se 5-MTHF numa dose de 0,13 mg/kg de peso do corpo, que, em estudos preliminares, atingiu uma concentração no plasma de ~2-3  $\mu\text{M}$  imediatamente após a administração e 1-2  $\mu\text{M}$  45 minutos depois da infusão. Esta concentração foi escolhida com base na análise de dose - resposta realizada em experiências ex vivo. Colheram-se 5 amostras de VS e de AMI ~45 minutos depois da infusão de 5-MTHF (tempo médio de colheita  $45,7 \pm 2,9$  minutos depois da infusão) e ensaiaram-se quanto à função vasomotora mediada por NO, à produção de superóxido vascular, níveis de 5-MTHF e de biopterina no plasma, tal como se descreve a seguir.

**Estudos vasomotores.** Avaliou-se a dilatação dependente do endotélio e independente do endotélio utilizando estudos de tensão isométrica, tal como previamente descrito (Guzik T. J. et al, *Circ Res.* 2000; 86: e85). Os anéis dos vasos foram equilibrados e foram postos em pré-tensão de uma forma passiva até 3 g, uma tensão em repouso óptima que foi determinada em estudos de base da resposta contráctil ao KCl. No seguimento da pré-contracção com fenilefrina ( $3 \times 10^{-6}$  M), as respostas vasomotoras à acetilcolina (ACh,  $10^{-9}$  M a  $10^{-5}$  M) e à bradiquinina (BQ,  $10^{-9}$  M a  $10^{-5}$  M) de agonistas mediada pelo endotélio, foram quantificadas em 4 segmentos com a mesma dimensão do mesmo vaso. Nas experiências ex vivo, as respostas vasomotoras repetiram-se depois da incubação durante 45 minutos com 5-MTHF 0 (controlo), 1, 10 ou 100  $\mu\text{M}$ , adicionado às câmaras do banho de órgãos. Finalmente, as relaxações com o nitroprussido de sódio dador de NO (SNP,  $10^{-10}$  M a  $10^{-6}$  M), foram avaliadas na presença do éster metílico de NG-nitro-L-arginina inibidor de SON (L-NAME; 100  $\mu\text{M}$ ).

**Medições de superóxido/peroxinitrio.** Mediu-se a produção de superóxido vascular a partir de vasos humanos frescos utilizando quimioluminescência aumentada pela lucigenina (5  $\mu$ M), como previamente descrito (Skatchkov M. P. et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 254: 319). Amostras de VS e de AMI do mesmo paciente foram abertas longitudinalmente para expor a superfície endotelial e depois foram equilibradas durante 20 minutos em tampão de Krebs-HEPES oxigenado (95 % de O<sub>2</sub>/5 % de CO<sub>2</sub>) (2 mL, pH = 7,4) a 37 °C. Mediu-se o superóxido derivado de SON por meio da adição de L-NAME (100  $\mu$ M) no tampão de equilíbrio e calculando a diferença no sinal de superóxido comparado com as condições iniciais. Determinou-se o peroxinitrito vascular utilizando luminol (100  $\mu$ M) em vez de lucigenina e por subtração do sinal remanescente depois da adição de ácido úrico específico para a retenção de peroxinitrito (1 mM), como se descreveu previamente (Laursen, J. B. et al., *Circulation.* 2001; 103: 1282).

**Microtopografia fluorescente oxidante.** Determinou-se a produção de superóxido in situ em crio-seções de um vaso com o corante fluorescente oxidante di-hidroetídio (DHE) (Bendall, J. K. et al., *Circ Res.* 2005; 97: 864). Incubaram-se as crio-seções emparelhadas (30  $\mu$ M) do mesmo vaso com DHE (2  $\mu$ mole/L) no seio de STF, com ou sem L-NAME (100  $\mu$ M). Obtiveram-se imagens de fluorescência (x 40, microscópio confocal de varrimento de laser 6 LSM 510 META da Zeiss) de cada quadrante do vaso, incorporando o lado do luminal do vaso para quantificar a fluorescência das células endoteliais. Em cada caso, os segmentos de anéis dos vasos (com e sem L-NAME) foram analisados em paralelo com parâmetros de imagem idênticos. A análise da imagem de DHE foi realizada de uma forma cega e por dois investigadores

independentes, utilizando o software Image-Pro Plus (Media Cybernetics).

**Ensaio de captação de superóxido e de peroxinitrito.** O efeito de retenção directa do superóxido do 5-MTHF foi avaliado com a utilização de um sistema de xantina/xantina oxidase. A produção de superóxido foi induzida pela adição de xantina oxidase (6,67 UM/mL) em tampão de Krebs HEPES (2 mL, pH = 7,4) a 37 °C, contendo xantina (0,133 mM) e lucigenina (5 µM), na presença de 5-MTHF (0 - 100 µM) ou concentrações iguais de ácido ascórbico como controlo positivo. A produção de peroxinitrito foi induzida pela adição de 3-morfolinosidnonimida (SIN-1, 1 µM) em tampão de Krebs HEPES (2 mL, pH = 7,4) a 37 °C, contendo luminol (100 µM), na presença de diferentes concentrações de 5-MTHF (0-100 µM) ou em concentrações iguais de ácido úrico como controlo positivo, tal como foi descrito previamente (Kuzkaya N. et al., *J Biol Chem.* 2003; 278: 22546). Os efeitos na retenção de 5-MTHF, vitamina C ou ácido úrico foram calculados como a percentagem de inibição da quimioluminescência comparada com o controlo.

**Determinação de 5-MTHF e Hcit.** Colheram-se amostras de sangue antes da administração de 5-MTHF ou de placebo e no momento da recolha de vasos. Mediu-se a homocisteína total (Hcit) no plasma por meio de um imuno-ensaio de polarização de fluorescência adaptado ao analisador IMx (Abbot Diagnostics). Determinaram-se os níveis de 5-MTHF no plasma e nos tecidos por meio de cromatografia líquida de elevada resolução (CLER), tal como se descreveu previamente (Leeming R. J. et al., *Metabolism.* 1990; 39: 902).

**Determinação dos níveis de biopterina.** Determinaram-se os níveis de biopterina nos vasos humanos por CLER, tal como previamente descrito (Alp N. J. et al., *J Clin Invest.* 2003;

112: 725) e expressou-se como pmole/g de tecido. Para examinar o efeito de 5-MTHF na oxidação de BH<sub>4</sub> induzida por peroxinitrito, utilizou-se SIN-1 (2 µM) para oxidar BH<sub>4</sub> (0,1 µM) na presença ou na ausência de 5-MTHF (1 µM) a 37 °C durante 14 minutos (Milstien S. e Katusic Z. Biochem Biophys Res Commun. 1999; 263: 681).

**Avaliação da actividade de SONE em vasos intactos.** Estimou-se a actividade de SONE por meio de uma quantificação feita por CLER da conversão de arginina, marcada com rádio, em citrulina a partir de anéis de vasos intactos, tal como se descreveu previamente (de Bono J. et al., Nitric Oxide. 2006; (em impressão)).

**Análise de manchas de Western.** Mediu-se a relação dímero:monómero de SONE em pares de amostras de AMI incubadas durante 45 minutos na presença ou na ausência de 5-MTHF 1 µM por análise de mancha de Western tal como descrito previamente (Cai S. et al., Cardiovasc Res. 2002; 55: 838). Visualizaram-se as bandas utilizando quimioluminescência e quantificaram-se utilizando o software de imagens NIH.

