



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1173255 E**

(51) Classificação Internacional:
A61P 27/02 (2006.01) **A61K 31/535** (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2000.03.13**

(30) Prioridade(s): **1999.03.17 IT RM99016**

(43) Data de publicação do pedido: **2002.01.23**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.12.27**
003/2007

(73) Titular(es):

FARMIGEA S.P.A.
VIA G.B. OLIVA, 6/8 56121 PISA

IT

(72) Inventor(es):

ENRICO BOLDRINI
MARIO CIUFFI

IT

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE PIRENOXINA PARA A PROTECÇÃO DE TECIDOS DA CÓRNEA EM
FOTOQUERATECTOMIA**

(57) Resumo:

RESUMO

"Utilização de pirenoxina para a protecção de tecidos da córnea em fotoqueratectomia"

Pirenoxina ou ácido 1-hidroxi-5-oxo-5H-pirido-[3,2a]-fenoxazino-3-carboxílico, também denominada pirfenossona e já utilizada como agente anti-cataratas, na forma de um seu sal farmaceuticamente aceitável, se desejado, é utilizada para a protecção do tecido corneal em intervenções de fotoqueratectomia, como a fotoablação da córnea utilizando laser de excímero, para fins tanto refractivos como terapêuticos. De facto, a pirenoxina é capaz de inibir, na córnea, os fenómenos oxidativos determinados por espécies de oxigénio reactivas (ROS) que são produzidas no interior dos tecidos após a irradiação com laser.

DESCRIÇÃO

"Utilização de pirenoxina para a protecção de tecidos da córnea em fotoqueratectomia"

A presente invenção refere-se à utilização de pirenoxina para a protecção dos tecidos corneais em intervenções de fotoqueratectomia. Mais particularmente, a invenção refere-se à utilização de pirenoxina e seus sais como agentes capazes de inibir no interior da córnea os fenómenos oxidativos determinados por espécies de oxigénio reactivas (ou ROS, do inglês "Reactive Oxygen Species") que são produzidas nos tecidos após a irradiação com laser.

Como sabido, a cirurgia oftálmica, e particularmente a refractiva, que tem o objectivo de modificar o poder refractivo do olho de modo a corrigir defeitos visuais não desprezáveis, utiliza várias técnicas, mais ou menos consolidadas ou em evolução, das quais são alguns exemplos a queractomia radial, a epikeratofaquia e a queratomileusis. Em adição a estas, também no campo da oftalmologia, a utilização de laser, particularmente laser em estado sólido, (como o laser de neodímio:granada de ítrio-alumínio, conhecido como Nd:YAG), e, acima de tudo, laser de excímero, está notavelmente aumentada.

O laser de excímero é um laser pulsátil que, devido ao decaimento de dímeros de gás nobre excitados (excímeros obtidos a partir de misturas gasosas de halogéneo e gases nobres), é capaz de emitir grandes quantidades de energia na forma de radiação na gama do ultravioleta longínquo (UV-L), na forma de sucessões de impulsos possuindo duração, frequência e fluência predeterminadas. Qualquer fotão emitido durante a irradiação possui energia suficiente para quebrar as ligações intramoleculares do material exposto, de tal modo que as moléculas irradiadas são "quebradas" em pequenos fragmentos voláteis que são expulsos a velocidades supersónicas concretizando um processo conhecido como "fotodecomposição".

Nas aplicações que utilizam o laser de excímero em intervenções de cirurgia corneal, usualmente é empregue um laser de árgon-flúor, emitindo radiação com um comprimento de

onda de 193 nm, que é adequado para realizar intervenções de alta precisão com um controlo óptimo sobre a profundidade da penetração e um efeito mínimo de danos térmicos ou mecânicos sobre tecidos adjacentes aos expostos. Ao contrário de outros lasers utilizados no campo clínico, o laser de excímero não emite energia concentrada num ponto focal mas possui um raio com uma grande secção transversal que, ao atravessar ranhuras adequadas, é dirigido para atingir grandes zonas da superfície da córnea com um controlo preciso do formato e dos tamanhos das zonas expostas. A energia emitida é quase totalmente adsorvida por uma camada superficial dentro de uma espessura de alguns micra e resulta, por meio de evaporação, na ablação em cada impulso de camadas de córnea pouco mais grossas que moleculares, com uma reproduzibilidade não atingível por outras técnicas.

O laser de excímero é amplamente utilizado para a remodelação refractiva corneal em técnicas conhecidas como queratectomia fotorrefractiva ou PRK e LASIK (do inglês, "*laser intrastromal keratomileusis*" - queratomileusis intraestroma a laser), para a correção de várias ametropias, sendo entre elas a mais difundida a miopia. Como conhecido, esta última é um defeito determinado por uma curvatura da córnea superior à requerida pelo comprimento do globo ocular, de modo que os raios de luz vindos do exterior são refractados de tal modo que convergem num ponto focal antes de atingirem a retina. Nestas circunstâncias, a utilização de laser de excímero proporciona que camadas de tecido corneal, cuja espessura aumenta no sentido do centro, sejam removidas, reduzindo desse modo a curvatura da córnea. Quando a técnica é utilizada para a correção de hipermetropia, em que, ao contrário, a modificação a obter é um aumento da curvatura da córnea, a quantidade de tecido removido na periferia da zona exposta é mais importante do que no centro. Finalmente, para a correção do astigmatismo, que, como se sabe, é uma ametropia causada por diferenças de curvatura em vários meridianos da superfície ocular, a profundidade da ablação pode ser assimétrica, dependendo do meridiano a "aplanar".

