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

**(11) PI 0511367-9 B1**

**(22) Data do Depósito:** 10/06/2005

**(45) Data de Concessão:** 22/05/2018

**(54) Título:** USO DE UMA COMPOSIÇÃO,COMPOSIÇÃO, USO DE VIP E/OU DE UM FRAGMENTO ATIVO DO MESMO

**(51) Int.Cl.:** A61K 38/17; A61P 9/04; A61P 9/00

**(30) Prioridade Unionista:** 11/06/2004 AU 2004903188

**(73) Titular(es):** VECTUS BIOSYSTEMS LIMITED

**(72) Inventor(es):** KAREN ANNETTE DUGGAN

"USO DE UMA COMPOSIÇÃO"

Campo da técnica

[0001] Esta invenção refere-se a composições e métodos para tratamento terapêutico e profilático de fibrose miocardial ou condições associadas.

Antecedentes

[0002] Toda discussão sobre a técnica anterior durante o relatório descritivo não deve de forma alguma ser considerada como uma admissão de que a referida técnica amplamente divulgada é de todo conhecida ou se forma a partir do conhecimento geral comum no assunto.

[0003] Na fibrose miocardial, o músculo cardíaco é substituído por um tecido fibroso ou cicatrizado. Isto pode interferir com a flexibilidade do músculo cardíaco. Isto pode conduzir a uma diminuição na função e, eventualmente, manifestar a falha cardíaca.

[0004] Na Austrália, a falha cardíaca congestiva afeta um por cento da população geral e três a cinco por cento daqueles com idade acima de 65 anos, elevando-se para 20 por cento da população com idade de 80 ou acima.

[0005] A falha cardíaca congestiva é a causa mais comum da admissão hospitalar na medicina adulta. A mortalidade anual, em pacientes admitidos, varia de 10 a 20% naqueles com sintomas médios a moderados, e de até 40 a 60% naqueles com falha cardíaca severa. O impacto destas admissões e o custo para a comunidade é tal que pelo menos dois Governadores de Estados na Austrália fundaram programas para melhorar o procedimento para a falha cardíaca. Entretanto, estes são programas para os estágios tardios que, enquanto ele pode encurtar as admissões de pacientes com doença severa

estabelecida, não se dirige aos mecanismos fundamentais. Assim, existe uma necessidade substancial em reduzir ou prevenir as admissões e, especialmente, prevenir e/ou reverter a fibrose miocardial e sua progressão, definitivamente para o estágio final.

[0006] A base patológica fundamental/subjacente da falha cardíaca congestiva é o desenvolvimento da fibrose miocardial. Este se inicia como uma fibrose perivascular e então se estende dentro do interstício, tornando-se mais generalizado, e resultando em uma disfunção diastólica e/ou eventualmente, manifestando uma falha cardíaca. Existem numerosos estudos em humanos e em animais e estes sugerem vários fatores relevantes para a fibrose miocardial, incluindo pré-disposição genética, doença cardíaca isquêmica, hipertensão, deficiência de óxido nítrico, stress oxidativo, consumo excessivo de sal e vários outros fatores.

[0007] Em um estudo do efeito de baixa, intermediária ou alta ingestão de sódio em ratos, o grau de fibrose miocardial aumentou com o consumo exagerado de sódio na alimentação. Foi descoberto que existe uma correção negativa entre a concentração de peptídeo intestinal vasoativo (VIP) no coração e o grau de fibrose miocardial (*"Experimental Physiology" (2002), 87.5, 539-546)*. Este estudo sugeriu que a diminuição na concentração de VIP miocardial pode participar de uma regra patogênica no desenvolvimento de fibrose miocardial.

[0008] O peptídeo intestinal vasoativo (VIP) foi primeiro purificado em ou em torno de metade dos anos 1970 e então sintetizado.

[0009] A patente norte-americana No. 4.939.224 discute

numerosas e variadas atividades biológicas de VIP. Isto inclui relaxamento do músculo liso, incitamento da vasodilatação, estimulação da secreção intestinal de água e eletrólitos, neuroregulação, estimulação da produção de suco pancreático e inibição da secreção de ácido gástrico. Entretanto, existem significantes efeitos colaterais deletério, incluindo hipertensão, taquicardia e ruborização.

[0010] Devido ao VIP ser conhecido por exercer a ação de vasodilatação e efeito ionotrópico positivo no coração, sua regra na isquemia miocardial foi examinada (*"19: J. Pharmacol. Exp. Ther., (1994-Fev.), 268 (2):952-8)*. O estudo foi realizado no coração isolado de rato. O estudo descobriu que uma quantidade significante de VIP foi liberada a partir do coração isquêmico aspergido. Em um próximo experimento, o coração isolado do rato foi aspergido com VIP, a isquemia foi induzida e, então, o fluxo coronário foi eliminado, seguido pela aspersão. O estudo indicou uma melhora significante da função miocardial por VIP, evidenciada pelo aumento das funções ventriculares esquerda e pelo fluxo coronário e pela redução dos danos ao tecido.

[0011] Um estudo foi conduzido em trabécula isolada a partir do átrio direito e ventrículo esquerdo de corações humanos (*"Clinical Science (2001) 101, 637-643)*. Os corações foram obtidos previamente a partir de indivíduos saudáveis que morreram devido a acidentes cérebro-vasculares ou traumatismo craniano. O estudo descobriu que VIP tem um efeito ionotrópico positivo direto tanto no átrio quanto nos ventrículos do coração humano.

[0012] No estudo relacionado acima (*"Experimental Physiology" (2002) 87.5, 529-546)*, os experimentos foram

realizados nos corações removidos dos ratos tratados com dietas de sódio. Este estudo *in vitro* descobriu que existia uma correlação significante entre a diminuição da concentração de VIP miocardial e o aumento do grau de fibrose miocardial no coração. Isto sugeriu que a depleção no coração pode participar de uma regra no desenvolvimento da fibrose.

[0013] Apesar de os resultados destes estudos *in vitro*, foi descoberto previamente que o VIP injetado não foi absorvido por um coração normal (*"Gastroenterology (1979) 771., 55-60)*. A incapacidade do coração normal em absorver o VIP injetado, indicou que o VIP não tem participação como um agente terapêutico efetivo para o tratamento ou a prevenção de fibrose miocardial.

[0014] É um objetivo da presente invenção contornar ou amenizar pelo menos uma das desvantagens da técnica anterior, ou prover uma alternativa útil.

Sumário da invenção

[0015] Consequentemente, em um primeiro aspecto, a invenção provê uma composição para o tratamento profilático ou terapêutico de fibrose miocardial ou uma condição associada, a composição incluindo uma quantidade farmaceuticamente efetiva de um ou mais peptídeos intestinais vasoativos (VIP) e fragmentos ativos dos mesmos, opcionalmente, em combinação com um veículo farmaceuticamente aceitável.

[0016] A quantidade farmaceuticamente efetiva de VIP ou de um fragmento ativo irá variar de acordo com o paciente e/ou com a severidade da doença ou da condição. Estas variáveis podem ser determinadas por um técnico no assunto, durante a rotina experimental. Uma faixa de dosagem apropriada, como um

ponto inicial, pode ser derivada a partir das dosagens administradas nos modelos animais descritos aqui e, nos níveis conseguidos no plasma. Os referidos parâmetros podem ser facilmente determinados por uma rotina de medição simples.

[0017] Os fragmentos ativos preferidos de VIP são VIP (1-12) e VIP (6-28).

[0018] As composições da invenção podem ser administradas em conjunto com um veículo farmaceuticamente aceitável, que pode ser qualquer um daqueles conhecidos na técnica ou planejados daqui em diante e adequados para o uso pretendido. Bem como os veículos, a composição farmacêutica da invenção pode incluir outros ingredientes, incluindo secantes, conservantes, tampões e antioxidantes, por exemplo. As composições da presente invenção também podem incluir outros agentes ativos úteis no tratamento de condições cardiovasculares.

[0019] A composição farmacêutica da invenção pode tomar qualquer forma apropriada, mas é, preferivelmente, adequada para a administração por injeção intravenosa, intramuscular ou subcuticular, enquanto os fragmentos ativos de VIP podem ser adequados para a administração oral. Entretanto, se, formulado apropriadamente, o VIP também pode ser administrado oralmente. Outros métodos de administração tais como, adesivos, inalação, sprays nasais e do gênero serão claros aos técnicos no assunto.

[0020] De acordo com um segundo aspecto, a invenção provê um método para tratamento terapêutico de fibrose miocardial ou uma condição associada em um indivíduo, o método incluindo a administração ao indivíduo com fibrose miocardial ou com

uma condição associada, de uma composição de acordo com a invenção.

[0021] As composições farmacêuticas da invenção podem ser usadas para prevenir ou diminuir a progressão da fibrose miocardial estabelecida, bem como reduzir o grau de fibrose estabelecida.

[0022] De acordo com um terceiro aspecto, a invenção provê um método para tratamento profilático de fibrose miocardial ou uma condição associada em um indivíduo, o método incluindo a administração ao indivíduo em risco de desenvolver fibrose miocardial ou uma condição associada, de uma composição de acordo com a invenção.