**Análise estatística.** Realizaram-se as análises utilizando o pacote SPSS 12.0 para Windowa (SPSS Inc., Illinois, EUA). Os dados numa distribuição normal estão apresentados como a média ± DPM, enquanto as variáveis com uma distribuição não normal (tal como o superóxido vascular) estão apresentadas como a mediana (valores do 25°-75° percentis). As comparações de base entre grupos foram realizadas com ANOVA de uma só via para comparações múltiplas, seguida da correcção de Bonferoni. Os efeitos de 5-MTHF nas respostas vasomotoras em cada anel dos vasos foram avaliados por ANOVA de duas vias para medições repetidas. Os efeitos das incubações de 5-MTHF na produção de superóxido e nos níveis de 5-MTHF ou de Hcit

foram avaliados pelos testes U de Mann-Whitney, testes de classificação de Wilcoxon ou testes t para dados desemparelhados ou aos pares, conforme apropriado. Um valor de  $P < 0,05$  "two-tailed" foi considerado como significativo sob o ponto de vista estatístico.

**Exemplo 1: Efeitos de 5-MTHF na função endotelial e na produção de superóxido e de peroxinitrito em vasos humanos ex vivo**

Investigaram-se os efeitos de 5-MTHF nas respostas vasomotoras a Ach e a BQ nos segmentos de vasos no início e passados 45 minutos de incubação em câmaras de órgãos com 5-MTHF 0-100  $\mu\text{M}$ . As relaxações em resposta à acetilcolina (Ach) ou à bradiquinina (BQ) foram semelhantes entre os 4 anéis do mesmo vaso no início. A figura 1 mostra que as respostas máximas de relaxação a Ach (painel A) ou a BQ (painel B) aumentaram significativamente após 45 minutos de incubação com 5-MTHF 1  $\mu\text{M}$ , mas permaneceram inalteradas nos segmentos de controlo. As contracções absolutas em resposta a fenilefrina foram de  $7,9 \pm 0,8$  g no início e permaneceram inalteradas depois da incubação (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  vs o valor inicial). Concentrações mais elevadas de 5-MTHF (10 ou 100  $\mu\text{M}$ ) não resultaram em mais aumentos nas relaxações máximas quer com a Ach quer com a BQ. As relaxações máximas com a Ach estão correlacionadas, significativamente, com as respectivas relaxações com BQ nos mesmos pacientes ( $r = 0,746$ ,  $P < 0,001$ ). Os níveis vasculares de 5-MTHF confirmaram os aumentos dependentes da dose com uma concentração crescente da incubação de 5-MTHF, de  $0,40 \pm 0,06$  nmole/g de tecido no controlo até  $3,40 \pm 0,71$ ,  $21,3 \pm 8,10$  e  $57,2 \pm 18,9$  nmole/g de tecido depois da incubação de 25 VS com 5-MTHF 1, 10 e 100  $\mu\text{M}$  respectivamente ( $P < 0,05$  para todos vs. o controlo). Não houve diferenças nas respostas vasomotoras ao

agonista independente do endotélio, SNP, entre os segmentos dos vasos de controlo e os incubados com 5-MTHF (dados não mostrados), indicando um efeito específico de 5-MTHF na função endotelial mediada por NO.

A produção de superóxido vascular e de peroxinitrito das VS e das AMI foi determinada passados 45 minutos de incubação quer apenas com tampão ou com 5-MTHF 1, 10 e 100  $\mu\text{M}$ . A figura 2 mostra que a produção de superóxido vascular e de peroxinitrito diminui significativamente depois da incubação com concentrações crescentes de 5-metiltetra-hidrofolato (5-MTHF) durante 45 minutos, tanto nas veias safenas (VS, painel A, n = 32 e painel B, n = 6) como nas artérias mamárias internas (AMI, painel C n = 32 e painel D n = 6), comparada com os vasos de controlo (incubadas com tampão) dos mesmos pacientes (valores expressos como mediana (linha horizontal), 25°-75° percentis (quadrados) e intervalo (hastes); \*P < 0,01 vs controlo). Assim, a incubação com 5-MTHF 1  $\mu\text{M}$  reduziu significativamente tanto a produção de superóxido vascular como a de peroxinitrito nas VS e nas AMI sem mais reduções a concentrações de 5-MTHF mais elevadas.

### **Exemplo 2: Efeitos de 5-MTHF na função endotelial e na produção de superóxido em vasos humanos in vivo**

Os pacientes foram considerados aleatoriamente para receberem i.v. 5-MTHF ou placebo de uma forma duplamente cega. Os níveis de 5-MTHF no plasma, no início, não eram significativamente diferentes entre pacientes que tenham recebido 5-MTHF intravenosamente ( $32,4 \pm 9,01$  nM) comparados com placebi ( $26,4 \pm 4,68$  nM, P = NS). Ao contrário, os níveis de 5-MTHF no plasma estavam significativamente aumentados no momento da colheita dos vasos no grupo tratado com 5-MTHF ( $2,28 \pm 0,21$   $\mu\text{M}$ ; P < 0,001 vs a base) mas permaneceram

inalterados no grupo tratado com placebo ( $25,8 \pm 6,85$  nM,  $P =$  NS vs a base,  $P < 0,001$  vs. o grupo tratado com 5-MTHF). De uma forma correspondente, os níveis de 5-MTHF no tecido nas VS ( $9,35 \pm 72$  nmole/g) e nas AMI ( $12,7 \pm 2,58$  nmole/g) aumentaram significativamente no grupo tratado com 5-MTHF comparado com o grupo tratado com placebo ( $1,19 \pm 0,25$  nmole/g para as VS e  $1,54 \pm 0,38$  nmole/g para as AMI respectivamente,  $P < 0,001$  para ambos), confirmando que a administração intravenosa de 5-MTHF aumenta substancialmente os níveis nos tecidos vasculares. A Hcit do plasma diminuiu modestamente nos pacientes que receberam 5-MTHF (de  $11,0 \pm 0,62$  a  $9,42 \pm 0,46$   $\mu$ mole/L,  $P < 0,05$ ) 45 minutos depois da infusão, mas permaneceu inalterada no grupo do placebo (de  $12,0 \pm 1,23$  a  $11,6 \pm 1,26$   $\mu$ mole/L,  $P =$  NS). Os efeitos da administração in vivo de 5-MTHF na função endotelial foram então avaliados por quantificação das respostas vasomotoras à ACh e BQ em segmentos de vasos de pacientes que tinham recebido quer placebo quer 5-MTHF. A figura 3 indica que o 5-MTHF intravenoso tem efeitos notáveis nas vaso-relaxações máximas quer com ACh (painel A,  $43,2 \pm 4,5$  %) e BQ (painel B,  $51,4 \pm 4,2$  %) comparados com o grupo do placebo ( $19,43 \pm 3,3$  % e  $37,1 \pm 3,7$  % respectivamente,  $P < 0,05$  para ambos), em que as respostas vasomotoras ao nitroprussido (SNP), independentes do endotélio, foram idênticas entre os dois grupos (figura 3). As pré-contracções absolutas em relação a fenilefrina nesses vasos foram de  $8,20 \pm 1,26$  g e  $7,72 \pm 1,31$  g nos grupos tratados com 5-MTHF e com placebo, respectivamente ( $P =$  NS) (\* $P < 0,05$  vs. placebo). Não há correlação entre as relaxações máximas quer com ACh ou Bq e a Hcit no plasma (ACh  $r = 0,272$ ,  $P = 0,114$ ; BQ  $r = -0,090$ ,  $P = 0,605$ ). Mediu-se a produção básica de superóxido em pares de segmentos de VS e de AMI de 40 pacientes (25 receberam placebo e 15 receberam 5-MTHF intravenosamente). O superóxido vascular era significativamente mais baixo tanto na VS como

na AMI no grupo de 5-MTHF intravenosa (ca. 45 minutos depois da infusão intravenosa de 5-MTHF, 0,13 mg/kg de peso do corpo, n = 15; barras brancas), comparado com o grupo do placebo (n = 25, barras cinzentas; P < 0,01 para ambos, figura 4). Realizaram-se as medições em pares de amostras tanto das veias safenas (VS) como nas artérias mamárias internas (AMI) dos mesmos pacientes, utilizando quimio-luminescência aumentada por leucigenina 5 µM. Os valores estão expressos como a mediana (linha horizontal), 25°-75° percentis (caixas) e intervalos (hastes). \*P < 0,01 vs. placebo.

