



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112021002920-6 A2



(22) Data do Depósito: 15/08/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 11/05/2021

(54) **Título:** COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA TRATAMENTO DE LESÃO PULMONAR AGUDA

(51) **Int. Cl.:** A61K 38/17; A61K 8/64; A61Q 17/00; A61Q 19/00; A61Q 19/08; (...).

(30) **Prioridade Unionista:** 17/08/2018 US 62/719,217.

(71) **Depositante(es):** THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA.

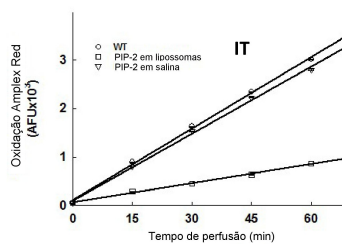
(72) **Inventor(es):** ARON B. FISHER; SHELDON I. FEINSTEIN.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2019046698 de 15/08/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2020/037146 de 20/02/2020

(85) **Data da Fase Nacional:** 17/02/2021

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA TRATAMENTO DE LESÃO PULMONAR AGUDA. Em vários aspectos e modalidades a invenção fornece composições e métodos úteis no tratamento de lesão pulmonar aguda (ALI).



“COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA TRATAMENTO DE LESÃO PULMONAR AGUDA”

REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS RELACIONADOS

[001] O presente pedido reivindica prioridade sob 35 U.S.C. § 119 (e) do Pedido de Patente Provisório U.S. Nº 62/719.217, depositado em 17 de agosto de 2018, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

DECLARAÇÃO SOBRE PESQUISA OU DESENVOLVIMENTO PATROCINADO FEDERALMENTE

[002] Esta invenção foi feita com o apoio governamental sob o 2R01 HL102016 concedido pelo National Heart, Lung and Blood Institute. O governo tem certos direitos sobre a invenção.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[003] A inflamação pulmonar é um componente importante na patogênese da síndrome da lesão pulmonar aguda (LPA) que resulta de diversas etiologias. A inflamação pulmonar associada à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) é um importante contribuinte para a síndrome de ALI. A ativação da NADPH oxidase, tipo 2 (NOX2), a principal fonte de ROS nos pulmões, requer a atividade da fosfolipase A2 (PLA2) da peroxirredoxina 6 (Prdx6).

[004] O tratamento atual da LPA é de suporte e não há nenhum fármaco aprovado atualmente para sua prevenção ou tratamento. Portanto, há uma necessidade na técnica de métodos e composições que protejam contra ALI. A presente divulgação aborda essa necessidade.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[005] Em um aspecto, a invenção fornece uma composição compreendendo um polipeptídeo que consiste em:

SEQ ID NO: 4 X¹X²X³X⁴X⁵LX⁶X⁷X⁸X⁹HQIL

em que:

X¹ pode estar presente ou ausente e se presente é E;
X² pode estar presente ou ausente e se presente é L;
X³ pode estar presente ou ausente e se presente é Q;
X⁴ pode estar presente ou ausente e se presente é A ou T;
X⁵ pode estar presente ou ausente e se presente é T ou E;
X⁶ é H ou Y;
X⁷ é D ou E;
X⁸ é F ou I; e
X⁹ é R ou K.

[006] Em várias modalidades, o polipeptídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em: SEQ ID NO: 5 ELQTELYEIKHQIL, SEQ ID NO: 6 QTELYEIKHQIL e SEQ ID NO: 7 ELYEIKHQIL.

[007] Em várias modalidades, o polipeptídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em: SEQ ID NO: 1 LHDFRHQIL, SEQ ID NO: 2 LYEIKHQIL ou SEQ ID NO: 3 LYDIRHQIL.

[008] Em várias modalidades, a composição compreende ainda um portador farmacologicamente aceitável.

[009] Em várias modalidades, o polipeptídeo é encapsulado em um ou mais lipossomas.

[010] Em várias modalidades, a composição é formulada para inalação de aerossol ou injeção intratraqueal ou intravenosa. Em várias modalidades, a composição farmacêutica é administrada ao sujeito por injeção intravenosa.

[011] Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de tratamento de lesão pulmonar aguda em um sujeito, o método compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo que consiste em:

SEQ ID NO: 4 X¹X²X³X⁴X⁵LX⁶X⁷X⁸X⁹HQIL

em que:

X¹ pode estar presente ou ausente e se presente é E;

X² pode estar presente ou ausente e se presente é L;

X³ pode estar presente ou ausente e se presente é Q;

X⁴ pode estar presente ou ausente e se presente é A ou T;

X⁵ pode ser T ou E;

X⁶ é H ou Y;

X⁷ é D ou E;

X⁸ é F ou I; e

X⁹ é R ou K.

e um portador farmacêuticamente aceitável.

[012] Em várias modalidades, o polipeptídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em: SEQ ID NO: 5 ELQTELYEIKHQIL, SEQ ID NO: 6 QTELYEIKHQIL e SEQ ID NO: 7 ELYEIKHQIL.

[013] Em várias modalidades, o polipeptídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em: SEQ ID NO: 1 LHDFRHHQIL, SEQ ID NO: 2 LYEIKHQIL ou SEQ ID NO: 3 LYDIRHQIL.

[014] Em várias modalidades, o polipeptídeo é encapsulado em um ou mais lipossomas.

[015] Em várias modalidades, a composição farmacêutica é administrada ao sujeito por inalação de aerossol ou por injeção intratraqueal ou intravenosa.

[016] Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de tratamento de sepsis em um sujeito, o método compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo que consiste em:

SEQ ID NO: 4 X¹X²X³X⁴X⁵LX⁶X⁷X⁸X⁹HQIL

em que:

X¹ pode estar presente ou ausente e se presente é E;
X² pode estar presente ou ausente e se presente é L;
X³ pode estar presente ou ausente e se presente é Q;
X⁴ pode estar presente ou ausente e se presente é A ou T;
X⁵ pode ser T ou E;
X⁶ é H ou Y;
X⁷ é D ou E;
X⁸ é F ou I; e
X⁹ é R ou K.

e um portador farmacologicamente aceitável.

[017] Em várias modalidades, o polipeptídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em: SEQ ID NO: 5 ELQTELYEIKHQIL, SEQ ID NO: 6 QTELYEIKHQIL e SEQ ID NO: 7 ELYEIKHQIL

[018] Em várias modalidades, o polipeptídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em: SEQ ID NO: 1 LHDFRHQIL, SEQ ID NO: 2 LYEIKHQIL ou SEQ ID NO: 3 LYDIRHQIL.

[019] Em várias modalidades, o polipeptídeo é encapsulado em um ou mais lipossomas.

[020] Em várias modalidades, a composição farmacêutica é administrada ao sujeito por inalação de aerossol ou por injeção intratraqueal ou intravenosa. Em várias modalidades, a composição farmacêutica é administrada ao sujeito por injeção intravenosa.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[021] A seguinte descrição detalhada de modalidades preferidas da invenção será melhor compreendida quando lida em conjunto com os desenhos anexos. Com o propósito de ilustrar a invenção, são mostradas nos desenhos modalidades que são presentemente preferidas. Deve ser entendido, no entanto, que a invenção não está

limitada às disposições e instrumentalidades precisas das modalidades mostradas nos desenhos.

[022] Figuras 1A e 1B: Camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem com idade de 8 a 10 semanas foram injetados com 2 µg/g de peso corporal de PIP-2 por meio de um cateter intratraqueal (IT) ou por via intravenosa (IV). O peptídeo injetado foi dissolvido em solução salina ou foi incorporado em lipossomas unilamelares consistindo em dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), fosfatidilcolina de ovo (PC), fosfatidilglicerol (PG) e colesterol (razão molar de lipídios, 50:25:10:15). Determinamos que os lipossomas contendo 75 % de DPPC ou 75 % de PC de ovo (mais PG e colesterol) são igualmente eficazes para os lipossomas de DPPC/PC/PG/colesterol para distribuição intracelular de PIP-2. Os camundongos foram sacrificados após 5 min, os pulmões foram perfundidos até a eliminação do sangue e, em seguida, submetidos a perfusão de recirculação sob condições de temperatura controlada (37 °C) na presença do indicador fluorescente Amplex red mais peroxidase de rábano (HRP), de modo a monitorar a oxidação do Amplex red por H₂O₂. A fluorescência das alíquotas do perfusato foi medida nos tempos indicados e expressa como unidades arbitrárias de fluorescência (AFU). O aumento da fluorescência com o tempo de perfusão indica a produção de H₂O₂ refletindo a ativação da NADPH oxidase celular (NOX2). A administração de PIP-2 em solução salina não tem efeito na taxa de produção de H₂O₂, mas PIP-2 em lipossomas injetados tanto IT (Figura 1A) ou IV (Figura 1B) inibe marcadamente a geração de H₂O₂.

[023] As Figuras 2A a 2F representam um curso de tempo de lesão pulmonar após injeção intratraqueal de lipopolissacarídeo (LPS), seguindo vários marcadores de oxidação de tecido e inflamação pulmonar. O lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (E. coli) foi administrado a camundongos C57Bl/6 de tipo selvagem por injeção intratraqueal (IT) a 5 µg/g de peso corporal. Os camundongos foram sacrificados em

12, 16, 24, ou 48 h após LPS como indicado. Os pulmões foram removidos e lavados com solução salina através da traqueia para obtenção do BALf; o pulmão foi então homogeneizado. Os parâmetros de lesão pulmonar foram células nucleadas e proteínas no BALf e a razão de peso úmido/seco do pulmão (P/D); para P/D, o peso do lóbulo superior esquerdo do pulmão foi medido antes e depois da secagem até peso constante em um forno. Os índices de estresse oxidativo do tecido (linha inferior) foram substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), 8-isoprostanos e carbonilas de proteína medidos no homogenato de pulmão. Os valores são média + para n = 4. * P <0,05 vs todos os outros valores; § p <0,05 vs 12 h, 16 h e 24 h. A Figura 2A representa substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A Figura 2B representa 8-isoprostanos. A Figura 2C representa carbonilas de proteína no homogenato de pulmão. A Figura 2D representa o número de células no fluido de lavagem broncoalveolar (BALF). A Figura 2E representa a proteína total em BALF. A Figura 2F representa a razão de peso úmido e seco do pulmão.

[024] As Figuras 3A a 3F A lesão pulmonar aguda (LPA) foi produzida com LPS intratraqueal (5 mg/g de peso corporal). PIP-2 (2 µg/g de peso corporal) em lipossomas foi administrado IT juntamente com LPS (0 h) ou intravenosamente (IV) 12 ou 16 h após LPS. PIP-2 foi administrado IV para evitar um segundo “ataque” na traqueia. Os camundongos foram sacrificados em 24 horas e os pulmões foram avaliados quanto a lesão pulmonar e estresse oxidativo do tecido. Os resultados são média + SE para n = 4. * P <0,05 vs todos os outros grupos. A Figura 3A representa o número de células em BALF. A Figura 3B representa a proteína total em BALF. A Figura 3C representa a razão de peso úmido e seco do pulmão. A Figura 3D representa TBARS. A Figura 3E representa 8-isoprostanos. A Figura 3F representa carbonilas de proteína no homogenato de pulmão.

[025] Figuras 4A e 4B: A fosfolipase A₂ de Prdx6 (aiPLA₂) foi medida pela liberação de ácido palmítico de dipalmitoilfosfatidilcolina sob condições ácidas (pH 4)

na ausência de Ca^{2+} . A Figura 4A: O efeito do aumento da concentração de PIP-2 na atividade de aiPLA₂ de Prdx6 humano recombinante. Figura 4B: O efeito do tratamento com LPS e PIP-2 na atividade de aiPLA₂ de pulmões de camundongo. Os camundongos (n = 3 para cada condição) foram tratados com LPS intratraqueal (2 µg/g de peso corporal) sem ou com PIP-2 (2 µg/g de peso corporal) em lipossomas. Os animais foram sacrificados às 6, 12, ou 24 horas após receber LPS. Os pulmões foram limpos de sangue e homogeneizados. Os pulmões de controle eram de camundongos que não receberam LPS. * P <0,05 vs controle correspondente e vs LPS + PIP-2; § P <0,05 vs LPS às 12 e 24 h.

[026] Figuras 5A e 5B: PIP-2, incorporado nos lipossomas, foi instilado intratraquealmente antes do isolamento do pulmão. Figura 5A: Os pulmões isolados foram perfundidos em um sistema de recirculação com meio artificial. A atividade de NOX2 foi estimulada pela adição de angiotensina II (Ang II). Amplex red juntamente com peroxidase de rábano foram adicionados ao perfusato para detecção da produção de ROS. As alíquotas de perfusato foram analisadas em intervalos por espectrofotometria para determinar a oxidação do Ampex red, indicando a produção de ROS. Os resultados são média + SE para N = 3 - 4. Figura 5B: Os camundongos foram sacrificados 6, 12 ou 24 h após a administração de LPS (5 mg/g de peso corporal) e os pulmões foram perfundidos *in situ* por 15 min com solução salina contendo um fluoróforo (diacetato de difluorofluoresceína, DFFDA). Os pulmões foram então homogeneizados e a fluorescência do homogenato pulmonar foi determinada como um índice de produção de ROS. Resultados para a Figura 5A e Figura 5B são média ± DP para N = 4. * P <0,05 vs LPS e LPS + PIP-2 correspondentes; § P <0,05 vs 12 h e 24 h LPS; ΔP <0,05 vs LPS correspondente.

[027] Figura 6: PIP-2 em lipossomas foi administrado a camundongos tanto intratraquealmente (IT) quanto intravenosamente (IV) no tempo 0. Os pulmões foram colhidos em intervalos entre 4 e 72 h após a administração de PIP-2, homogeneizados

e analisados quanto à atividade de Prdx6-PLA2. O PIP-2 é eficaz por via IT ou IV com um tempo calculado de $\frac{1}{2}$ tempo para recuperação de ~ 50 h. Os resultados são média + SE para N = 3 - 4.

[028] Figuras 7A e 7B: gráficos de Kaplan-Meier para sobrevivência. LPS (15 mg/g de peso corporal) foi administrado a todos os camundongos por: Figura 7A: injeção intratraqueal (IT) ou Figura 7B: intraperitoneal (IP). PIP-2 em lipossomas ou placebo (lipossomas isoladamente) foi administrado por via intravenosa (IV) 12 h após LPS (este é o tempo de tratamento zero) e, em seguida, em intervalos de 12 ou 24 h para um total de 5 doses, conforme indicado pelas setas. Figura 7A: PIP-2 a 2 μ g/g de peso corporal; N = 14 para cada grupo. Figura 7B: PIP-2 a 2 ou 20 μ g/g de peso corporal; Grupo placebo, n = 8; Grupo PIP-2 de 2 mg, n = 7; Grupo PIP-2 de 20 mg, n = 10.

[029] Figura 8: O peptídeo inibidor de PLA2 (PIP-2) inibe a produção de ROS estimulada pela angiotensina II (Ang II) em pulmão isolado de camundongo perfundido. PIP-2 (2 μ g/g de peso corporal) foi administrado a camundongos intactos de tipo selvagem (WT) pela via IV. WT basal, WT controle e NOX2 nulo não receberam o peptídeo. Após 30 minutos, os pulmões foram isolados de camundongos anestesiados e perfundidos em um sistema de recirculação com Ang II adicionado (50 μ M) como um ativador Nox2 e Amplex red mais peroxidase de rábano para detectar ROS de perfusão. Os pulmões basais do WT não foram estimulados com Ang II. Após um período de equilíbrio de 15 minutos (denominado tempo zero), alíquotas foram retiradas em intervalos de 15 minutos para análise de fluorescência. Cada ponto plotado representa a média \pm SE para n = 3. As linhas foram traçadas pelo método dos mínimos quadrados. As taxas médias de redução de ROS calculadas a partir da inclinação de cada linha são indicadas entre parênteses. * P <0,05 vs as outras 3 inclinações.

[030] Figuras 9A e 9B: PIP-2 inibe o aumento da atividade de aiPLA₂ do pulmão e o aumento da geração de ROS após a administração de LPS. LPS (5 µg/g de peso corporal) foi administrado por instilação intratraqueal (IT) juntamente com lipossomas sozinhos (marcados como LPS) ou com PIP-2 em lipossomas (marcados como + PIP-2). O controle eram lipossomas sozinhos sem LPS (marcados como controle). Os camundongos foram sacrificados em 6, 12 ou 24 h após LPS e os pulmões foram perfundidos *in situ* por 15 min com solução salina contendo o fluoróforo (diacetato de difluorofluorosceína DFFDA). Os pulmões foram homogeneizados e analisados quanto a: Figura 9A: atividade de aiPLA₂; Figura 9B: fluorescência do homogenato de pulmão como um índice de produção de ROS. Os resultados são a média ± DP para N = 3 para A e N = 4 para B. * P <0,05 vs. Controle e + PIP-2 no mesmo ponto de tempo; Δ P <0,05 vs. valor correspondente em 6 h.

[031] Figura 10: Efeito da composição de lipossomas na distribuição de PIP-2 aos pulmões após administração IV. Mesmo protocolo para distribuição mediada por lipossomas de PIP-2 por infusão intravenosa que para as Figuras 5A a 5B. * % de lipídio total; todos os lipossomas também continham 15 % de colesterol. † Média ± SE para n = 3 ou faixa para n = 2. PC ou DPPC dentro dos lipossomas têm eficácia semelhante para liberação intracelular de PIP-2. A omissão de PG resulta em redução de eficácia de ~ 10 %.

[032] Figura 11: “Proteção” (%) por PIP-2 contra lesão pulmonar avaliada 24 horas após IT LPS. * Valores para efeito de PIP-2 com administração em 0,12 ou 16 h após LPS. A proteção (%) contra lesão pulmonar foi calculada como [1- (lesão com PIP-2 - controle)/(apenas LPS - controle)]. “Proteção” por PIP-2 é > 75 %.