[0023] Com relação ao tratamento profilático deverá ser entendido que o referido tratamento seria benéfico particularmente aos indivíduos que estão em risco de desenvolver fibrose miocardial ou uma condição associada. Como um exemplo de indivíduos em uma categoria de risco, são citados aqueles tendo hipertensão, diabetes, miocardite, doença cardíaca isquêmica, fármacos tais como daunorubicina e outros que são utilizados na quimioterapia do câncer, pré-disposição genética, outras condições tais como Síndrome de com e Faeocromocitoma, dietas com excesso de sal e do gênero. O tratamento profilático pode ser usado para prevenir ou diminuir o desenvolvimento de fibrose no grupo de risco. Uma grande proporção de indivíduos já pode ter sinais precoces de falha cardíaca em um ecocardiograma. Por exemplo, os referidos sinais estão presentes em aproximadamente 80% dos pacientes com hipertensão. A incidência em diabetes é muito maior.

[0024] De acordo com um quarto aspecto, a invenção provê

um método para tratamento profilático ou terapêutico de falha cardíaca congestiva, em um indivíduo, o método incluindo a administração ao indivíduo em risco de desenvolver uma falha cardíaca congestiva, de uma composição farmacêutica de acordo com a invenção.

[0025] De acordo com um quinto aspecto, a invenção provê um método para reduzir os níveis, inibir ou reduzir a produção, de mediadores pró-fibróticos em um indivíduo, o método incluindo a administração ao indivíduo de uma composição definida de acordo com a invenção.

[0026] De acordo com um sexto aspecto, a invenção provê um método para elevar o conteúdo de VIP do músculo cardíaco, em um indivíduo com fibrose miocardial ou uma condição relacionada, ou um indivíduo com risco de desenvolver fibrose miocardial ou uma condição associada, incluindo a administração ao indivíduo de uma composição definida de acordo com a invenção.

[0027] De acordo com um sétimo aspecto, a invenção provê um método para reduzir a formação de colágeno ou aumentar a degradação de colágeno no músculo cardíaco de um indivíduo, o método incluindo a administração ao indivíduo de uma composição definida de acordo com a invenção.

[0028] Será aparente a um técnico no assunto que o padrão de utilização das composições farmacêuticas da invenção pode requerer ser alterado para um efeito otimizado. Pode ser necessário levar em consideração a natureza da doença ou da condição, bem como sua severidade.

[0029] As condições associadas, que podem ser submetidas à prevenção ou ao tratamento através das composições farmacêuticas da presente invenção, podem incluir,

hipertrofia ventricular esquerda, disfunção diastólica, miocardite, cardiomiopatia, disfunção ventricular esquerda e falha cardíaca congestiva (para a qual a fibrose miocardial pode ser uma patologia fundamental/subjacente). A condição associada também pode incluir as condições que conduzem ao aumento da produção de mediadores pró-fibróticos ou das condições que predispõem um indivíduo à fibrose miocardial, tais como, por exemplo, hipertensão e/ou dietas com alto consumo de sal, doenças tais como, diabetes e do gênero.

[0030] Um aspecto adicional da invenção inclui o uso das composições da presente invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento profilático ou terapêutico de fibrose miocardial, ou uma condição associada.

[0031] Em ainda um outro aspecto adicional da invenção é provido o uso das composições da presente invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento profilático ou terapêutico da falha cardíaca congestiva.

Breve descrição dos desenhos

[0032] A figura 1 representa os níveis de fibrose miocardial em um número de modelos de fibrose miocardial (painel da esquerda). O painel da direita mostra a diferença entre as concentrações médias de VIP miocardial nos quatro modelos após uma hora da infusão de VIP ou do veículo. A diferença entre a concentração média de VIP miocardial após a infusão de VIP ou do veículo representa a medida de absorção de VIP pelo miocárdio. Enquanto a fibrose agrava, a quantidade de VIP absorvida pelo coração aumenta.

[0033] A figura 2 representa o índice de fibrose miocardial em ratos WKY após 4 semanas com uma dieta com altas doses de sal e infusão de VIP ou do veículo controle.

[0034] A figura 3 representa o índice de fibrose miocardial em ratos WKY com uma dieta com altas doses de sal mais L-NAME (10 mg/kg/dia) durante 4 semanas recebendo a infusão de VIP ou de veículo controle.

[0035] A figura 4 representa a fibrose miocardial em ratos com idade de 14 semanas (tempo zero), tratados com uma dieta com altas doses de sal durante 4 semanas, e recebendo a infusão de VIP ou de veículo controle (5 pmol/kg/minuto) durante 4 semanas.

[0036] A figura 5 representa a fibrose miocardial em ratos com 14 semanas de idade (tempo zero), tratados com uma dieta com altas doses de sal mais L-NAME (10 mg/kg) na água de beber por 4 semanas, e recebendo a infusão de veículo ou a infusão de VIP (5 pmol/kg/minuto) durante 4 semanas.

[0037] A figura 6 representa a fibrose miocardial em ratos WKY, tratados com estreptozotocina (60 mg/kg) em 14 semanas. Após 8 semanas, uma infusão de VIP diabetes foi iniciada em alguns ratos e continuada durante 4 semanas. Todos os ratos foram sacrificados com 26 semanas de idade.

[0038] A figura 7A ilustra as concentrações de VIP miocardial em ratos WKY alimentados com altas doses de sal após uma infusão intravenosa por quatro semanas de VIP ou do veículo controle.

[0039] A figura 7B ilustra as concentrações de VIP miocardial em ratos WKY alimentados com altas doses de sal e L-NAME (10 mg/kg) na água de beber após uma infusão intravenosa por quatro semanas de VIP ou do veículo controle.

[0040] A figura 8 representa a comparação entre os efeitos do tratamento com o peptídeo VIP (1-12) e com a molécula completa de VIP na fibrose miocardial. Ambos os peptídeos

foram administrados em uma dose de 5 pmol/kg/minutos durante 4 semanas, intravenosamente.

[0041] A figura 9 representa a comparação entre os efeitos do tratamento com o peptídeo VIP (6-28) e com a molécula completa de VIP na fibrose miocardial. Ambos os peptídeos foram administrados em uma dose de 5 pmol/kg/minutos durante 4 semanas, intravenosamente.

[0042] A figura 10 representa a comparação entre os efeitos do tratamento com o peptídeo VIP (1-12), VIP (6-28) e com a molécula completa de VIP na fibrose miocardial. Todos os peptídeos foram administrados em dosagens de 5 pmol/kg/minutos durante 4 semanas, intravenosamente.

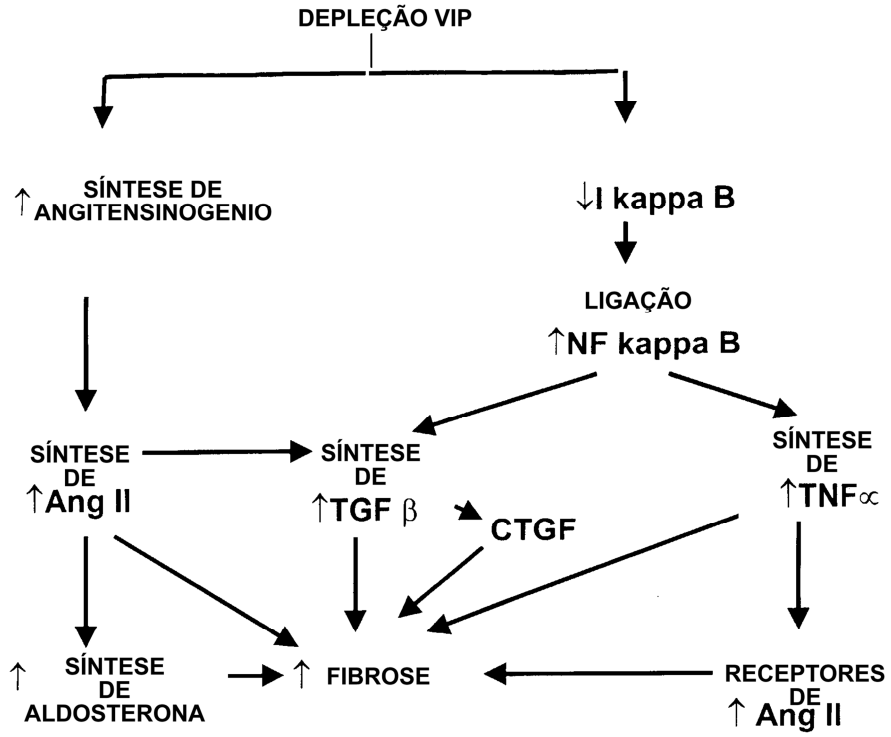
Descrição da concretização preferida

[0043] Foi descoberto agora, absolutamente surpreendente em vista das indicações negativas, que o VIP é útil e importante como um agente terapêutico para reverter ou retardar o quadro de fibrose miocardial, ou prevenir o quando de fibrose miocardial em indivíduos com risco de desenvolver a fibrose miocardial. Assim, o VIP também é útil no tratamento da falha cardíaca congestiva.

[0044] O uso de composições farmacêuticas da invenção no tratamento da fibrose miocardial ou condições associadas representam uma nova classe de agente terapêutico para estas condições. Existindo tratamentos para a fibrose miocardial ou condições associadas usualmente uma em alvo, ou no máximo duas, reconhecem-se os mecanismos causadores da fibrose miocardial. Sem desejar estar ligado por qualquer mecanismo particular de ação, acredita-se que as preparações farmacêuticas da invenção podem ser alvos virtuais de todos os promotores atualmente conhecidos da fibrose miocardial.