### **Exemplo 3: Capacidade de retenção directa do superóxido/peroxinitrito do 5-MTHF**

Para se investigar se a retenção directa do superóxido pelo 5-MTHF deve-se ter em conta os seus efeitos na produção do superóxido vascular e na função endotelial, a capacidade de 5-MTHF para reter o superóxido, avaliou-se e comparou-se com o ácido ascórbico (vitamina C) que se sabe que retém o superóxido. Quando adicionado a um sistema de xantina/xantina oxidase que gera superóxido a níveis similares aos observados nos tecidos vasculares, o ácido ascórbico tem um potente efeito de retenção, reduzindo o superóxido mensurável de 50 % a 1 µM, enquanto que concentrações baixas de 5-MTHF (1-10 µM) não tinham um efeito detectável no superóxido mensurável (figura 5), com apenas uma modesta retenção observada mesmo a concentrações de 5-MTHF muito altas (100 µM).

A capacidade de retenção directa de peroxinitrito de 5-MTHF foi avaliada em comparação com o ácido úrico (vitamina C) que se sabe que retém o superóxido. A figura 5 mostra que quando adicionado a um sistema de Sin-1, 5-MTHF tem um potente efeito de retenção comparável com o efeito do ácido

úrico na mesma concentração, em que o peroxinitrito mensurável foi reduzido de 75 % a 1  $\mu$ M (figura 5), sugerindo que 5-MTHF, a concentrações utilizadas em estudos in vivo, exerce um efeito significativo de retenção de peroxinitrito (os valores são as médias  $\pm$  DPM de 3 experiências separadas. \*P < 0,01 vs. vitamina C; †P < 0,05 e ‡P < 0,01 vs. 0  $\mu$ M.

#### **Exemplo 4: Efeitos de 5-MTHF na produção vascular de superóxido derivada de SONE e actividade de SONE**

Estimou-se a produção de superóxido derivada de SON em pares de amostras de VS e de AMI, quantificando os efeitos da inibição de SON, utilizando L-NAME. A produção de superóxido vascular diminuiu por meio de L-NAME tanto nas VS como nas AMI no grupo placebo, sugerindo uma contribuição líquida para a produção de superóxido vascular pela SON. Pelo contrário, L-NAME aumentou a produção de superóxido em vasos de pacientes tratados com 5-MTHF, sugerindo nenhuma produção líquida de NO (figura 6). É importante que a produção de superóxido inibível por L-NAME nas VS e nas AMI está correlacionada com a 5-MTHF no plasma ( $r = 0,511$ ,  $p = 0,006$  e  $r = 0,690$ ,  $p = 0.0001$  respectivamente) mas não com os níveis de Hcit no plasma ( $r = 0,40$ ,  $p = 0,829$  e  $r = -0,289$ ,  $p = 0,106$ , respectivamente). Utilizou-se a microtopografia fluorescente oxidante com DHE para visualizar a produção de superóxido vascular e para especificar as alterações na produção de superóxido endotelial mediada por SONE (figura 6). L-NAME fez diminuir a fluorescência de DHE nos vasos dos pacientes tratados com placebo (indicando o desacoplamento de SONE), enquanto L-NAME aumentou a fluorescência de DHE endotelial em vasos nos pacientes tratados com 5-MTHF, sugerindo uma melhoria no acoplamento de SONE nestes vasos (figura 6). É importante notar que a fluorescência de DHE noutras regiões da parede dos vasos não foi afectada por 5-

MTHF, providenciando um controlo dentro da secção e demonstrando o efeito da inibição de SONE específico do endotélio. Utilizou-se a análise por CLER para avaliar melhor os efeitos de 5-MTHF na actividade de SONE, medindo a conversão de arginina, marcada com rádio, em citrulina em amostras de AMI de 12 pacientes, incubadas com ou sem 5-MTHF 1  $\mu$ M, durante 45 minutos. Observou-se um aumento significativo na produção de citrulina em vasos incubados com 5-MTHF ( $0,20 \pm 0,03$  %/g de tecido), comparado com os pares de vasos de controlo dos mesmos pacientes ( $0,14 \pm 0,020$  %/g,  $p < 0,05$ ), sugerindo que 5-MTHF aumenta directamente a actividade de SONE em vasos humanos. Assim, 5-MTHF reduziu a produção de superóxido vascular e aumentou a função endotelial mediada por NO através de efeitos no acoplamento de SONE.

**Exemplo 5: Efeitos de 5-MTHF nos níveis de tetra-hidrobioterina e na relação dímero:monómero de SONE em vasos humanos**

A figura 7 mostra que a incubação de VS durante 45 minutos ex vivo com 5-MTHF 1  $\mu$ M aumentou significativamente  $BH_4$  vascular assim como a relação  $BH_4/tBio$ . Mais estritamente, tanto os níveis absolutos de  $BH_4$  como a relação  $BH_4/tBio$  eram significativamente elevados em pacientes que receberam infusão intravenosa de 5-MTHF in vivo, comparados com os pacientes tratados com placebo (figura 7). A figura 7 também indica que 5-MTHF também reduziu significativamente a diminuição tanto de  $BH_4$  como da relação  $BH_4/tBio$  depois da exposição ao peroxinitrito gerado por SIN-1, o que está de acordo com a verificação anterior de que 5-MTHF é um forte captor de peroxinitrito. Além disso, a relação dímero:monómero estava também aumentada depois da exposição dos anéis das AMI a 5-MTHF 1  $\mu$ M (figura 7). Verificou-se ainda que a relação  $BH_4/tBio$  estava

significativamente correlacionada com a alteração induzida por L-NAME na produção de superóxido. A figura 8 mostra a correlação combinada para as VS e as AMI (círculos vermelhos abertos: AMI tratadas com placebo, círculos vermelhos a cheio: AMI tratados com 5-MTHF; Círculos pretos abertos: VS tratadas com placebo; Círculos a cheio: VS tratadas com 5-MTHF) tanto nas VS ( $r = 0,495$ ,  $P = 0,002$ ) como nas AMI ( $r = 0,621$ ,  $P = 0,001$ ) de pacientes individuais. Finalmente, a relação  $BH_4/tBio$  nas VS e nas AMI estava significativamente relacionada com a 5-MTHF no plasma ( $r = 0,498$ ,  $p = 0,01$  e  $r = 0,656$ ,  $p = 0,0001$  respectivamente) mas não com a Hcit do plasma ( $r = 0,033$ ,  $p = 0,836$  e  $r = -0,165$ ,  $p = 0,374$ , respectivamente), sugerindo que a própria 5-MTHF mais do que a Hcit do plasma é o parâmetro crítico que evita a oxidação de  $BH_4$  nos vasos humanos in vivo. Estas observações sugerem uma relação funcional directa entre a disponibilidade de  $BH_4$  vascular e o acoplamento de SONE em vasos humanos que é um determinante principal tanto da função endotelial mediada por NO como da produção de superóxido vascular.