[033] Figura 12: Índices de lesão pulmonar em camundongos tratados com PIP-2 que sobrevivem a altas doses de LPS. Os camundongos foram injetados com LPS (15 µg/g em peso): Linha B. intratraquealmente (IT); ou Linha C. intraperitonealmente (IP). PIP-2 a 2 µg/g ou 20 µg/g de peso corporal em lipossomas

foi injetado (IV) nos tempos indicados na Figura 7. Cinco dos camundongos sobreviventes foram sacrificados 108 h após o início do tratamento (120 h após administração de LPS). Os resultados são comparados aos valores para camundongos de controle histórico (sem LPS) (Linha A). BALf, fluido de lavagem broncoalveolar; TBARS, substâncias reativas tiobarbitúricas. Os valores são média \pm SE para n = 4 para controle e n = 5 para LPS + PIP-2. Nenhum dos valores médios para LPS + PIP-2 são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$) do controle correspondente. Os camundongos tratados com PIP-2 que sobreviveram 5 dias após LPS tinham pulmões normais.

[034] Figura 13: Efeito de PIP-2 na lesão pulmonar induzida por ventilação (VILI). Os camundongos anestesiados foram ventilados mecanicamente por 6 h com volume corrente de 12 ml/Kg de peso corporal com frequência respiratória de 120/min e 2 cm de H₂O de pressão expiratória final positiva (PEEP). PIP-2 (2 μ g/g peso corporal) em lipossomas foi administrado por injeção IT no início da ventilação mecânica e os camundongos foram sacrificados 6 h mais tarde. O controle representa os valores para pulmões normais (não ventilados). % de proteção foi calculada como na Tabela 1. Os resultados são média + SE para n = 4. * P <0,05 para VILI + PIP vs VILI. PIP-2 protegido contra lesão pulmonar associada à ventilação mecânica.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Definições

[035] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado como comumente entendido por uma pessoa versada na técnica à qual a invenção pertence. Embora quaisquer métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos descritos neste documento possam ser usados na prática para o teste da presente invenção, os materiais e métodos preferidos são descritos neste documento. Na descrição e reivindicação da presente invenção, a seguinte terminologia será usada.

[036] Também deve ser entendido que a terminologia usada neste documento tem a finalidade de descrever modalidades particulares apenas e não se destina a ser limitante.

[037] Os artigos “um” e “uma” são usados neste documento para se referir a um ou mais de um (isto é, a pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. A título de exemplo, “um elemento” significa um elemento ou mais de um elemento.

[038] “A cerca de”, tal como aqui utilizado quando se refere a um valor mensurável, tal como uma quantidade, uma duração temporal e semelhantes, destina-se a abranger variações de $\pm 20\%$ ou $\pm 10\%$, mais preferencialmente $\pm 5\%$, ainda mais preferencialmente $\pm 1\%$, e ainda mais preferencialmente $\pm 0,1\%$ do valor especificado, uma vez que tais variações são apropriadas para realizar os métodos divulgados.

[039] “Lesão pulmonar aguda” ou “ALI” conforme usado neste documento, refere-se a uma síndrome caracterizada pelo início agudo de infiltrados pulmonares bilaterais com hipoxemia que não está associada a insuficiência cardíaca.

[040] Uma doença ou distúrbio é “aliviado” se a gravidade de um sintoma da doença ou distúrbio, a frequência com que tal sintoma é experimentado por um paciente, ou ambos, for reduzida.

[041] Conforme usado neste documento, o termo “composição” ou “composição farmacêutica” refere-se a uma mistura de pelo menos um composto útil dentro da invenção com um portador farmacêuticamente aceitável. A composição farmacêutica facilita a administração do composto a um paciente ou sujeito. Existem várias técnicas de administração de um composto na técnica, incluindo, mas não se limitando a, administração intravenosa, oral, aerossol, parentérica, oftálmica, pulmonar e tópica.

[042] Uma “quantidade eficaz” ou “quantidade terapeuticamente eficaz” de um composto é que quantidade de composto que é suficiente para fornecer um efeito

benéfico ao sujeito ao qual o composto é administrado. Uma “quantidade eficaz” de um veículo de entrega é que quantidade suficiente para ligar ou liberar efetivamente um composto.

[043] Os termos “paciente”, “sujeito”, “indivíduo”, e semelhantes são usados indistintamente neste documento e referem-se a qualquer animal, ou células do mesmo, seja *in vitro* ou *in situ*, suscetíveis aos métodos descritos neste documento. Em certas modalidades não limitativas, o paciente, sujeito ou indivíduo é um ser humano.

[044] Conforme usado neste documento, o termo “farmaceuticamente aceitável” se refere a um material, como um portador ou diluente, que não anula a atividade biológica ou propriedades do composto e é relativamente não tóxico, ou seja, o material pode ser administrado a um indivíduo sem causar efeitos biológicos indesejáveis ou interagir de forma deletéria com nenhum dos componentes da composição em que está contido.

[045] Conforme usado neste documento, o termo “portador farmaceuticamente aceitável” significa um material, composição ou portador farmaceuticamente aceitável, tal como um enchimento líquido ou sólido, estabilizador, agente de dispersão, agente de suspensão, diluente, excipiente, agente espessante, solvente ou material encapsulante, envolvido no carregamento ou transporte de um composto útil dentro da invenção dentro ou para o paciente de modo que possa desempenhar a função pretendida. Normalmente, essas construções são carregadas ou transportadas de um órgão, ou parte do corpo, para outro órgão ou parte do corpo. Cada portador deve ser “aceitável” no sentido de ser compatível com os outros ingredientes da formulação, incluindo o composto útil na invenção, e não ser prejudicial ao paciente. Alguns exemplos de materiais que podem servir como portadores farmaceuticamente aceitáveis incluem: açúcares, como lactose, glicose e sacarose; amidos, como amido de milho e amido de batata; celulose, e seus

derivados, tais como carboximetilcelulose de sódio, etilcelulose e acetato de celulose; tragacanto em pó; malte; gelatina; talco; excipientes, tais como manteiga de cacau e ceras para supositórios; óleos, tais como óleo de amendoim, óleo de semente de algodão, óleo de cártamo, óleo de sésamo, azeite, óleo de milho e óleo de soja; glicóis, tais como propilenoglicol; polióis, tais como glicerina, sorbitol, manitol e polietilenoglicol; ésteres, tais como oleato de etil e laurato de etil; ágar; agentes tamponantes, tais como hidróxido de magnésio e hidróxido de alumínio; agentes tensoativos; ácido algínico; água apirogênica; solução salina isotônica; Solução de Ringer; Álcool etílico; soluções tampão de fosfato; e outras substâncias não tóxicas compatíveis empregadas em formulações farmacêuticas. Conforme usado neste documento, “portador farmacêuticamente aceitável” também inclui todos e quaisquer revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos e agentes de retardo de absorção e semelhantes que são compatíveis com a atividade do composto útil dentro da invenção e são fisiologicamente aceitáveis para o paciente. Os compostos ativos suplementares também podem ser incorporados nas composições. O “portador farmacêuticamente aceitável” pode incluir ainda um sal farmacêuticamente aceitável do composto útil dentro da invenção. Outros ingredientes adicionais que podem ser incluídos nas composições farmacêuticas utilizadas na prática da invenção são conhecidos na técnica e descritos, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Sciences (Genaro, Ed., Mack Publishing Co., 1985, Easton, PA), que é aqui incorporado por referência.

[046] Conforme usado neste documento, “PIP-2” significa um peptídeo tendo SEQ ID NO: 1 LHDFRHQIL.

[047] Conforme usado neste documento, “PIP-4” significa um peptídeo tendo SEQ ID NO: 2 LYEIKHQIL.

[048] Conforme usado neste documento, “PIP-5” significa um peptídeo tendo SEQ ID NO: 3 LYDIRHQIL.

[049] Conforme usado neste documento, “tratar uma doença ou distúrbio” significa reduzir a frequência com que um sintoma da doença ou distúrbio é experimentado por um paciente. Doença e distúrbio são usados indistintamente aqui.

[050] Conforme usado neste documento, “sepsis” é uma condição potencialmente fatal causada pela resposta do corpo a uma infecção e pode levar à falência de múltiplos órgãos.

[051] Conforme usado neste documento, o termo “tratamento” ou “tratando” abrange profilaxia e/ou terapia. Consequentemente as composições e métodos da presente invenção não são limitados a aplicações terapêuticas e podem ser usados em aplicações profiláticas. Portanto, “tratando” ou “tratamento” de um estado, distúrbio ou condição inclui: (i) prevenir ou retardar a aparência de sintomas clínicos do estado, distúrbio ou condição em desenvolvimento em um sujeito que pode ser afligido com ou predisposto ao estado, distúrbio ou condição mas ainda não experimenta ou exibe sintomas clínicos ou subclínicos do estado, distúrbio ou condição, (ii) inibir o estado, distúrbio ou condição, ou seja, interromper ou reduzir o desenvolvimento da doença ou pelo menos um sintoma clínico ou subclínico disso, ou (iii) alívio da doença, ou seja, causando a regressão do estado, distúrbio ou condição ou pelo menos um de seus sintomas clínicos ou subclínicos.

[052] Faixas: ao longo desta divulgação, vários aspectos da invenção podem ser apresentados em um formato de faixa. Deve ser entendido que a descrição em formato de faixa é meramente por conveniência e brevidade e não deve ser interpretada como uma limitação inflexível no escopo da invenção. Por conseguinte, a descrição de uma faixa deve ser considerada como tendo divulgado especificamente todas as subfaixas possíveis, bem como valores numéricos individuais dentro dessa faixa. Por exemplo, a descrição de uma faixa, como de 1 a 6, deve ser considerada como tendo as subfaixas especificamente divulgadas, como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., bem como números individuais dentro dessa faixa,

por exemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 e 6. Isso se aplica independentemente da amplitude da faixa.

Descrição

Composições

[053] A invenção é baseada em parte na engenharia de inibidores de peptídeos específicos de aiPLA₂ que podem ser usados para tratar ALI. A atividade de inibição de aiPLA₂ de vários peptídeos da invenção é mostrada abaixo na Tabela 1

Tabela 1: Efeito dos peptídeos na atividade de aiPLA₂ de hPrdx6

recombinante

sequência	Atividade em nmol/min/mg de prot.
SEQ ID NO: 8 DEELQATLHDFRHHQIL (16) humano PIP-1	45,0
SEQ ID NO: 9 DEELQTELYEIKHQIL (16) rato, camundongo PIP-3	32,0
SEQ ID NO: 10 ELQTELYEIKHQIL (14)	33,2
SEQ ID NO: 11 QTELYEIKHQIL (12)	31,5
SEQ ID NO: 12 ELYEIKHQIL (10)	28,6
SEQ ID NO: 13 YEIKHQIL (8)	94,4
SEQ ID NO: 14 IKHQIL (6)	97,1
SEQ ID NO: 15 DEELQTELYEIKHQ (14)	102
SEQ ID NO: 16 DEELQTELYEIK (12)	95,7
SEQ ID NO: 17 DEELQTELYEI (10)	94,9
SEQ ID NO: 18 DEELQTEL (8)	93,6
hPrdx6 apenas (nenhum peptídeo)	93,4
SEQ ID NO: 9 DEELQTELYEIKHQIL (16) r	20,1

Tabela 2: Otimização do tamanho de peptídeo inibitório por efeito em atividade de aiPLA₂ de proteína humana recombinante

sequência	Atividade em nmol/min/mg de prot.
SEQ ID NO: 19 TLHDFRHHQIL (10)	31,5
SEQ ID NO: 1 LHDFRHHQIL (9) PIP-2	29,9
SEQ ID NO: 20 TLHDFRHHQI (9)	89,6
SEQ ID NO: 21 LHDFRHHQI (8)	93,6
SEQ ID NO: 2 LYEIKHHQIL (9) PIP-4	32,3
SEQ ID NO: 22 ELYEIKHHQI (9)	93,5
SEQ ID NO: 23 LYEIKHHQI (8)	92,1
hPrdx6 apenas	92,0
SEQ ID NO: 9 DEELQTELYEIKHHQIL (16) r	32,0

Tabela 3: Substituições em PIP-2: efeito na inibição de atividade de aiPLA₂ de Prdx6 humano recombinante

amostra	sequência	Atividade em nmol/min/mg de prot.
SN019	SEQ ID NO: 24 LKIEYHHQIL	97,67
SN020	SEQ ID NO: 25 LRFDDHHQIL	98,97
SN021	SEQ ID NO: 3 LYDIRHHQIL-PIP-5	29,74
SN022	SEQ ID NO: 26 LHEFKHHQIL	99,42
SN023	SEQ ID NO: 27 LFKLEHHQIL	97,95
SN024	SEQ ID NO: 28 LHDFRDDQIL	102,04
SN025	SEQ ID NO: 29 LHDFRPPQIL	101,34
SN026	SEQ ID NO: 30 LHDFRHHNIL	98,97

SN029	SEQ ID NO: 31 LHDFRHIIL	97,30
SN028	SEQ ID NO: 32 LHDFRHQLL	102,45
SN029	SEQ ID NO: 33 LHDFRHQTL	100,35
Nenhum peptídeo	hPrdx6 apenas	99,91
PIP-2* (PIP-4)* * que ocorre naturalmente	SEQ ID NO: 1 LHDFRHQIL (SEQ ID NO: 2 LYEIKHQIL)	26,18 Não testado

[054] Conseqüentemente, em um aspecto, a invenção fornece uma composição compreendendo um polipeptídeo que consiste em:

SEQ ID NO: 4 X¹X²X³X⁴X⁵LX⁶X⁷X⁸X⁹HQIL

em que:

X¹ pode estar presente ou ausente e se presente é E;

X² pode estar presente ou ausente e se presente é L;

X³ pode estar presente ou ausente e se presente é Q;

X⁴ pode estar presente ou ausente e se presente é A ou T;

X⁵ pode estar presente ou ausente e se presente é T ou E;

X⁶ é H ou Y;

X⁷ é D ou E;

X⁸ é F ou I; e

X⁹ é R ou K.

[055] Em várias modalidades, a composição compreende um polipeptídeo que consiste em SEQ ID NO: 1 LHDFRHQIL (PIP-2), SEQ ID NO: 2 LYEIKHQIL (PIP-4) ou SEQ ID NO: 3 LYDIRHQIL (PIP-5). A composição da invenção pode ser fornecida a sujeitos como uma composição farmacêutica. Conseqüentemente, em várias modalidades, a composição compreende ainda um portador farmacêuticamente aceitável. Como mostrado na Figura 1, os polipeptídeos podem ser eficazmente administrados em lipossomas. Conseqüentemente, em várias modalidades, o

polipeptídeo é encapsulado em um ou mais lipossomas. Em várias modalidades, a composição é formulada para inalação de aerossol ou injeção intratraqueal ou intravenosa. Os portadores farmacologicamente aceitáveis apropriados bem como formulações inaláveis ou injetáveis são descritos em outro lugar neste documento.

Métodos de Tratamento de Lesão Pulmonar Aguda

[056] Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de tratamento de lesão pulmonar aguda em um sujeito, o método compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo que consiste em:

SEQ ID NO: 4 X¹X²X³X⁴X⁵LX⁶X⁷X⁸X⁹HQIL

em que:

X¹ pode estar presente ou ausente e se presente é E;

X² pode estar presente ou ausente e se presente é L;

X³ pode estar presente ou ausente e se presente é Q;

X⁴ pode estar presente ou ausente e se presente é A ou T;

X⁵ pode ser T ou E;

X⁶ é H ou Y;

X⁷ é D ou E;

X⁸ é F ou I; e

X⁹ é R ou K;

e um portador farmacologicamente aceitável.

[057] Em várias modalidades, o polipeptídeo pode ser um polipeptídeo que consiste em SEQ ID NO: 1 LHDFRHHQIL, SEQ ID NO: 2 LYEIKHHQIL ou SEQ ID NO: 3 LYDIRHHQIL. Em várias modalidades, o polipeptídeo administrado ao sujeito é encapsulado em um ou mais lipossomas. Em várias modalidades, a composição farmacêutica é administrada ao sujeito por inalação de aerossol ou por injeção intratraqueal ou intravenosa.

Métodos de Tratamento de Sepses

[058] Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de tratamento de sepses em um sujeito, o método compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo que consiste em:

SEQ ID NO: 4 X¹X²X³X⁴X⁵LX⁶X⁷X⁸X⁹HQIL

em que:

X¹ pode estar presente ou ausente e se presente é E;

X² pode estar presente ou ausente e se presente é L;

X³ pode estar presente ou ausente e se presente é Q;

X⁴ pode estar presente ou ausente e se presente é A ou T;

X⁵ pode ser T ou E;

X⁶ é H ou Y;

X⁷ é D ou E;

X⁸ é F ou I; e

X⁹ é R ou K;

e um portador farmacêuticamente aceitável.

[059] Em várias modalidades, o polipeptídeo pode ser um polipeptídeo que consiste em SEQ ID NO: 1 LHDFRHHQIL, SEQ ID NO: 2 LYEIKHHQIL ou SEQ ID NO: 3 LYDIRHHQIL. Em várias modalidades, o polipeptídeo administrado ao sujeito é encapsulado em um ou mais lipossomas. Em várias modalidades, a composição farmacêutica é administrada ao sujeito por inalação de aerossol ou por injeção intratraqueal ou intravenosa. Em várias modalidades, a composição farmacêutica é administrada ao sujeito por injeção intravenosa.

Administração/Dosagem/Formulações

[060] O regime de administração pode afetar o que constitui uma quantidade eficaz. As formulações terapêuticas podem ser administradas ao sujeito antes ou após

o início da lesão. Além disso, várias dosagens divididas, bem como dosagens escalonadas, podem ser administradas diariamente ou sequencialmente, ou a dose pode ser infundida continuamente ou pode ser uma injeção em bolus. Além disso, as dosagens das formulações terapêuticas podem ser aumentadas ou diminuídas proporcionalmente, conforme indicado pelas exigências da situação terapêutica ou profilática.

