

(11) Número de Publicação: **PT 1740164 E**

(51) Classificação Internacional:

**A61K 31/366** (2007.10) **A61K 9/00** (2007.10)  
**A61P 27/06** (2007.10)

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

---

(22) Data de pedido: **2005.04.25**

(30) Prioridade(s): **2004.04.26 US 565469 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2007.01.10**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.08.13**  
**206/2008**

(73) Titular(es):

**ALCON INC.**  
**BÖSCH 69, P.O. BOX 62 6331 HÜNENBERG CH**

(72) Inventor(es):

**IOK-HOU PANG** US  
**MARK R. HELLBERG** US  
**DEBRA L. FLEENOR** US  
**ALLAN SHEPARD** US

(74) Mandatário:

**ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS**  
**RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA**

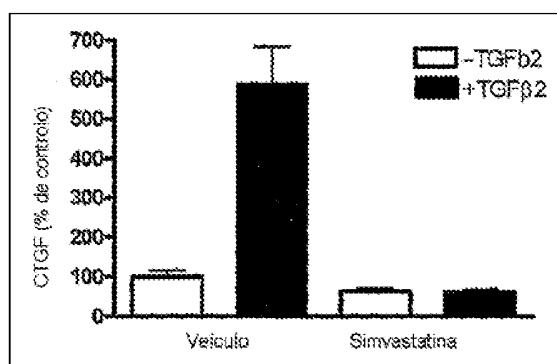
PT

(54) Epígrafe: **ESTATINAS PARA O TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO OCULAR E GLAUCOMA**

(57) Resumo:

**RESUMO****"ESTATINAS PARA O TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO OCULAR E GLAUCOMA"**

É descrita a utilização de inibidores de HMG-CoA reductase (por exemplo, estatina) para tratar glaucoma, controlar a pressão intra-ocular, preservar a malha trabecular, proteger contra a neurodegeneração ocular e/ou proteger contra a retinopatia glaucomatosa. Os inibidores de HMG-CoA reductase preferidos, que são estatina tendo um valor de RI de 0,2 a 0,7 (por exemplo, pravastatina), são administrados por via de aplicação tópica ao(s) olho(s) afectado(s) do paciente.



**DESCRIÇÃO**

**"ESTATINAS PARA O TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO OCULAR E  
GLAUCOMA"**

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se para o tratamento de glaucoma e controlo ou redução da pressão intra-ocular em pacientes. Mais particularmente, a presente invenção refere-se para a utilização de composições farmacêuticas que são úteis no tratamento de glaucoma e controlo ou redução da pressão intra-ocular.

A neuropatia óptica glaucomatosa (glaucoma) é uma doença caracterizada pela perda permanente da função visual devido a lesão irreversível do nervo óptico. O vários tipos morfológicamente ou funcionalmente distintos de glaucoma são tipicamente caracterizados pela elevada pressão intra-ocular (IOP), que é considerado como sendo causalmente relacionada com o curso patológico da doença. A hipertensão ocular é uma patologia em que a IOP é elevada, mas não ocorre nenhuma perda aparente de função visual; tais pacientes são considerados como estando em elevado risco de desenvolvimento eventual da perda de visão associada com glaucoma. Alguns pacientes com perda de campo glaucomatoso têm IOP relativamente baixa. Estes pacientes com glaucoma

de tensão normal ou tensão baixa também podem beneficiar de agentes que reduzem e controlam a IOP. Se o glaucoma ou hipertensão ocular é descoberto precocemente e tratado prontamente com medicamentos que efectivamente reduzem a elevada pressão intra-ocular, a perda de função visual ou sua deterioração progressiva, geralmente pode ser melhorada. Terapias com fármacos que provaram ser eficazes na redução da pressão intra-ocular incluem ambos os agentes que diminuem a produção de humor aquoso e agentes que aumentam a facilidade de escoamento.

A IOP continuamente elevada tem sido associada com a deterioração progressiva da retina e a perda de função visual. Por conseguinte, reduzir a IOP pode ser um objectivo para o tratamento de pacientes com glaucoma, de modo a diminuir o potencial para, ou gravidade de, retinopatia glaucomatosa. Infelizmente, muitos indivíduos não respondem bem quando tratados com terapias de glaucoma existentes.

Esta invenção está principalmente relacionada com a classe de fármacos que exibem actividade inibitória da HMG-CoA reductase. O termo "estatina" foi frequentemente utilizado para descrever um "inibidor de HMG-CoA reductase". As estatinas têm sido utilizadas ou avaliadas em vários estudos médicos para uma variedade de propósitos. Alguns destes estudos são apresentados abaixo. Porém, com todos estes estudos, não houve nenhum reconhecimento de que as estatinas têm a capacidade de serem eficazes no

tratamento de glaucoma e/ou de controlar ou reduzir a pressão intra-ocular. As estatinas são uma classe dos inibidores 3-hidroxi-3-metilglutarilo coenzima A (HMG-CoA) reductase, que são conhecidos pelas suas propriedades hipolipidémicas clínicas. As propriedades hipolipidémicas são devido à capacidade das estatinas para inibir a HMG-CoA reductase, prevenindo a conversão de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA a mevalonato que é o passo da razão limitante na síntese do colesterol. Porém, as estatinas também exercem acções que podem não estar relacionadas com a inibição da biossíntese do colesterol. Por exemplo, as estatinas também têm sido reportadas por inibirem a expressão de várias integrinas, inibir produção do anião superóxido, por interferir com a isoprenilação da proteína Rho, e por agir como armadilhas de radicais livres, entre outros efeitos (Wassmann e Nickenig, *Endothelium*, 2003, **10**:23-33; Mason JC, *Clin Sci* (Lond) 2003, **105**:251-66). Também, foram comunicadas as actividades anti-inflamatórias e protectoras cardíacas da estatina (Yoshida M.J. *Atheroscelrosis Thromb* 2003, **10**(3), 140-4; Luo JD e Chen AF *Curr Med Chem* 2003, **10**(16), 1593-601.

São descritos outros exemplos de estudos em que as estatinas foram utilizadas para propósitos não relacionados com glaucoma no Pedido de Patente U.S. Nº 2003/0065020 que se refere para a utilização de inibidores de HMG-CoA reductase, estatinas, para tratar a degeneração macular ou prevenir a degeneração macular. Também, a Patente U.S. Nº 6 569 461 se refere para a utilização de

uma formulação de libertação controlada de certas estatinas ácidas abertas de di-hidroxilo para o tratamento de retinopatia diabética. Schmidt *et al.* (Ophthalmic Res. 1994, 26, 352-60) publicou que os pacientes tratados com lovastatina ou simvastatina, administrados oralmente durante pelo menos um ano, não registaram nenhuma mudança clinicamente significativa na pressão intra-ocular.

Clofibrato, um membro da classe dos fibratos do agonista do receptor activado proliferador de peroxissoma (PPAR) que produz uma redução moderada no colesterol LDL e triglicéridos, também foi documentado como sendo redutor da IOP.