Mais recentemente, a utilização do laser de excímero foi sugerida para a remoção terapêutica de tecidos corneais superficiais, para o tratamento de várias irregularidades e

opacidades corneais: tais como do tipo distrófico, degenerativo, cicatricial ou infeccioso. Esta operação, denominada queratectomia fototerapêutica ou PTK, tem sido utilizada, por exemplo, para o tratamento de erosões corneais recorrentes, queratite pós-operatória, distrofias corneais como distrofias de Reis-Buckler, opacidades ou cicatrizes corneais causadas por Herpes simplex, irregularidades da superfície após intervenções cirúrgicas, por exemplo como resultado de queratoplastia ou intervenções corneais refractivas. Ao contrário da fotoqueratectomia refractiva, a PTK tem como objectivo eliminar irregularidades na superfície corneal de modo a aplanar o seu perfil e desse modo envolve a ablação de camadas de tecido com diferentes espessuras nas várias zonas da superfície corneal tratada.

Embora as intervenções de fotoqueratectomia atrás descritas pareçam ser uma alternativa menos traumática do que as técnicas de cirurgia oftálmica, o processo correctivo após a fotoablação não está isento de inconvenientes que são mais ou menos transitórios e inconvenientes ou incapacitantes para o paciente, entre os quais, por exemplo, os problemas cicatriciais corneais, a geração de opacidades sub-epiteliais denominadas "névoa", que determinam uma redução de eficiência visual resultante de fenómenos de "dispersão de luz" (difusão de luz) e, em algumas circunstâncias, uma redução de valores refractivos em resultado da operação. Parece não ser discutível pelos peritos na especialidade que, pelo menos parcialmente, estes efeitos resultam da formação de radicais livres e, geralmente, espécies de oxigénio reactivas, que foi detectada como um efeito secundário da irradiação com UV e do aumento da temperatura que ocorre nos tecidos envolvidos.

Como se sabe, a expressão "espécies (ou substâncias) de oxigénio reactivas", ou ROS, significa actualmente, colectivamente, radicais livres e espécies químicas não radicalares que correntemente fazem parte dos processos biológicos oxidativos e cujo excesso em relação às condições de equilíbrio natural, é considerado como sendo a base de um número sempre crescente de fenómenos degenerativos e patológicos. Especificamente, o termo ROS compreende o radical aniónico superóxido $O_2^- \cdot$, o radical hidroxilo OH^- , o oxigénio singuleto 1O_2 e o peróxido de hidrogénio, H_2O_2 , assim como

radicais alcóxido RO^\bullet e peróxido ROO^\bullet , que são gerados a partir de moléculas orgânicas durante os processos oxidativos. A actividade destas espécies exerce-se, no interior do organismo, sobre vários componentes celulares, entre os quais um grande número de proteínas estruturais e enzimas, ADN, ARN e, acima de tudo, os lípidos de membranas.

De facto, a peroxidação dos lípidos é o mecanismo mais conhecido através do qual as ROS exercem a sua actividade degenerativa sobre ácidos gordos poli-insaturados (AGPI) que danificam as estruturas celulares, contidos nas membranas citoplasmáticas, frequentemente na forma de ésteres fosfolipídicos. Na etapa inicial deste processo, a acção de um radical livre subtrai um átomo de hidrogénio H^\bullet à cadeia lipídica, formando um radical livre R^* que sofre um rearranjo molecular das ligações duplas resultando num radical dieno conjugado. Este último reage rapidamente com oxigénio molecular formando desse modo um radical peróxido lipídico ROO^\bullet , que, sendo um oxidante suficientemente forte para atacar outro AGPI, inicia a etapa de propagação da reacção. Desta maneira, são formados um radical hidroperóxido lipídico, ROOH ; e, de forma correspondente, outro radical peróxido lipídico, ROO^\bullet . Assim, o ramo principal atrás descrito da reacção ocorre por meio de ataques em cadeia de radicais aos lípidos da membrana que são assim transformados, passo a passo, nos correspondentes hidroperóxidos, até à terminação da cadeia por meio de um radical livre.

Vários agentes de ocorrência natural nos tecidos celulares podem realizar a acção atrás descrita, praticamente funcionando como sequestrantes ou antioxidantes. Entre estes, os mais conhecidos são as vitaminas C (ácido ascórbico) e E (alfa-tocoferol), enzimas antioxidantas como a superóxido-dismutase (SOD), a catalase, a glutationa-peroxidase e vários compostos de baixo peso molecular, entre os quais glutationa (GSH), tirosina, ácido úrico. A protecção natural contra os stressses oxidativos realizada por estas substâncias, contudo, não consegue ser suficientemente forte para antagonizar o efeito de degradação das ROS, circunstâncias em que a peroxidação de lípidos pode resultar em danos irreversíveis nas membranas celulares.