[061] A administração das composições da presente invenção a um paciente, preferencialmente um mamífero, mais preferencialmente um ser humano, pode ser realizada usando procedimentos conhecidos, em dosagens e por períodos de tempo eficazes para tratar uma lesão pulmonar no paciente. Uma quantidade eficaz do composto terapêutico necessário para atingir um efeito terapêutico pode variar de acordo com fatores como o estado da doença ou distúrbio no paciente; a idade, sexo e peso do paciente; e a capacidade do composto terapêutico para tratar ou prevenir lesão pulmonar aguda no paciente. Os regimes de dosagem podem ser ajustados para fornecer a resposta terapêutica ideal. Por exemplo, várias doses divididas podem ser administradas diariamente ou a dose pode ser reduzida proporcionalmente conforme indicado pelas exigências da situação terapêutica. Um exemplo não limitativo de um intervalo de dose eficaz para um composto terapêutico da invenção é de cerca de 1 e 5.000 mg/kg de peso corporal/por dia. Uma pessoa versada na técnica seria capaz de estudar os fatores relevantes e fazer a determinação em relação à quantidade eficaz do composto terapêutico sem experimentação indevida.

[062] Os níveis de dosagem reais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas desta invenção podem ser variados de modo a obter uma quantidade do ingrediente ativo que seja eficaz para atingir a resposta terapêutica desejada para um determinado paciente, composição e modo de administração, sem ser tóxico para o paciente.

[063] Em particular, o nível de dosagem selecionado depende de uma variedade de fatores, incluindo a atividade do composto particular empregado, o tempo de administração, a taxa de excreção ou degradação do composto, a duração do tratamento, outros fármacos, compostos ou materiais usados em combinação com o composto, a idade, sexo, peso, condição, saúde geral e histórico médico anterior do paciente a ser tratado, e fatores semelhantes bem conhecidos nas técnicas médicas.

[064] Um médico, por exemplo, médico ou veterinário, com habilidade comum na técnica pode facilmente determinar e prescrever a quantidade eficaz da composição farmacêutica necessária. Por exemplo, o médico ou veterinário pode iniciar doses dos compostos da invenção empregues na composição farmacêutica em níveis mais baixos do que os necessários para atingir o efeito terapêutico desejado e aumentar gradualmente a dosagem até que o efeito desejado seja alcançado.

[065] Em modalidades particulares, é especialmente vantajoso formular o composto na forma de dosagem unitária para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. A forma de dosagem unitária conforme aqui usada refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para os pacientes a serem tratados; cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de composto terapêutico calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico necessário. As formas de dosagem unitária da invenção são ditadas por e diretamente dependentes de (a) as características únicas do composto terapêutico e o efeito terapêutico particular a ser alcançado, e (b) as limitações inerentes à técnica de composição/formulação de tal agente terapêutico composto para o tratamento de uma lesão pulmonar em um paciente.

[066] O portador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol e polietilenoglicol líquido e semelhantes), misturas adequadas dos mesmos e óleos vegetais.

[067] Em certas modalidades, as composições da invenção são administradas ao paciente em dosagens que variam de uma a cinco vezes por dia ou mais. Em outras modalidades, as composições da invenção são administradas ao paciente em uma faixa de dosagens que incluem, mas não estão limitadas a uma vez por dia, a cada dois dias, a cada três dias a uma vez por semana e uma vez a cada duas semanas. É prontamente aparente para uma pessoa versada na técnica que a frequência de administração das várias composições de combinação da invenção varia de indivíduo para indivíduo, dependendo de muitos fatores, incluindo, mas não se limitando a, idade, doença ou distúrbio a ser tratado, gênero, saúde geral e outros fatores. Assim, a invenção não deve ser interpretada como limitada a qualquer regime de dosagem particular e a dosagem e composição precisas a serem administradas a qualquer paciente são determinadas pelo atendimento médico levando em consideração todos os outros fatores sobre o paciente.

[068] Os compostos da invenção para administração podem ser na faixa de cerca de 1 µg a cerca de 10.000 mg, cerca de 20 µg a cerca de 9.500 mg, cerca de 40 µg a cerca de 9.000 mg, cerca de 75 µg a cerca de 8.500 mg, cerca de 150 µg a cerca de 7.500 mg, cerca de 200 µg a cerca de 7.000 mg, cerca de 350 µg a cerca de 6.000 mg, cerca de 500 µg a cerca de 5.000 mg, cerca de 750 µg a cerca de 4.000 mg, cerca de 1 mg a cerca de 3.000 mg, cerca de 10 mg a cerca de 2.500 mg, cerca de 20 mg a cerca de 2.000 mg, cerca de 25 mg a cerca de 1.500 mg, cerca de 30 mg a cerca de 1.000 mg, cerca de 40 mg a cerca de 900 mg, cerca de 50 mg a cerca de 800 mg, cerca de 60 mg a cerca de 750 mg, cerca de 70 mg a cerca de 600 mg, cerca de 80 mg a cerca de 500 mg, e todo e qualquer incremento total ou parcial entre eles.

[069] Em algumas modalidades, a dose de um composto da invenção é de cerca de 1 mg e cerca de 2.500 mg. Em algumas modalidades, uma dose de um composto da invenção usada em composições descritas aqui é menos do que cerca

de 10.000 mg, ou menos do que cerca de 8.000 mg, ou menos do que cerca de 6.000 mg, ou menos do que cerca de 5.000 mg, ou menos do que cerca de 3.000 mg, ou menos do que cerca de 2.000 mg, ou menos do que cerca de 1.000 mg, ou menos do que cerca de 500 mg, ou menos do que cerca de 200 mg, ou menos do que cerca de 50 mg. Da mesma forma, em algumas modalidades, uma dose de um segundo composto como descrito aqui é menos do que cerca de 1.000 mg, ou menos do que cerca de 800 mg, ou menos do que cerca de 600 mg, ou menos do que cerca de 500 mg, ou menos do que cerca de 400 mg, ou menos do que cerca de 300 mg, ou menos do que cerca de 200 mg, ou menos do que cerca de 100 mg, ou menos do que cerca de 50 mg, ou menos do que cerca de 40 mg, ou menos do que cerca de 30 mg, ou menos do que cerca de 25 mg, ou menos do que cerca de 20 mg, ou menos do que cerca de 15 mg, ou menos do que cerca de 10 mg, ou menos do que cerca de 5 mg, ou menos do que cerca de 2 mg, ou menos do que cerca de 1 mg, ou menos do que cerca de 0,5 mg, e todo e qualquer incremento total ou parcial do mesmo.

[070] Em certas modalidades, a presente invenção é direcionada a uma composição farmacêutica embalada que compreende um recipiente contendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto da invenção, sozinho ou em combinação com um segundo agente farmacêutico; e instruções para usar o composto para tratar, prevenir ou reduzir um ou mais sintomas de lesão pulmonar aguda em um paciente.

[071] As formulações podem ser empregadas em misturas com excipientes convencionais, isto é, substâncias portadoras orgânicas ou inorgânicas farmacologicamente aceitáveis adequadas para oral, parentérica, nasal, intravenosa, subcutânea, enteral ou qualquer outro modo de administração adequado, conhecido na técnica. As preparações farmacêuticas podem ser esterilizadas e, se desejado, misturadas com agentes auxiliares, por exemplo, lubrificantes, conservantes, estabilizantes, agentes umectantes, emulsificantes, sais para influenciar os tampões

de pressão osmótica, corantes, aromatizantes e/ou substâncias aromáticas e semelhantes. Eles também podem ser combinados quando desejado com outros agentes ativos, por exemplo, outros agentes analgésicos.

[072] As vias de administração de qualquer uma das composições da invenção incluem oral, nasal, retal, intravaginal, parentérica, bucal, sublingual ou tópica. Os compostos para uso na invenção podem ser formulados para administração por qualquer via adequada, tal como por via oral ou parentérica, por exemplo, administração transdérmica, transmucosa (por exemplo, sublingual, lingual, (trans) bucal, (trans) uretral, vaginal (por exemplo, trans- e perivaginalmente), (intra) nasal e (trans) retal), intravesical, intrapulmonar, intraduodenal, intragástrico, intratecal, subcutânea, intramuscular, intradérmica, intra-arterial, intravenosa, intrabrônquica, inalação e tópica.

[073] As composições e formas de dosagem adequadas incluem, por exemplo, comprimidos, cápsulas, caplets, pílulas, cápsulas de gel, trociscos, dispersões, suspensões, soluções, xaropes, grânulos, grânulos, adesivos transdérmicos, géis, pós, pelotas, magmas, pastilhas, cremes, pastas, emplastos, loções, discos, supositórios, sprays líquidos para administração nasal ou oral, pó seco ou formulações em aerossol para inalação, composições e formulações para administração intravesical e semelhantes. Deve ser entendido que as formulações e composições que seriam úteis na presente invenção não estão limitadas às formulações e composições particulares que são aqui descritas.

Administração Oral

[074] Para aplicação oral, são particularmente adequados os comprimidos, drágeas, líquidos, gotas, supositórios ou cápsulas, comprimidos ovais e cápsulas de gel. As composições destinadas ao uso oral podem ser preparadas de acordo com qualquer método conhecido na técnica e tais composições podem conter um ou mais agentes selecionados do grupo que consiste em excipientes farmacologicamente

inertes, não tóxicos que são adequados para a fabricação de comprimidos. Esses excipientes incluem, por exemplo, um diluente inerte como a lactose; agentes de granulação e desintegração tais como amido de milho; agentes de ligação, tais como amido; e agentes lubrificantes, tais como estearato de magnésio. Os comprimidos podem ser não revestidos ou podem ser revestidos por técnicas conhecidas para fins de elegância ou para retardar a liberação dos ingredientes ativos. As formulações para uso oral também podem ser apresentadas como cápsulas de gelatina dura em que o ingrediente ativo é misturado com um diluente inerte.

[075] A presente invenção também inclui um comprimido multicamadas compreendendo uma camada que proporciona a liberação retardada de um ou mais compostos da invenção, e uma outra camada que fornece a liberação imediata de um fármaco para o tratamento de certas doenças ou distúrbios. Usando uma mistura de polímero sensível a cera/pH, uma composição insolúvel gástrica pode ser obtida na qual o ingrediente ativo é aprisionado, garantindo sua liberação retardada.

Administração Parentérica

[076] Para administração parentérica, os compostos da invenção podem ser formulados para injeção ou infusão, por exemplo, injeção ou infusão intravenosa, intramuscular ou subcutânea, ou para administração em uma dose de bolus e/ou infusão contínua. Podem ser utilizadas suspensões, soluções ou emulsões em um veículo oleoso ou aquoso, contendo opcionalmente outros agentes de formulação, tais como agentes de suspensão, estabilização e/ou dispersão.

Formas de Administração Adicionais

[077] As formas de dosagem adicionais desta invenção incluem as formas de dosagem como descritas nas Patentes U.S. N^{os} 6.340.475; 6.488.962; 6.451.808; 5.972.389; 5.582.837; e 5.007.790. As formas de dosagem adicionais desta invenção também incluem as formas de dosagem como descritas nos Pedidos de Patente U.S. N^{os} 20030147952; 20030104062; 20030104053; 20030044466; 20030039688; e

20020051820. As formas de dosagem adicionais desta invenção também incluem as formas de dosagem descritas nos Pedidos PCT N^{os} WO 03/35041; WO 03/35040; WO 03/35029; WO 03/35177; WO 03/35039; WO 02/96404; WO 02/32416; WO 01/97783; WO 01/56544; WO 01/32217; WO 98/55107; WO 98/11879; WO 97/47285; WO 93/18755; e WO 90/11757.

Formulações de Liberação Controlada e Sistemas de Administração de Fármaco

[078] Em certas modalidades, as formulações da presente invenção podem ser, mas não estão limitadas a formulações de curto prazo, de deslocamento rápido, bem como controladas, por exemplo, liberação sustentada, liberação retardada e liberação pulsátil.

[079] O termo liberação sustentada é usado em seu sentido convencional para se referir a uma formulação de fármaco que fornece a liberação gradual de um fármaco ao longo de um período de tempo prolongado e que pode, embora não necessariamente, resultar em níveis de sangue substancialmente constantes de um fármaco ao longo de um período de tempo prolongado. O período de tempo pode ser tão longo quanto um mês ou mais e deve ser uma liberação que seja mais longa do que a mesma quantidade de agente administrado em forma de bolus.

[080] Para liberação sustentada, os compostos podem ser formulados com um polímero adequado ou material hidrofóbico que proporciona propriedades de liberação sustentada aos compostos. Como tal, os compostos para usar o método da invenção podem ser administrados na forma de micropartículas, por exemplo, por injeção ou na forma de bolachas ou discos por implantação.

[081] Em uma modalidade da invenção, os compostos da invenção são administrados a um paciente, sozinhos ou em combinação com outro agente farmacêutico, usando uma formulação de liberação sustentada.

[082] O termo liberação retardada é usado neste documento em seu sentido convencional para se referir a uma formulação de fármaco que fornece uma liberação inicial do fármaco após algum atraso após a administração do fármaco e que pode, embora não necessariamente, incluir um atraso de cerca de 10 minutos até cerca de 12 horas.

[083] O termo liberação pulsátil é aqui utilizado no seu sentido convencional para se referir a uma formulação de fármaco que proporciona a liberação do fármaco de forma a produzir perfis de plasma pulsado do fármaco após a administração do fármaco.

[084] O termo liberação imediata é usado em seu sentido convencional para se referir a uma formulação de fármaco que fornece a liberação do fármaco imediatamente após a administração do fármaco.

[085] Conforme usado neste documento, curto prazo refere-se a qualquer período de tempo até e incluindo cerca de 8 horas, cerca de 7 horas, cerca de 6 horas, cerca de 5 horas, cerca de 4 horas, cerca de 3 horas, cerca de 2 horas, cerca de 1 hora, cerca de 40 minutos, cerca de 20 minutos ou cerca de 10 minutos e qualquer ou todos os seus incrementos totais ou parciais após a administração do fármaco após a administração do fármaco.

[086] Conforme usado neste documento, deslocamento rápido se refere a qualquer período de tempo até e incluindo cerca de 8 horas, cerca de 7 horas, cerca de 6 horas, cerca de 5 horas, cerca de 4 horas, cerca de 3 horas, cerca de 2 horas, cerca de 1 hora, cerca de 40 minutos, cerca de 20 minutos ou cerca de 10 minutos, e todo e qualquer incremento total ou parcial após a administração do fármaco.

Dosagem

[087] A quantidade ou dose terapeuticamente eficaz de um composto da presente invenção depende da idade, sexo e peso do paciente, a condição médica atual do paciente e a progressão da lesão pulmonar aguda no paciente a ser tratado.

A pessoa versada na técnica é capaz de determinar as dosagens apropriadas dependendo destes e de outros fatores.

[088] Uma dose adequada de um composto da presente invenção pode ser na faixa de cerca de 0,01 mg a cerca de 5.000 mg per dia, como de cerca de 0,1 mg a cerca de 1.000 mg, por exemplo, de cerca de 1 mg a cerca de 500 mg, como cerca de 5 mg a cerca de 250 mg por dia. A dose pode ser administrada em uma dosagem unitária ou em várias dosagens, por exemplo de 1 a 4 ou mais vezes por dia. Quando várias dosagens são usadas, a quantidade de cada dosagem pode ser a mesma ou diferente. Por exemplo, uma dose de 1 mg por dia pode ser administrada como duas 0,5 mg doses, com cerca de um intervalo de 12 horas entre doses.

[089] Entende-se que a quantidade de composto dosado por dia pode ser administrada, em exemplos não limitativos, todos os dias, qualquer outro dia, a cada 2 dias, a cada 3 dias, a cada 4 dias ou a cada 5 dias. Por exemplo, com a administração em dias alternados, uma dose de 5 mg por dia pode ser iniciada na segunda-feira com uma primeira dose subsequente de 5 mg por dia administrada na quarta-feira, uma segunda dose subsequente de 5 mg por dia administrada na sexta-feira e assim por diante.

[090] No caso em que o estado do paciente melhora, a critério do médico, a administração do inibidor da invenção é opcionalmente dada continuamente; alternativamente, a dose de fármaco a ser administrada é temporariamente reduzida ou temporariamente suspensa por um certo período de tempo (ou seja, um “feriado de fármaco”). A duração do feriado do fármaco opcionalmente varia entre 2 dias e 1 ano, incluindo apenas a título de exemplo, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 10 dias, 12 dias, 15 dias, 20 dias, 28 dias, 35 dias, 50 dias, 70 dias, 100 dias, 120 dias, 150 dias, 180 dias, 200 dias, 250 dias, 280 dias, 300 dias, 320 dias, 350 dias ou 365 dias. A redução da dose durante um feriado de fármaco inclui de 10 % a 100 %,

incluindo, por via de exemplo apenas, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, ou 100 %.

[091] Uma vez que a melhora das condições do paciente ocorreu, uma dose de manutenção é administrada, se necessário. Subsequentemente, a dosagem ou a frequência de administração, ou ambas, é reduzida, em função da carga viral, a um nível em que a doença melhorada é retida. Em certas modalidades, os pacientes requerem tratamento intermitente a longo prazo em qualquer recorrência dos sintomas e/ou infecção.

[092] Os compostos para uso no método da invenção podem ser formulados na forma de dosagem unitária. O termo "forma de dosagem unitária" refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagem unitária para pacientes em tratamento, com cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de material ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado, opcionalmente em associação com um portador farmacêutico adequado. A forma de dosagem unitária pode ser para uma única dose diária ou uma de várias doses diárias (por exemplo, cerca de 1 a 4 ou mais vezes por dia). Quando várias doses diárias são usadas, a forma de dosagem unitária pode ser a mesma ou diferente para cada dose.