WO 2005/053683, EP-A-0473337 e US-A-5134124 descrevem utilização de estatinas no tratamento de glaucoma.

Os presentes inventores, através de estudos significativos, descobriram métodos para tratar glaucoma e/ou de controlar ou reduzir a pressão intra-ocular com a utilização de inibidores de HMG-CoA reductase, tal como as estatinas.

#### **SUMÁRIO DA PRESENTE INVENÇÃO**

A presente invenção fornece a utilização de estatinas seleccionadas de rosuvastatina, pitavastatina, berivastatina, glenvastatina, ou um derivado destes, ou uma combinação destes, na produção de um medicamento para o

tratamento de glaucoma num paciente, para controlar a pressão intra-ocular normal ou elevada num paciente, para preservar a malha trabecular num paciente, para proteger contra neurodegeneração ocular num paciente, e para proteger contra a retinopatia glaucomatosa num paciente, de acordo com as reivindicações que se seguem.

Características e vantagens adicionais da invenção presente serão estabelecidas em parte na descrição que segue, e em parte será evidente da descrição, ou pode ser entendido pela prática da presente invenção. Os objectivos e outras vantagens da presente invenção e serão realizados e conseguidos por meio dos elementos e combinações particularmente apontados na descrição e reivindicações apensas.

Para alcançar estas e outras vantagens e de acordo com os pressupostos da invenção presente, como forma de realização e amplamente descrito aqui, a presente invenção refere-se para a utilização de composições contendo pelo menos um inibidor de HMG-CoA reductase para o tratamento de glaucoma e/ou da redução ou controlo da IOP normal ou elevada, tal como IOP associada com glaucoma de tensão normal e/ou de hipertensão ocular. As composições podem preferencialmente ser composições farmacêuticas, por exemplo, adequadas para entrega tópica no olho.

Deve ser entendido que tanto a descrição geral precedente como a descrição detalhada seguinte são exemplares e exemplares apenas e é pretendido que forneça

uma explicação adicional da presente invenção, como reivindicado.

**BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

As figuras 1-3 são gráficos estabelecendo os efeitos da estatina basal e expressão do gene CTGF induzido por TGFp2 na cultura de células de malha trabecular humana.

A figura 4 é um gráfico de barras que mostra o efeito da tensão oxidativa induzida por  $H_2O_2$  na viabilidade da célula HTM-35D. As células foram incubadas na presença ou ausência de agentes de teste em meio livre de soro durante 30 minutos ( $37^\circ C$ , 5%  $CO_2$ ), seguido por lavagem e substituição com meio livre de soro durante 2 dias. De seguida a viabilidade foi avaliada por retoma do vermelho neutro. As barras representam média e SEM de duas experiências separadas, cada um executado em triplicado.

A figura 5 descreve gráficos de barras que mostram o efeito da lovastatina na secreção e viabilidade de fibronectina em células GTM-3. As células de malha trabecular humana transformada (GTM-3) foram incubadas na presença ou ausência de agentes de teste em meio livre de soro DMEM durante 24 h ( $37^\circ C$ , 5%  $CO_2$ ). As células sobrenadantes foram de seguida analisadas para conteúdo de fibronectina por ELISA e as monocamadas de células foram analisadas para a viabilidade através de retoma do vermelho neutro.

**DESCRIÇÃO DETALHADA DA PRESENTE INVENÇÃO**

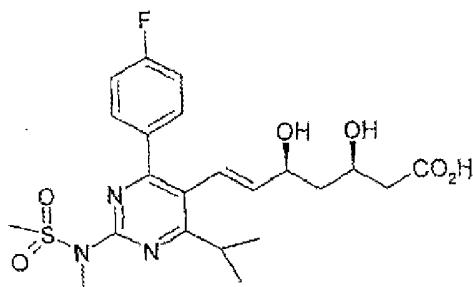
A presente invenção refere-se em parte para um composto para utilizar no tratamento de glaucoma em um paciente humano ou outros mamíferos. A presente invenção também se refere para uma utilização para reduzir ou controlar a IOP normal ou elevada num paciente humano ou outros mamíferos. As utilizações envolvem administração de uma composição contendo pelo menos um inibidor de 3-hidroxi-3-metilglutarilo coenzima A (HMG-CoA) reductase. Por outras palavras, a presente invenção refere-se para a utilização de pelo menos uma substância que tenha actividade inibidora da HMG-CoA reductase.

Um grupo de inibidores de HMG-CoA reductase que são adequados para utilização na presente invenção é conhecido como estatina. Para propósitos da presente invenção, as "estatinas" como utilizado aqui são inibidores de HMG-CoA. Estes fármacos podem ter propriedades hipolipidémicas devido à sua capacidade para inibir HMG-CoA reductase, prevenindo a conversão de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA a mevalonato que é o passo razão-limitante na síntese do colesterol.

Exemplos de inibidores de HMG-CoA reductase incluem rosuvastatina, pitavastatina, berivastatina, glenvastatina.

Os nomes químicos são como se segue:

- Rosuvastatina - (ácido (3R,5S,6E)-7-[4-(4-fluorofenil)-6-(1-metiletil)-2-[metil(metilsulfonil)amino]-5-pirimidinil]-3,5-di-hidroxi-6-heptanóico),
- Pitavastatina - (ácido (3R,5S,6E)-7-[2-ciclopropil-4-(4-fluorofenil)-3-quinolinil]-3,5-di-hidroxi-6-heptenóico),
- Berivastatina - (éster (R\*,S\*-(E)-7-(4-(4-fluorofenil)-spiro-(2H-1-benzopiran-2,1'-ciclopantan)-3-il)-3,5-di-hidroxi-etilo),
- Glenvastatina - ((4R,6S)-6-[(1E)-2-[4-(4-fluorofenil)-2-(1-metiletil)-6-fenil-3-piridinil]etenil]tetra-hidro-4-hidroxi-2H-piran-2-ona),



Rosuvastatina - ácido (3R,5S,6E)-7-[4-(4-fluorofenil)-6-(1-metiletil)-2-[metil(metilsulfonil)amino]-5-pirimidinil]-3,5-di-hidroxi-6-heptanóico

É reconhecido que os compostos descritos acima podem conter um ou mais centros quirais. Esta invenção contempla todos os enantiómeros, diastereómeros, e misturas destes.

Os inibidores de HMG-CoA reductase utilizados na presente invenção também incluem compostos que têm ou incluem metade da Estrutura B descrita anteriormente em combinação com metades diferentes da metade da Estrutura A apresentada anteriormente.