Demonstrou-se também que as formas oxidadas de iões de metais de transição, como Fe^{3+} e Cu^{2+} , na presença de H_2O_2 , podem acelerar o mecanismo oxidativo através de uma reacção não enzimática conhecida como reacção de Fenton. Na presença de um agente redutor, como ascorbato, parte dos iões oxidados são reduzidos para o estado de oxidação mais baixo (por exemplo Fe^{2+}) e a reacção, cuja velocidade depende da razão $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$, prossegue, resultando na conversão de peróxido de hidrogénio no ião hidroxilo, OH^- , e um radical hidroxilo, $\text{OH}\cdot$. Este último representa a ROS mais reactiva.

Embora seja difícil detectar ROS devido à sua reactividade e portanto aos seus curtos tempos de vida, a formação de radicais livres em tecidos submetidos a fotoablação utilizando laser de excímero tem sido amplamente demonstrada. Por exemplo, a presença de radicais livres em córneas bovinas expostas a irradiação utilizando laser ArF foi revelada por espectroscopia de EPR (ressonância paramagnética de electrões) (R.J. Landry et al., *Laser and Light in Ophthalmol.*, 6: 87-90, 1994), enquanto medições de aumentos de temperatura ao nível do endotélio corneal e determinações analíticas da redução da actividade de SOD ao nível do humor aquoso confirmaram a formação de ROS na córnea de coelhos tratados com PRK (K. Bigihan et al., *Jpn. J. Ophthalmol.*, 40, 154-157, 1996). A peroxidação lipídica foi detectada, novamente na córnea de coelho, após tratamento com PTK realizado utilizando laser de excímero, tanto por teste histoquímico como por detecção analítica da presença de produtos de degradação em extractos de lípidos corneais, particularmente dienos conjugados e cetodienos (S. Hayashi et al., *British J. Ophthalmol.* 81, 141-144, 1997).

Adicionalmente, foi notada, por espectroscopia EPR, a geração de radicais livres também quando os tecidos corneais são irradiados utilizando laser Nd:Yag em estado sólido, a um comprimento de onda de 213 nm em vez de 193 nm, comprimento de onda que é típico do laser de excímero de árgon-flúor. Contudo, neste caso, em adição a um dano oxidativo comparável com o que é obtido utilizando o laser de excímero, foi também detectado um efeito citotóxico mais notável, de algum modo dependente do maior comprimento de onda da radiação (E. Ediger et al., *Lasers Surg. Med.*, 21:88-93, 1997).

Em adição ao efeito da radiação UV sobre a produção primária de ROS, foi também observado que a actividade de quimiotaxia dos hidroperóxidos lipídicos assim formados retira *in situ* células polimorfonucleadas e macrófagos que, por sua vez, produzindo mais ROS, aumentam a acção de danos da radiação induzindo um conjunto de efeitos citotóxicos (H. Goto *et al.*, *Curr. Eye Res.*, 10:1009-1014, 1991).

Embora a literatura atrás mencionada demonstre a formação de radicais livres e espécies de oxigénio reactivas no tratamento de fotoablação e relate este fenómeno com outras possíveis complicações pós-operatórias, não é considerada particularmente importante a protecção dos tecidos corneais por administração de agentes exógenos possuindo actividade antagonizante de ROS tanto antes como depois da operação. Com efeito, a terapia farmacológica correntemente utilizada para os tratamentos de fotoqueratotomia consiste na aplicação ocular tópica, após a operação, de antibióticos, com o claro fim de manter em condições assépticas a superfície ocular durante o processo de cicatrização, e fármacos anti-inflamatórios (esteróides ou, de acordo com a mais recente tendência, não esteróides) de modo a actuar contra as condições de flogose pós-operatória.

Portanto, o objecto da presente invenção consiste em proporcionar aos tecidos corneais envolvidos na irradiação com UV, tanto antes como logo após o tratamento, um agente adequado para realizar uma actividade protectora contra os danos celulares desencadeados pelas espécies de oxigénio reactivas e para sequestrar a sua acção. Particularmente o agente sugerido tem que ser eficaz para se opor à peroxidação lipídica nos tecidos celulares corneais.

Nos estudos acerca dos efeitos das ROS e da inibição da peroxidação lipídica por várias moléculas exógenas possuindo actividades sequestrante ou antioxidante, verificou-se que a pirenoxina, um princípio activo já conhecido e utilizado terapeuticamente noutro distrito ocular, o cristalino, apresenta uma notável actividade para a inibição de peroxidação lipídica nos tecidos corneais e é portanto capaz de realizar uma acção protectora contra as modificações celulares resultantes da irradiação com laser.

A pirenoxina ou ácido 1-hidroxi-5-oxo-5H-pirido-[3,2a]-fenoxazino-3-carboxílico (também denominada pirfenossona) é um composto conhecido possuindo a seguinte fórmula:



utilizado em oftalmologia, usualmente na forma do seu sal de sódio, para o tratamento da catarata. Esta é uma condição anómala progressiva do cristalino do olho caracterizada por uma crescente perda de transparência. Como se sabe, as cataratas resultam mais frequentemente de modificações degenerativas, muitas vezes ocorrendo após os 50 anos de idade, embora mais raramente possam resultar de traumatismos ou exposição a venenos. Inicialmente a visão é enevoada, depois as luzes brilhantes encandeiam difusamente e pode-se desenvolver distorção e visão dupla. No final, se a catarata não for tratada, ocorre anopia. Em adição ao tratamento cirúrgico, que se torna necessário para estados degenerativos mais avançados e envolve a ablação do cristalino (com ou sem implantação cirúrgica de uma lente intra-ocular) as cataratas podem ser tratadas por administração tópica oftálmica de pirenoxina na forma de colírio.