Além disso, o VIP no coração em concentrações normais pode agir para inibir a produção de mediadores pró-fibróticos. Em adição a regra de participação do VI na homeostase de sódio e neurotransmissão, o VIP parece ser também o maior modulador do sistema imune, agindo para diminuir-regulação de muitas das citocinas inflamatórias autoimunes envolvidas nos danos dos tecidos. Um grande número de citocinas, incluindo, mas não se limitando a, $IL_2$, $IL_{12}$, IFN-$\gamma$, TNF-$\alpha$ e TGF-$\beta$, que são conhecidas por causar fibrose em ambos os miocárdios e outros tecidos, são pouco-reguladas por VIP. O VIP também pouco reduz a expressão de NF Kappa B, a translocação e a ligação através da estabilização de I Kappa B. Além disso, o VIP pouco-regula a síntese de um outro mediador fibrótico, angiotensina II (Ang II) através da baixa redução da síntese de angiotensinogeno.

[0045] Com base no presente estudo, e não desejando estar ligado à teoria, é postulado que o VIP age como o maior regulador para prevenir o desenvolvimento de fibrose e que a depleção de VIP pode desencadear a síntese de um grande número de mediadores pró-fibróticos, causando, desse modo, danos miocardiais. O esquema a seguir representa as interações hipotéticas entre VIP e os mediadores pró-fibróticos.




[0046] No coração normal o VIP não é absorvido pelo miocárdio. Entretanto, em estudos de infusão aguda, os presentes inventores descobriram que a absorção de VIP pelo miocárdio é mais ávida com um aumento no grau de fibrose sugerindo o potencial para VIP como um agente reparador.

[0047] O presente estudo demonstrou que determinados fragmentos de VIP têm atividades biológicas similares àquelas da molécula VIP completa e, podem ser mais apropriados para as formulações farmacêuticas devido ao seu pequeno tamanho, melhor estabilidade e fácil fabricação. Particularmente útil, são os fragmentos VIP (1-12) e os VIP (6-28). Deverá ser entendido que a presente invenção também abrange, em seu escopo, determinados análogos de VIP que estão baseados na substituição conservativa de um ou mais aminoácidos de VIP, pelos aminoácidos que não alteram a atividade biológica de VIP. As referidas substituições serão bem conhecidas dos técnicos no assunto e não requerem mais do que uma simples

tentativa sem erros, usando técnicas bem estabelecidas. Ademais, o termo "VIP" como usado no contexto da presente invenção pretende abranger os referidos análogos.

[0048] A presente invenção também contempla as composições farmacêuticas que incluem o VIP e/ou seus fragmentos ativos. As referidas composições podem incluir qualquer tipo de forma de dosagem tais como, tabletes, cápsulas, pós, formulações líquidas, de distribuição sustentada ou liberada, adesivos, inalação, sprays nasais e do gênero. As formulações podem, adicionalmente, incluir ingredientes tais como, secantes, conservantes, tampões e antioxidantes, por exemplo. A forma física e o conteúdo das formulações farmacêuticas contemplados são preparações convencionais que podem ser formuladas pelos técnicos na arte de formulações farmacêuticas e estão baseadas em princípios bem estabelecidos e nas composições descritas em, por exemplo, "*Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, 1995; British Pharmacopeia 2000*" e em textos e manuais de formulações similares. As composições da presente invenção também podem incluir outros agentes ativos úteis no tratamento de condições cardiovasculares.

[0049] A rota e a frequência de administração das composições da presente invenção dependerão do tratamento requerido e da natureza da molécula a ser administrada. Assim, as formulações podem ser preparadas adequadamente para administração por injeção intravenosa, intramuscular ou subcuticular. O VIP e os fragmentos de VIP também podem ser adequados para administração mucosal tal como administrações orais, sublinguais, nasais e do gênero. Estes parâmetros são facilmente estabelecidos por um técnico no assunto.

[0050] As composições farmacêuticas da invenção demonstraram ser efetivas na prevenção ou diminuição da progressão da fibrose miocardial estabelecida, bem como na redução do grau (reversão) da fibrose estabelecida e, assim, importantes para as aplicações terapêuticas. As composições da presente invenção também são formas úteis de tratamento profilático ou terapêutico da falha cardíaca congestiva. Estas são importantes descobertas com relação à classe e a severidade das condições que podem ser tratadas com as composições da presente invenção.

[0051] Além disso, as composições da presente invenção também podem ser utilizadas profilaticamente em indivíduos com risco de desenvolver fibrose miocardial ou uma condição associada. Como um exemplo de indivíduos na categoria de risco são aqueles tendo hipertensão, diabetes, miocardites, doença cardíaca isquêmica, fármacos tais como daunorubicina e outros que são utilizados na quimioterapia do câncer, pré-disposição genética, outras condições, tais como, Síndrome de Conn e Faeocromocitoma, dietas com alto consumo de sal e do gênero. O termo "profilático" como usado no contexto da presente invenção pretende *inter alia* abranger tratamentos usados para prevenir ou diminuir o desenvolvimento de fibrose no grupo de risco. Altas proporções de indivíduos que podem receber o tratamento profilático também já apresentam sinais de falha cardíaca precoce no ecocardiograma.

[0052] O termo "condição associada" como utilizado no contexto da presente invenção e em referência à fibrose miocardial pretende abranger, sem limitação, hipertrofia ventricular esquerda, disfunção diastólica, miocardites, cardiomiopatia, disfunção ventricular esquerda e falha

cardíaca congestiva (para a qual a fibrose miocardial pode ser uma patologia fundamental/subsequente). A condição associada também pode incluir condições que conduzem ao aumento da produção de mediadores pró-fibróticos ou das condições que predispõem um indivíduo à fibrose miocardial, tais como, por exemplo, hipertensão e/ou dietas com alto consumo de sal, doenças tais como, diabetes e do gênero.

[0053] Através da elevação do conteúdo de VIP do músculo cardíaco em um indivíduo com, ou em risco de desenvolver, fibrose miocardial ou condição associada, através do uso das composições da presente invenção significativos benefícios terapêuticos podem ser conseguidos, incluindo redução da fibrose, redução no nível, produção ou atividade de mediadores pró-fibróticos, redução no progresso da fibrose, redução na formação de colágeno ou aumento da degradação de colágeno no músculo cardíaco.

[0054] A invenção será agora descrita, mais particularmente, com referência aos exemplos não-limitativos.

Experimental

Exemplo 1 - Estudos Preliminares:

[0055] Nos estudos preliminares uma série de experimentos de infusão aguda foi conduzida em modelos animais. Estes demonstraram um elevado nível de fibrose, maiores absorções de VIP pelo coração a partir do plasma dos animais tratados.

[0056] Experimentos preliminares adicionais foram realizados em um grande número de modelos animais, os quais abrangem uma classe de reposição de tecido fibroso, variando de médio a moderado para grave. Os experimentos nos modelos animais abrangerem uma variedade de etiologias (sozinhas e em combinação) e uma série de níveis de fibrose induzida. Para

estes experimentos dois tipos de ratos foram utilizados, ratos hipertensivos espontâneos (SHR) e ratos Wistar-Kyoto normotensivos controle (WKY). Os ratos WKY foram tratados:

1) dieta baixa em sal;

2) dieta com altas doses de sal; ou

3) L-NAME (ω-monometil-nitro-L-arginina; 10 mg/kg/dia) mais a dieta com altas doses de sal.

[0057] Os ratos SHR foram tratados com dietas com doses baixas ou altas de sal. O efeito da infusão de VIP na doença cardíaca diabética também foi estudado nos ratos WKY com diabetes induzido por estreptozotocina.

[0058] Em cada grupo de tratamento, os ratos foram randomizados para VI ou para a infusão de veículo (n=24 em cada grupo) durante quatro semanas. O VIP foi administrado via mini-bomba Alzet em uma proporção de 7.2 nmol/kg/dia.

[0059] Após as quatro semanas, os ratos foram anestesiados e os corações foram colhidos. As concentrações de VIP miocardial e a fibrose miocardial foram quantificadas. Uma melhora significativa foi descoberta nos corações dos ratos tratados, com o que o índice de fibrose miocardial foi significativamente menor nos ratos tratados comparado com os grupos controle.

Exemplo 2 - Efeito da Infusão de VIP nas Concentrações de VIP miocardial:

[0060] Ratos WKY de 14 semanas de idade foram randomizados em uma dieta com baixa ingestão de sal (0.008%), uma dieta com ingestão intermediária de sal (2.2%), uma dieta com alta ingestão de sal (4.4%) ou uma dieta com alta ingestão de sal mais L-NAME (10mg/kg/dia) em água de beber durante 4 semanas (n=16 ratos por grupo). Um dos dias do experimento os ratos

foram anestesiados e inseridos com uma cânula venosa e arterial. Após uma hora no período de equilíbrio restante os ratos foram randomizados com o veículo controle (Haemaccell, Aventis) ou infusão de VIP (10 pmol/kg/minuntos) por uma hora em uma proporção de infusão de 0.0017 ml/min. Os corações foram então colhidos, as concentrações de VIP miocardial foram medias e a fibrose miocardial quantificada.

[0061] A diferença entre as concentrações médias de VIP miocardial após a infusão de VIP ou de controle foi uma medida do VIP absorvido pelo coração. Esta diferença foi verificada por aumentar com o grau de fibrose aumentada (ver Figura 1).