Os sais e solvatos farmaceuticamente aceitáveis, e forma pró-fármacos dos compostos descritos anteriormente também podem ser utilizados nos métodos da presente invenção. Além disso, também podem ser utilizados derivados dos compostos estabelecidos acima nos métodos da presente invenção. Os derivados incluem: derivados de ácidos carboxílicos (por exemplo: sais de ácidos carboxílicos, ésteres, lactonas, amidas, ácidos hidroxâmicos, álcoois, álcoois esterificados e álcoois alquilados (alcóxidos)) e derivados de álcoois (por exemplo: ésteres, carbamatos, lactonas, carbonatos, alcóxidos, aceitais, cetais, fosfatos, e ésteres de fosfato). Com respeito aos compostos descritos anteriormente, vários compostos contêm flúor em um ou mais dos anéis aromáticos, e assim em vez de um flúor, pode ser utilizado qualquer outro haleto. Também, em vez de hidrogénio ou grupos alquilo como estabelecido nos compostos anteriores, podem ser utilizados diferentes grupos alquilo. Por exemplo, em vez de um grupo -OH, poderia ser utilizado um grupo -O-alquilo. Assim, podem facilmente ser utilizados vários derivados na presente invenção com base na orientação e conhecimento apresentado aqui, junto com o conhecimento que um perito na técnica tem nesta área técnica.

Os exemplos anteriores tanto estão disponíveis comercialmente (por exemplo, Calbiochem-Novabiochem Corporation, SST Corporation, Aceto Corporation, Tocris Cookson Inc., Sigma, and BIOMOL Research Laboratories, Inc.) como podem ser sintetizados com base na literatura disponível para esse perito na técnica.

A biodisponibilidade oral das estatinas é baixa (isto é, variando geralmente entre 5 e 20%) devido à eliminação pré-sistémica extensiva no fígado e mucosa intestinal. Além disso, a maioria das estatinas estão excessivamente ligadas ao plasma e são rapidamente eliminadas (Klotz U Arzneim Forsch (Drug Research) 2003, **53**, 605-611). Estes factores limitam significativamente a quantidade de composto activo que alcança os tecidos oculares a seguir à administração oral.

A utilização de administração ocular tópica é contudo largamente preferida na presente invenção. Porém, os presentes inventores descobriram que enquanto certas estatinas podem alcançar os tecidos intra-oculares por penetração da córnea a seguir à administração ocular tópica (por exemplo, pravastatina), outras estatinas não penetram a córnea prontamente e por conseguinte não são agentes terapêuticos viáveis nos métodos da presente invenção por esta via de administração (por exemplo, atorvastatina).

A utilização de parâmetros de retenção de

cromatografia líquida de alta pressão de fase inversa tal como o índice de retenção ("RI") provou ser útil no prognóstico da partição de moléculas em e por membranas biológicas. (Brent DA, Sabalts JJ, Minick DJ, e Henry DW, Journal of Medical Chemistry 1983, **26**, 1014-1020). Os presentes inventores descobriram que os valores de RI podem ser utilizados para prognosticar a competência das estatinas para alcançar concentrações terapêuticas nos tecidos intra-oculares a seguir à administração de tópico ocular. Especificamente, os inventores descobriram que as estatinas que têm um valor de RI de 0,2 a 0,7 podem ser administrados aos pacientes por via de administração ocular tópica. Os valores de RI são determinados por meio do procedimento descrito a seguir.

#### Determinação dos Valores do Índice de Retenção ("RI")

O artigo de teste é dissolvido num solvente para fornecer uma solução 15-20  $\mu$ g/mL. Esta solução e uma solução de referência (éster isopropílico de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  a 1% em etanol diluído em 3 mL de solvente diluente) são directamente injectados numa coluna de cromatografia de alta pressão de fase inversa Microsorb-MV ODS (4,6 mm ID X 15 cm comprimento, 5  $\mu$ m). A fase móvel é uma mistura aquosa a pH 3,0 de tampão fosfato de amónio/acetonitrilo (1:1) com uma razão de fluxo de cerca de 1 mL por minuto. O índice de retenção (RI) foi calculado usando a seguinte fórmula:

$$RI = RT1/RT2$$

em que:

RT1 = tempo de retenção do artigo teste, e

RT2 = tempo de retenção do padrão éster isopropílico de PGF<sub>2α</sub>.

A gama de valores de RI descrita anteriormente de 0,2 a 0,7 é aplicável a todas as estatinas descritas aqui. Porém, a gama tem como base a forma de ácido aberto do dihidroxilo dos compostos. Por conseguinte, as estatinas em que a Estrutura B está na configuração de lactona deve ser convertida ao correspondente ácido aberto antes de determinar o valor de RI.

Os compostos da presente invenção podem ser utilizados para baixar e controlar a IOP incluindo a IOP associada a glaucoma com normotensão, hipertensão ocular, e glaucoma em animais de sangue quente, particularmente humanos. As composições são composições farmacêuticas preferencialmente formuladas que são preferencialmente adequadas para entrega tópica, tal como para o olho do paciente. A composição pode ser administrada de qualquer modo adequado através de técnicas convencionais.

As estatinas podem ajudar no atraso/contrariar a perda de celularidade da malha trabecular (TM) observada com glaucoma. Embora não seja conhecido o mecanismo exacto, os efeitos anti-oxidativos e de armadilha de radicais livres das estatinas podem contrariar a tensão/lesão oxidativa relacionada com a idade e/ou glaucoma na TM. Uma diminuição na celularidade foi previamente notada no tecido

da TM de pacientes com glaucoma (Alvarado *et al*, *Ophthalmology*, 1984, **91**:564-579). Além disso, foi descrito que os níveis de produto de peroxidação dos lípidos aumentaram pelo menos duas vezes em humor aquoso de pacientes com glaucoma, junto com uma diminuição na capacidade antioxidativa total (Kuryshova *et al*, *Vestn Oftalmol*, 1996, **112**:3-5). O aumentado dos níveis de radicais livres pode ser destruidor para uma larga variedade de tecidos, e portanto as estatinas podem ajudar a atrasar/contrariar a perda de celularidade TM observada com glaucoma. A TM é o principal local de drenagem de humor aquoso (AH) e o compromisso do escoamento de AH através da TM pode ser frequentemente um factor causativo para o aumento da IOP observada no glaucoma. Preservando a celularidade da TM através de tratamento com estatina, o escoamento de AH pode ser melhorado e a IOP pode ser reduzida. Assim, a invenção presente se refere para um método para preservar a TM de um paciente administrando a um paciente, uma quantidade farmaceuticamente eficaz de uma composição que contenha pelo menos um inibidor de HMG-CoA reductase.