Foi postulado que a capacidade da pirenoxina para inibir a formação de opacidades lenticulares resulta de pelo menos três diferentes mecanismos de acção: (a) inibição da actividade de oxidação das moléculas de quinona nas proteínas lenticulares, por ligação dos seus grupos -SH; (b) activação e normalização da actividade de bombagem de catiões realizada pela cápsula do cristalino; (c) inibição da síntese de sorbitol e redução dos danos osmóticos resultantes do armazenamento desta substância (S. Iwata, *J. Pharmac. Soc. Jap.*, 1964; 844: 435-440; F. Ikemoto et al., em: *Proc. 50th Congr. Pharmacol. Soc. Jap.*, Kanto Region, 1974: I. Korte et al., *Ophthalmic Res.*, 1979; 11: 123-125).

Nos estudos mais recentes acerca da actividade biológica da pirenoxina verificou-se também, e é o objecto do pedido de patente europeia N.º EP 0885612, concedida ao presente Requerente, que esta molécula, em adição à actividade no

tratamento da catarata, possui igualmente propriedades anti-inflamatórias. Estas propriedades, que foram verificadas em modelos animais, concretizam-se através de um mecanismo de acção não elucidado no referido pedido de patente, embora na descrição da referida patente seja postulada uma actividade de inibição do catabolismo oxidativo do ácido araquidónico, que resulta na produção de prostaglandinas.

De acordo com a presente invenção verificou-se, como já relatado, que a pirenoxina pode ser utilizada vantajosamente para a protecção dos tecidos corneais durante tratamentos com laser de excímero porque é activa na inibição da peroxidação lipídica nos tecidos celulares corneais.

É portanto um objecto da presente invenção a utilização de ácido 1-hidroxi-5-oxo-5H-pirido-[3,2a]-fenoxazino-3-carboxílico (pirenoxina) ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, para a produção de um fármaco oftálmico tópico adequado para a protecção dos tecidos corneais em intervenções de fotoqueratectomia. Como já apontado, o fármaco sugerido é desenhado como inibidor da actividade de ROS (espécies de oxigénio reactivas) ao nível de tecidos corneais e, particularmente como inibidor da peroxidação lipídica ao nível dos referidos tecidos.

A utilização de pirenoxina como agente protector pré- e pós-operatório tem aplicação em qualquer tratamento de fotoqueratectomia, sendo ainda presumível uma mais ampla utilização nos tratamentos que presentemente estão mais difundidos, *i.e.* fotoablação da córnea por meio de laser de excímero, tanto refractiva como terapêutica e, no primeiro caso tanto por meio da técnica PRK como da LASIK.

As preparações oftálmicas da presente invenção preferivelmente contêm o princípio activo, *i.e.* pirenoxina ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, numa quantidade de 0,0001% a 0,01% em peso, expressa como ácido livre. Mais convenientemente, os referidos medicamentos contêm de 0,001% a 0,005% em peso de pirenoxina, expressa como ácido livre, sendo a concentração óptima igual à que é presentemente utilizada para a terapia da catarata, *i.e.* 0,005% em peso. Mais convenientemente, a referida pirenoxina está na forma do sal

de sódio. Quando utilizada na forma de colírio contendo 0,005% em peso do princípio activo, a preparação de acordo com a invenção pode ser administrada, de modo a obter o efeito desejado de inibição de ROS, numa dosagem de uma-duas gotas duas ou três vezes por dia, preferivelmente duas gotas três vezes por dia, começando pelo menos um ou dois dias antes da operação e continuando, após a operação, ao longo de pelo menos um ou dois dias. Geralmente a dosagem e a posologia podem ser amplamente variáveis sem prejuízo do efeito protector global contra ROS exercido pelo produto.

O fármaco tópico oftálmico contendo pirenoxina ou um seu sal, pode estar, geralmente, nas mesmas formas que é preparado ou proposto para a utilização do mesmo princípio activo para a terapia da catarata ou da inflamação oftálmica, como descrito no pedido de patente europeia atrás mencionado EP-A-0885612. Particularmente, o produto pode estar na forma de solução ou suspensão aquosa para colírio ou na forma de emulsão, pomada, gel ou creme. Preferivelmente o produto é administrado na forma de solução oftálmica aquosa. Devido à instabilidade do princípio activo, a pirenoxina é normalmente formulada, nos medicamentos já utilizados para o tratamento da catarata, na forma de uma preparação de dois componentes em que um primeiro componente compreende pirenoxina criodessecada e o segundo componente compreende um transportador ou diluente aquoso aceitável para o olho. Os dois componentes são reconstituídos antes da utilização e a solução assim obtida pode ser geralmente armazenada à temperatura ambiente durante cerca de duas semanas sem degradação.