[093] A toxicidade e a eficácia terapêutica de tais regimes terapêuticos são determinadas opcionalmente em culturas de células ou animais experimentais, incluindo, mas não se limitando a, a determinação do LD₅₀ (a dose letal para 50 % da população) e do ED₅₀ (a dose terapeuticamente eficaz em 50 % da população). A razão da dose entre os efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico, que é expresso como a razão entre LD₅₀ e ED₅₀. Os dados obtidos a partir de ensaios de cultura de células e estudos em animais são opcionalmente usados na formulação de uma faixa de dosagem para uso em seres humanos. A dosagem de tais compostos encontra-se preferencialmente dentro de uma faixa de concentrações circulantes que incluem o ED₅₀ com toxicidade mínima. A dosagem opcionalmente varia dentro desta

faixa dependendo da forma de dosagem empregue e da via de administração utilizada.

[094] As pessoas versadas na técnica reconhecerão, ou serão capazes de determinar usando não mais do que experimentação de rotina, numerosos equivalentes aos procedimentos, modalidades, reivindicações e exemplos específicos descritos neste documento. Tais equivalentes foram considerados como estando dentro do escopo desta invenção e cobertos pelas reivindicações anexas. Por exemplo, deve ser entendido que as modificações nas condições de reação, incluindo, mas não se limitando a tempos de reação, tamanho/volume da reação e reagentes experimentais, tais como solventes, catalisadores, pressões, condições atmosféricas, por exemplo, atmosfera de nitrogênio e redução/agentes oxidantes, com alternativas reconhecidas na técnica e usando não mais do que experimentação de rotina, estão dentro do escopo do presente pedido.

[095] Deve ser entendido que onde quer que os valores e faixas sejam fornecidos neste documento, todos os valores e faixas abrangidos por esses valores e faixas devem ser abrangidos pelo escopo da presente invenção. Além disso, todos os valores que caem dentro dessas faixas, bem como os limites superior ou inferior de uma faixa de valores, também são contemplados pelo presente pedido.

EXEMPLOS EXPERIMENTAIS

[096] A invenção é ainda descrita em detalhe com referência aos seguintes exemplos experimentais. Esses exemplos são fornecidos apenas para fins de ilustração e não se destinam a ser limitantes, a menos que especificado de outra forma. Assim, a invenção não deve de forma alguma ser interpretada como sendo limitada aos seguintes exemplos, mas, em vez disso, deve ser interpretada de forma a abranger todas e quaisquer variações que se tornem evidentes como resultado dos ensinamentos aqui fornecidos.

[097] Sem descrição adicional, acredita-se que uma pessoa versada na técnica pode, usando a descrição anterior e os seguintes exemplos ilustrativos, fazer e utilizar os compostos da presente invenção e praticar os métodos reivindicados. Os seguintes exemplos de trabalho, portanto, apontam especificamente as modalidades preferidas da presente invenção e não devem ser interpretados como limitando de qualquer forma o restante da divulgação.

Exemplo 1: Atividade de peptídeos PIP *in vivo*

[098] Os camundongos foram injetados com PIP-2 (2 µg/g de peso corporal) tanto lipossomas (ver Figura 1) quanto IT (Figura 1A) ou IV (Figura 1B); estes lipossomas continham o traçador [³H] na posição 9,10 do palmitato sn-2 de DPPC. Os pulmões foram retirados de camundongos e estudados em sistema isolado. A inclinação das linhas indica a produção de oxidantes (H₂O₂).

[099] PIP-2 em lipossomas injetados IV ou IT inibe a atividade de Prdx6 do homogenato de pulmão. A inibição máxima foi observada dentro de 4 horas após a administração de PIP-2. A recuperação da inibição começou em ~ 36 horas e foi concluída em 48 horas. Os resultados são semelhantes para PIP-1,2,4 (PIP-3 e -5 não foram testados). Com base nos resultados do camundongo, PIP-2 ou 4 pode ser administrado uma vez a cada 24 a 36 horas para manter a inibição máxima da atividade de Prdx6 e ativação de NOX2. A eficácia requer lipossomas para a liberação do peptídeo. A inibição após a administração de IT ou IV foi semelhante. Os dados são apresentados nas Tabelas 4 a 6, abaixo.

Tabela 4: Atividade de aiPLA₂ do pulmão de camundongo 24 horas após a injeção de PIP-4 IV com e sem lipossomas para liberação

	atividade de aiPLA ₂ em nmol/h/mg de prot.
Controle (lipossomas apenas) N = 3	8,81 ± 0,2 (n = 3)

PIP-4 (em lipossomas)	1,55 ± 0,02 (n=3)
PIP-4 (sozinho, sem lipossomas)	8,43 ± 0,23 (n=3)

PIP-4 = 2 µg/g em peso de camundongos. Média +/- SE; n=3.

Tabela 5: Atividade de aiPLA₂ de e homogenato de pulmão de camundongo em aumento de tempo após a injeção de IT ou IV de PIP-2: Persistência *in vivo*

	Intratraqueal (IT)	Intravenosa (IV)
Tempo (h), pós injeção	Atividade de aiPLA ₂ em nmol/h/mg de proteína	
0	8,84 ± 0,35 (100)	8,85 ± 0,3 (100)
4	1,56 ± 0,03 (18)	1,45 ± 0,07 (16)
12	1,61 ± 0,04 (18)	1,58 ± 0,04 (18)
24	1,63 ± 0,14 (18)	1,77 ± 0,11 (20)
36	2,04 ± 0,04 (27)	2,14 ± 0,03 (24)
48	2,95 ± 0,10 (33)	3,03 ± 0,05 (34)
72	8,78 ± 0,18 (99)	8,49 ± 0,10 (96)

Tabela 6: Atividade de Prdx6-PLA₂ de homogenato de pulmão de camundongo em aumento de tempo após a injeção de IT ou IV de PIPs

	Intratraqueal (IT)* PIP-1	Intravenoso (IV) PIP-1	IT* PIP-2	IV PIP-4
Tempo, pós injeção	Atividade de Prdx6-PLA ₂ nmol/h/mg de proteína			
0	9,0 ± 0,2	8,8 ± 0,3	8,1 ± 0,3	8,0 ± 0,7
4 h	1,6 ± 0,1	1,4	-	-
12 h	1,6 ± 0,1	1,5	-	-
24 h	1,7 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,2 ± 0,02	1,1 ± 0,02

48 h	2,9 ± 0,2	-	3,0 ± 0,2	2,8 ± 0,2
72 h	-	-	8,3 ± 0,9	7,8 ± 1,2
96 h	-	-	-	8,1 ± 0,2

* Os pulmões foram lavados antes do ensaio para evitar possíveis efeitos do peptídeo SP-A não internalizado.

Exemplo 2: Curso de tempo da lesão após IT LPS.

[0100] O lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (*E. coli*) foi administrado a camundongos C57Bl/6 de tipo selvagem por injeção intratraqueal (IT) a 5 µg/g de peso corporal. Os camundongos foram sacrificados em 12, 16, 24 ou 48 horas após LPS como indicado. Os pulmões foram removidos e lavados com solução salina através da traqueia para obtenção do LBA; o pulmão foi então homogeneizado. Os parâmetros medidos foram células nucleadas e proteínas no BALF, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), 8-isoprostanos e carbonilas de proteínas no homogenato de pulmão e a razão de peso úmido de pulmão para peso seco (P/D). Os valores são médios + para n = 4.

[0101] Como mostrado na Figura 2, células aumentadas em BALF refletem inflamação, proteína em BALF e razão de peso úmido/seco aumentada refletem permeabilidade alveolar alterada, TBARS e 8-isoprostanos refletem peroxidação lipídica da membrana celular e carbonilas de proteína refletem oxidação de proteínas do tecido. Todos esses efeitos são característicos da síndrome de ALI. Há lesão pulmonar significativa após uma dose única de LPS que permanece essencialmente inalterada entre 12 a 24 horas após o LPS. A recuperação parcial é observada em 48 horas. A lesão pulmonar com LPS é relativamente estável em 12 a 24 horas; presumivelmente, isso reflete um equilíbrio entre a lesão pulmonar em curso e os processos de recuperação. Os dados são apresentados na Tabela 7, abaixo.

Tabela 7: Curso de tempo da lesão após IT LPS

Condição	# de células em BALf (x 10 ⁴ /g em peso corporal)	Proteína Total em BALf (µg/g em peso corporal)	TBARS em pmol/mg de prot.	8 - Isoprostanos em pmol/mg de prot.	Carbonilas de proteína em nmol/mg de prot.	Razão em peso seco/úmido de pulmão
Controle	0,97 ± 0,06	77 ± 2	75 ± 2,03	0,33 ± 0,03	5,6 ± 0,2	5,61 ± 0,02
LPS, sacrifício@12 h	7,94 ± 0,54	153 ± 4	374 ± 14	1,01 ± 0,11	15,9 ± 0,7	8,35 ± 0,15
LPS, sacrifício@16 h	8,43 ± 0,15	156 ± 3	379 ± 2,2	1,05 ± 0,04	16,7 ± 0,4	8,32 ± 0,15
LPS, sacrifício@24 h	8,57 ± 0,53	162 ± 2	368 ± 12	1,04 ± 0,13	16,4 ± 1,4	7,84 ± 0,34
LPS, sacrifício@48 h	5,20 ± 0,2	107 ± 1	214 ± 9,4	0,75 ± 0,02	8,52 ± 0,3	6,39 ± 0,4

LPS 5 µg/g

Exemplo 3: PIP-2 protege contra lesão pulmonar

[0102] O modelo IT de lesão pulmonar aguda (LPA), conforme mostrado na Tabela 9, foi usado para testar os efeitos do PIP-2. PIP-2 (2 µg/g de peso corporal) em lipossomas foi administrado IT juntamente com LPS (0 horas) ou intravenosamente (IV) 12 ou 16 horas após LPS. A administração IV de PIP-2 foi usada para evitar um segundo “ataque” à traqueia. Os camundongos foram sacrificados em 24 horas e os pulmões foram avaliados quanto a lesão conforme descritos na Tabela 9. A proteção (%) contra lesão pulmonar foi calculada como $[1 - (\text{lesão com PIP-2} - \text{controle}) / (\text{apenas LPS} - \text{controle})]$. Os resultados são média + SE para n = 4. * P < 0,01 vs controle. † P < 0,01 vs sem PIP, 24 horas.

[0103] Como mostrado na Figura 3, a administração de PIP-2 junto com LPS preveniu completamente a lesão pulmonar quando avaliada 24 horas após a administração de LPS. PIP-2 administrado em 12 ou 16 horas após LPS forneceu cerca de 85 a 95 % de proteção contra lesão pulmonar avaliada em 24 horas após LPS. Os efeitos do PIP-2 são muito dramáticos. PIP-2 ou PIP-4 previne lesão pulmonar quando administrado no momento 0 e quando administrado em 12 a 16 horas, evita lesões adicionais permitindo que o pulmão danificado se cure durante o

intervalo entre 12 a 16 horas após LPS e o sacrifício @ 24 horas (h) Assim, PIP-2 e PIP-4 podem prevenir e tratar lesões pulmonares. Os dados para vários marcadores de lesão pulmonar são apresentados nas Tabelas 8 a 11.

Tabela 8: Efeito de PIP-2 na inflamação e edema após LPS

Condição	# de células x10 ⁴ /g em peso	mg de proteína/g em peso	Razão em peso de pulmão seco/úmido
Controle Sem LPS	0,95 ± 0,16	75 ± 1,3	5,59 ± 0,03
LPS (IT) sacrifício@24 h	8,67 ± 0,53	164 ± 2	8,10 ± 0,22
LPS IT, PIP-2 IT@0 h Sacrifício em 24 h	0,92 ± 0,02	71 ±	5,50 ± 0,04
LPS IT, PIP-2 IV@12 h Sacrifício em 24 h	1,45 ± 0,03	84 ± 1,2	5,95 ± 0,02
LPS IT, PIP-2 IV @ 16 h, Sacrifício em 24 h	1,43 ± 0,2	82,0 ± 1,2	6,19 ± 0,06

N = 4, PIP-2 concentração (2 µg/g em peso de camundongos), LPS 5 µg/g

Tabela 9: Efeito de PIP-2 na oxidação do tecido pulmonar após LPS

Condição	TBARS em pmol/mg de prot.	8 -Isoprostanos em pmol/mg de prot.	Carbonilas de proteína em nmol/mg de prot.
Controle (sem LPS)	75 ± 1,3	34 ± 3	5,6 ± 0,2
LPS em lipossomas (IT) Sacrifício@24 h	381 ± 4,5	101 ± 7	16,9 ± 0,4
LPS IT, PIP-2 IT@ 0 h Sacrifício em 24 h	70 ± 2,1	31 ± 2	5,4 ± 0,1

LPS IT, PIP-2 IV @12 h Sacrifício em 24 h	85 ± 5,2	38 ± 1	6,4 ± 0,2
LPS IT, PIP-2 IV@16 h Sacrifício em 24 h	89 ± 9,3	40 ± 1	6,4 ± 0,3

N = 4, concentração de PIP (2 µg/g em peso de camundongos), LPS 5 µg/g

Tabela 10: Efeito de PIP-4 em inflamação e edema depois de LPS

Condição	# de células x10 ⁴ /g em peso	µg de proteína/g em peso	Razão em peso de pulmão seco/úmido
Controle (PIP em Lipossomas)	0,96 ± 0,03	78 ± 2	5,59 ± 0,02
LPS em lipossomas (IT) sacrifício@24 h	8,5 ± 0,46	166 ± 3	7,40 ± 0,31
LPS IT, PIP-4 IT@ 0 h Sacrifício em 24 h	0,95 ± 0,02	77 ± 3	6,1 ± 0,01
LPS IT, PIP-4 IV@12 h Sacrifício em 24 h	1,46 ± 0,25	85 ± 2	5,94 ± 0,05
LPS IT, PIP-4 IV @ 16 h, Sacrifício em 24 h	1,44 ± 0,12	83 ± 1	6,12 ± 0,09

N = 4; concentração de PIP, 2 µg/g em peso de camundongos, LPS 5 µg/g

Tabela 11: Efeito de PIP-4 na oxidação do tecido pulmonar depois de LPS

Condição	TBARS em pmol/mg de prot.	8 -Isoprostanos em pmol/mg de prot.	Carbonilas de proteína em nmol/mg de prot.
Controle (PIP em Lipossomas) IT	76 ± 2	34 ± 1	5,8 ± 0,2
LPS em lipossomas (IT) Sacrifício@24 h	374 ± 4	1,02 ± 3	16,9 ± 0,4

LPS IT, PIP-4 IT@ 0 h Sacrifício em 24 h	78 ± 4	32 ± 2	5,9 ± 0,3
LPS IT, PIP-4 IV @12 h Sacrifício em 24 h	84 ± 2	0,38 ± 1	6,4 ± 0,1
LPS IT, PIP-4 IV@16 h Sacrifício em 24 h	85 ± 2	0,39 ± 1	6,4 ± 0,1

n = 4, concentração de PIP (2 µg/g em peso de camundongos), LPS 5 µg/g

Exemplo 4: PIP-2 é estável como um pó seco.

[0104] A atividade de aiPLA₂ foi medida em intervalos para determinar por quanto tempo o peptídeo poderia manter sua eficácia como um inibidor da atividade de aiPLA₂. O peptídeo manteve-se estável durante 4 meses de observação.

Tabela 12: Atividade de PIP-2 durante 4 meses de armazenamento como um pó seco em temperatura ambiente indica estabilidade.

amostra	atividade de aiPLA ₂ em nmol/min/mg de prot.
Nenhum PIP-2	100 ± 4,0
PIP-2, 0 dias	29,7 ± 2,9
30 d	31,1 ± 1,3
45 d	31,8 ± 1,0
60 d	32,8 ± 0,9
90 d	29,9 ± 1,1
120 d	31,9 ± 2,4
Nenhum PIP-2, 120 d	103 ± 4,7

Exemplo 5:

[0105] Os materiais e métodos usados nos exemplos a seguir são descritos

aqui.

Animais

[0106] Camundongos nulos C57Bl/6J ou NADPH oxidase (Nox2) foram obtidos do Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) e foram mantidos sob ar filtrado por HEPA com 12 h de ciclos de luz/escuridão nas instalações do University of Pennsylvania Laboratory Animal Resources (ULAR).

Reagentes

[0107] A pureza estimada dos peptídeos, avaliada por espectroscopia de massa, foi > 89 %. Lipopolissacarídeo (LPS) derivado de Escherichia coli 0111:B4 membranas celulares e purificado por cromatografia de filtração em gel foi obtido de Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, EUA, cat # L3012). O kit de ensaio amplex red/rábano peroxidase (HRP) (cat. # A22188) e os adutos de carboxi de diacetato de difluorofluoresceína reduzida (DFF-DA, cat. # 13293) foram adquiridos da Life Technologies, Grand Island, NY, EUA (através da Thermo-Fisher Scientific). A angiotensina II (Ang II) foi obtida de Bachem, Torrance, CA, EUA (cat. # 4095850.0005). Lipídios autênticos foram adquiridos da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA e os lipossomas foram preparados por evaporação até à secura seguida de reconstituição em solução salina como descrito anteriormente para refletir a composição do surfactante pulmonar; a composição do lipossoma era, na fração molar, 0,5 dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), 0,25 fosfatidilcolina de ovo (PC), 0,10 fosfatidilglicerol (PG) e 0,15 colesterol. O PIP-2 quando adicionado era 0,15 µg de PIP-2/µg de lipídio.