Lisboa, 13 de Fevereiro de 2007

## REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um folato para a produção de um medicamento caracterizado pelo facto de conter folato como o agente activo para a prevenção e/ou o tratamento de doenças cardiovasculares.
2. Utilização, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo facto de a doença cardiovascular ser aterosclerose.
3. Utilização, de acordo com uma qualquer das reivindicações precedentes, caracterizada pelo facto de o folato ser seleccionado no grupo que consiste em monoglutamato de ácido pteróico (ácido fólico), ácido di-hidrofólico, ácido 5-formiltetra-hidrofólico, ácido 5-metiltetra-hidrofólico, 5,10-metilenotetra-hidrofólico, ácido 5,10-metileniltetra-hidrofólico, ácido 10-formiltetra-hidrofólico ou ácido tetra-hidrofólico, os seus poliglutamatos, os seus isómeros ópticos, particularmente os seus isómeros naturais opticamente puros e também as misturas de isómeros ópticos, particularmente as misturas racémicas, assim como os seus sais e ésteres aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico.
4. Utilização, de acordo com uma qualquer das reivindicações precedentes, caracterizada pelo facto de o folato ser seleccionado no grupo que consiste em ácido 5-metil-(6S)-tetra-hidrofólico, ácido 5-metil-(6R)-tetra-hidrofólico, ácido 5-metil-(6R,S)-tetra-hidrofólico, ácido 5-formil-(6S)-tetra-hidrofólico, ácido 5-formil-(6R)-tetra-hidrofólico ou ácido 5-formil-(6R,S)-tetra-hidrofólico ou um seu sal ou éster aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

5. Utilização, de acordo com uma qualquer das reivindicações precedentes, caracterizada pelo facto de o folato ser seleccionado no grupo que consiste em ácido 5-metil-(6S)-tetra-hidrofólico ou ácido 5-metil-(6R,S)-tetra-hidrofólico ou um seu sal ou éster aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.
6. Preparação farmacêutica para o tratamento e/ou a prevenção de doenças cardiovasculares, caracterizada pelo facto de consistir em pelo menos um folato ou um seu sal ou éster aceitável sob o ponto de vista farmacêutico e pelo menos um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.
7. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo facto de o folato ser seleccionado no grupo que consiste em monoglutamato de ácido pterico (ácido fólico), ácido di-hidrofólico, ácido 5-formil-tetra-hidrofólico, ácido 5-metiltetra-hidrofólico, ácido 5,10-metilenotetra-hidrofólico, ácido 5,10-meteniltetra-hidrofólico, ácido 10-formiltetra-hidrofólico ou ácido tetra-hidrofólico, os seus poliglutamatos, os seus isómeros ópticos, particularmente os seus isómeros naturais opticamente puros e também as misturas de isómeros ópticos, particularmente as misturas racémicas, assim como os seus sais e ésteres aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico.
8. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizada pelo facto de compreender um ou mais ingredientes activos adicionais e/ou adjuvantes aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico.

9. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo facto de o ingrediente activo, aceitável sob o ponto de vista farmacêutico, ser aspirina.
10. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo facto de o ingrediente activo, aceitável sob o ponto de vista farmacêutico, ser ácido ascórbico.
11. Processo para o tratamento e/ou a prevenção de doenças cardiovasculares, caracterizado pelo facto de compreender a administração, a um indivíduo que necessita desse tratamento e/ou prevenção, de uma quantidade efectiva sob o ponto de vista terapêutico de pelo menos um folato ou um seu sal ou éster aceitável sob o ponto de vista farmacêutico ou uma preparação farmacêutica que consiste em pelo menos um folato ou um seu sal ou éster aceitável sob o ponto de vista farmacêutico e pelo menos um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.
12. Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo facto de a doença cardiovascular ser aterosclerose.
13. Processo de acordo com as reivindicações 11 ou 12, caracterizado pelo facto de pelo menos um folato se seleccionar no grupo que consiste em monoglutamato de ácido pterico (ácido fólico), ácido di-hidrofólico, ácido 5-formiltetra-hidrofólico, ácido 5-metiltetra-hidrofólico, ácido 5,10-metilenotetra-hidrofólico, ácido 5,10-meteniltetra-hidrofólico, ácido 10-formiltetra-hidrofólico ou ácido tetra-hidrofólico, os seus poliglutamatos, os seus isómeros ópticos, particularmente

os seus isómeros naturais, opticamente puros e também as misturas de isómeros ópticos, particularmente as misturas racémicas, assim como os seus sais e ésteres aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico.

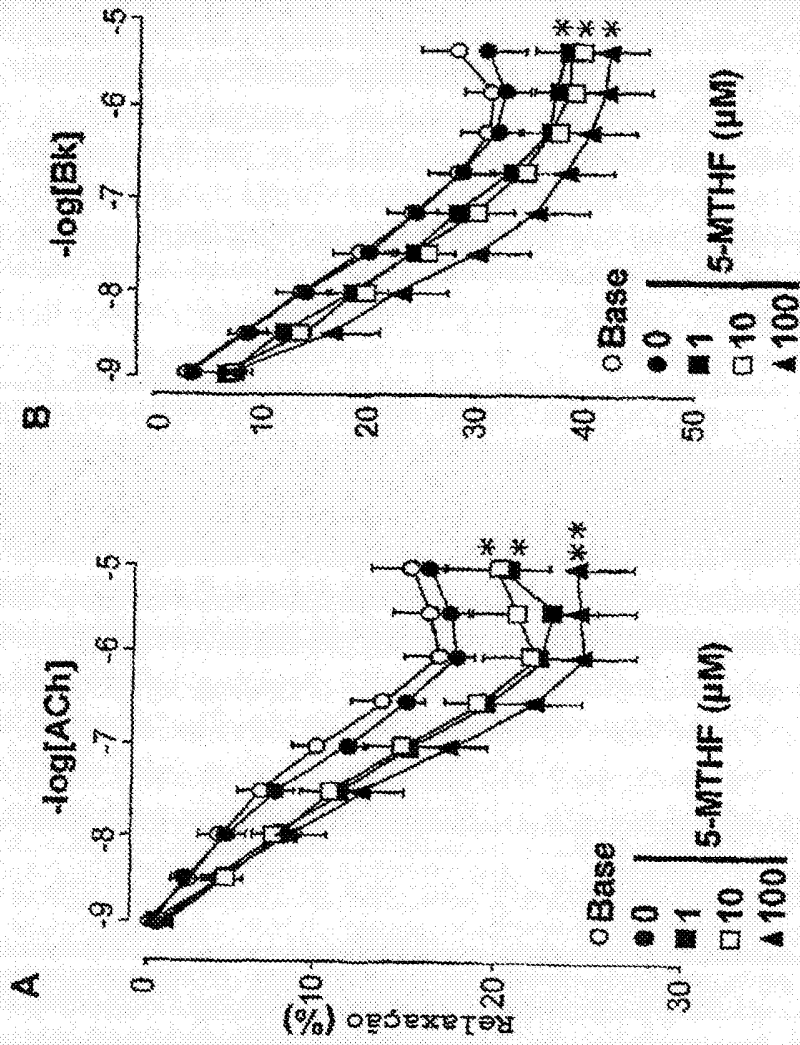
14. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 11 a 13, caracterizado pelo facto de pelo menos um folato se seleccionar no grupo que consiste em ácido 5-metil-(6S)-tetra-hidrofólico, ácido 5-metil-(6R)-tetra-hidrofólico, ácido 5-metil-(6R,S)-tetra-hidrofólico, ácido 5-formil-(6S)-tetra-hidrofólico, ácido 5-formil-(6R)-tetra-hidrofólico ou ácido 5-formil-(6R,S)-tetra-hidrofólico ou um seu sal ou éster aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.
15. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 11 a 14, caracterizado pelo facto de pelo menos um folato se seleccionar no grupo que consiste em ácido 5-metil-(6S)-tetra-hidrofólico ou ácido 5-metil-(6R,S)-tetra-hidrofólico ou um seu sal ou éster aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.
16. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 11 a 15, caracterizado pelo facto de a preparação farmacêutica compreender ainda um ou mais ingredientes activos adicionais e/ou adjuvantes aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico.
17. Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo facto de o ingrediente activo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico ser aspirina.
18. Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo facto de o ingrediente activo,