Exemplo 3 – Efeito da infusão de VIP na fibrose em modelos animais de fibrose:

[0062] Três modelos animais de fibrose miocardial foram utilizados (animais obtidos da "Australian Animal Resoruces, Perth, Western Australia, Australia").

i) ratos WKY alimentados com uma dieta com alta ingestão de sal;

ii) ratos WKY alimentados com uma dieta com alta ingestão de sal e com L-NAME (ω-monometil-nitro-L-arginina, Sigma Chemical Co.), 10 mg/kg/dia na água de beber; e

iii) ratos WKY com diabetes induzido por injeção de estreptozotocina, 60 mg/kg.

[0063] E cada modelo os ratos foram randomizados para VIP (H-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-$NH_2$, obtido de Auspep, Australia) ou infusão de veículo controle (Haemaccel, Aventis) durante 4 semanas via mini bomba Alzet (n=6-8 cada grupo experimental). A dose de VIP foi de 5

pmol/kg/min.

[0064] Nos modelos (i) e (ii) ratos WKY de 14 semanas foram alimentados com uma dieta com altas doses de sal ou altas doses de sal mais L-NAME. Eles padeceram de inserção operativa de uma mini-bomba Alzet para infusão de VIP ou de veículo. Após as 4 semanas os ratos foram anestesiados e os corações colhidos. O VIP miocardial e a fibrose miocardial foram quantificados.

[0065] No modelo (iii) os ratos foram injetados com estreptozotocina 60 mg/kg em ratos com 14 semanas de idade. Após 8 semanas os ratos diabéticos foram randomizados para a infusão de VIP (5 pmol/kg/minuto) ou sem tratamento. O VIP foi administrado como acima. Após um adicional de 4 semanas, os ratos foram anestesiados e os corações colhidos como acima.

[0066] As concentrações de VIP miocardial e fibrose miocardial foram quantificadas.

[0067] O VIP foi medido através de radio-imunoensaio de maneira conhecida (ver Davis. R.E.; Shelley, S.; Macdonald, G.J. & Duggan, K.A. (1992) "The effects of a high sodium diet on the metabolism and secretion of vasoactive intestinal peptide in the rabbit", *J. Physiol., 451:17-23. Duggan K.A.; Ye V.Z.C.; Jones, D.M., Davis R.E. & Macdonald, G.J., (1995) "Effects of Endopeptidase", 24.11 - Blockade on plasma and tissue concetrations of vasoactive intestinal peptide" - Clin. Sci., 89:267-271)).* O grau de fibrose miocardial foi quantificado por dois métodos de maneira conhecida (refere-se a Ye VZC, Hodge G., Yong JLC & Duggan KA (2002). A fibrose miocardial precoce está associada com a depleção do peptídeo intestinal vasoativo no coração, "Exp. Physiol. 87:539-546,

Ye VZC, Hodge G., Yong JLC & Duggan KA (2003). O VIP miocardial e a fibrose miocardial induzidos pela inibição da síntese do óxido nítrico em ratos – "*Acta Physiol. Scand., 179:353-360"*, Ye VZC, Hodge G., Yong JLC & Duggan KA (2004) "*Vasopeptidase inhibition reverses myocardial VIP depletion and decreases myocardial fibrosis in salt sensitive hypertension", – Europ. J. Pharmacol., 485:235-242).*

[0068] Uma melhora significante foi descoberta nos corações dos ratos tratados em que o índice de fibrose miocardial foi significativamente menor nos ratos tratados comparado com os grupos controles (Figuras 2 e 3).

Exemplo 4 – Efeito do tratamento com VIP no conteúdo de VIP miocardial e da regressão da fibrose em modelos animais de fibrose:

[0069] Para determinar se a infusão de VIP causou regressão na existência de fibrose bem como preveniu a progressão da fibrose nos dois grupos de estudo foi verificado:

(i) o grau de fibrose miocardial em ratos WKY com 14 semanas de vida foi comparado com o grau de fibrose em ratos WKY com 18 semanas de idade após 4 semanas de tratamento com uma alta dose de sal na dieta ou uma dieta com altas doses de sal mais L-NAME (10 mg/kg/dia) e também com infusão de VIP (5 pmol/kg/min) ou infusão controle (ver figuras 4 e 5);

(ii) ratos WKY controle não-diabéticos foram sacrificados com 26 semanas de idade e o grau de fibrose miocardial foi comparado com àquele dos ratos WKY que tiveram diabetes induzida pela injeção de estreptozotocina (60 mg/kg) com 14 semanas. Após 8 semanas de diabetes os ratos foram randomizados com a infusão VIP ( 5 pmol/kg/min) via uma mini-

bomba Alzet ou sem tratamento para um adicional de 4 semanas. (ver Figura 6).

[0070] Os resultados são demonstrados nas figuras 4 a 6. Os dados mostram claramente a regressão da fibrose miocardial nos três modelos seguidos pela infusão de VIP. O modelo de rato diabético demonstrou a mesma ação de VIP em um modelo que não está relacionado à ingestão de sal ou com a pressão alta no sangue. A regressão da fibrose pode ser devida tanto à redução na formação de colágeno ou aumentar a sua degradação. Apesar de não desejar estar vinculada a qualquer mecanismo particular de ação, a regressão da fibrose miocardial é provavelmente devida a ação das colagenases, que participam de uma parte da reabsorção de colágeno.

[0071] A medida do conteúdo miocardial de VIP nos modelos animais acima demonstra a clara associação entre o grau de fibrose e a absorção do VIP exógeno (ver as figuras 7A e 7B).

Exemplo 5 – Efeito dos fragmentos VIP na fibrose miocardial:

[0072] Para determinar o menor VIP relacionado ao peptídeo que tivera qualquer atividade biológica da molécula VIP completa, particularmente na regulação da fibrose miocardial, o grau de fibrose miocardial após o tratamento com VIP (1–12) em 5 pmol/kg/minuto e VIP (6–28) em 5 mol/kg/minuto durante 4 semanas via mini–bomba Alzet foi comparado com o VIP completo ( 5pmol/kg/min) e veículo controle. Os fragmentos de VIP foram obtidos da Auspep (Melbourne, Austrália).

[0073] Resumidamente, os ratos WKY de 14 semanas de idade foram alimentados com uma dieta com altas doses de sal como descrito anteriormente. Eles foram submetidos à inserção operativa de uma mini–bomba Alzet para infusão do peptídeo VIP ou do veículo. Após 4 semanas os ratos forma

anestesiados, os corações colhidos e a fibrose miocardial quantificada nas seções “Masson Trichrome” usando a versão 5 de “Imagem Pro Plus” (Cybernetics). Ambos os VIP (1–12) e VIP (6–28) diminuíram o grau de fibrose miocardial comparado com o veículo controle. O VIP (1–12) foi aproximadamente 1/3 tão efetivo quanto o VIP, enquanto o VIP (6–28) foi tão efetivo quanto VIP. As figuras 8 a 10 mostram os resultados destes estudos.

[0074] A importância da presente invenção para o cuidado com a saúde será imediatamente evidente aos técnicos no assunto, após a leitura desta descrição. Apesar da capacidade em tratar a falha cardíaca ter melhorado significativamente com o advento da angiotensina convertendo os inibidores da enzima (ACE) e dos bloqueadores dos receptores de angiotensina, bem como a realização dos antagonistas aldosterona e dos bloqueadores beta melhoram consequentemente em um estágio posterior da doença, a adição da preparação farmacêutica da invenção, que age para prevenir a progressão da lesão fundamental/subsequente (fibrose), ou mesmo a fibrose reversa, tem a capacidade de prevenir a escala da doença de média à severa e, assim, para reduzir substancialmente a aflição com os cuidados da saúde.

[0075] Deve ser apreciado que outras concretizações estão disponíveis para a composição, método e uso da invenção e que estas estão dentro do escopo de proteção da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma composição, caracterizado pelo fato de compreender um ou mais peptídeos intestinais vasoativos (VIP) (SEQ ID NO:1) e fragmento(s) ativo(s) dos mesmos, opcionalmente, em combinação com um veículo farmaceuticamente aceitável, na fabricação de um medicamento para tratamento terapêutico ou tratamento profilático de fibrose miocardial ou uma condição associada em um indivíduo, sendo que o fragmento ativo é VIP (1-12) (SEQ ID NO:2) e/ou VIP (6-28) (SEQ ID NO:3), e onde a condição associada é selecionada do grupo consistindo de hipertrofia ventricular esquerda, disfunção diastólica, miocardite, cardiomiopatia, disfunção ventricular esquerda e falha cardíaca congestiva.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o medicamento ser administrado através de uma rota selecionada a partir do grupo consistindo de administração intravenosa, intramuscular, subcuticular e oral.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o indivíduo em risco de desenvolver fibrose miocardial ou uma condição associada é um indivíduo que tem hipertensão, diabetes, miocardites, doença cardíaca isquêmica, pré-disposição genética, Síndrome de Conn, Faeocromocitoma ou uma dieta com excesso de sal, ou está sendo tratado com fármacos que são utilizados na quimioterapia do câncer.

4. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizado pelo fato de o tratamento profilático prevenir o desenvolvimento de fibrose.