A invenção presente também pode prevenir a acumulação de excesso ou matriz extracelular imprópria que podem obstruir o caminho do escoamento. Uma sobre acumulação de materiais de matriz extracelular na região da TM também é uma garantia de muitas formas de glaucoma. Tal aumento pode conduzir a uma crescente resistência do escoamento aquoso, elevando assim a IOP. O factor de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF) é implicado como um

factor causador em condições associadas com a sobre acumulação de ECM, por exemplo, esclerodoma, doenças fibroproliferativas, e de cicatrização. O CTGF pode aumentar a produção de materiais da matriz extracelular (ECM) tal como colagénio I e fibronectina. A presença de produtos de gene CTGF tem sido detectada em tecidos isolados e linhas de células constituídas de TM humano, e a fibronectina de componente ECM é segregado activamente através de cultura de células TM humanas. Os fármacos de estatina tal como simvastatina, lovastatina, e mevastatina (compactina) reduz significativamente expressão do gene do factor de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) através de cultura de células TM humanas. As estatinas também reduzem significativamente a secreção de fibronectina através de cultura de células TM humanas. Então, por via anti-oxidativa e actividade de armadilha de radicais livres, como bem por via da supressão da expressão de CTGF e secreção de fibronectina, os agentes de estatina representam novos meios potenciais para reduzir a IOP.

Complementando o efeito hipotensivo ocular, as estatinas podem exercer um efeito neuroprotector. Têm sido observados na retina glaucomatosa, elevados níveis de mediadores de neurodegeneração, tal como iNOS, TNF $\alpha$ , metaloproteinase das matrizes (MMP) e astrócitos activados.

Uma forma de neuroprotecção pode ser devido a uma redução da lesão isquémica do tecido neuronal. A estatina regulam a sintaxe endotelial do óxido nítrico, e assim podem ajudar a preservar o fluxo de sangue aos tecidos

isquémicos. As estatinas também mostraram proteger os neurónios retinais num modelo de lesão de reperfusão isquémica, um efeito que foi bloqueado por um inibidor de sintaxe de óxido nítrico.

Além disso, os efeitos anti-oxidativos e de armadilha de radicais livres de estatinas podem ser protectores contra lesões/tensão oxidativo na retina e nervo óptico relacionado com glaucoma. Glaucoma causa a morte das células de gânglio retinais (RGC). O(s) mecanismo(s) molecular(es) exacto(s) não é(são) claro(s). Porém, há três hipóteses populares: (1) anormalidade vascular retinal que conduz a isquemia (Flammer *et al*, *Prog Retin Eye Res*, 2002, **21**:359-393), (2) toxicidade do glutamato (Dreyer *et al*, *Arch Ophthalmol*, 1996, **114**:299-305), e (3) retirada de factores neurotróficos (Quigley *et al*, *Arch Ophthalmol*, 1981, **99**:635-649; Quigley *et al*, *Arch Ophthalmol*, 1982, **100**:135-146; Quigley *et al*, *Am J Ophthalmol*, 1983, **95**:674-691). Todos estes mecanismos propostos podem conduzir a uma toxicidade oxidativa para o RGC em glaucoma e podem contribuir para a sua morte. Por exemplo, quantias excessivas de radicais livres e espécies oxigenadas reactivas podem ser geradas por isquemia que esgota a produção de ATP causas disfunção mitocondrial e aumenta os radicais livres. A toxicidade do glutamato aumenta concentração de cálcio intracelular, activa as calpainas e a sintaxe de NO e produz os radicais livres. A supressão de factores neurotróficos também demonstrou causar lesão oxidativa (Greenlund *et al*, *Neuron*, 1995, **14**:303-315). Com base nesta informação, antioxidantes, tal

como as estatinas, são úteis como neuroprotectores em pacientes com glaucoma. A presente invenção ainda se refere para um método para proteger contra a retinopatia glaucomatosa de um paciente administrando uma quantidade farmaceuticamente eficaz de uma composição que contém pelo menos um inibidor de HMG-CoA reductase ao paciente.

As composições utilizadas na presente invenção podem ser de vários tipos de composições farmacêuticas, tal como formulações oftálmicas para entrega no olho (por exemplo, topicalmente, intracameralmente, ou por via de um implante). As composições são preferivelmente formulações oftálmicas tópicas para entrega no olho. As composições podem incluir conservantes oftalmologicamente aceitáveis, intensificadores de viscosidade, intensificadores de penetração, tampões, cloreto de sódio, e água para formar uma suspensão ou solução oftálmica aquosa, estéril. As formulações de soluções oftálmicas podem ser preparadas dissolvendo o ingrediente activo num tampão aquoso isotónico fisiologicamente aceitável. Ainda, a solução oftálmica pode incluir um tensioactivo oftalmologicamente aceitável para ajudar a dissolver o ingrediente activo. Além disso, a solução oftálmica pode conter um agente para aumentar viscosidade, tal como hidroximetilcelulose, hidroxietilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, metilcelulose, polivinilpirrolidona, ou do género, para melhorar a retenção da formulação no saco conjuntival. Também podem ser utilizados agentes gelificantes, incluindo, mas não limitado a, goma de gellan e xantana. Para preparar formulações de pomadas oftálmicas estéreis, o ingrediente

activo é combinado com um conservante num veículo apropriado, tal como, óleo mineral, lanolina líquida, ou vaselina branca. As formulações de gel oftálmicas estéreis podem ser preparadas suspendendo o ingrediente activo numa base hidrófila preparada do composto, por exemplo, carbopol-974, ou do género, de acordo com as formulações publicadas para preparações oftálmicas análogas; podem ser incorporados conservantes e agentes de tonicidade.

As composições utilizadas na presente invenção são formuladas preferencialmente como suspensões ou soluções oftálmicas tópicas, com um pH por exemplo de aproximadamente 4 até aproximadamente 8. O estabelecimento de um regime de dosagem específico para cada indivíduo é deixado à discrição dos médicos. O ingrediente activo (por exemplo, estatina) normalmente será contido nestes formulações numa quantidade de aproximadamente 0,01% até aproximadamente 10% em peso da composição ou formulação, tal como de aproximadamente 0,01% até aproximadamente 5% em peso, e preferencialmente numa quantidade de aproximadamente 0,05% até aproximadamente 2% e preferencialmente numa quantidade de aproximadamente 0,1 até aproximadamente 1,0% em peso. A forma de dosagem pode ser uma solução ou micro emulsão de suspensão. Por exemplo, para aplicação tópica, seriam entregues 1 a 2 gotas destas formulações à superfície do olho de aproximadamente 1 até aproximadamente 4 vezes por dia de acordo com a prescrição de um médico qualificado. Podem ser administradas as composições da invenção presente como uma única dose ou como doses de múltiplo. As composições da presente invenção Podem ser

administradas para um dia ou dias múltiplos e a composição da presente invenção pode ser administrada durante dias sucessivos ou pode ser administrada num horário onde um tratamento acontece em um dia mas não no dia seguinte. Por outras palavras, o tratamento pode acontecer em dias não consecutivos. O tratamento pode acontecer durante pelo menos dois dias consecutivos, pelo menos três dias consecutivos, ou mais. Além disso, as dosagens múltiplas podem acontecer no mesmo dia, durante dias sucessivos, ou durante dias não consecutivos. Qualquer combinação de regime de dose é possível.