aceitável sob o ponto de vista farmacêutico, ser ácido ascórbico.

19. Utilização de um folato para a produção de um medicamento contendo folato como o agente activo para melhorar as respostas vasomotoras dependentes do endotélio, mediadas por NO e para reduzir o superóxido vascular.
20. Utilização de um folato caracterizada pelo facto de se destinar à produção de um medicamento contendo folato como o agente activo para captar espécies de oxigénio reactivo (EOR), aumentar o BH<sub>4</sub> vascular, aumentar a relação de BH<sub>4</sub>/biopterina total, reverter o desacoplamento de SONE, aumentar a relação de dímero:monómero de SONE e aumentar directamente a actividade de SONE.
21. Utilização de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo facto de as espécies de oxigénio reactivo (EOR) serem peroxinitrito.

Lisboa, 13 de Fevereiro de 2007

Figura 1



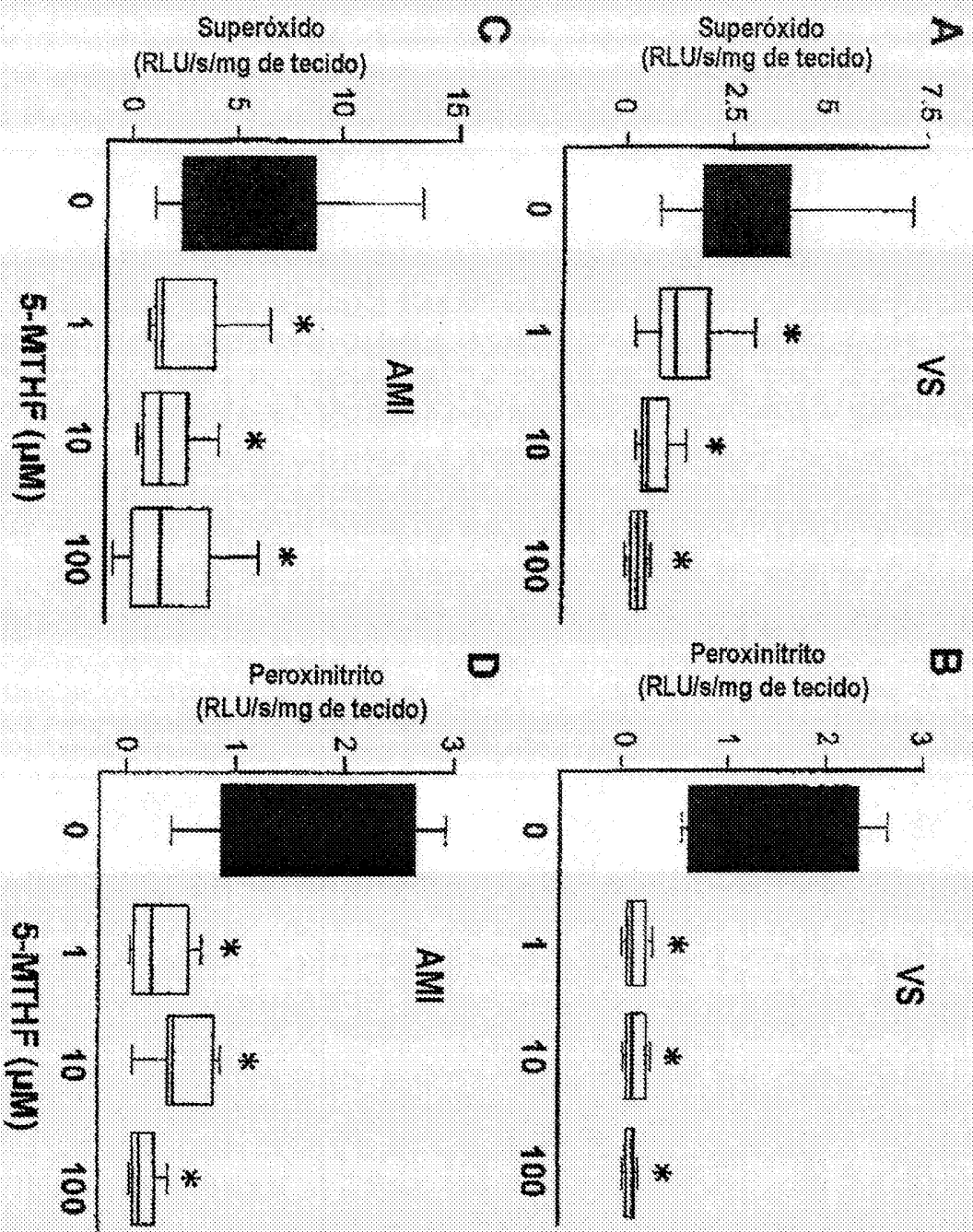
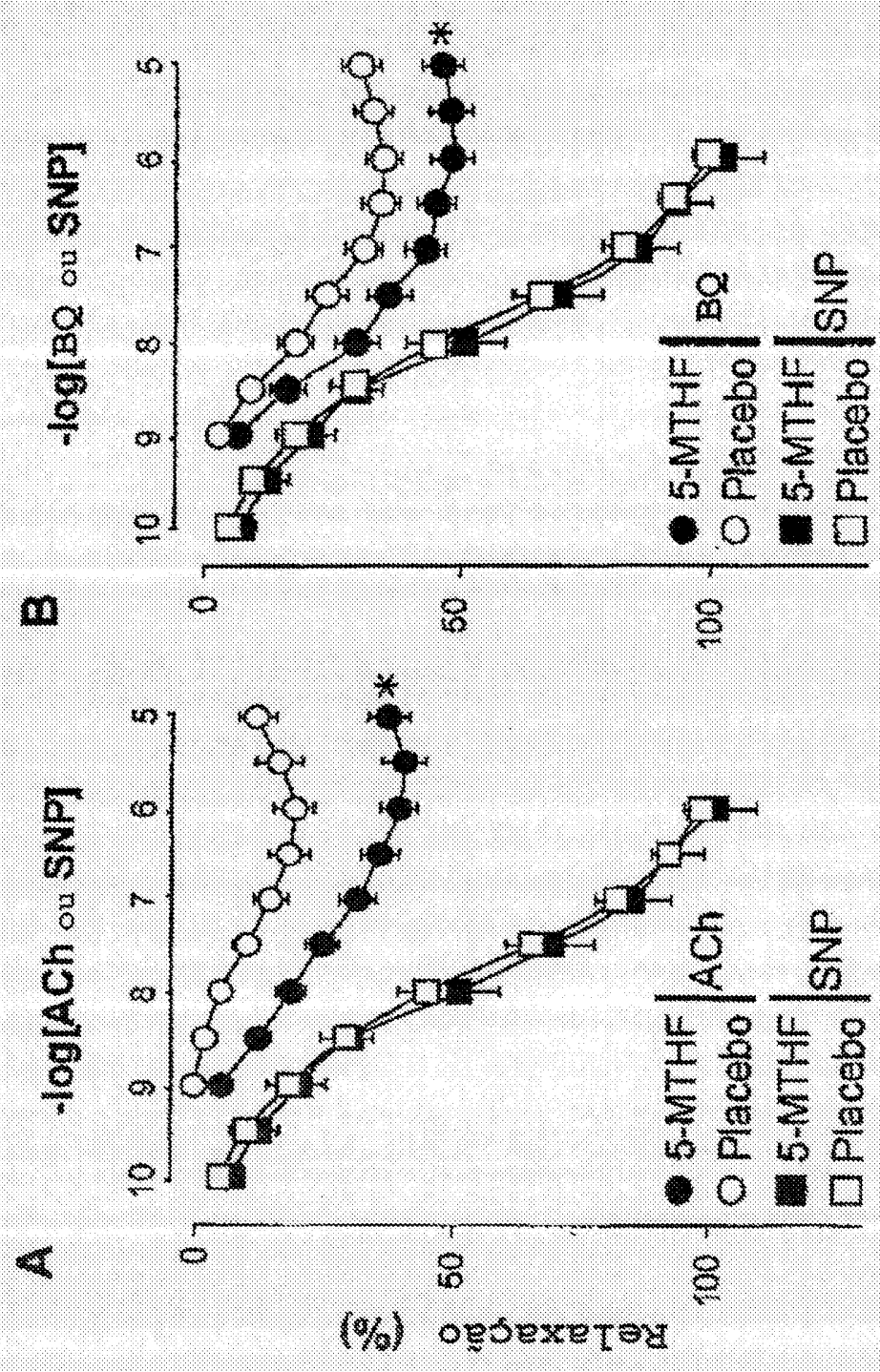