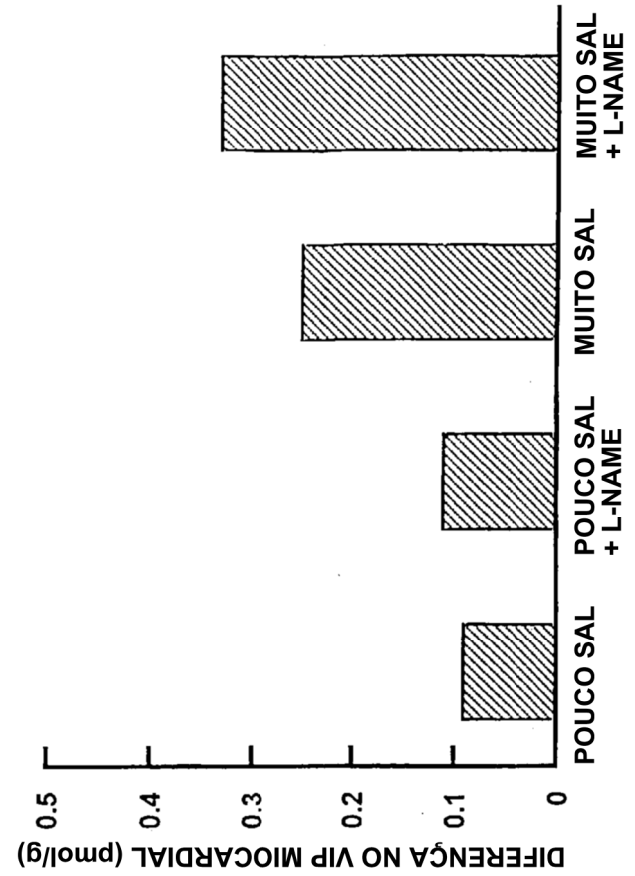
5. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizado pelo fato de o tratamento profilático

diminuir a progressão da fibrose.

6. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizado pelo fato de o medicamento elevar o conteúdo de VIP no músculo cardíaco em um indivíduo.

7. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, caracterizado pelo fato de o medicamento reduzir a formação do colágeno ou melhorar a degradação do colágeno no músculo cardíaco de um indivíduo.

8. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizado pelo fato de o medicamento ser administrado em conjunto com pelo menos um outro agente terapêutico para o tratamento profilático ou terapêutico da fibrose miocardial.


DIFERENÇA NO VIP MIOCARDIAL (pmol/g)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
POUCO SAL
POUCO SAL + L-NAME
MUITO SAL
MUITO SAL + L-NAME

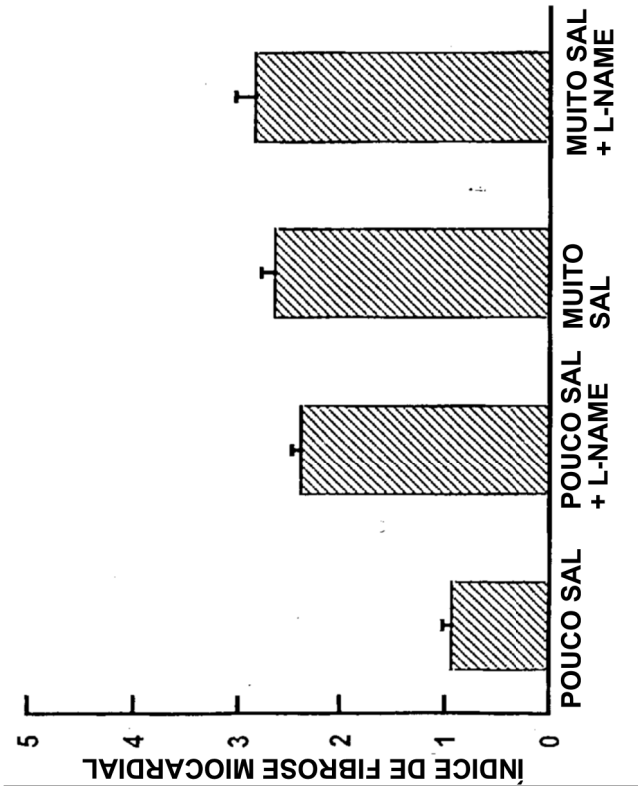

ÍNDICE DE FIBROSE MIOCARDIAL
5
4
3
2
1
0
POUCO SAL
POUCO SAL + L-NAME
MUITO SAL
MUITO SAL + L-NAME

FIG.1

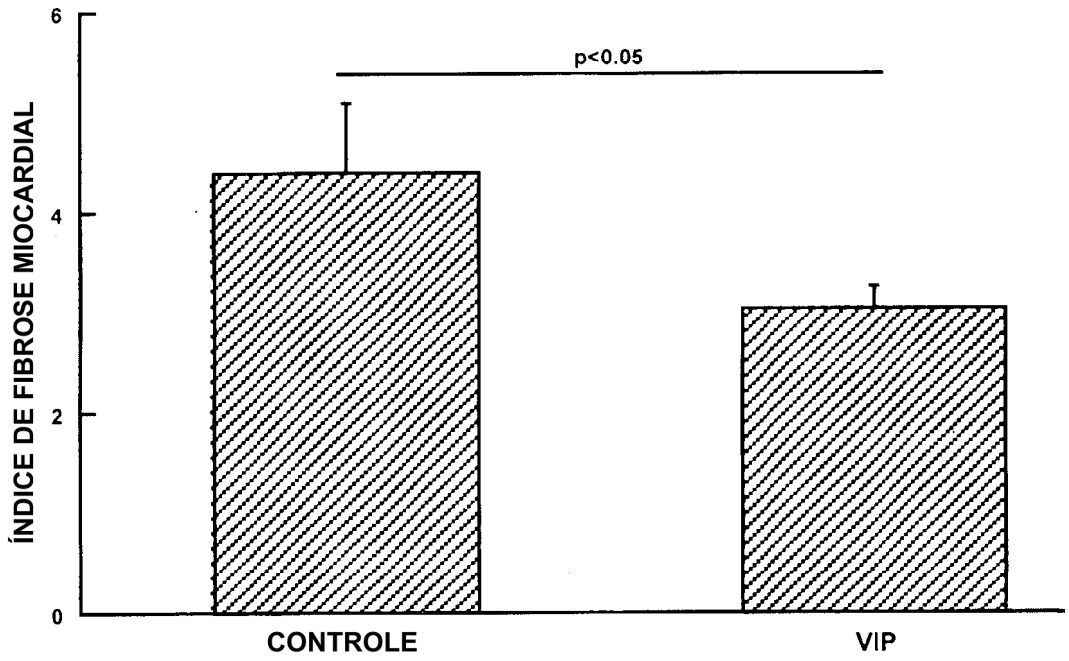



FIG.2

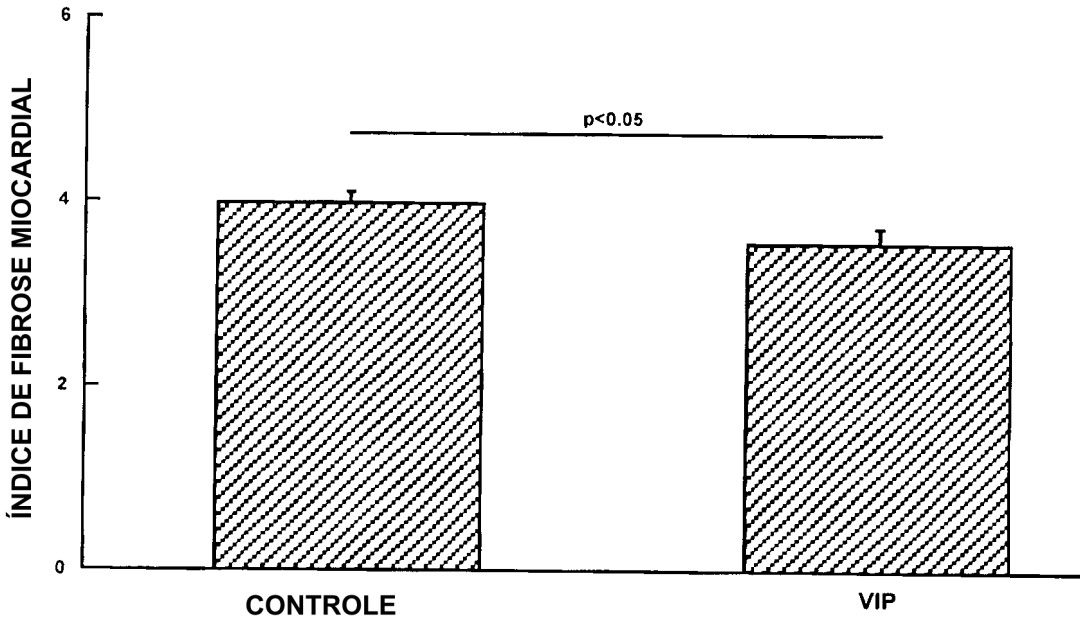
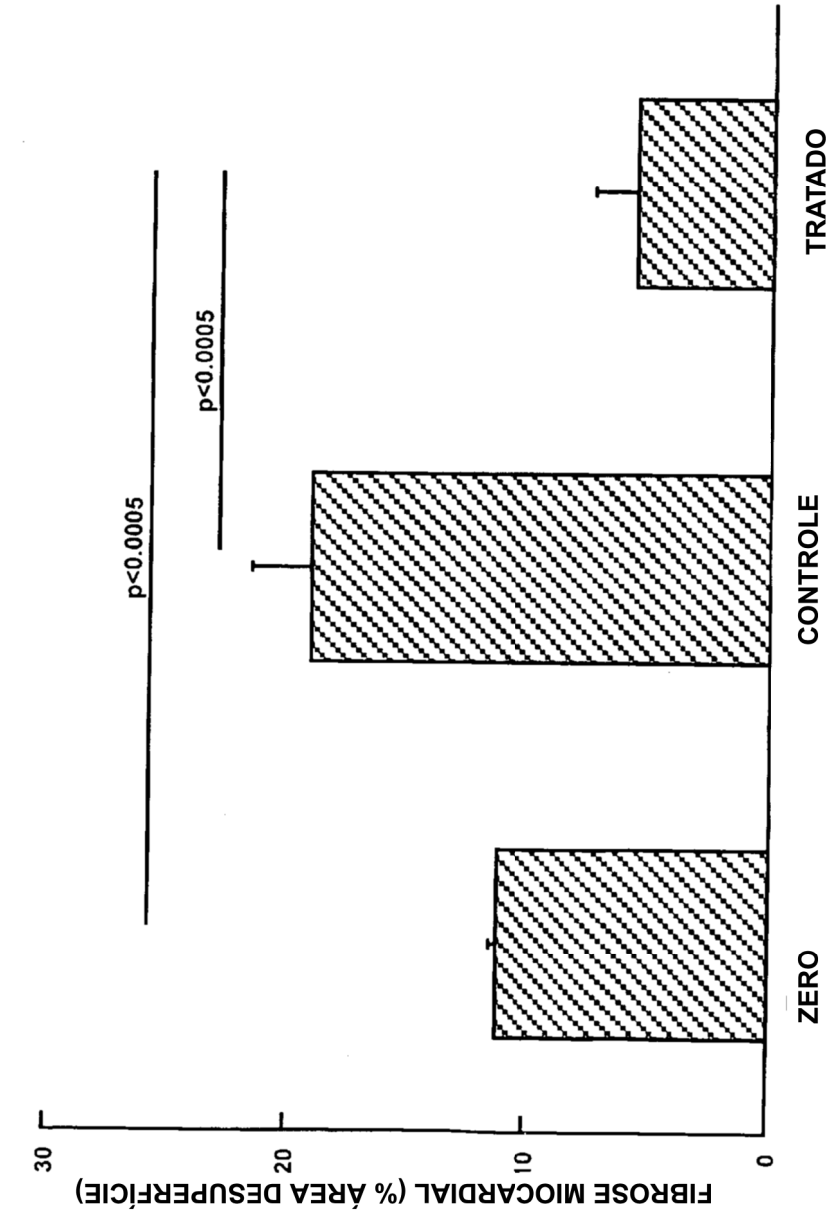