As composições também podem ser utilizadas em combinação com outros agentes para tratar glaucoma, tal como, mas não limitado a,  $\beta$ -bloqueadores (por exemplo, timolol, betaxolol, levobetaxolol, carteolol, levobunolol, propranolol), inibidores de anidrase carbónica (por exemplo, brinzolamida e dorzolamida)  $\alpha$ 1-antagonistas de alpha.1 (por exemplo, nipradolol).  $\alpha$ 2-antagonistas (por exemplo iopidina e brimonidina), mióticos (por exemplo, pilocarpina e epinefrina), análogos de prostaglandinas (por exemplo, latanoprost, travoprost, bimatoprost, unoprostone, e compostos estabelecidos nas Patentes U.S. N° 5 889 052; 5 296 504; 5 422 368; 5 352 708; e 5 151 444), e neuroprotectores (por exemplo, compostos estabelecidos no documento Patente E.U. N° 4 690 931, particularmente eliprodil e R-eliprodil, como estabelecido adiante no Pedido de Aplicação norte-americano N° 60/203,350), e compostos apropriados do documento WO 94/13275, incluindo memantina.

**EXEMPLO 1****Ensaio de Inibição de HMG-CoA Reductase**

A actividade HMG-CoA reductase pode ser avaliada pelo seguinte procedimento de Shefer *et al.* [J. Lipid Res 1972, 13, 402] como descrito no Pedido de patente dos E.U. N° 2003/0065020. O meio do ensaio completo continha o seguinte num volume total de 0,8 mL; tampão fosfato, pH 7,2, 100 mM; MgCl<sub>2</sub>, 3 mM; NADP, 3 mM; desidrogenase de glicose-6-fosfato, 3 unidades de enzima; glutationa reduzida 50 mM; HMG-CoA (glutaril-3-<sup>14</sup>C), 0,2 mM (0,1 µCi); e solução stock de enzima parcialmente purificada, 100 µL.

Os compostos de teste na forma de sal de ácido foram adicionados ao sistema de ensaio em volumes de 10 µL às concentrações seleccionadas. Depois de uma incubação de 40-minutos a 37°C com agitação e exposição ao ar, a reacção foi parada pela adição de 0,4 mL de HCl 8 N. Depois de uma incubação adicional 30-minutos a 37°C para assegurar a lactonização completa do ácido mevalónico a mevalonolactona, foram acrescentados 0,2 mL da mistura a uma coluna 0,5 x 0,5 cm contendo Bio-Rex 5 de malha 100-200, forma de cloreto (Bio-Rad), molhada com água destilada como descrito por Alberts *et al.* [Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1980, 77, 3967]. O [C<sup>14</sup>]HMG-CoA foi absorvido na resina e o [C<sup>14</sup>]mevalonato foi eluído com água destilada (2 x 1 mL) directamente em frascos de cintilação de 7 mL. Acrescentou-

se a cada frasco cinco mililitros de Aquasol-2, e mediu-se a radioactividade num contador de cintilação. Os valores de IC<sub>50</sub> foram determinados pelo traçado da percentagem de inibição contra a concentração do composto teste e ajustando uma linha direita aos dados resultantes utilizando os métodos dos mínimos quadrados. Para estimar as potências de inibição relativas, utilizou-se compactina como um padrão e atribuiu-se um valor de 100 e o valor IC<sub>50</sub> do composto teste foi comparado com o da compactina determinado simultaneamente.

**EXEMPLO DE REFERÊNCIA 2****Inibição da expressão do gene CTGF estimulado por TGF $\beta$ 2**

Foi estudada a eficácia das estatinas na expressão do gene CTGF na cultura de células da malha trabeular(TM) humana. Os resultados estão resumidos nas Figuras 1-3. Nestas experiências, os níveis de CTGF/18S cDNA foram medidos através de transcrição reversa quantitativa PCR (QPCR) e comparados. Como pode ser visto do resumo dos resultados nas Figuras 1 e 2, foram testados três tipos diferentes de estatina para determinar o efeito no controlo dos níveis de CTGF. Como pode ser visto das Figuras, quando o TGF $\beta$ 2 estava presente no veículo, os níveis de CTGF eram bastante altos. Porém, quando uma das estatinas foi introduzida, estes níveis foram significativamente reduzidos na ordem de mais de 100%. A lovastatina inibiu a expressão de CTGF estimulada por TGF $\beta$ 2 de uma forma dependente da dose

com um valor de  $IC_{50}$  de 75 nM (Fig. 3). Os resultados deste estudo demonstram claramente que as estatinas têm um grande efeito na expressão do gene CTGF na cultura de células de malha trabecular humana.

**EXEMPLO DE REFERÊNCIA 3****Protecção contra a morte de células TM mediada  $H_2O_2$** 

O efeito de tensão oxidativa induzida por  $H_2O_2$  em células HTM-35 D (uma estirpe de células TM humanas de cultura) viabilidade foi testada com e sem presença de estatinas. Em particular, as células foram incubadas na presença ou ausência de agentes de teste em meio livre de soro durante 30 minutos ( $37^\circ C$ , 5%  $CO_2$ ), seguido por lavagem e substituição com meio livre de soro durante dois dias. A viabilidade foi então avaliada por captação de vermelho neutro. Os resultados estão resumidos na Figura 4, em que as barras representam o meio e SEM de duas experiências separadas, cada uma executada em triplicado. Como pode ser visto na Figura 4, com a presença de uma estatina, os efeitos da  $H_2O_2$  na viabilidade das células HTM-35D foram suprimidos ou controlados para níveis essencialmente comparáveis para onde não estava presente nenhuma  $H_2O_2$ . Assim, estes testes mostram a capacidade das estatinas serem úteis no tratamento de glaucoma e controlo ou redução da IOP.

**EXEMPLO DE REFERÊNCIA 4****Inibição da secreção de TM fibronectina**

Foi testado o efeito da lovastatina na secreção de fibronectina tanto basal (veículo) como estimulada (TGF $\beta$ 2) GTM-3 (uma estirpe de células TM humanas de cultura) secreção. Foram incubadas células GTM-3 na presença ou ausência de agentes de teste em meio livre de soro durante 24 h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), de seguida foram determinados por ELISA os níveis de fibronectina segregados de sobrenadantes de células. Foram executados ensaios de captação de vermelho neutros nas restantes monocamadas de células, para determinar o efeito de agentes de teste na viabilidade das células GTM-3. Os resultados estão resumidos na Figura 5. Como pode ser imediatamente visto na Figura 5, a lovastatina suprimiu a secreção de fibronectina estimulada por TGF $\beta$ 2, além de supressão da secreção basal, sem afectar a viabilidade das células. Assim, em virtude da capacidade para reduzir a acumulação excessiva de matriz extracelular (por exemplo fibronectina), as estatinas são úteis no tratamento de glaucoma e controlo ou redução da IOP.