Administração de LPS e PIP-2

[0108] Camundongos anestesiados receberam LPS (5 ou 15 µg/g de peso corporal) em 20 µl de solução salina que foi instilada no pulmão através de um cateter endotraqueal colocado ao nível da carina traqueal. Mostramos anteriormente que PIP-2 é ineficaz se injetado sozinho, enquanto inibe a atividade de aiPLA₂ com um ½ tempo

de ~ 50 h se encapsulado em lipossomas. O PIP-2 em lipossomas foi suspenso em 20 µl de solução salina para injeção IV ou IT. Para estudos para avaliar o efeito de PIP-2 no tempo zero, a administração de LPS foi seguida por lipossomas ± PIP-2 também administrados por instilação IT. Para estudos para avaliar o efeito de PIP-2 administrado posteriormente após LPS, os lipossomas ± PIP-2 foram administrados por injeção em uma artéria retiniana. Esta mudança na via de administração foi usada para minimizar os danos à traqueia do camundongo que poderiam ocorrer com a traqueostomia repetida e levar a efeitos adversos no pulmão. A dose de PIP-2 usada para o tratamento após LPS intratraqueal foi de 2 µg/g de peso corporal do camundongo; em camundongos de controle, esta dose de PIP-2 demonstrou inibir a atividade de aiPLA₂ do pulmão ao máximo por pelo menos 24 h. Demos a segunda dose de PIP-2 às 12 horas para ter certeza da cobertura máxima e, em seguida, passamos a cada 24 horas para a administração de PIP-2. Para o modelo de sepse, LPS (15 µg/g de peso corporal) em 20 µl de solução salina foi injetado intraperitonealmente e os camundongos foram tratados com PIP-2 IV a 2 ou 20 µg/g de peso corporal; observe que a dose inicial de PIP-2 para este modelo de sepse foi IV, não IT. Usamos os mesmos tempos de administração do PIP-2 no modelo de sepse que foram usados para o modelo IT LPS. Após a recuperação da anestesia, todos os camundongos foram mantidos no biotério com acesso *ad lib* a comida e água.

Avaliação de lesão pulmonar

[0109] No final de cada experimento com IT LPS (em 24 ou 120 h), os camundongos sobreviventes foram sacrificados por exsanguinação sob anestesia. Os pulmões *in situ* foram limpos de sangue por perfusão através da artéria pulmonar e, em seguida, foram lavados através da traqueia com solução salina. O pulmão foi então removido do tórax para ensaios de tecido. Avaliamos o efeito do LPS na lesão pulmonar medindo o número de células nucleadas e o conteúdo de proteína no fluido de lavagem broncoalveolar pulmonar (BALf), a razão de peso de pulmão úmido para

pulmão seco usando o lóbulo superior esquerdo do pulmão e produtos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), 8-isoprostanos e carbonilas de proteínas no homogenato do pulmão para determinar a oxidação dos componentes lipídicos e proteicos do tecido pulmonar. Para estudos de mortalidade de camundongos, os gráficos de sobrevivência foram construídos usando o estimador Kaplan-Meier.

Medição da produção de ROS do pulmão e atividade de aiPLA₂

[0110] O efeito dos PIPs na produção de ROS em pulmões de controle (não tratados) foi determinado *in vitro* com pulmões isolados em perfusão. O PIP-2 em lipossomas foi administrado a 2 µg/g de peso de camundongo pela via IV. Após 30 minutos, os camundongos foram anestesiados e os pulmões foram isolados, limpos de sangue e perfundidos em um sistema de recirculação com perfusato contendo Ang II (50 µM) como um ativador Nox2 e Amplex red mais peroxidase de rábano para detectar ROS. Pulmões de camundongos de tipo selvagem e pulmões de camundongos nulos de NOX2 que não foram tratados com PIP-2 foram usados como controles. A taxa basal de produção de ROS foi avaliada com pulmões WT que foram perfundidos na ausência de Ang II. O protocolo de perfusão incluiu um período de equilíbrio de 15 min seguido por um período experimental de 60 min. Alíquotas de perfusato foram retiradas em intervalos de 15 minutos e analisadas por fluorescência para resorufina ($\lambda_{\text{excitação}}$ 568 nm, $\lambda_{\text{emissão}}$ 581 nm), o produto da oxidação do Amplex red. A taxa de oxidação do Amplex red foi calculada e expressa como unidades de fluorescência arbitrárias (AFU) com normalização para peso corporal de camundongo. Houve uma baixa taxa de oxidação do Amplex red na ausência de HRP no perfusato (~ 7 % da fluorescência estimulada por AngII), indicando uma oxidação não mediada por ROS do fluoróforo; este valor foi subtraído para obter os valores relatados.

[0111] Para determinar a produção de ROS no pulmão após o tratamento com LPS, camundongos intactos foram tratados com LPS (5 µg/g) ± PIP-2 (2 µg/g). Os camundongos foram anestesiados às 6, 12, ou 24 horas após o tratamento com LPS

e os pulmões *in situ* foram limpos de sangue e então perfundidos por 10 minutos com solução salina contendo o fluoróforo DFF-DA que é hidrolisado intracelularmente em DFF. Os pulmões foram então homogeneizados e a fluorescência do homogenado foi medida em Ex 495 nm, Em 525 nm. A fluorescência pulmonar foi expressa como AFU por minuto de perfusão com normalização para o peso corporal do camundongo.

Análise Estatística

[0112] Os dados são expressos como média \pm erro padrão (SE). A inclinação dos gráficos lineares foi calculada pelo método dos mínimos quadrados médios. O software SigmaStat (Jandel Scientific, San Jose, CA) foi usado para avaliar a significância estatística. Os valores médios das diferenças entre os grupos foram avaliados por ANOVA de 1 fator seguido do teste post hoc de Bonferroni. Para comparação de 2 grupos, as médias foram comparadas pelo teste t de Student. As diferenças entre os valores médios foram consideradas estatisticamente significativas a $P < 0,05$.

Resultados:

Inibição da produção de ROS do pulmão por PIP.

[0113] De modo a confirmar o efeito inibitório dos compostos PIP na ativação de NOX2, estudamos a produção de ROS pelo pulmão isolado perfundido na presença de Ang II, um conhecido ativador de NOX2. Oxidação Amplex red foi usada como um índice de produção de ROS. Houve uma taxa de linha de base muito baixa de produção de ROS em pulmões perfundidos sob condições de controle, ou seja, nenhum estimulante adicionado da atividade de NOX2 (Figura 8, WT basal). A produção de ROS foi acentuadamente aumentada com a adição de Ang II ao perfusato para ativar NOX2 (Figura 8, controle de WT). A geração de ROS foi diminuída em 76 % em NOX2 nulo em comparação com pulmões WT, indicando que NOX2 é a principal fonte de ROS que entra no perfusato após a estimulação de Ang II. A adição de PIP-2 (em lipossomas) aos pulmões WT inibiu a produção de ROS (~ 75 %) de forma

semelhante ao NOX2 nulo, como mostrado anteriormente. Assim, PIP-2 resultou em inibição essencialmente total da geração de ROS mediada por NOX2.

[0114] Em seguida, determinamos o efeito de PIP-2 (em lipossomas) na atividade de aiPLA₂ e produção de ROS nos pulmões após LPS. Esses parâmetros foram determinados 6, 12 e 24 horas após a administração de IT LPS. A atividade de aiPLA₂ no homogenato de pulmão aumentou em ~ 50 % em comparação com o controle 6 h após o tratamento com LPS e aumentou em outros 50 % em 12 e 24 h (Figura 9A). Usamos um fluoróforo intracelular (DFF-DA) para determinar a geração de ROS no pulmão. A fluorescência induzida por ROS foi muito baixa no pulmão de controle não tratado com LPS, mas aumentou ~ 10 vezes em 6 h e ~ 20 vezes em 12 e 24 h nos pulmões de camundongo tratados com LPS (Figura 9B). Este aumento na fluorescência DFF do pulmão após LPS pode ser ligeiramente subestimado devido à diluição do sinal da presença de edema nesses pulmões (ver abaixo). O pré-tratamento de camundongos com PIP-2 antes da administração de LPS resultou em uma diminuição dramática na atividade de aiPLA₂ e na fluorescência gerada por ROS em todos os 3 períodos de tempo para valores semelhantes ao controle não tratado com LPS. Esses resultados indicam que a administração intratraqueal de LPS resulta no aumento da produção de ROS no pulmão, que é mantida por pelo menos 24 horas e pode ser inibida quase totalmente pelo pré-tratamento dos pulmões com PIP-2.

Curso de tempo para lesão pulmonar mediada por LPS

[0115] A sensibilidade à lesão mediada por LPS varia significativamente entre as linhagens de camundongos. Para este estudo, determinamos o curso da lesão pulmonar para camundongos C57Bl/6J que receberam IT LPS a 5 µg/g de peso corporal (Figuras. 2A a 2F). Os pulmões mostraram lesões consideráveis quando avaliados 12 h após LPS, conforme indicado pelo aumento de células nucleadas no BALf, aumento da proteína BALf e aumento da razão de peso úmido para seco ($p < 0,05$). Esses resultados são compatíveis com inflamação pulmonar (células em

BALf), alteração da barreira de permeabilidade alvéolo-capilar (proteína BALf) e acúmulo de fluido pulmonar (peso úmido/seco do pulmão). O aumento no tecido pulmonar TBARS, 8-isoprostanos e carbonilas de proteínas indica estresse oxidativo com oxidação de lipídios do tecido pulmonar e componentes de proteínas. Esses índices de lesão pulmonar mostraram valores semelhantes em 12, 16 ou 24 h após LPS (Figuras 2A a 2F), indicando que o grau de lesão pulmonar era essencialmente estável em 12 a 24 h após esta dose não letal de LPS. A recuperação parcial (~ 50 %, $p < 0,05$) nos índices de lesão pulmonar foi observada em 48 horas, embora eles ainda estivessem elevados em comparação com o controle ($p < 0,05$).

Efeito de PIP-2 na lesão pulmonar mediada por LPS

[0116] Para estudar o efeito da administração de PIP-2 na lesão pulmonar, os camundongos foram tratados com LPS (5 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal) dado IT. A dose de LPS foi escolhida com base em nossos estudos anteriores usando o mesmo lote de LPS que mostrou um nível relativamente baixo de lesão pulmonar com 1 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal e maior lesão sem mortalidade significativa usando 5 μg de LPS/g de peso corporal. PIP-2 (2 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal em lipossomas) foi administrado a 0, 12, ou 16 h após o LPS. Mostramos anteriormente que esta dose de PIP-2 pode inibir a atividade de aiPLA_2 do pulmão em ~ 90 % por pelo menos 24 horas. O PIP-2 recebeu TI no tempo zero e IV às 12 ou 16 horas para evitar danos excessivos à traqueia. Os animais foram sacrificados e os pulmões examinados 24 horas após o LPS. Todos os índices de lesão pulmonar, refletindo inflamação pulmonar, disfunção da barreira alveolar-capilar, acúmulo de fluido pulmonar e estresse oxidativo nos tecidos, foram elevados em camundongos tratados com LPS em comparação com o controle ($p < 0,05$). O PIP-2 administrado no tempo 0 evitou completamente a lesão pulmonar quando avaliado 24 h após LPS (Figuras 3A a 3F). Índices de lesão de tecido em pulmões de camundongos tratados com PIP-2 em 12 e 16 h também diminuíram marcadamente em comparação com LPS sozinho e os valores não foram

significativamente diferentes dos valores de controle (Figuras 3A a 3F). Uma vez que a lesão pulmonar estava presente nos pulmões em 12 e 16 h após LPS, os valores normais em 24 h em pulmões de camundongos tratados com LPS que receberam PIP-2 em 12 ou 16 h só podem significar que os pulmões foram capazes de se recuperar totalmente de sua lesão durante o intervalo de 8 a 12 horas entre a administração de PIP-2 e o exame dos pulmões.

O tratamento com PIP-2 previne a mortalidade de camundongos com altas doses de LPS.

[0117] Embora os camundongos tratados com LPS de baixa dose (5 µg/g de peso corporal) sofram lesão pulmonar significativa, é transitória e essencialmente todos os camundongos se recuperarão do insulto (não mostrado). Para testar o efeito do tratamento com PIP-2 com um modelo de lesão mais grave, os camundongos receberam uma dose mais alta de LPS (15 µg/g de peso corporal). Os dados de sobrevivência são plotados com o tratamento PIP-2 inicial como tempo 0; O LPS foi administrado 12 h antes do PIP-2 (-12 h que está fora do gráfico na Figura 7A e Figura 7B). Com esta dose mais alta de LPS, os camundongos que foram tratados com placebo (lipossomas sozinhos) mostraram 73 % de mortalidade durante as 24 horas após o LPS e 100 % de mortalidade em 48 horas. Para o braço de tratamento, PIP-2 foi administrado a camundongos em 12, 24, 48, 72 e 96 h após LPS e os camundongos foram sacrificados em 120 h; os camundongos tratados com PIP-2 mostraram apenas 17 % de mortalidade (83 % de sobrevivência) 36 h após o início do tratamento com PIP-2 e não tiveram mortalidade adicional durante o período de observação. Além do efeito sobre a mortalidade, uma diferença marcante foi observada no comportamento dos camundongos que receberam PIP-2 após LPS com um retorno da maioria dos camundongos à atividade física normal 12 h após receber PIP-2. Os índices de lesão pulmonar em camundongos tratados que foram sacrificados 120 h após LPS não mostraram nenhuma anormalidade (Tabela 13).

Tabela 13. Lesão pulmonar é reparada em camundongos que sobrevivem a altas doses de LPS.

0	Células BALf X10 ⁴ /g em peso corporal.	Proteína BALf µg/g em peso	Razão de úmido/seco	TBARS em pmol/mg de prot.	8-isoprostanos em pmol/mg de prot.	Carbonilas de proteína em nmol/mg de prot.
Controle (sem LPS)	0,95 ± 0,04	75 ± 1,3	5,59 ± 0,03	76 ± 6	34 ± 3	5,6 ± 0,2
LPS +PIP-2	0,96 ± 0,40	78 ± 2,2	5,34 ± 0,03	77 ± 1	34 ± 3	5,6 ± 0,2

[0118] Os camundongos foram instilados com LPS (15 µg/g em peso); PIP-2 (2 µg/g de peso corporal) em lipossomas foi injetado (IV) nos tempos mostrados na Figura 7A. Cinco dos camundongos sobreviventes foram sacrificados 120 h após o LPS; camundongos de controle receberam lipossomas, mas não LPS. BALf, fluido de lavagem broncoalveolar; TBARS, substâncias reativas tiobarbitúricas. Os valores são média ± SE para N = 4 para controle e N = 5 para LPS + PIP-2. Nenhum dos valores médios para LPS + PIP-2 são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$) do controle correspondente.

[0119] Em seguida, avaliamos o efeito de PIP-2 em camundongos que receberam LPS (15 µg de LPS/g de peso corporal) pela via intraperitoneal como um modelo para ALI associada à sepse sistêmica. Escolhemos a dose de LPS com base em nosso estudo anterior que mostrou 60 % de mortalidade com 10 µg de LPS/g de peso corporal; nosso objetivo era produzir 100 % de mortalidade nos camundongos tratados com placebo, semelhante ao observado com o estudo de IT LPS de alta dose. A sobrevivência de camundongos tratados com placebo (apenas lipossomas) foi inferior a 40 % em 24 h após LPS e 100 % dos camundongos estavam mortos em 48 h (Figura 7B). Em contraste, o tratamento de camundongos com PIP-2 (2 µg/g de peso corporal) aumentou a sobrevida em 36 h após LPS para 86 % e 43 % dos camundongos totalmente recuperados. Com uma dose mais elevada de PIP-2 (20

µg/g de peso corporal), a taxa de sobrevivência a longo prazo foi significativamente maior a 70 %. Assim, o PIP-2 aumentou significativamente a sobrevivência do camundongo neste modelo de LPA associada à sepse sistêmica.

[0120] ALI é uma síndrome de doença grave com uma taxa de mortalidade de aproximadamente 40 %. A inflamação é um fator importante que pode amplificar a lesão pulmonar associada ao insulto primário. Até o momento, não há tratamento farmacológico aprovado para o componente inflamatório da síndrome. Os mecanismos de lesão pulmonar durante a inflamação pulmonar são complexos, mas a produção excessiva de ROS parece desempenhar um papel importante. Mostramos anteriormente que a atividade aiPLA₂ de Prdx6 é necessária para a ativação da produção de ROS por NOX2 e descrevemos vários nonapeptídeos derivados de sequências de proteína A do surfactante pulmonar (SP-A) que inibem a atividade de aiPLA₂ e, portanto, inibem a ativação de NOX2 nas células pulmonares. O presente estudo confirma que esses peptídeos, chamados de peptídeos inibidores de PLA₂ (PIP-2, PIP-4 e PIP-5), inibem a produção de ROS por NOX2 ativado por Ang II no pulmão de camundongo isolado. Embora o PIP-2 pareça ser ligeiramente mais ativo que os outros 2, todos os 3 compostos PIP foram eficazes como inibidores, provavelmente refletindo em parte o alto grau de conservação da sequência de aminoácidos Prdx6 entre as espécies. Demonstramos que o local para ligação do precursor de 16 aminoácidos dos PIPs é à sequência de aminoácidos compreendendo os aminoácidos 195 a 204 de Prdx6. A sequência para este segmento de Prdx6 humano é: SEQ ID NO: 34 195-EEEAKKLFPK-204; a sequência de camundongo correspondente é a mesma para 8 dos 10 aminoácidos com Q em vez de K na posição 200 e C em vez de L na posição 201. Escolhemos PIP-2, o PIP que foi derivado da sequência relevante em SP-humano A, para investigações subsequentes. A sequência de aminoácidos PIP-2 é: SEQ ID NO: 1 LHDFRHHQIL.

[0121] O objetivo principal do presente estudo foi avaliar o efeito do PIP-2 na lesão pulmonar associada à administração intratraqueal de LPS. Demonstramos pela primeira vez que o PIP-2 inibiu marcadamente a geração de ROS mediada por Ang II; Ang II é um conhecido ativador de NOX2 e, como mostramos anteriormente, a ativação requer a atividade de aiPLA₂. Em seguida, mostramos que o tratamento com LPS resultou em um aumento acentuado na atividade de aiPLA₂ dos pulmões e também em um aumento significativo na produção de ROS por meio da ativação de NOX2; tanto o aumento mediado por LPS na atividade de aiPLA₂ quanto a produção de ROS também foram inibidos por PIP-2.