FIG.3

FIG.4


FIBROSE MIOCÁRDIAL (% ÁREA DESUPERFÍCIE)
30
20
10
0
ZERO
CONTROLE
TRATADO
p<0.0005
p<0.0005

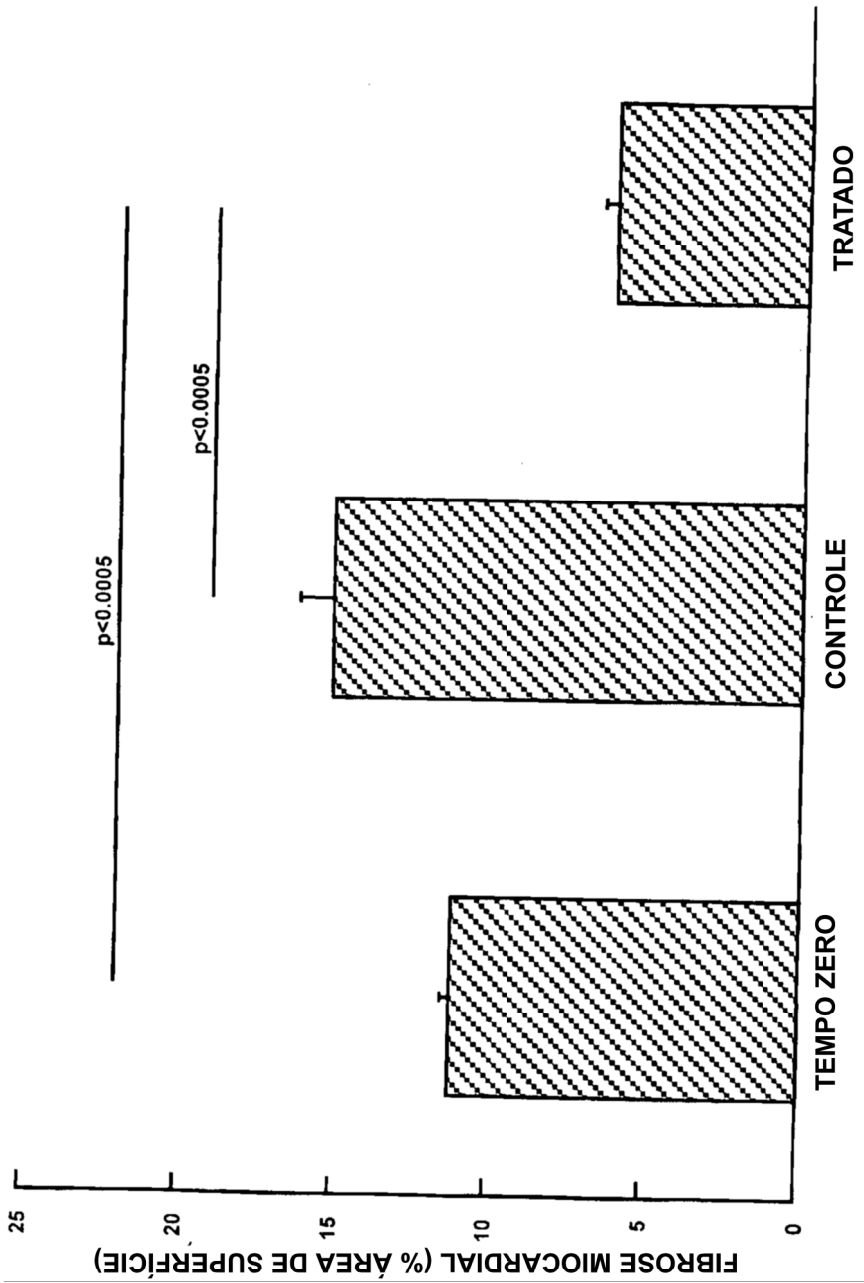

FIBROSE MIOCARDIAL (% ÁREA DE SUPERFÍCIE)
25
20
15
10
5
0
TEMPO ZERO
CONTROLE
TRATADO
p<0.0005
p<0.0005

FIG.5

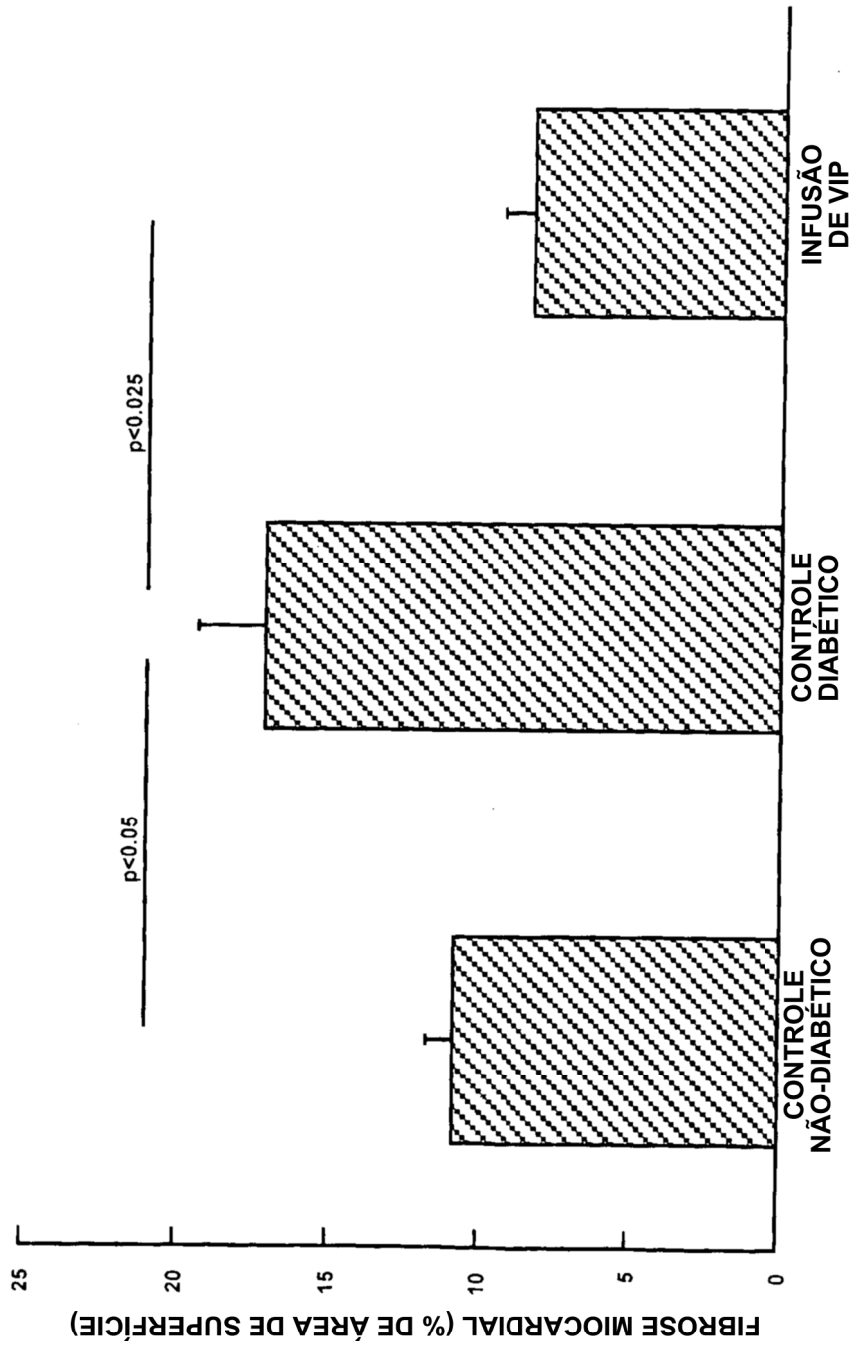

FIBROSE MIOCARDIAL (% DE ÁREA DE SUPERFÍCIE)
0
5
10
15
20
25
p<0.05
p<0.025
CONTROLE NÃO-DIABÉTICO
CONTROLE DIABÉTICO
INFUSÃO DE VIP