**EXEMPLO DE REFERÊNCIA 5****Resposta de IOP aguda em olhos tratados com laser (Hipertensivo) de macacos *Cynomolgus* Conscientes.**

A pressão intra-ocular (IOP) foi determinada com

um Alcon Pneumatonometer após leve anestesia da córnea com 0,1% de proparacaina. Os olhos foram lavados com soro fisiológico depois de cada medição. Depois da medição da linha de base de IOP, o composto de teste foi instilado numa alíquota de 30  $\mu$ L nos olhos à direita apenas em nove macacos Cynomolgus. O veículo foi instilado nos olhos à direita de mais seis animais. As subsequentes medições de IOP foram realizadas a 1, 3, e 6 horas. A lovastatina, fluvastatina, atorvastatina e pravastatina não reduziram significativamente a IOP a seguir a uma única aplicação ocular tópica de 300  $\mu$ g.

**EXEMPLO DE REFERÊNCIA 6****Resposta em olhos tratados com laser (Hipertensivo) de macacos Cynomolgus conscientes a seguir a repetidas doses**

Num estudo adicional, foi medida a eficácia da lovastatina na redução da pressão intra-ocular em macacos hipertensivos oculares conscientes utilizando um estudo de três dias, cinco doses. O artigo de teste foi administrado numa alíquota de 30  $\mu$ L aos olhos submetidos a laser (trabeculoplastia de laser unilateral) de oito animais. O veículo foi instilado nos olhos submetidos a laser de mais seis animais como um controlo. Foram instiladas doses 1, 3, e 5 às 09:00 horas em três dias sucessivos; doses 2 e 4 às 16:30 horas nos dias 1 e 2. A IOP foi medida a 1, 3 e 6 horas depois das doses 1 e 5. A IOP também foi medida 16 horas após a dose 4. A mudança de percentagem do tempo 0

linha base foi determinada para cada animal para todas as medições de IOP.

A lovastatina reduziu a IOP nos olhos submetidos a laser dos macaco por uma média de 22,8% (8,3 mmHg), 21,5% (8,1 mmHg) e 25,5% (9,5 mmHg) às 1, 3, e 6 horas, respectivamente, nos macacos submetidos a laser depois da quinta instilação ocular tópica de 300 µg. Houve uma redução média na IOP de 12,5% no grupo de controlo. Num estudo subsequente, em que foram administradas nove doses de lovastatina durante um período de cinco dias, a IOP foi reduzida por até 7,4%.

As seguintes formulações podem ser preparadas para propósitos da invenção presente.

**EXEMPLO DE REFERÊNCIA 7**

<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidades (peso %)</b>
Estatina, tal como lovastatina	0,01-2%
Hidroxipropilmetylcelulose	0,5%
Fosfato de sódio dibásico (anidro)	0,2%
Cloreto de sódio	0,5%
EDTA dissódico (Edetato dissódico)	0,01%
Polissorbato 80	0,05%
Cloreto de benzalcónio	0,01%
Hidróxido de sódio/ácido clorídrico	para ajustar o pH a 7,3-7,4
Água purificada	q.b. para 100%

Ingredientes	Quantidades (peso %)
Estatina, tal como lovastatina	0,01-2%
Metilcelulose	4,0%
Fosfato de sódio dibásico (anidro)	0,2%
Cloreto de sódio	0,5%
EDTA dissódico (Edetato dissódico)	0,01%
Polissorbato 80	0,05%
Cloreto de benzalcónio	0,01%
Hidróxido de sódio/ácido clorídrico	para ajustar o pH a 7,3-7,4
Água purificada	q.b. para 100%

Ingredientes	Quantidades (peso %)
Estatina, tal como lovastatina	0,01-2%
Goma Guar	0,4-6,0%
Fosfato de sódio dibásico (anidro)	0,2%
Cloreto de sódio	0,5%
EDTA dissódico (Edetato dissódico)	0,01%
Polissorbato 80	0,05%
Cloreto de benzalcónio	0,01%
Hidróxido de sódio/ácido clorídrico	para ajustar o pH a 7,3-7,4
Água purificada	q.b. para 100%

<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidades (peso %)</b>
Estatina, tal como lovastatina	0,01-2%
Vaselina e óleo de mineral e lanolina	Consistência de pomada
Fosfato de sódio dibásico (anidro)	0,2%
Cloreto de sódio	0,5%
EDTA dissódico (Edetato dissódico)	0,01%
Polissorbato 80	0,05%
Cloreto de benzalcónio	0,01%
Hidróxido de sódio/ácido clorídrico	para ajustar o pH a 7,3-7,4
Água purificada	q.b. para 100%

Lisboa, 9 de Outubro de 2008

**REIVINDICAÇÕES**

1. Utilização de uma estatina seleccionada de rosuvastatina, pitavastatina, berivastatina, glenvastatina, ou um derivado destes, ou uma combinação destes, na produção de um medicamento para o tratamento de glaucoma num paciente.

2. Utilização de uma estatina seleccionada de rosuvastatina, pitavastatina, berivastatina, glenvastatina, ou um derivado destes, ou uma combinação destes, na produção de um medicamento para controlar a pressão intra-ocular normal ou elevada num paciente.

3. Utilização de uma estatina seleccionada de rosuvastatina, pitavastatina, berivastatina, glenvastatina, ou um derivado destes, ou uma combinação destes, na produção de um medicamento para preservar a malha trabecular num paciente.

4. Utilização de uma estatina seleccionada de rosuvastatina, pitavastatina, berivastatina, glenvastatina, ou um derivado destes, ou uma combinação destes, na produção de um medicamento para proteger contra neurodegeneração ocular num paciente.

5. Utilização de uma estatina seleccionada de rosuvastatina, pitavastatina, berivastatina, glenvastatina,

ou um derivado destes, ou uma combinação destes, na produção de um medicamento para proteger contra a retinopatia glaucomatosa num paciente.

6. Utilização de qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que o referido medicamento seja para administração tópica a pelo menos um olho do referido paciente.

7. Utilização como na reivindicação 6, em que a referida estatina tenha um valor de índice de retenção (RI) de 0,2 a 0,7.

8. Utilização como em qualquer uma reivindicação 1 a 5, em que o referido medicamento seja para administração intra-ocular a pelo menos um olho do referido paciente.

9. Composição de uma estatina seleccionada de rosuvastatina, pitavastatina, berivastatina, glenvastatina, ou um derivado destes, ou uma combinação destes, de 0,02% a 2,0% em peso da referida composição, para utilização no tratamento de glaucoma num paciente, controlar a pressão intra-ocular normal ou elevada num paciente, para preservar a malha trabecular num paciente, ou para proteger contra a retinopatia glaucomatosa num paciente.

10. Composição da reivindicação 9, compreendendo ainda, um  $\beta$ -bloqueador, um inibidor de anidrase carbónica,

um antagonista  $\alpha 1$ , um agonista  $\alpha 2$ , um miótico, um análogo de prostaglandina, um neuroprotector, ou qualquer combinação destes.