Geralmente, as composições contendo pirenoxina ou um seu sal, de acordo com a invenção, podem ser formuladas de acordo com a arte conhecida, por exemplo de acordo com os ensinamentos sugeridos por "Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook", Hack Publ. Co., E.U.A. Usualmente, um ou mais agentes para a regulação da tonicidade deverão ser adicionados para que a solução possua um valor adequado de osmolaridade. Qualquer um dos produtos usualmente utilizados na especialidade pode ser utilizado, como, por exemplo, cloreto de sódio, cloreto de potássio, manitol, dextrose, ácido bórico, propilenoglicol. A preparação pode também compreender ácidos ou bases como agentes para a regulação do

pH e/ou tampões, como, por exemplo, sistemas fosfato monossódico - fosfato dissódico, borato de sódio - ácido bórico ou succinato de sódio - ácido succínico. Para obter uma boa tolerância no olho, o pH deverá estar entre 4,5 e 8,5. Adicionalmente, a composição deverá também compreender conservantes e agentes antimicrobianos, como cloreto de benzalcónio, mertiolato de sódio ou timerosal, metil-, etil- e propil-parabeno, clorobutanol, assim como agentes quelantes ou sequestrantes como edetatos ou EDTA. Se o produto for embalado em recipientes de dose unitária, a presença de conservantes pode ser evitada mas, quando são utilizados recipientes de doses múltiplas, por exemplo frascos para colírio contendo de 5 a 15 ml, a presença dos conservantes é necessária.

Em adição, a preparação oftálmica pode compreender outros ingredientes opcionais, como agentes espessantes, antioxidantes, estabilizantes, agentes superficialmente activos, etc. Apenas com fim exemplificativo, é adiante descrita a composição de um produto já disponível no comércio desenhado para o tratamento da catarata. A formulação pode ser adequada também para a utilização do produto como agente protector da córnea contra radicais livres e ROS.

Alguns resultados experimentais obtidos no âmbito da presente invenção estão relatados a título de exemplo juntamente com os desenhos anexos, em que:

a figura 1 mostra o efeito de pirenoxina 10^{-5} M sobre a formação de fluorescência de substâncias lipídicas solúveis em córneas de coelho após incubação com macrófagos autólogos estimulados por f-MLP. Cada barra \pm S.E.M. representa o valor médio (entre parêntesis o número de córneas processadas). *: $p<0,01$ vs controlo. Os valores de controlo são significativamente superiores aos valores de base ($p<0,0002$):

a figura 2 mostra a formação de fluorescência *in vitro* de substâncias lipídicas solúveis em células epiteliais corneais irradiadas com UV_{312} (80 mJ/cm^2) após incubação na presença e na ausência de pirenoxina 10^{-5} M. Os resultados são a média de 3 experiências;

a figura 3 mostra os efeitos *ex vivo* de instilações de pirenoxina ($60\text{ }\mu\text{l}$ de hora a hora durante 8 horas ao longo de 2 dias) nos olhos de coelho com formação de dienos conjugados

nas córneas *in vitro* submetidas a peroxidação lipídica induzida por ferro. Cada barra \pm S.E.M. representa o valor médio (entre parêntesis o número de córneas processadas). (a): expresso pela diferença entre o valor da amostra e o valor de base (sem indução por ferro: $1,3 \pm 0,21$ nmol/hemi-córnea; n = 8). *: $p < 0,02$ vs controlo.

Exemplo

Formulação de pirenoxina de sódio criodessecada

O componente em pó seco do produto possui a seguinte composição, em que as quantidades são dadas para a reconstituição numa solução de 7 ml:

Pirenoxina de sódio	0,376 mg
(equivalente a 0,350 mg de pirenoxina) taurina	34,34 mg

Na preparação, a taurina e a pirenoxina de sódio são separadamente dissolvidas em água desionizada, as duas soluções são esterilizadas por filtração e depois são misturadas e submetidas ao processo de criodessecagem.

O solvente aquoso possui a seguinte composição:

poli(álcool vinílico)	98 mg
ácido succínico	2,31 mg
succinato de sódio.6 H ₂ O	89,215 mg
cloreto de sódio	34,3 mg
cloreto de benzalcónio	0,175 mg
edetato de sódio	0,89 mg
água desionizada	q.b. para 7 ml

Em adição aos ingredientes mencionados na descrição anterior a referida formulação contém PVA como agente espessante. O pH do componente solvente é de 6. A formulação é preparada misturando primeiro e dissolvendo em água todos os ingredientes excepto o cloreto de benzalcónio. Após a dissolução completa de todos os produtos, adiciona-se o cloreto de benzalcónio sob agitação contínua e a mistura é

esterilizada por filtração. O pH do produto reconstituído é de 6-6,3.

Testes de actividade como inibidor da peroxidação lipídica

De modo a avaliar o desempenho da pirenoxina como agente protector contra a acção de ROS nos tecidos corneais e particularmente contra a peroxidação lipídica, avaliou-se a actividade *in vitro* da pirenoxina tanto em homogenatos corneais na presença do sistema oxidante Fe(III)-ácido ascórbico como em córnea completa submetida à acção de ROS geradas a partir de macrófagos autólogos.

Em adição, os efeitos da luz UV sobre a córnea foram cuidadosamente inspeccionados porque o tecido corneal é continuamente exposto ao ambiente externo e portanto à acção combinada de oxigénio e radiação.