Figura 2

Figura 3



4/30

Figura 4

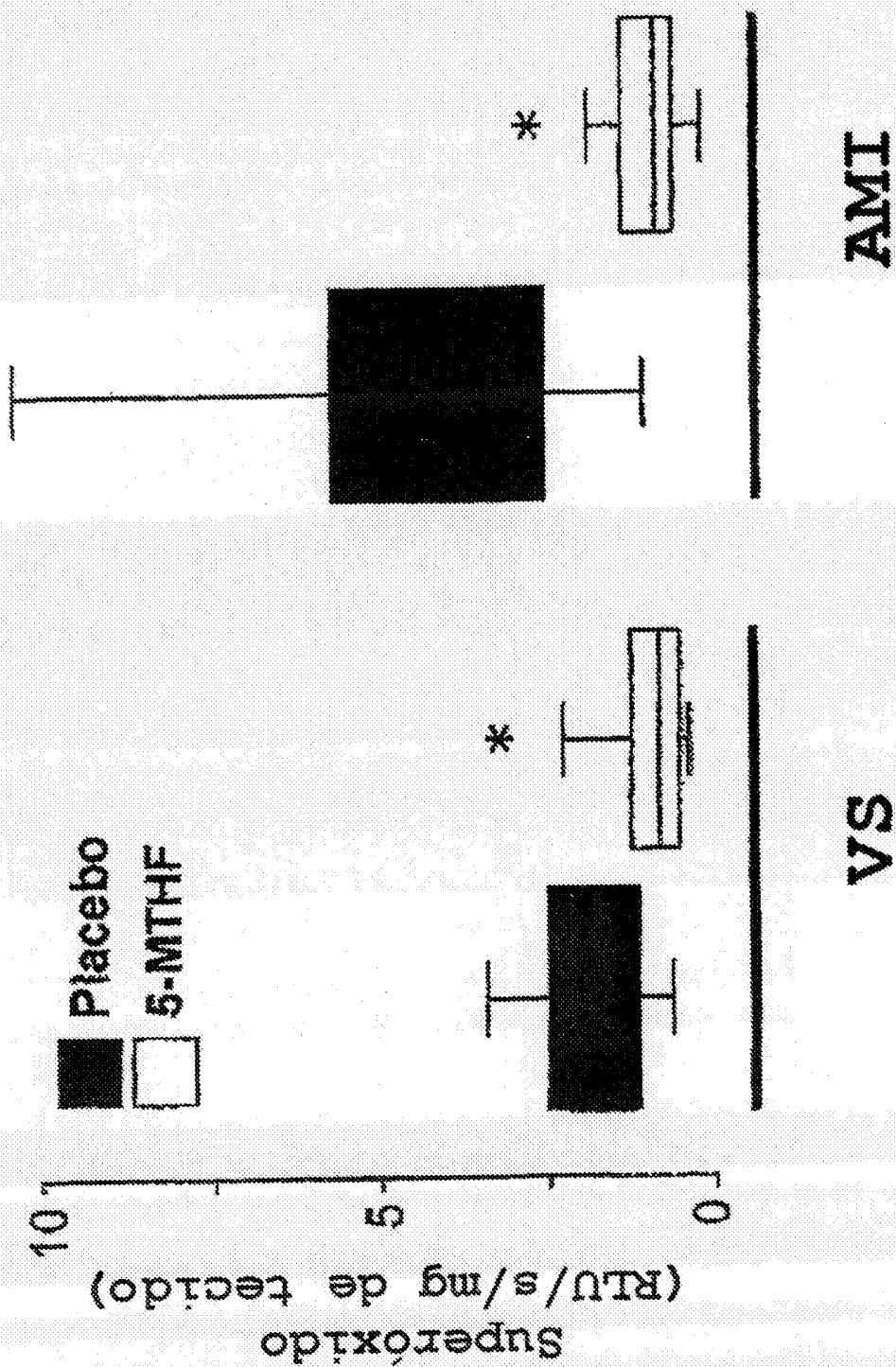


Figura 5

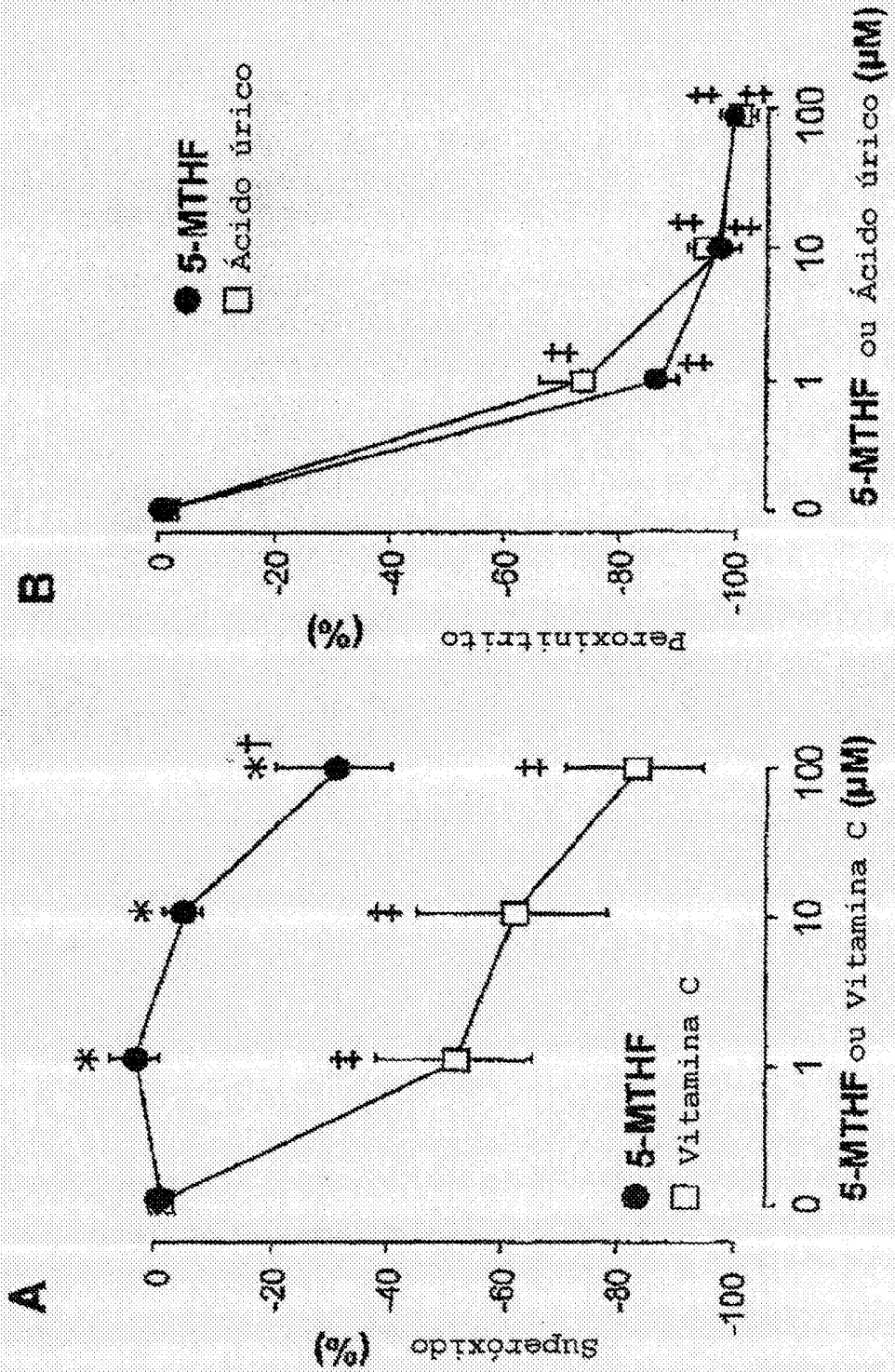


Figura 6

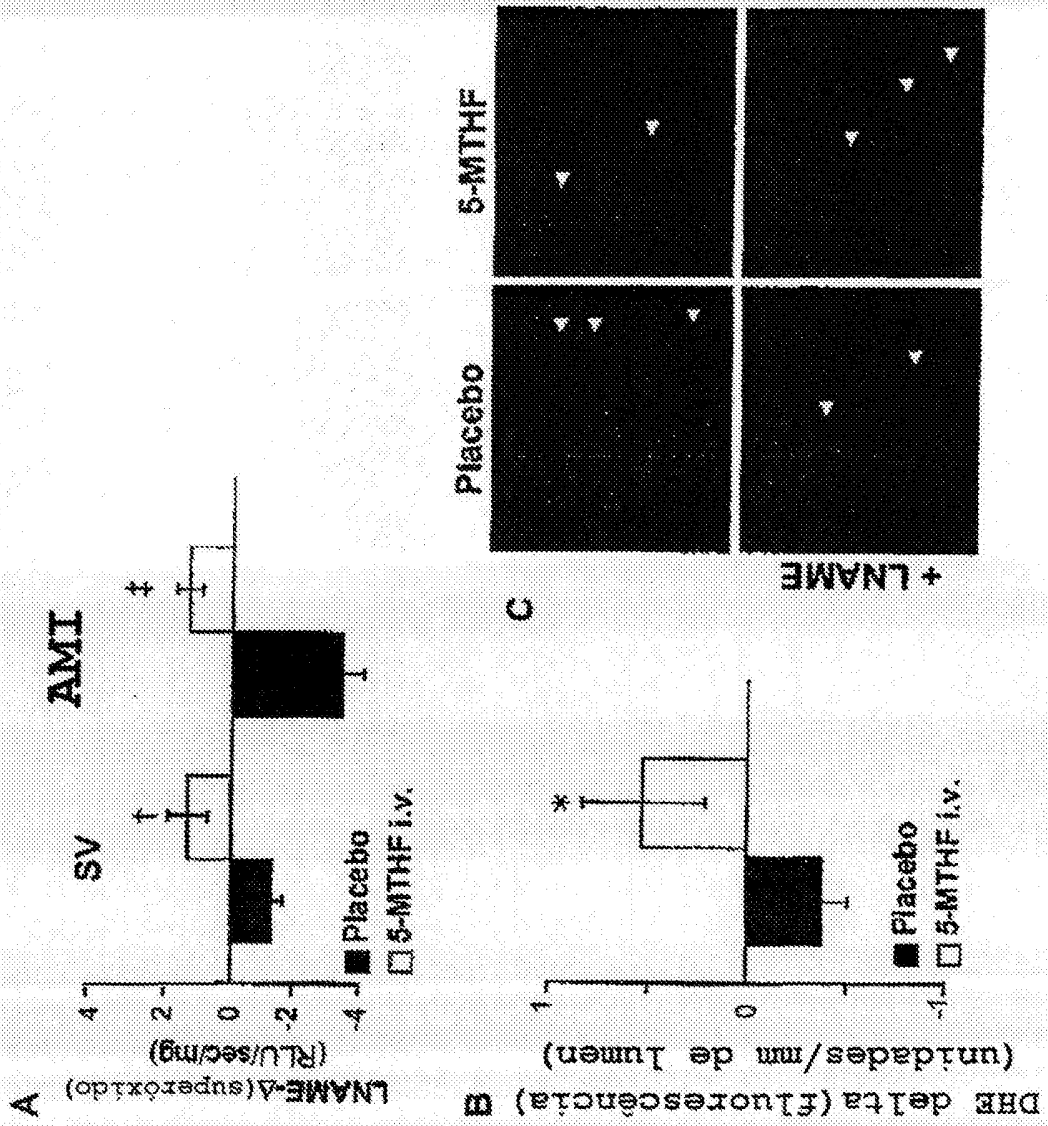


Figura 7