11. Composição da reivindicação 9, compreendendo ainda, pelo menos um inibidor de anidrase carbónica.

Lisboa 9 de Outubro de 2008

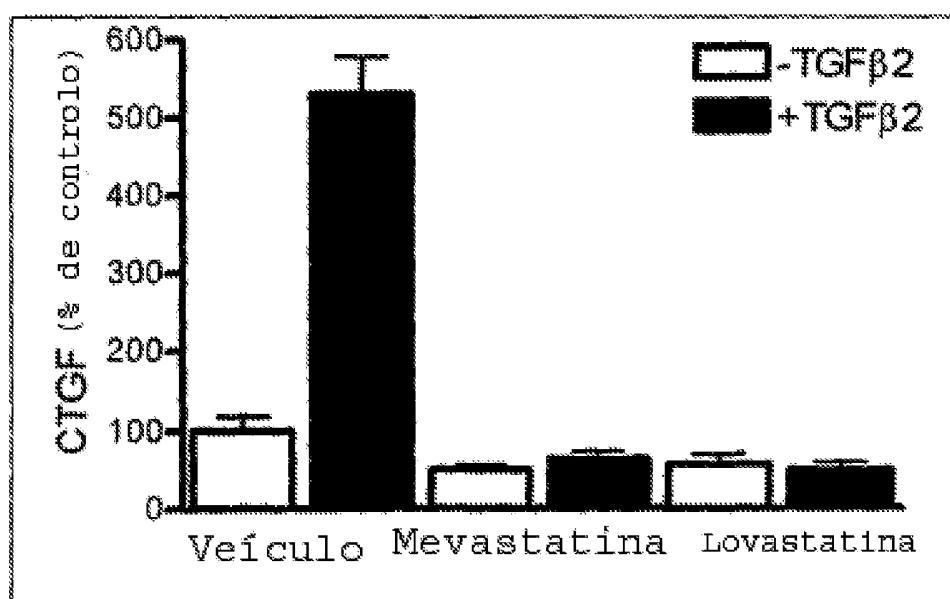
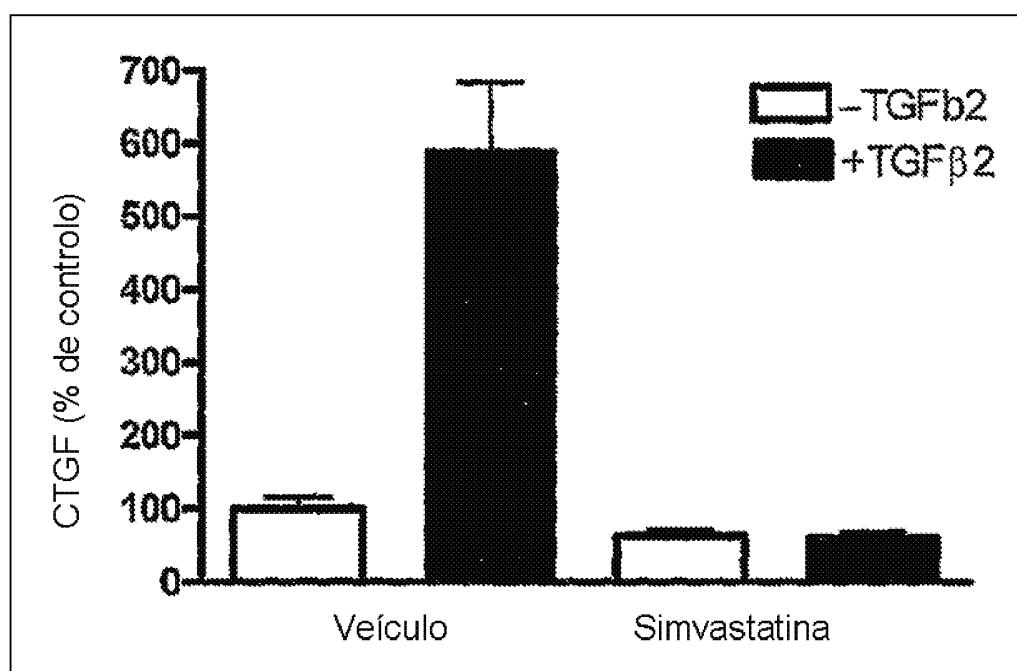


Fig. 2

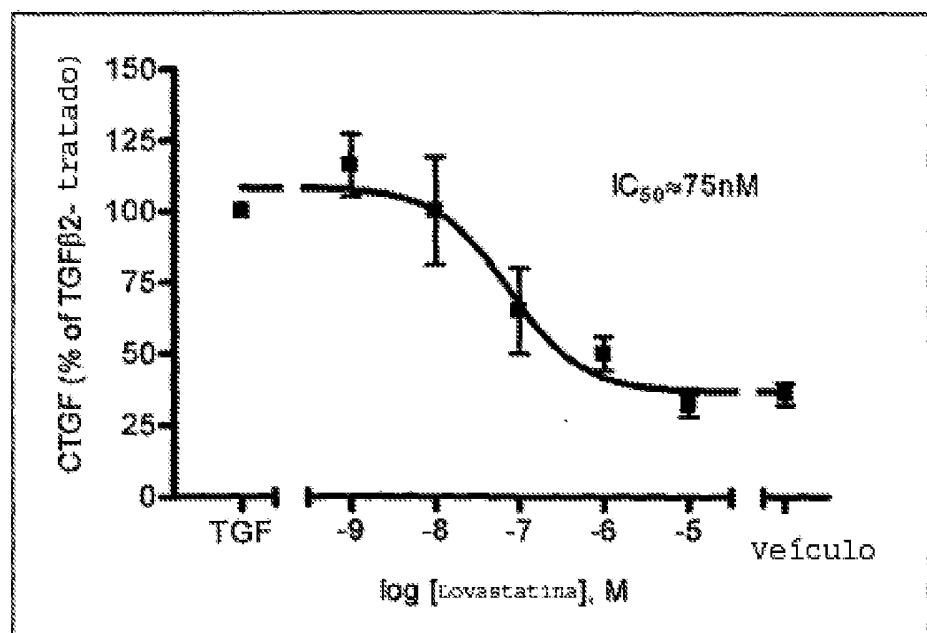
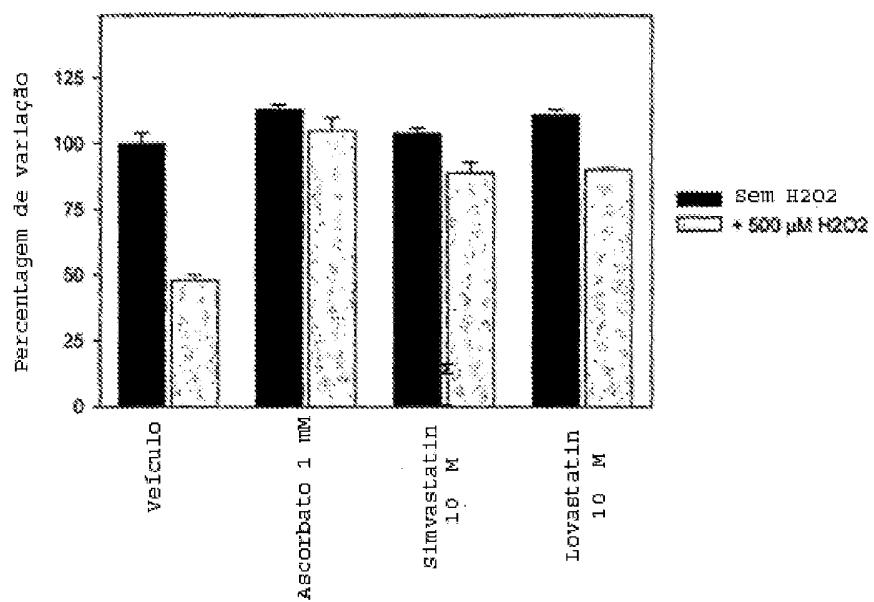