[0122] O primeiro estudo da eficácia do PIP-2 no modelo de lesão pulmonar foi a administração simultânea de PIP-2 com LPS, que protegeu marcadamente contra lesão pulmonar subsequente. As medidas para avaliar a lesão pulmonar aguda após LPS incluíram: a) células nucleadas em BALf (inflamação); b) proteína em BALf (permeabilidade alveolar-capilar); c) razão de peso úmido/seco de pulmão (edema pulmonar); e d) TBARS do pulmão, 8-isoprostanos e carbonilas de proteínas (oxidação de lipídios e proteínas do tecido). Todos esses índices de lesão foram significativamente elevados nos pulmões que foram avaliados 12 a 24 h após a administração de LPS. No entanto, nenhum desses índices de lesão tecidual foi alterado nos pulmões quando PIP-2 foi administrado concomitantemente com LPS. Assim, PIP-2 pode prevenir ALI associada à administração de LPS em camundongos.

[0123] O próximo estudo investigou o efeito do PIP-2 administrado 12 ou 16 h após a administração de LPS como uma modalidade de tratamento (em oposição à preventiva). Conforme mostrado nas Figuras 3A a 3F, a lesão do tecido associada ao LPS não letal é máxima neste momento. Com a administração de PIP-2 12 ou 16 h após o LPS, os parâmetros de lesão pulmonar voltaram aos valores essencialmente normais quando examinados 24 h após o LPS. Nossa conclusão deste estudo é que o PIP-2 preveniu a lesão pulmonar em curso associada ao LPS e permitiu que o

pulmão se autorreparasse durante as 8 a 12 h entre a administração do PIP-2 e o sacrifício do animal.

[0124] Nosso estudo final foi avaliar os efeitos do PIP-2 na função pulmonar e na sobrevivência de camundongos após a administração de uma dose letal de LPS. O PIP-2 administrado a cada 12 a 24 h após a administração de LPS levou a uma melhora dramática do comportamento do camundongo, reduziu marcadamente a mortalidade do camundongo e resultou no retorno dos índices de lesão pulmonar aos valores normais. Assim, o inibidor não peptídico da atividade de PLA₂ de Prdx6 evitou a geração de ROS subsequente à ativação de NOX2 e preveniu a mortalidade associada à administração de uma dose letal de LPS. Estes resultados indicam que PIP-2 pode prevenir e tratar o modelo de rato de ALI induzida por LPS.

[0125] Os presentes resultados com PIP-2 dão uma conclusão semelhante a nossos estudos anteriores que mostraram proteção em LPS induzida por LPS usando vários meios diferentes para inibir a atividade de aiPLA₂ e subsequente ativação de NOX2. Estes incluíram: a) administração de MJ33, um inibidor lipídico da atividade de aiPLA₂; b) uso de camundongos nulos Prdx6 (um modelo menos que perfeito, uma vez que a atividade da peroxidase de Prdx6 também é perdida); e c) camundongos com mutação do aminoácido D140 em Prdx6, um componente essencial do sítio ativo aiPLA₂. O camundongo inibido por MJ33, o camundongo mutante D140A e o camundongo tratado com PIP-2 retêm a atividade da peroxidase de Prdx6, enquanto esta atividade é abolida no camundongo nulo Prdx6. Nestes estudos anteriores, o LPS foi administrado pela via IT em a) e b) como modelo para lesão pulmonar direta e pela via intraperitoneal em c) como modelo para sepse não infecciosa. Propusemos que o mecanismo de proteção conferido por PIP-2 é a inibição da atividade de aiPLA₂ de Prdx6 por efeitos alostéricos resultantes da ligação do peptídeo a Prdx6. Os peptídeos PIP não inibem outras enzimas PLA₂ do pulmão, conforme demonstrado experimentalmente e como esperado com base na dissimilaridade de potenciais locais

de ligação nas diferentes proteínas. A inibição da atividade de aiPLA₂ impede a geração de lisoPC e seus produtos a jusante, evitando assim a ativação de Rac, um cofator necessário para a ativação de Nox2. Curiosamente, a sinvastatina, fármaco redutor de colesterol, também inibe a ativação de Rac e demonstrou inibir a produção de ROS pelas células endoteliais e ser protetora em modelos de camundongo de ALI induzida por LPS. Embora não haja evidências definitivas ainda, é possível que a inibição da ativação de Rac tenha efeitos salutares nas manifestações de ALI não mediadas por ROS, além de seu efeito na ativação de NOX2.

[0126] Os estudos atuais e anteriores mostraram que o NOX2 é a principal fonte de ROS nos pulmões e que a enzima é ativada na presença de LPS. Além do modelo LPS, a geração de ROS por NOX2 demonstrou desempenhar um papel central em vários outros modelos animais relacionados e díspares de ALI, incluindo sepse gram negativa, endotoxina, trauma grave, choque hemorrágico e instilação de ácido oleico. Presumivelmente, uma das principais manifestações do estresse oxidante associado à ativação do NOX2 é a oxidação de macromoléculas teciduais, conforme mostrado no presente estudo. No entanto, outro papel fisiopatológico importante associado às ROS derivadas de NOX2 é baseado na evidência de que as ROS são responsáveis pelos sinais que levam ao recrutamento de neutrófilos para o pulmão e a inflamação pulmonar resultante que é característica de ALI. A diminuição acentuada de células nucleadas em BALf após o tratamento com PIP-2 sugere que esta função de ROS é importante para a recuperação da lesão pulmonar. A esse respeito, um inibidor de peptídeo da proteína substrato da quinase C rica em alanina miristoilada (Marcks) também protege contra lesão pulmonar com LPS em camundongos. Embora este último peptídeo não tenha mostrado inibir a ativação de NOX2, seus efeitos podem ser mediados por meio de motilidade celular alterada que impede o influxo de PMN no pulmão. Assim, PIP-2, sinvastatina, o inibidor da proteína Marcks e possivelmente inibidores de NOX2, como apocinina, todos podem prevenir o influxo

de PMN no pulmão após LPS, revertendo assim a inflamação e a lesão pulmonar associada.

[0127] Com base nos presentes resultados, os inibidores de peptídeos da ativação de NOX2 podem ser eficazes como agentes preventivos para pacientes em risco de LPA, bem como para o tratamento de pacientes com LPA estabelecida. Embora a toxicidade desses pequenos peptídeos não seja esperada com base em sua expressão normal nos pulmões como um componente da proteína SP-A, isso ainda deve ser investigado. O potencial antigênico do peptídeo teoricamente é baixo, mas isso precisará ser confirmado em humanos. Outros possíveis efeitos colaterais dos peptídeos incluem aqueles associados à inibição da ativação de Rac, bem como à perda das funções de sinalização e reguladoras de ROS. Digno de nota, nenhum efeito importante foi relatado até o momento que pudesse estar relacionado à inibição de Rac com o fármaco amplamente utilizado, a sinvastatina. Um “efeito colateral” potencialmente mais importante do tratamento com PIP poderia ser o efeito da produção de ROS inibida na atividade bactericida de células inflamatórias (PMN e AM) que usam ânion superóxido gerado através da atividade de NOX2 para a morte de bactérias. Além disso, foi demonstrado que alguns antibióticos requerem ROS para eficácia máxima. Apesar da possibilidade teórica de uma resposta alterada à infecção, um inibidor da ativação de NOX2 não diminuiu a atividade bactericida de PMN em um modelo LPS de ALI. Isso pode refletir a capacidade das vias não-NOX2 de compensar a perda de ROS derivadas de NOX2. Embora isso enfatize o papel importante da cobertura de antibióticos em pacientes em tratamento com inibidores de NOX2, é importante observar que o uso de antibióticos por si só não foi eficaz na redução da mortalidade por esta doença a um valor significativamente abaixo de 40 %.

[0128] As divulgações de cada uma e todas as patentes, pedidos de patentes e publicações citados neste documento são incorporados neste documento por referência em sua totalidade.

[0129] Embora esta invenção tenha sido divulgada com referência a modalidades específicas, é evidente que outras modalidades e variações desta invenção podem ser concebidas por outros versados na técnica sem se afastar do verdadeiro espírito e escopo da invenção. As reivindicações anexas se destinam a ser interpretadas para incluir todas essas modalidades e variações equivalentes.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende um polipeptídeo que consiste em:

SEQ ID NO: 4 X¹X²X³X⁴X⁵LX⁶X⁷X⁸X⁹HQIL

em que:

X¹ pode estar presente ou ausente e se presente é E;

X² pode estar presente ou ausente e se presente é L;

X³ pode estar presente ou ausente e se presente é Q;

X⁴ pode estar presente ou ausente e se presente é A ou T;

X⁵ pode estar presente ou ausente e se presente é T ou E;

X⁶ é H ou Y;

X⁷ é D ou E;

X⁸ é F ou I; e

X⁹ é R ou K.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o polipeptídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em: SEQ ID NO: 5 ELQTELYEIKHQIL, SEQ ID NO: 6 QTELYEIKHQIL e SEQ ID NO: 7 ELYEIKHQIL.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o polipeptídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em: SEQ ID NO: 1 LHDFRHHQIL, SEQ ID NO: 2 LYEIKHQIL ou SEQ ID NO: 3 LYDIRHHQIL.

4. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que ainda compreende um portador farmacologicamente aceitável.

5. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o polipeptídeo é encapsulado em um ou mais lipossomas.

6. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a composição é formulada para inalação de aerossol ou injeção intratraqueal ou intravenosa.

7. Método de tratamento de lesão pulmonar aguda em um sujeito, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o método compreende administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo que consiste em:

SEQ ID NO: 4 X¹X²X³X⁴X⁵LX⁶X⁷X⁸X⁹HQIL

em que:

X¹ pode estar presente ou ausente e se presente é E;

X² pode estar presente ou ausente e se presente é L;

X³ pode estar presente ou ausente e se presente é Q;

X⁴ pode estar presente ou ausente e se presente é A ou T;

X⁵ pode ser T ou E;

X⁶ é H ou Y;

X⁷ é D ou E;

X⁸ é F ou I; e

X⁹ é R ou K.

e um portador farmacêuticamente aceitável.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em: SEQ ID NO: 5 ELQTELYEIKHQIL, SEQ ID NO: 6 QTELYEIKHQIL e SEQ ID NO: 7 ELYEIKHQIL.

9. Método, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em: SEQ ID NO: 1 LHDFRHQIL, SEQ ID NO: 2 LYEIKHQIL ou SEQ ID NO: 3 LYDIRHQIL.

10. Método, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo é encapsulado em um ou mais lipossomas.

11. Método, de acordo com a reivindicação 7, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a composição farmacêutica é administrada ao sujeito por inalação de aerossol ou por injeção intratraqueal ou intravenosa.

12. Método de tratamento de sepse em um sujeito, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o método compreende administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo que consiste em:

SEQ ID NO: 4 X¹X²X³X⁴X⁵LX⁶X⁷X⁸X⁹HQIL

em que:

X¹ pode estar presente ou ausente e se presente é E;

X² pode estar presente ou ausente e se presente é L;

X³ pode estar presente ou ausente e se presente é Q;

X⁴ pode estar presente ou ausente e se presente é A ou T;

X⁵ pode ser T ou E;

X⁶ é H ou Y;

X⁷ é D ou E;

X⁸ é F ou I; e

X⁹ é R ou K.

e um portador farmacêuticamente aceitável.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em: SEQ ID NO: 5 ELQTELYEIKHQIL, SEQ ID NO: 6 QTELYEIKHQIL e SEQ ID NO: 7 ELYEIKHQIL.

14. Método, de acordo com a reivindicação 12, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em: SEQ ID NO: 1 LHDFRHHQIL, SEQ ID NO: 2 LYEIKHQIL ou SEQ ID NO: 3 LYDIRHHQIL.

15. Método, de acordo com a reivindicação 12, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo é encapsulado em um ou mais lipossomas.

16. Método, de acordo com a reivindicação 12, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a composição farmacêutica é administrada ao sujeito por inalação de aerossol ou por injeção intratraqueal ou intravenosa.