As primeiras experiências realizadas por irradiação com UV₃₁₂ de células epiteliais corneais sugerem que também neste caso a pirenoxina proporciona protecção antioxidação.

A mesma molécula foi ensaiada quanto à sua acção *ex vivo* na protecção da córnea contra os ataques oxidativos *in vitro* catalisados pela presença de ferro, assim como contra a acção de um complexo fisiológico de ferro, ferritina, previamente irradiada com UV e depois injectada no estroma da córnea. Em ambos os casos a pirenoxina originou resultados bem sucedidos.

Das experiências realizadas até agora a pirenoxina resulta um meio eficaz para proteger a córnea afectada de patologias geradas por espécies de oxigénio reactivas.

Efeito *in vitro* de pirenoxina sobre a acção de ROS induzidas em homogenatos de epitélio e endotélio de córneas de coelho.

O procedimento experimental para a avaliação da acção de inibição contra a peroxidação lipídica exercida por pirenoxina em células epiteliais e endoteliais da córnea faz uso do sistema Fe(III)-ácido ascórbico para induzir o fenómeno peroxidativo. O ataque oxidativo aos lípidos de membrana foi confirmado pelas determinações espectrofotométricas tanto dos

dienos conjugados como das substâncias fluorescentes lipossolúveis que, como se sabe, são geradas pela degradação oxidativa de moléculas lipídicas.

O procedimento experimental utilizado incluía os passos seguintes: a) abstracção da córnea do olho de coelhos machos pigmentados adequadamente seleccionados e preparados para o estudo; b) incubação das córneas em tampão de fosfato 100 µM, pH 7,5, na presença de 1000 U de colagenase e CaCl₂ 5 µM durante 20 horas a 37°C; c) centrifugação a 35000 rpm a 0°C durante 10 minutos e lavagens do sedimento com tampão de fosfato; d) homogeneização do sedimento celular em 1 ml de tampão, pH 7,4 (10% p/v); e) incubação de uma alíquota de homogenato adequada com FeCl₃ 10 µM e ácido ascórbico em tampão fosfato, pH 7,4, a 27°C durante 30 minutos na presença e na ausência de pirenoxina 10⁻⁵ M; f) extracção das substâncias lipossolúveis utilizando a mistura clorofórmio/metanol (2:1 v/v). A determinação dos dienos conjugados contidos no extracto lipídico foi realizada de acordo com Buege et al. (*Methods Enzymol.*, 52: 302-310, 1974), enquanto as substâncias lipossolúveis fluorescentes foram determinadas de acordo com Fletcher et al. (*Anal. Biochem.* 52: 1-2, 1973). Os resultados do teste estão apresentados na tabela seguinte.

Tabela 1

	Dienos conjugados mmol/hemi-córnea	U de fluorescência/ hemi-córnea
Homogenato (valor basal)	2,93 ± 0,14	4,91 ± 0,11
Homogenato + Fe(III) (controlo)	3,49 ± 0,13*	5,89 ± 0,11 #
Homogenato + Fe(III) + pirenoxina 10 ⁻⁵ M	2,77 ± 0,07*	5,22 ± 0,13 ##

Cada valor ± SEM representa o valor médio de pelo menos 3 (x2) determinações

* p<0,05 e #: p<0,001 vs valores basais relativos;

**: p<0,001 e ##: p<0,005 vs controlos relativos.

A partir dos resultados apresentados na tabela anterior, é evidente que a pirenoxina exerce uma clara actividade de inibição contra a acção de peroxidação lipídica das ROS,

induzidas pelo sistema Fe(III)-ácido ascórbico, como se pode deduzir da notável diminuição dos dienos conjugados e da significativa diminuição das substâncias fluorescentes lipossolúveis quando estava presente a molécula atrás referida.

Efeito protector in vitro da pirenoxina sobre córneas submetidas à acção de ROS produzidas a partir de macrófagos de coelho autólogos estimulados por f-MLP

De modo a avaliar a inibição exercida pela pirenoxina contra a actividade de oxidação de ROS produzidas em macrófagos ao nível da córnea, realizou-se o seguinte procedimento: (a) lavagem bronco-alveolar do coelho para obter os macrófagos; (b) abstracção da córnea do olho do coelho; (c) incubação das córneas com macrófagos estimulados ou não estimulados por f-MLP 10^{-7} M (800 000 células/poço) durante duas horas a 37°C, 5% CO₂, na presença e na ausência de pirenoxina 10^{-5} M; (d) separação e homogeneização das células corneais epiteliais e endoteliais e subsequente determinação da fluorescência como descrito nos passos b, c, d e f da metodologia anterior.

Os resultados relatados na figura 1 mostram que por incubação de córneas completas juntamente com macrófagos autólogos na presença de pirenoxina, os níveis da fluorescência induzida resultam notavelmente inferiores aos controlos e são comparáveis com os de córneas normais (valores de base).

Efeito protector in vitro da pirenoxina sobre a acção de ROS induzidas em células epiteliais irradiadas com UVB

O efeito protector da pirenoxina sobre células epiteliais corneais (SIRC) irradiadas durante 36" utilizando luz UV₃₁₂ (80 mJ/cm²), de acordo com o seguinte procedimento: (a) as células corneais foram plaqueadas em poços de 35 mm de diâmetro; (b) a 80% da confluência, as células foram colocadas em contacto com um meio de baixo teor de soro (0,2%) para inibir a sua proliferação durante a experiência (c) as células foram irradiadas com luz UV na presença e na ausência de pirenoxina 10^{-5} , incubadas a 37°C durante 17 horas e homogeneizadas em tampão fosfato 10 mM, pH 7,4; (d) as

substâncias lipossolúveis fluorescentes e as proteínas contidas em alíquotas de homogenato adequadas foram determinadas.