FIG.6

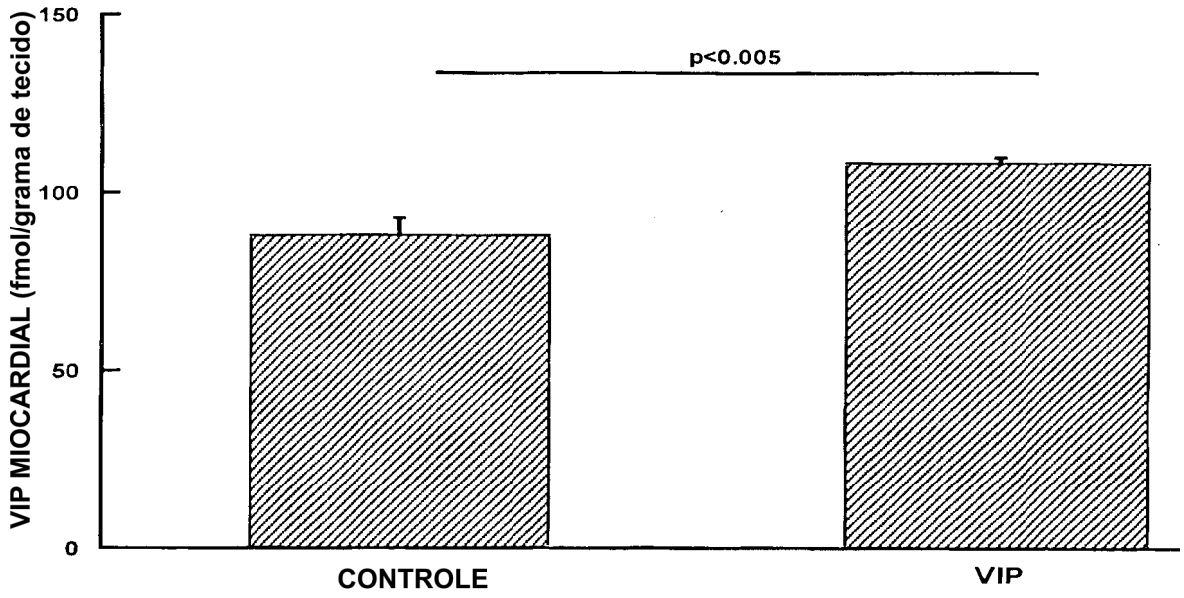

VIP MIOCARDIAL (fmol/grama de tecido)
150
100
50
0
p<0.005
CONTROLE
VIP

FIG.7A

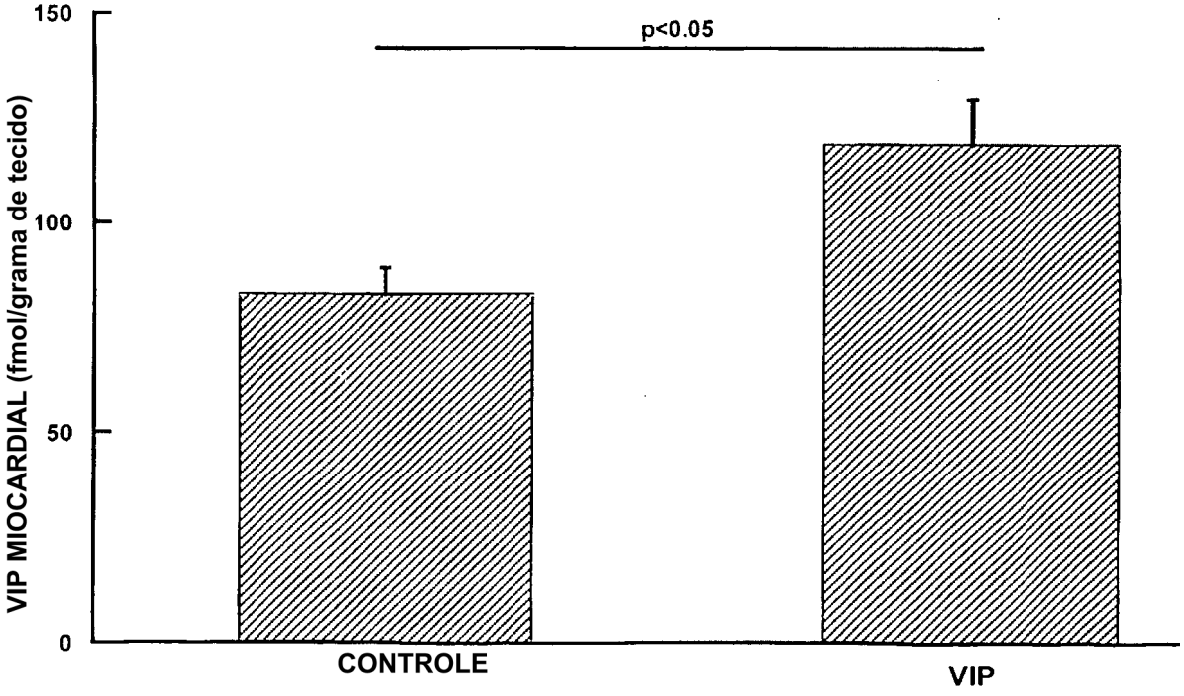

VIP MIOCARDIAL (fmol/grama de tecido)
150
100
50
0
p<0.05
CONTROLE
VIP

FIG.7B

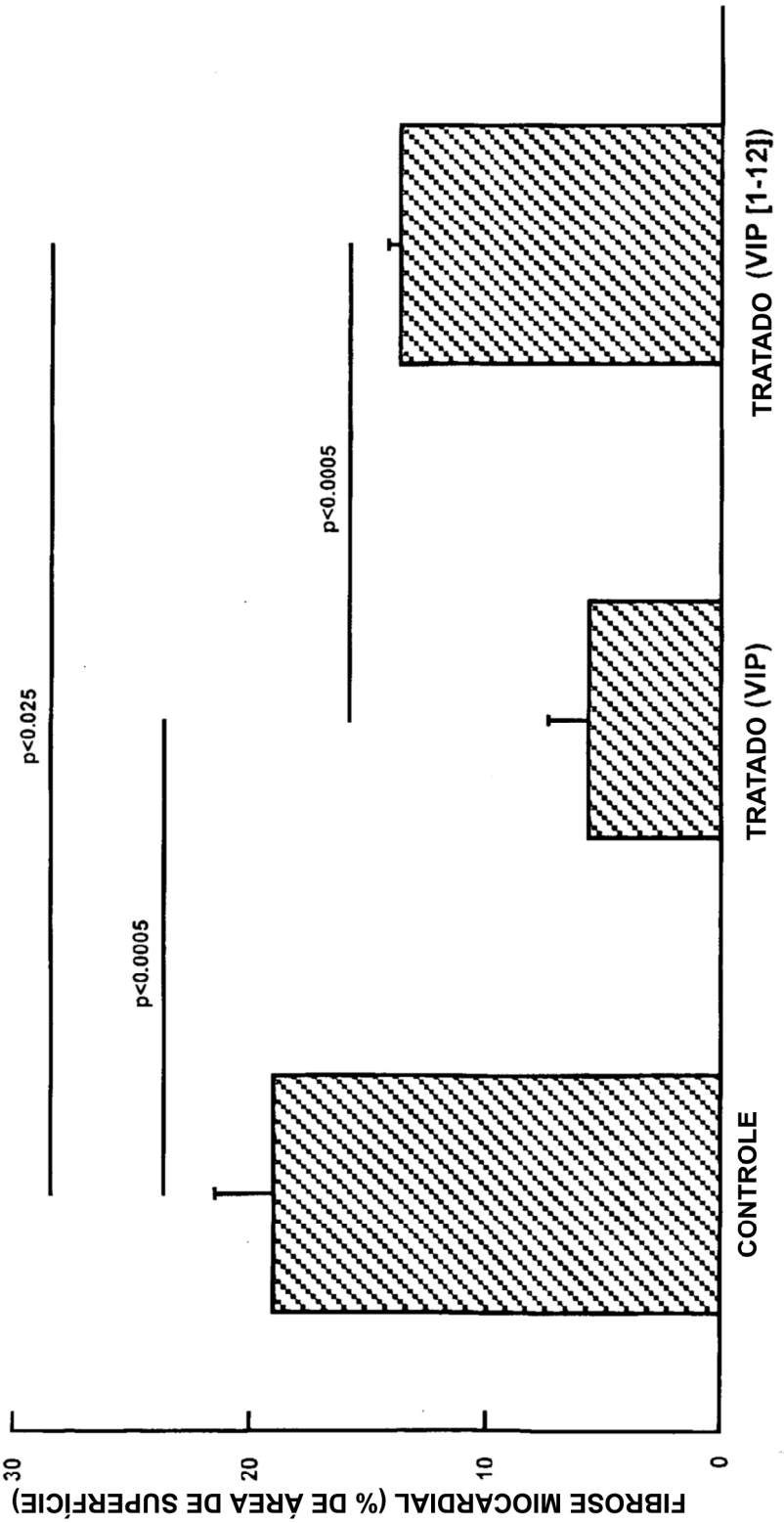

FIBROSE MIOCARDIAL (% DE ÁREA DE SUPERFÍCIE)
0
10
20
30
CONTROLE
TRATADO (VIP)
TRATADO (VIP [1-12])
p<0.0005
p<0.0005
p<0.025