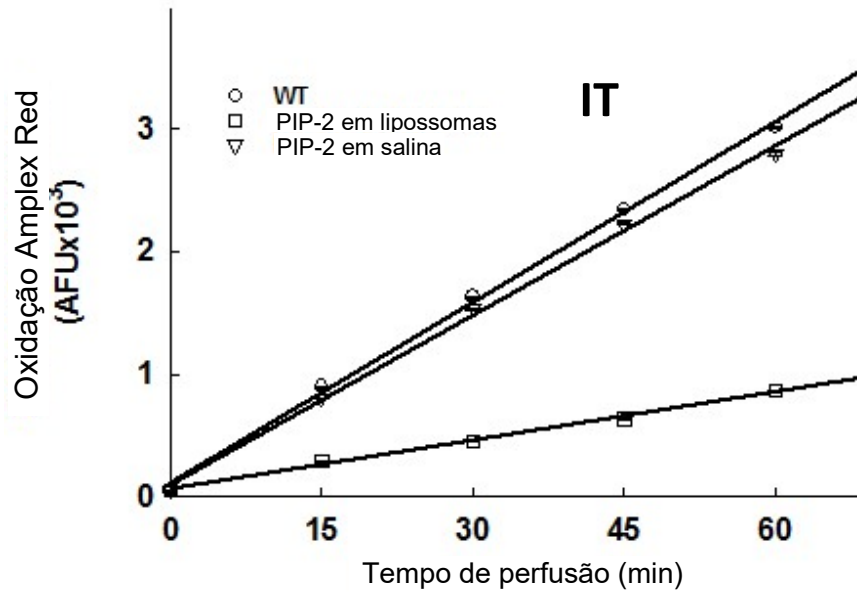


FIG. 1A

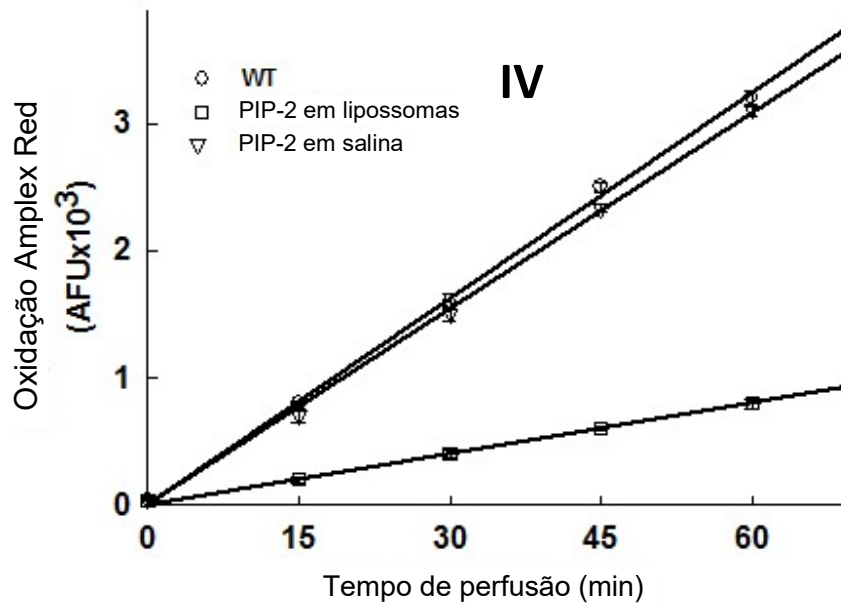


FIG. 1B

FIG. 2C

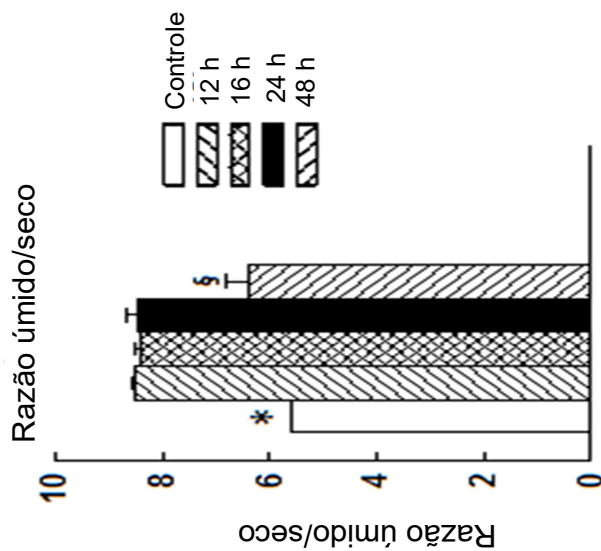


FIG. 2B

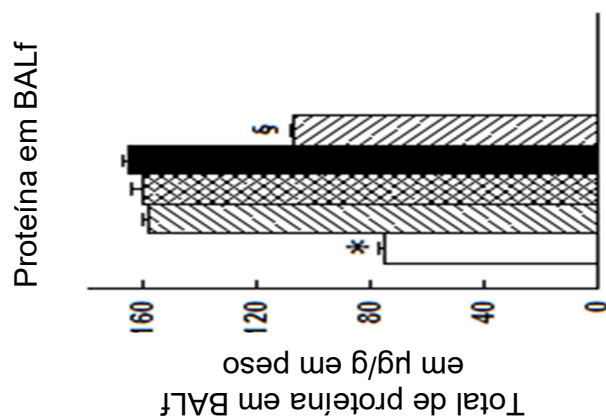


FIG. 2A

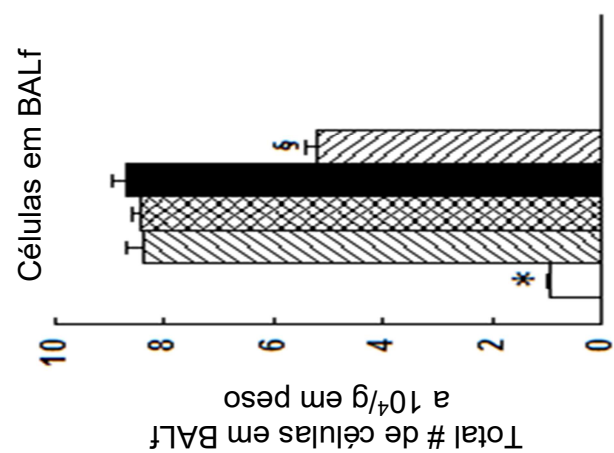


FIG. 2F

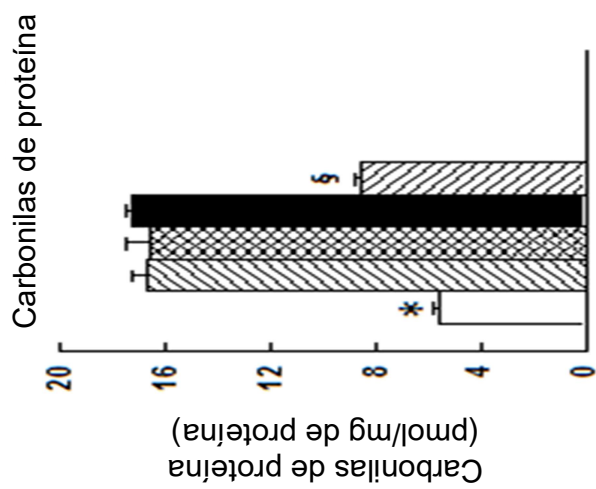


FIG. 2E

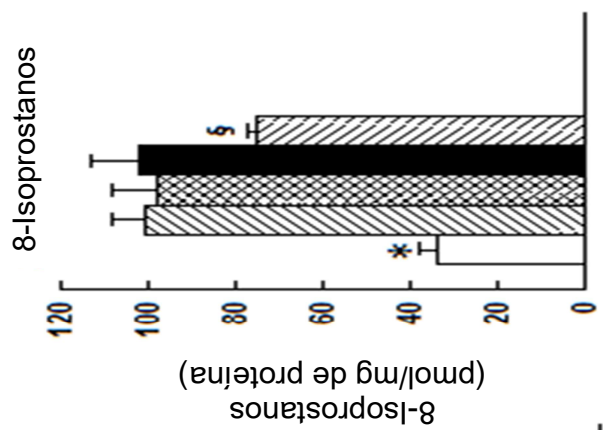


FIG. 2D

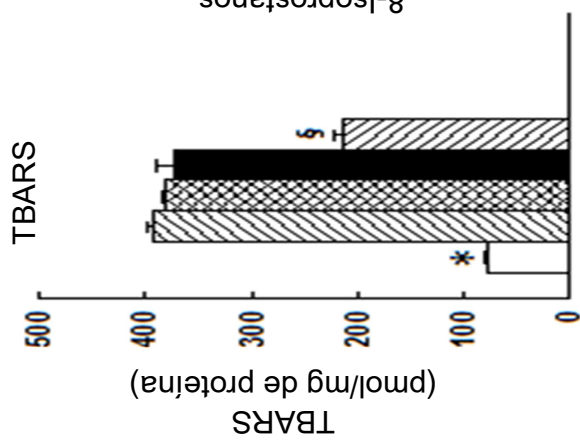


FIG. 3C

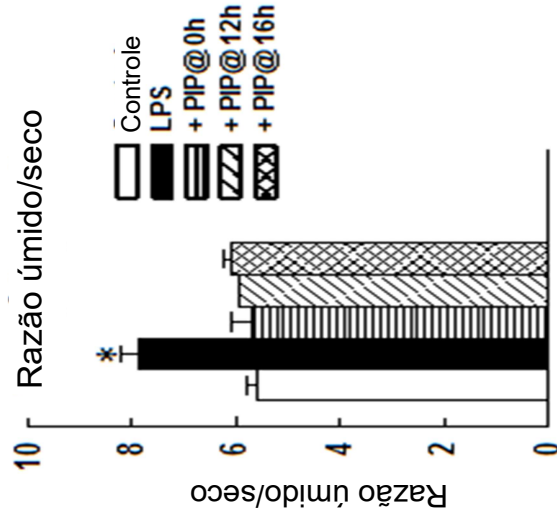


FIG. 3B

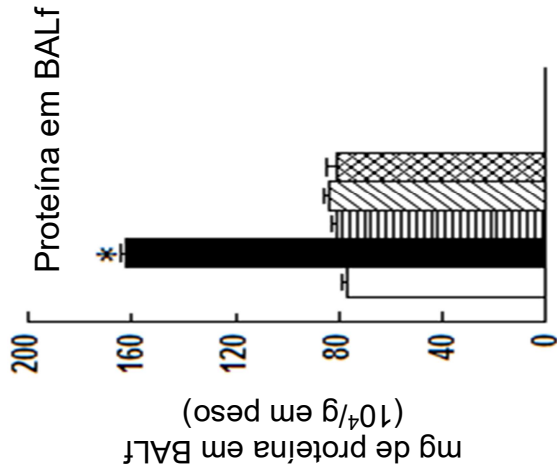


FIG. 3A

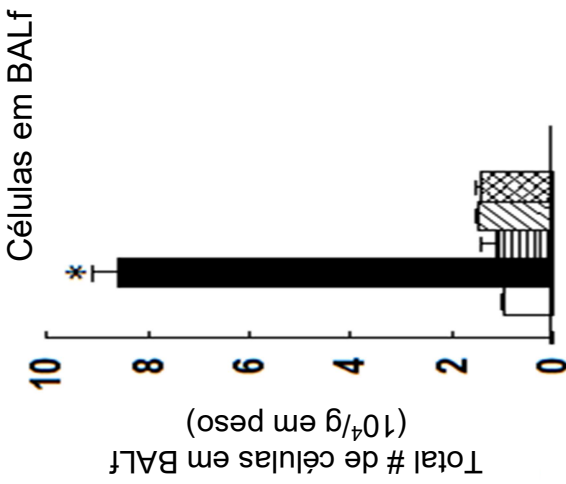


FIG. 3D

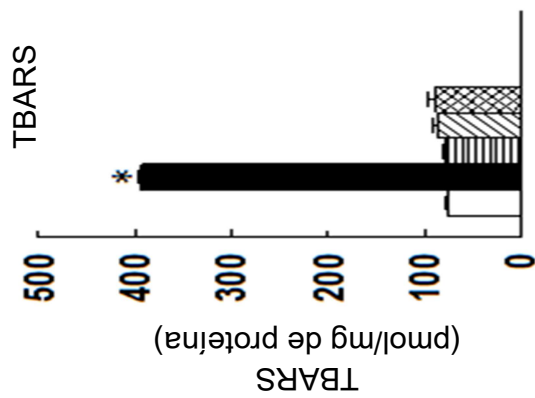


FIG. 3E

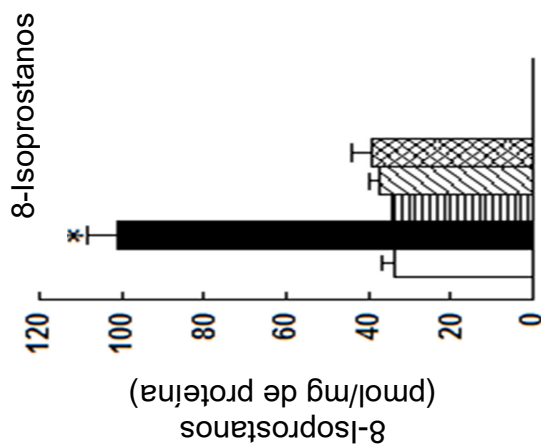
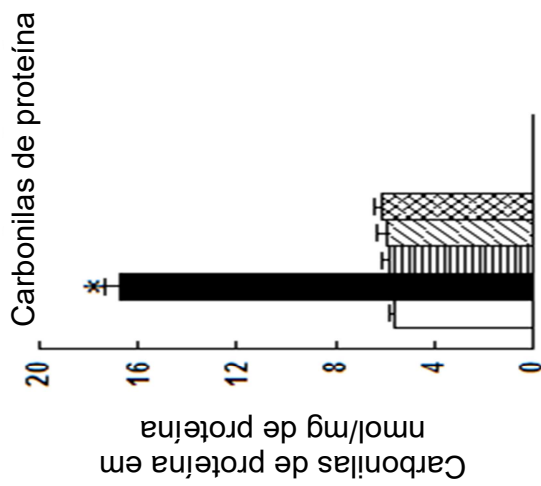


FIG. 3F



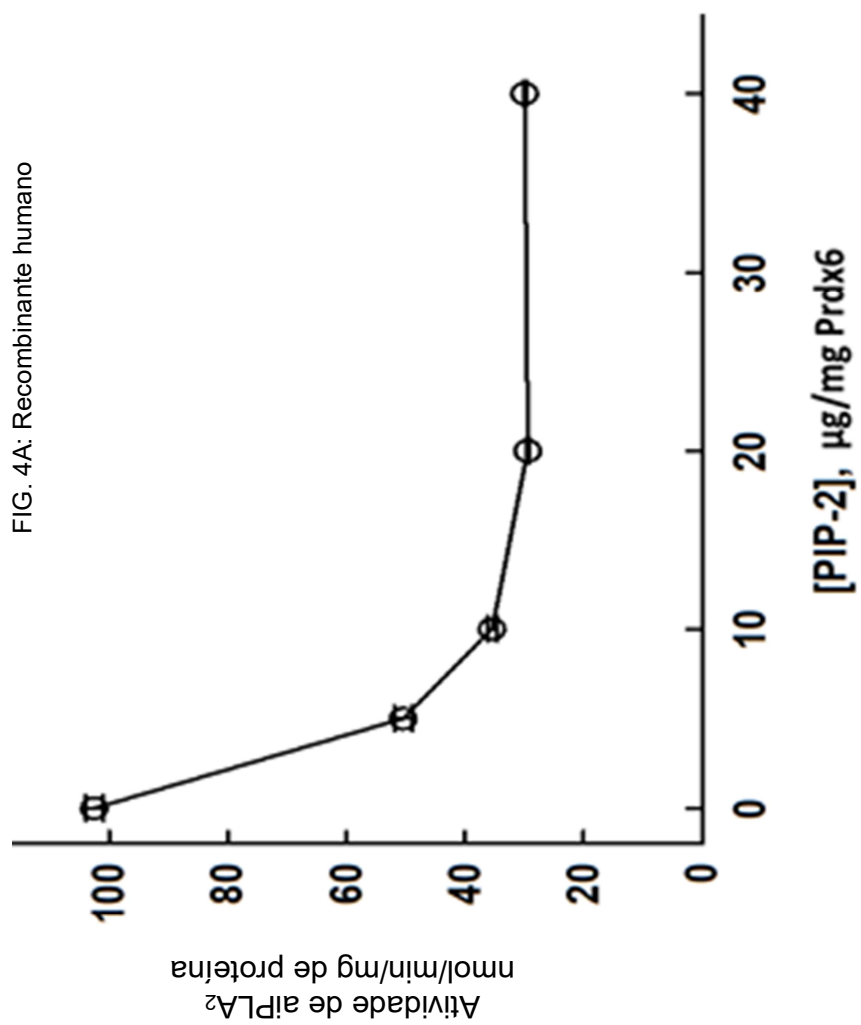


FIG. 4B: pulmão de camundongo

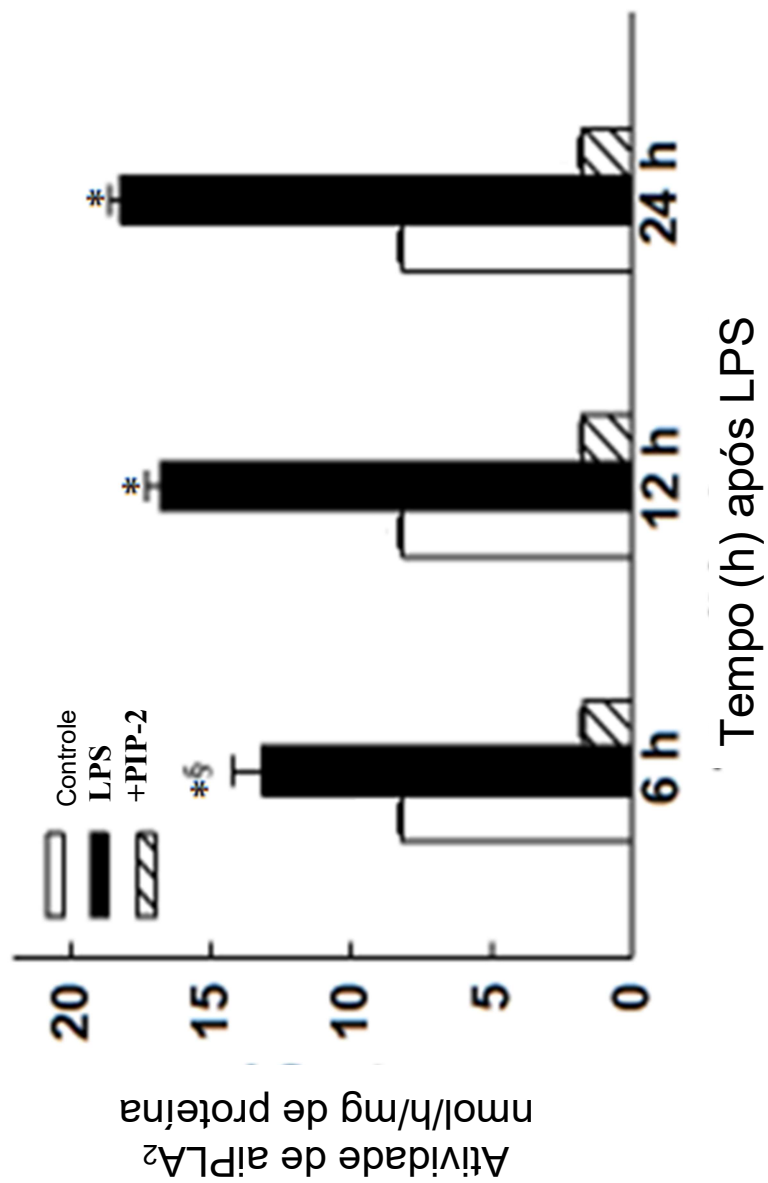
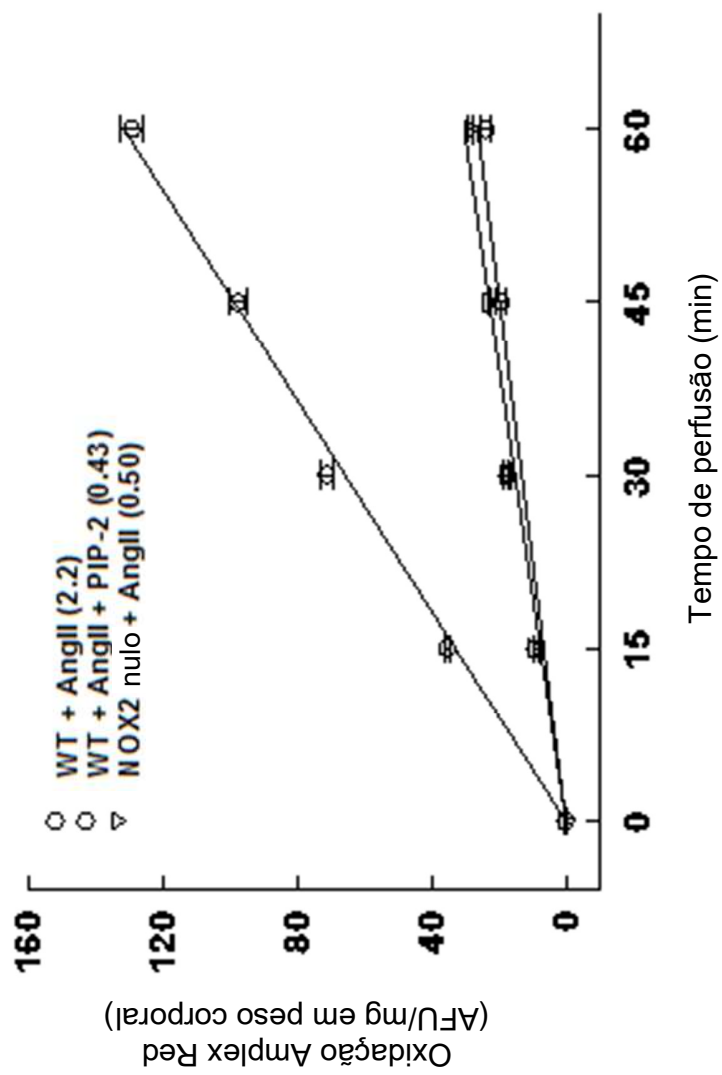
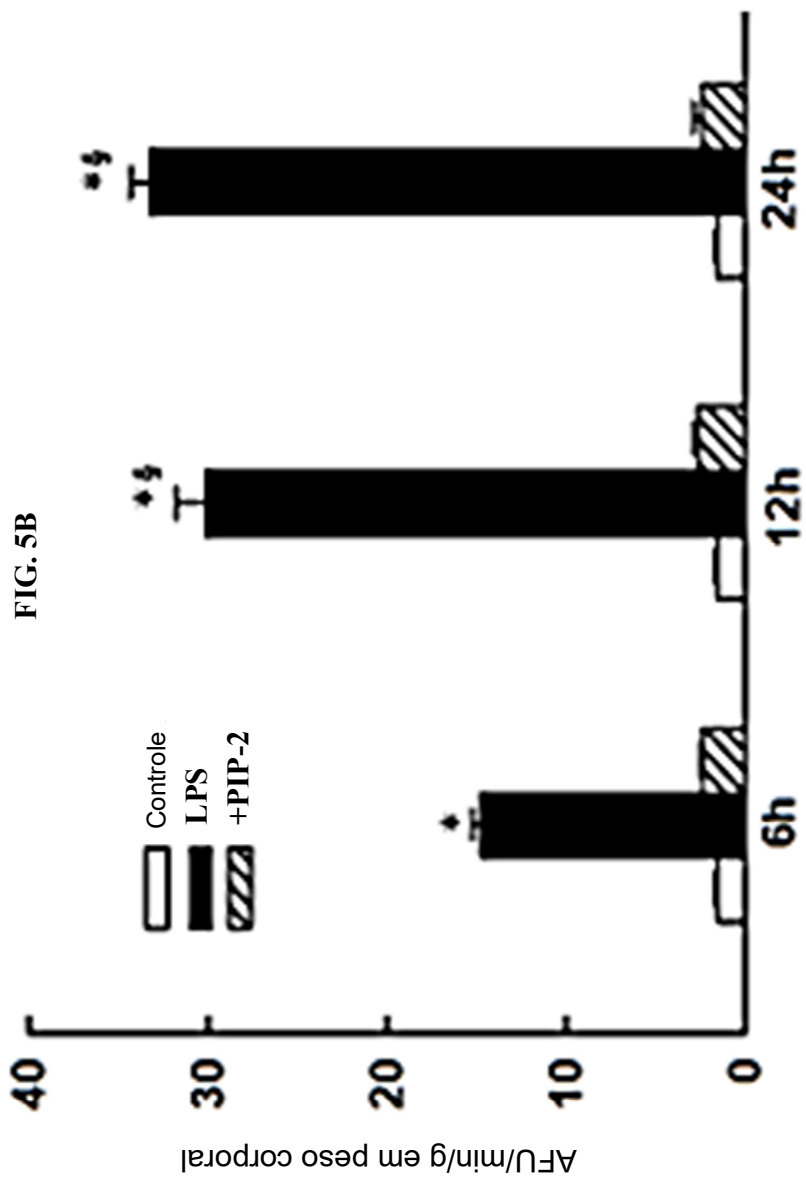