Os resultados apresentados na figura 2 e na tabela 2 mostram que a pirenoxina exerce um efeito protector. De facto, as substâncias lipossolúveis fluorescentes produzidas a partir de células epiteliais corneais após a irradiação com UV₃₁₂ e na presença da referida molécula foram notavelmente inferiores (cerca de duas vezes e meia) às que são produzidas a partir de células irradiadas da mesma maneira mas não protegidas por pirenoxina e apresentam valores de fluorescência iguais aos de células não irradiadas.

Tabela 2

Células 17/12

	U/poço	Proteínas, mg/ml	U/mg de proteína
Controlo	4,029	0,405	9,95
UV ₃₁₂	7,3	0,27	27
UV ₃₁₂ + pir.	3,66	0,403	9,08

Células 20/12

	U/poço	Proteínas, mg/ml	U/mg de proteína
Controlo	1,61	0,171	9,4
UV ₃₁₂	2,256	0,13	17,35
UV ₃₁₂ + pir	1,8	0,245	7,35

Células 14/01

	U/poço	Proteínas, mg/ml	U/mg de proteína
Controlo	4,48	0,444	1,08
UV ₃₁₂	1,02	0,189	5,4
UV ₃₁₂ + pir.	0,92	0,333	2,76

Média

Controlo	6,81
UV ₃₁₂	16,6
UV ₃₁₂	6,4

Efeito ex vivo da pirenoxina sobre córneas de coelhos submetidas in vitro à acção de ROS

Utilizando o mesmo sistema de Fe(III)-ácido ascórbico para induzir a peroxidação lipídica que no primeiro teste descrito, a acção protectora da pirenoxina foi avaliada

ex vivo de acordo com o seguinte procedimento experimental: a) o olho direito do mesmo tipo de coelhos que se utilizou no teste anterior foi tratado topicalmente de hora a hora durante 8 horas e ao longo de 2 dias com 2 gotas de pirenoxina a 0,005% em NaCl 0,145 M (1 gota = 30 µl, correspondendo a cerca de 1,5 µg), enquanto o olho esquerdo foi tratado apenas com gotas de solução salina (60 µl); b) no terceiro dia, o coelho foi sacrificado por injecção com pentobarbital (100 mg/kg de peso corporal); c) as córneas, abstraídas (115-120 mg), foram retiradas e incubadas em tampão de fosfato 100 µM, pH 7,5, na presença de 1000 U de colagenase e CaCl₂ 5 µM durante 20 horas a 37°C; depois: (d) centrifugação a 3500 rpm a 0°C durante 10 minutos e lavagem do sedimento com tampão de fosfato; (e) homogeneização de sedimento celular em 1 ml de tampão de pH 7,5; (f) extracção com mistura clorofórmio/metanol e determinação espectrofotométrica dos dienos conjugados. Os resultados experimentais estão apresentados na figura 3 e na tabela 3 adiante:

Tabela 3

(dienos conjugados
(mmol/hemi-córnea))

instilação dos olhos com solução salina 1,85 ± 0,31

Instilação dos olhos com pirenoxina 1,34* ± 0,2

Cada valor ± SEM representa a média de pelo menos 3 (x2) determinações;

*: p<0,05

Os valores apresentados na tabela 3 indicam que a pirenoxina, administrada topicalmente nos olhos do coelho, atinge na córnea uma concentração tal que contraria *in vitro* a acção de peroxidação lipídica das ROS; de facto a formação de dienos conjugados nas córneas dos olhos (direitos) submetidas a instilação com pirenoxina a 0,005% foi inferior à presente nos olhos (esquerdos) tratados apenas com solução salina.

**Efeito in vivo da pirenoxina sobre córneas de coelho
submetidas a injecção intra-estroma de ferritina irradiada
com UV**

O efeito *in vivo* da pirenoxina foi avaliado de acordo com o seguinte:

(a) os coelhos foram anestesiados com doses baixas de pentobarbital (20 mg/kg); (b) injectaram-se 25 µl de ferritina 50 µM em NaCl 0,15 M no estroma da córnea através de uma seringa de insulina de 0,33 x 13 mm/29G enquanto os controlos foram tratados com 25 µl de solução fisiológica; (c) instilararam-se os olhos de hora a hora com duas gotas (1 gota = 30 µl) de pirenoxina a 0,005% em NaCl 0,145 M, 8 vezes por dia, durante 4 dias, enquanto os controlos foram tratados apenas com o solvente, na mesma quantidade e com a mesma frequência; (d) no 5º dia sacrificaram-se os animais utilizando uma sobredosagem de pentobarbital (100 mg/kg); (e) as córneas foram abstraídas e as células do tecido foram separadas e recolhidas de acordo com o procedimento descrito na experiência *ex vivo*; (f) determinaram-se os dienos conjugados e o lípido solúvel fluorescente contidos em aliquotas de homogenato adequadas.