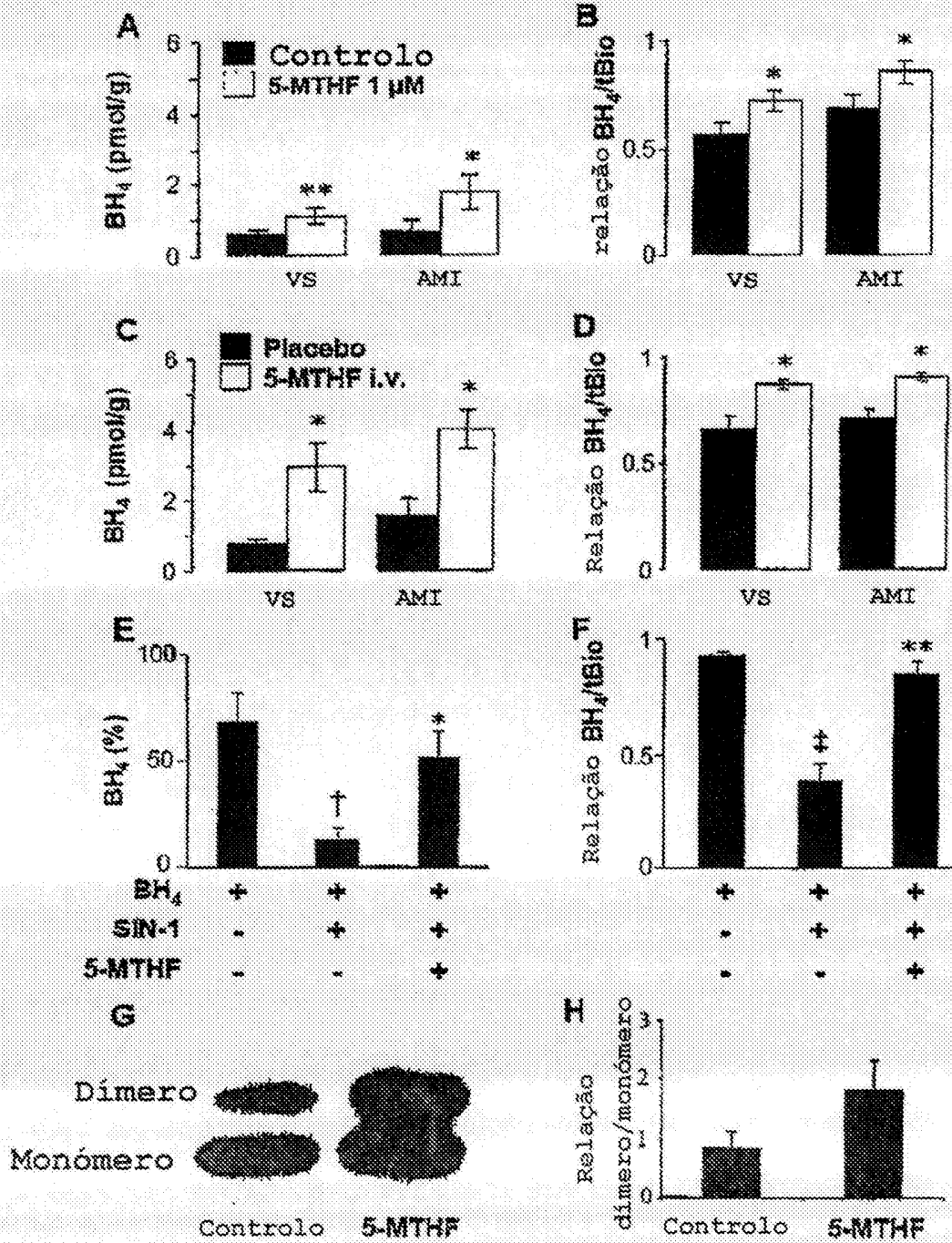


Figura 8

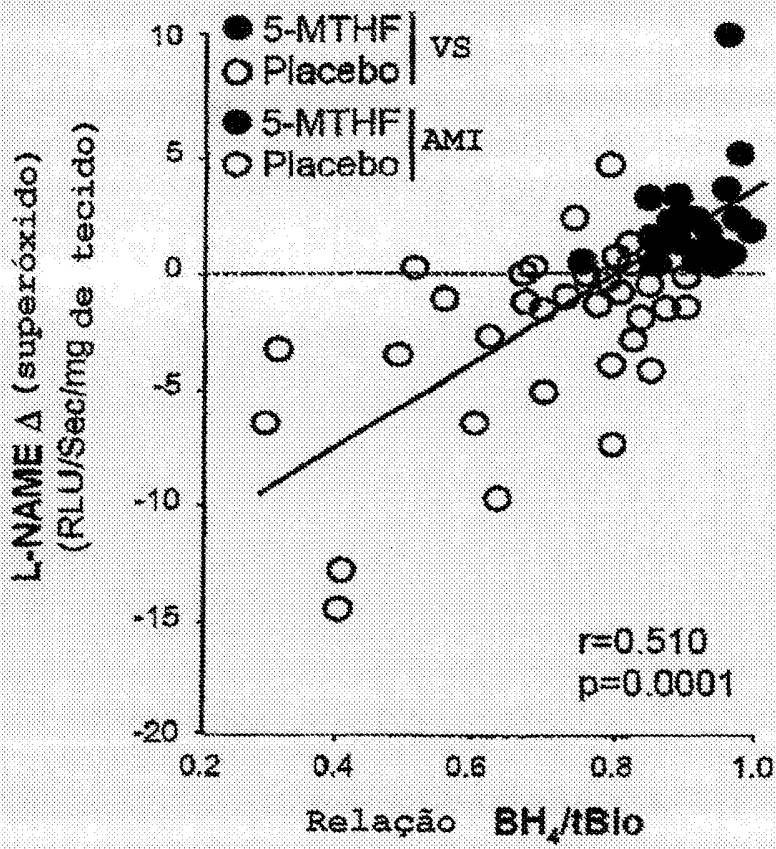


Figura 9

Visão sobre a reação de L-arginina com NO e L-citrulina catalisada por sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS)