FIG. 5A





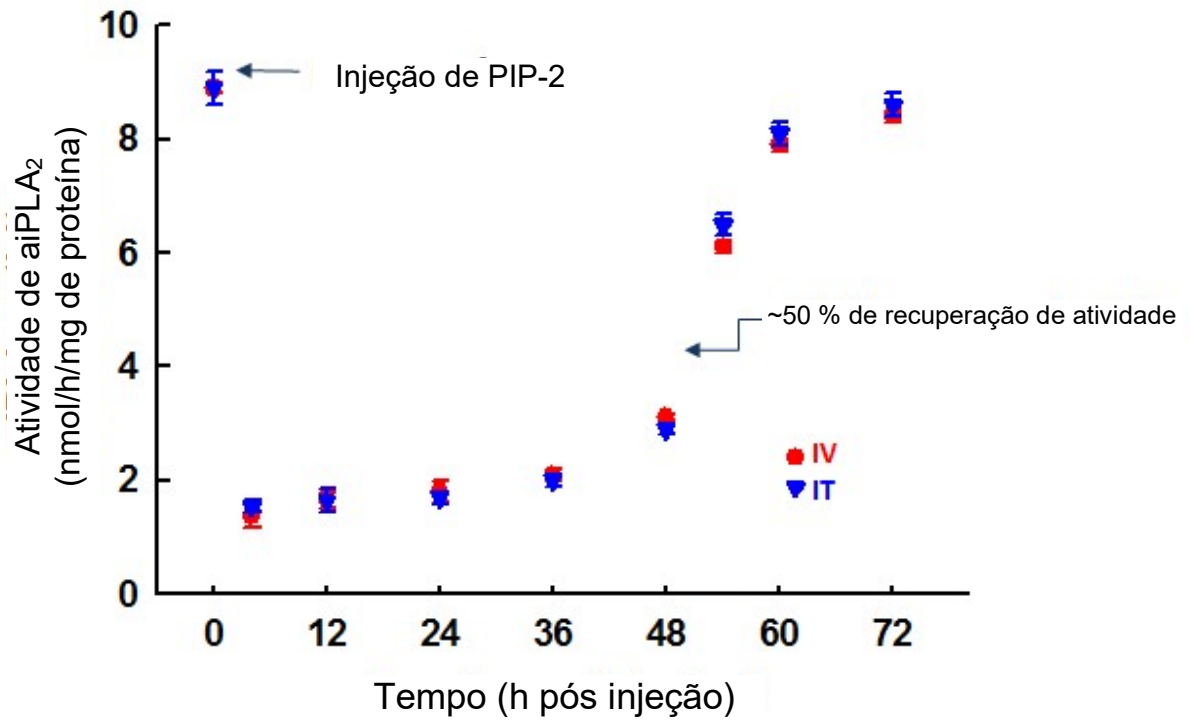


FIG. 6

FIG. 7A: LPS Intratraqueal (IT)

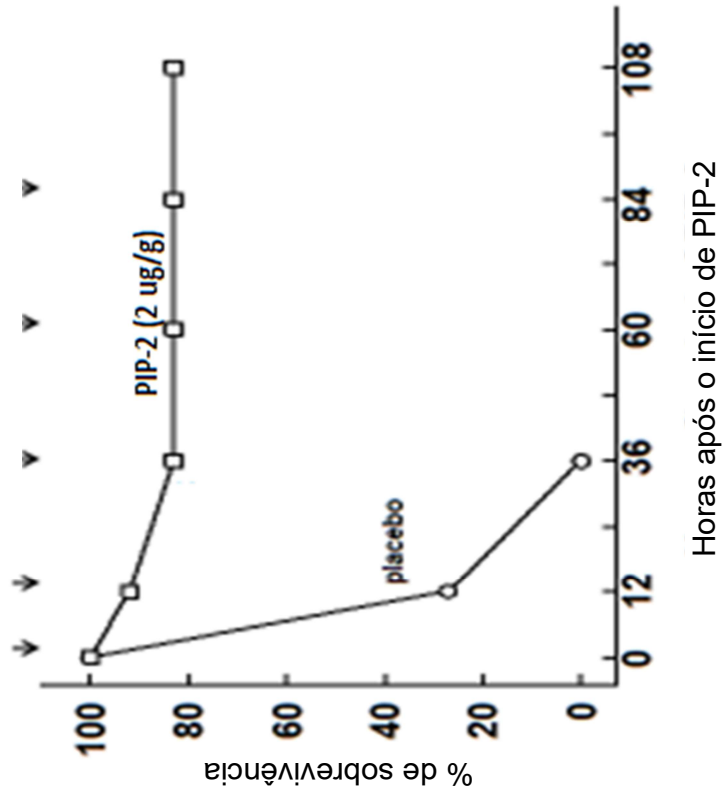
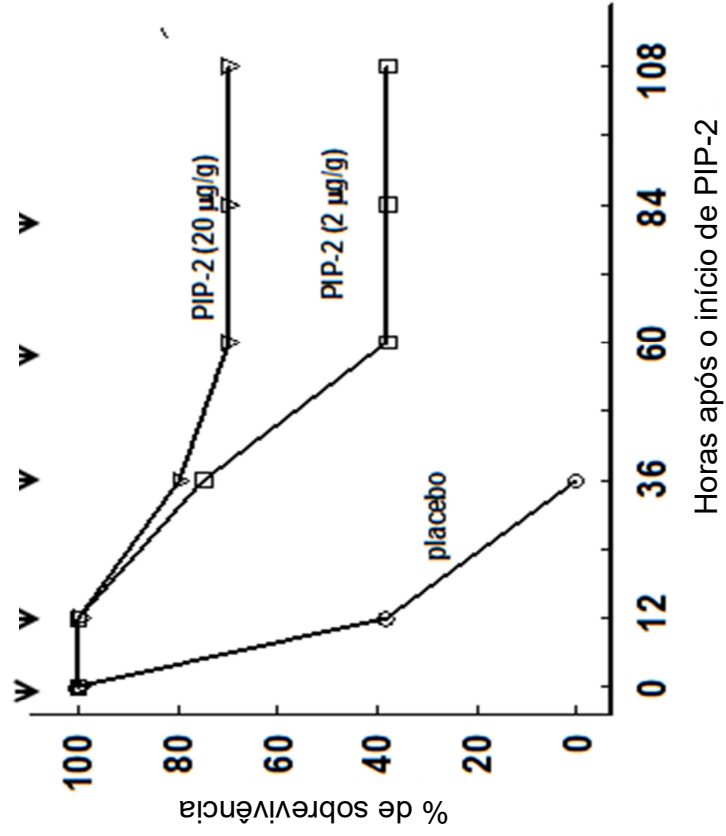


FIG. 7B: Intraperitoneal (IP) LPS



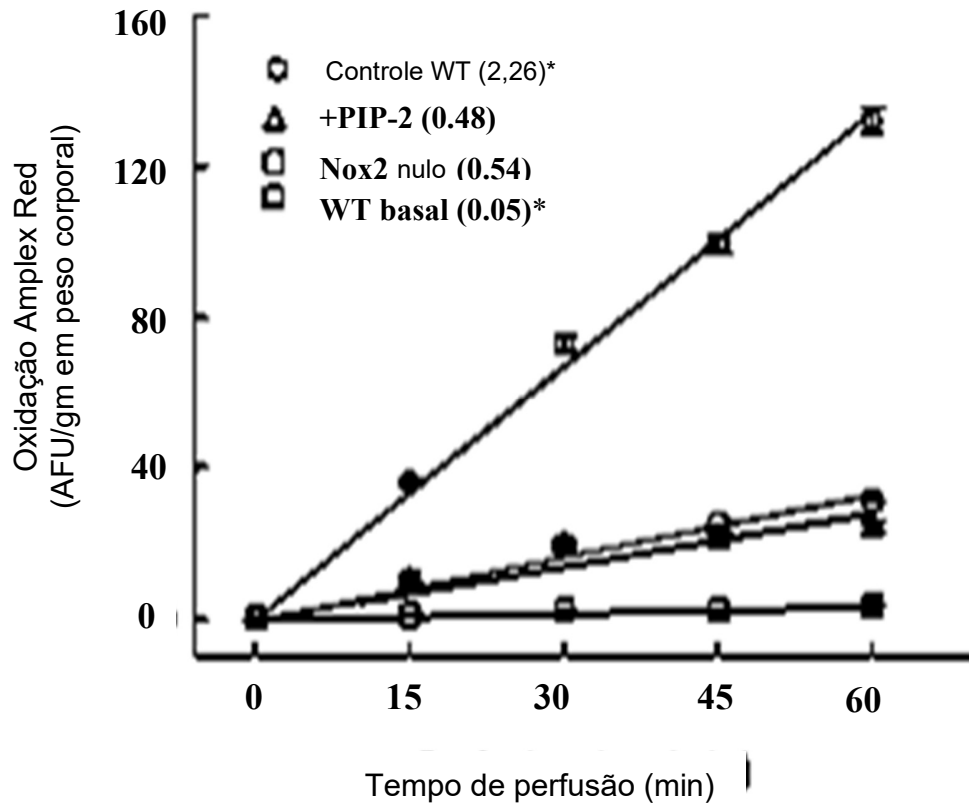


FIG. 8

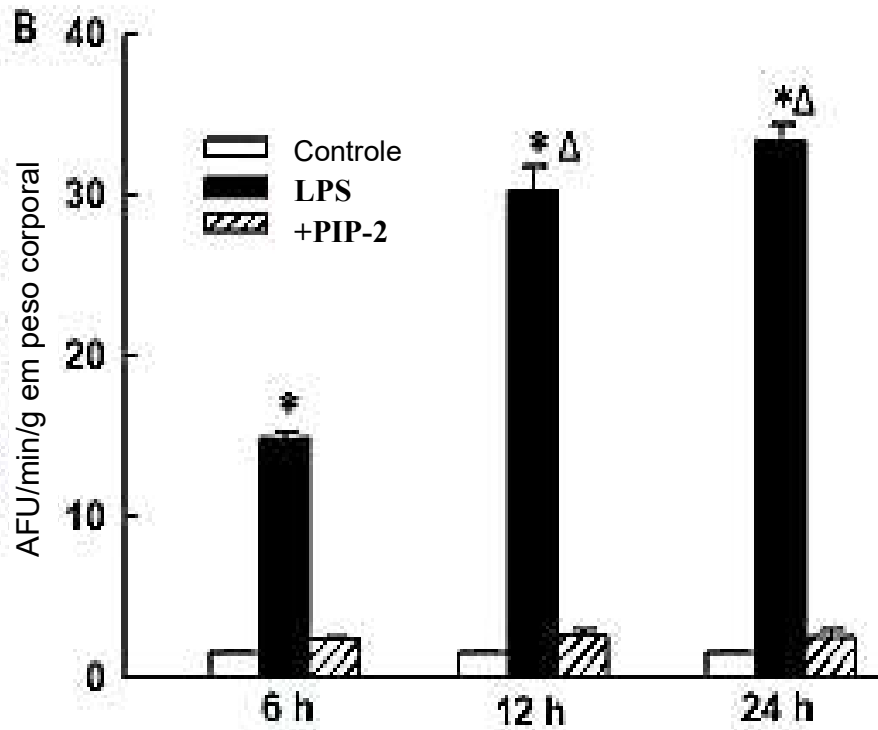


FIG. 9A

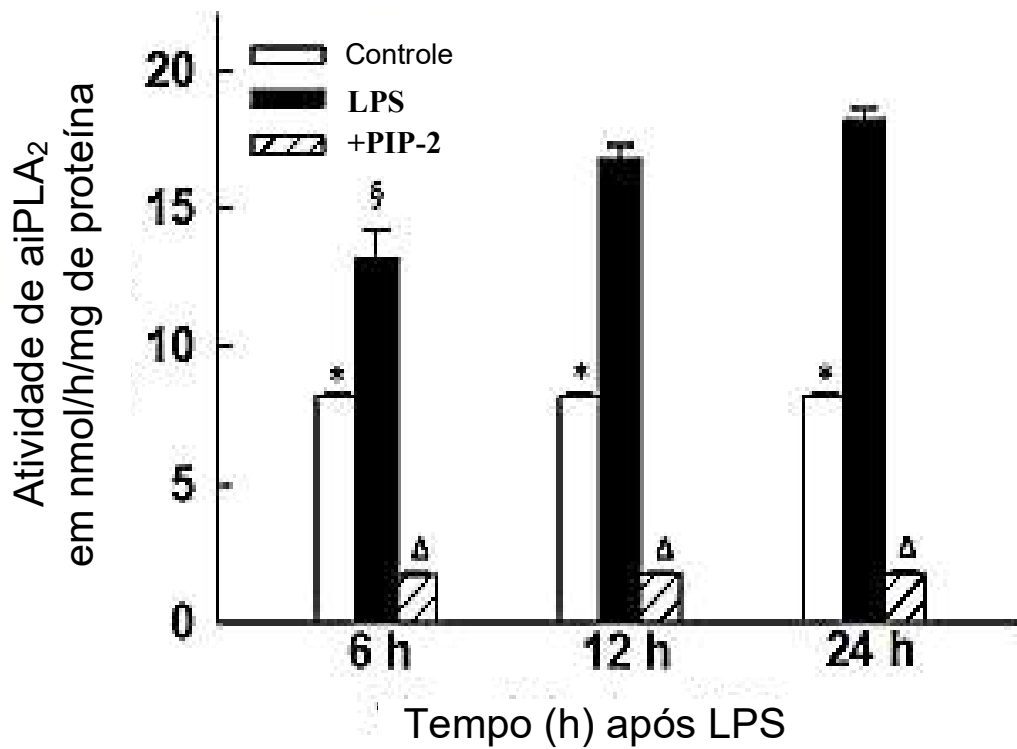


FIG. 9B

Composição* % DPPC/PC/PG	PIP-2	n	Atividade [†] nmol/mg prot/h	% de inibição	% de inibição máx.
50/25/10	não	2	8.83 ± 0.1	----	----
50/25/10	sim	3	1.64 ± 0.04	81.4	100
0/75/10	sim	3	1.72 ± 0.06	80.5	99
75/0/10	sim	2	1.84 ± 0.02	79.2	97
55/30/0	sim	2	2.50 ± 0.12	71.7	88

FIG. 10

Condição	# de células BALf (x10 ⁴ /g em peso corporal)	Proteína total em BALf (µg/g em peso corporal)	Peso úmido/seco de pulmão	TBARS em pmol/mg de proteína	8-Isoprostanos em pmol/mg de proteína	Carbolinas de proteína em nmol/mg de proteína
# de Proteção por PIP-2 @ 0/12/16 h*	100/ 94/ 94*	100/ 90/ 93*	100/ 86/ 76*	100/ 97/ 96*	100/ 94/ 91*	100/ 93/ 93*

FIG. 11

	células BALF x10 ⁴ /g em peso corporal	Proteína BALF em µg/g em peso corporal	Razão úmido/seco	TBARS em pmol/mg de proteína	8-Isoprostanos em pmol/mg de proteína	Carbolinas de proteína em nmol/mg de proteína
A. Controle (sem LPS)	0.95 ± 0.04	75 ± 1.3	5.59 ± 0.03	76 ± 6	34 ± 3	5.60 ± 0.20
B. LPS (IT) + PIP-2 2 µg/g em peso corporal	0.96 ± 0.04	78 ± 2.2	5.34 ± 0.03	77 ± 1	34 ± 3	5.60 ± 0.20
C. LPS (IP) + PIP-2 20 µg/g em peso corporal	0.95 ± 0.05	79 ± 2.0		77 ± 2	35 ± 1	5.52 ± 0.14

FIG. 12

	# de células BALf (x10 ⁴ /g em peso corporal)	Proteína total em BALf (µg/g em peso corporal)	Razão em peso úmido/seco de pulmão	TBARS em pmol/mg de proteína	8-Isoprostanos em pmol/mg de proteína	Carbolinas de proteína em nmol/mg de proteína
Controle	0.97 ± 0.06	77 ± 2.0	5.61 ± 0.02	74.6 ± 2.3	33.1 ± 3.0	5.6 ± 0.2
VILI	19.6 ± 1.4	235 ± 10	10.82 ± 0.21	530 ± 7	174 ± 5	22.8 ± 0.8
VILI + PIP-2	8.4 ± 0.3*	107 ± 8*	7.42 ± 0.11*	210 ± 4*	77.4 ± 1.0*	8.6 ± 0.4*
% de Proteção	60	81	65	70	69	83

FIG. 13

RESUMO

“COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA TRATAMENTO DE LESÃO PULMONAR AGUDA”

Em vários aspectos e modalidades a invenção fornece composições e métodos úteis no tratamento de lesão pulmonar aguda (ALI).

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 211.993-5 - Listagem de sequências.txt
- Data de Geração do Código: 16/04/2021
- Hora de Geração do Código: 11:27:57
- Código de Controle:
 - Campo 1: 8120A2F2B42E7CFC
 - Campo 2: 16ED563FB60725D0