Fig. 3

## Viabilidade das células HTM-35D:

Efeito das Estatinas na Tensão Oxidativa induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

As células foram incubadas na presença ou ausência de agentes de teste em meio livre de soro durante 30 minutos (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), seguido por lavagem e substituição com meio livre de soro durante 2 dias. De seguida a viabilidade foi avaliada pela retoma do vermelho neutro. As barras representam a média e SEM de duas experiências separadas, cada um executado em triplicado.

Fig.4

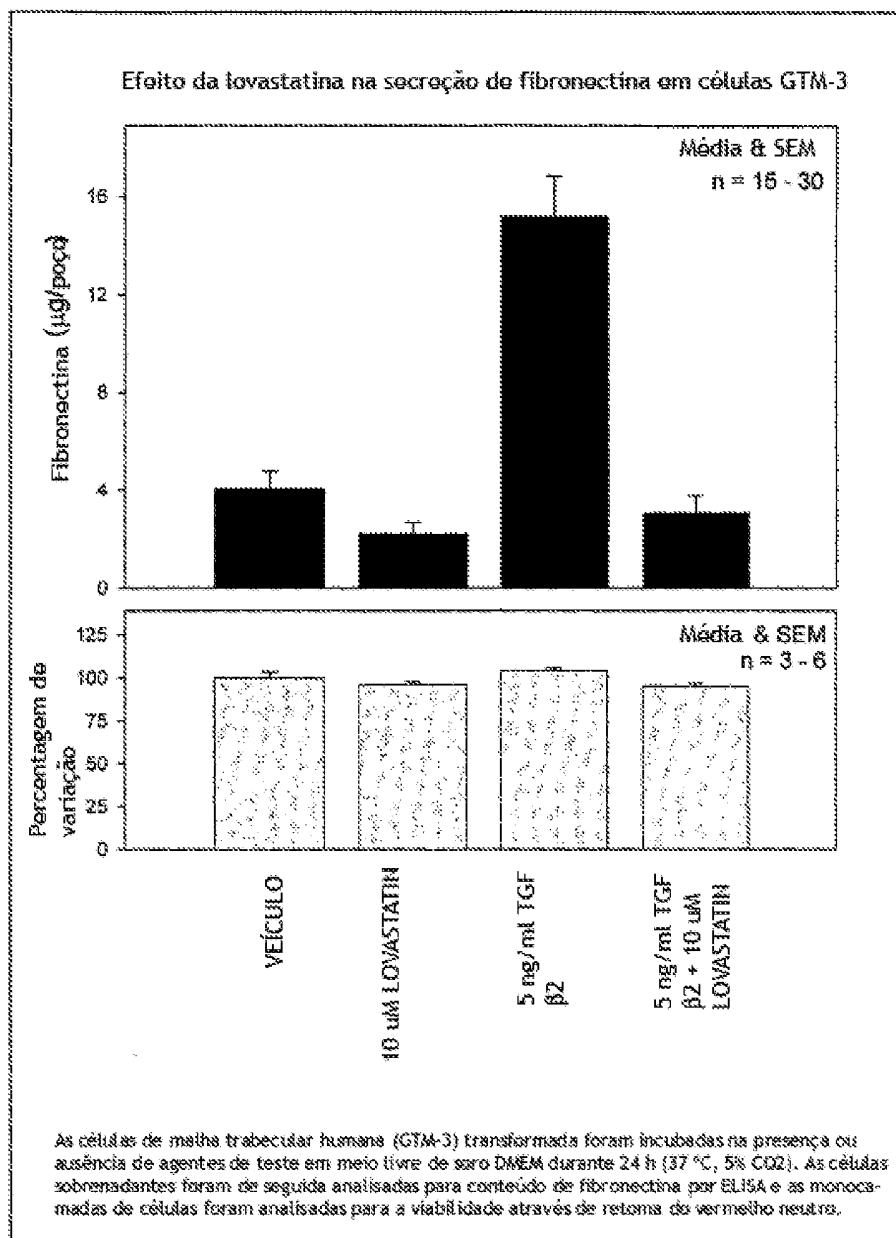


Fig. 5

**REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

**Documentos de patentes citadas na Descrição**

- US 20030065020 A
- US 6569461 B
- WO 200503683 A
- EP 0473337 A
- US 5134124 A
- US 5889052 A
- US 5236504 A
- US 5422368 A
- US 5352708 A
- US 5151444 A
- US 4690931 A
- US SN80203350 P
- WO 9413275 A

**Literatura que não é de patentes citada na Descrição**

- WASSMANN ; NICKENIG. *Endothelium*, 2003, vol. 10, 23-33
- MASON JC. *Clin Sci (Lond)*, 2003, vol. 105, 251-66
- YOSHIDA M J. *Atherosclerosis Thromb*, 2003, vol. 18 (3), 140-4
- LUO JD ; CHEN AF. *Curr Med Chem*, 2003, vol. 10 (18), 1593-601
- SCHMIDT et al. *Ophthalmic Res.*, 1994, vol. 26, 352-60
- KLOTZ U. *Arzneim Forsch (Drug Research)*, 2003, vol. 53, 605-611
- BRENT DA ; SABALTKS JJ ; MINICK DJ ; HENRY DW. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1993, vol. 26, 1014-1020
- ALVARADO et al. *Ophthalmology*, 1994, vol. 91, 564-579
- KURYSHEVA et al. *Vestn Oftalmol*, 1996, vol. 112, 3-5
- FLAMMER et al. *Prog Retin Eye Res*, 2002, vol. 21, 359-393
- DREYER et al. *Arch Ophthalmol*, 1996, vol. 114, 299-305
- QUIGLEY et al. *Arch Ophthalmol*, 1981, vol. 99, 635-649
- QUIGLEY et al. *Arch Ophthalmol*, 1982, vol. 100, 135-146
- QUIGLEY et al. *Am J Ophthalmol*, 1983, vol. 95, 674-691
- GREENLUND et al. *Neuron*, 1995, vol. 14, 303-315
- SHEFER et al. *J. Lipid Res*, 1972, vol. 13, 402
- ALBERTS et al. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 1980, vol. 77, 3967