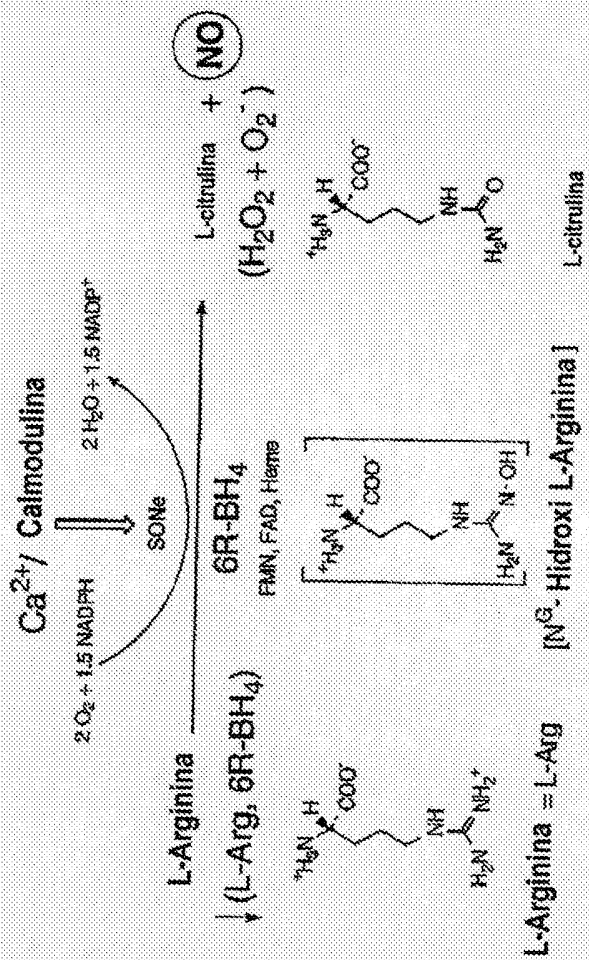


Figura 10

Produção de NO por SONE, comparação da via fisiológica (acoplamento de SONE) e via prejudicada (desacoplamento de SONE)