FIG.8

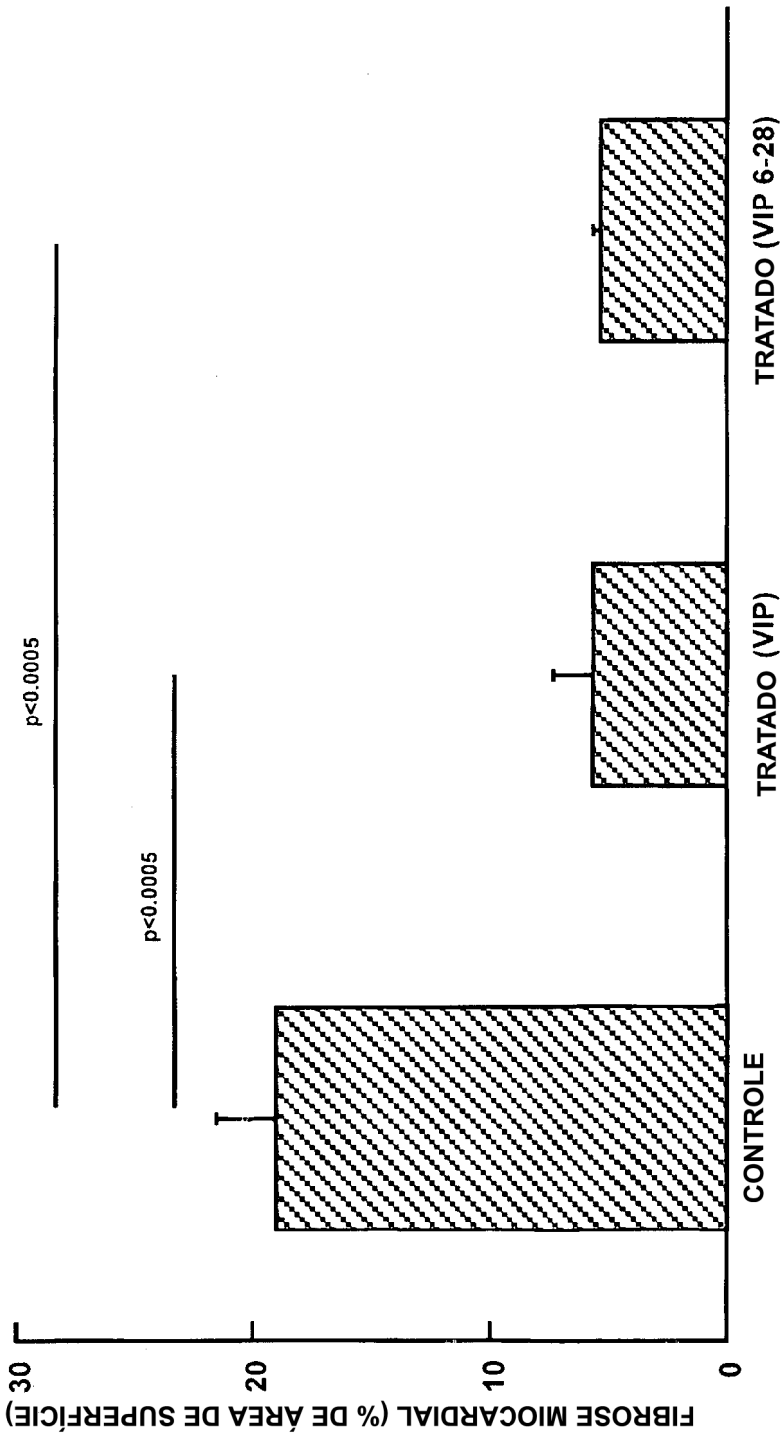

FIBROSE MIOCARDIAL (% DE ÁREA DE SUPERFÍCIE)
0
10
20
30
p<0.0005
p<0.0005
CONTROLE
TRATADO (VIP)
TRATADO (VIP 6-28)

FIG.9

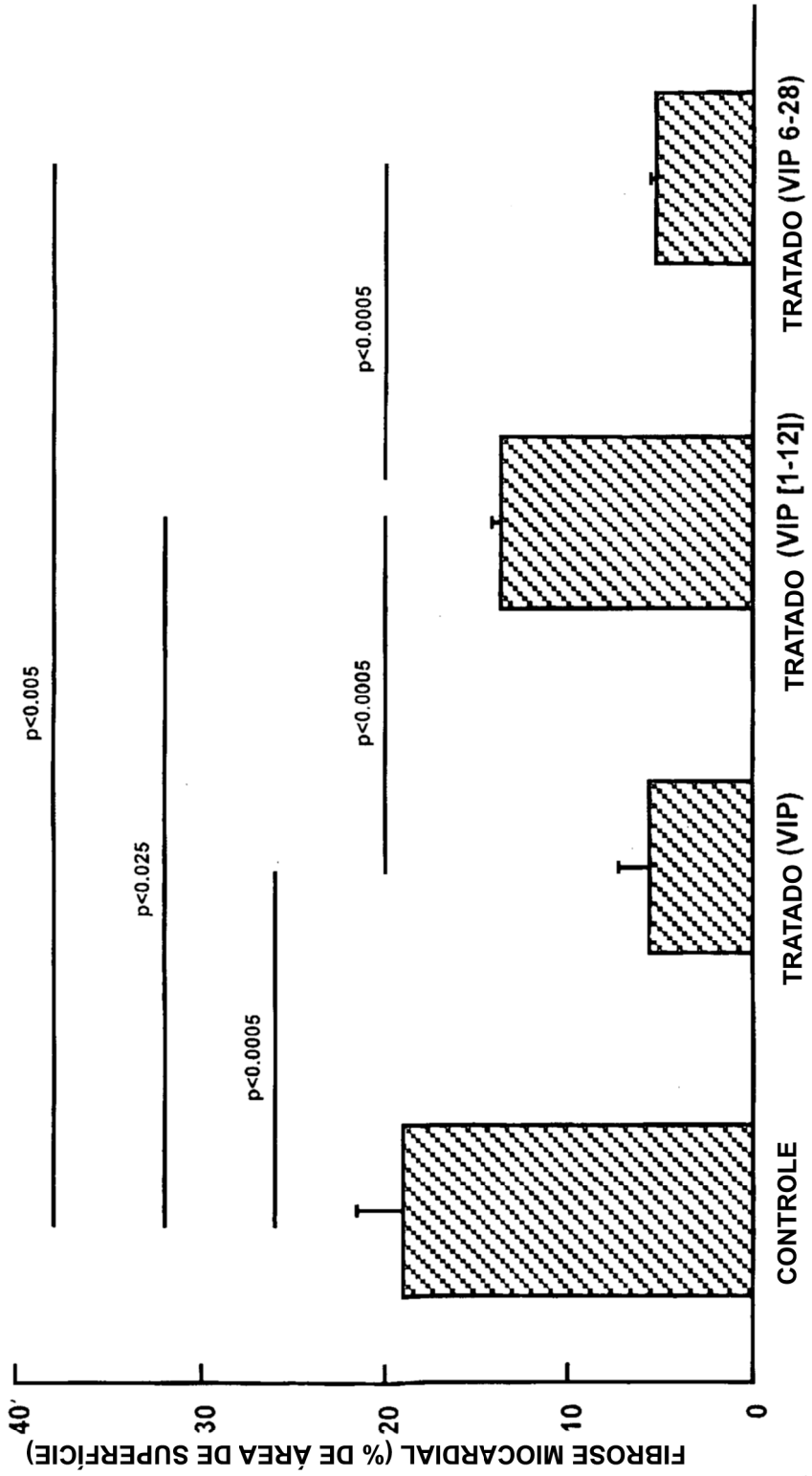

FIBROSE MIOCARDIAL (% DE ÁREA DE SUPERFÍCIE)
40
30
20
10
0
p<0.005
p<0.025
p<0.0005
p<0.0005
p<0.0005
CONTROLE
TRATADO (VIP)
TRATADO (VIP [1-12])
TRATADO (VIP 6-28)

FIG.10