Os resultados obtidos, apresentados na tabela 4, salientam uma redução da peroxidação lipídica nas córneas de olhos tratados com pirenoxina, como indicado pela diminuição de dienos conjugados e substâncias lipossolúveis fluorescentes.

Tabela 4

Olhos com injecção intra-estroma de Díeno conjugado ferritina	Díeno conjugado Nmol/hemi- córnea	Unidades de Fluorescência /hemi-córnea
Olhos com instilação com solução salina (sem ferritina: valor basal)	1,6	4,5
Olhos com instilação com solução salina (controlo)	2,1	11,5
Olhos com instilação com pirenoxina a 0,005%	1,7	4,4

Formação *in vivo* de dieno conjugado e substância lipossolúvel fluorescente nas córneas 5 dias após os olhos de coelho serem submetidos a injecção intra-estroma de ferritina irradiada com UV e instilação tópica de solução de pirenoxina (2 gotas de hora a hora durante 8 h ao longo 4 dias)

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de ácido 1-hidroxi-5-oxo-5H-pirido-[3,2-a]-fenoxazino-3-carboxílico (pirenoxina) ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, para a produção de um fármaco oftálmico tópico para a protecção do tecido corneal em intervenções de fotoqueratectomia.

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1 em que o referido fármaco é adequado como inibidor da acção de ROS (espécies de oxigénio reactivas) ao nível de tecidos corneais.

3. Utilização de acordo com a reivindicação 2 em que o referido fármaco é adequado como inibidor da peroxidação lipídica ao nível dos tecidos corneais.

4. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3 em que as referidas intervenções de fotoqueratectomia são intervenções de fotoablação corneal utilizando laser de excímero.

5. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, em que o referido fármaco contém de 0,0001% a 0,01% em peso de pirenoxina, expressa como ácido livre.

6. Utilização de acordo com a reivindicação 5, em que o referido fármaco contém de 0,001% a 0,005% em peso de pirenoxina, expressa como ácido livre.

7. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-6, em que a referida pirenoxina está na forma do correspondente sal de sódio.

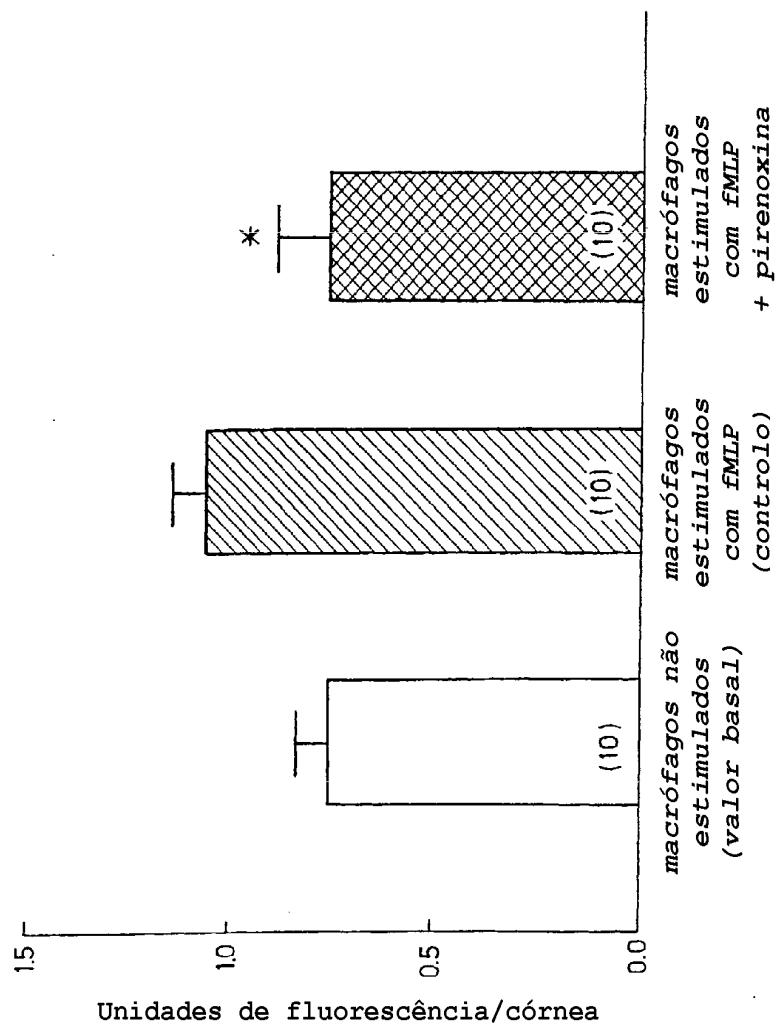
8. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-7, em que o referido fármaco oftálmico tópico está na forma de solução ou suspensão aquosa para colírio, ou na forma de emulsão, pomada, gel ou creme.

9. Utilização de acordo com a reivindicação 8, em que a referida solução aquosa é obtida por reconstituição de uma preparação de dois componentes em que um primeiro componente

compreende pirenoxina criodessecada, na forma do sal de sódio, juntamente com um transportador aceitável para o olho, e o segundo componente compreende um transportador ou diluente aquoso aceitável para o olho.

Lisboa,

FIG. 1



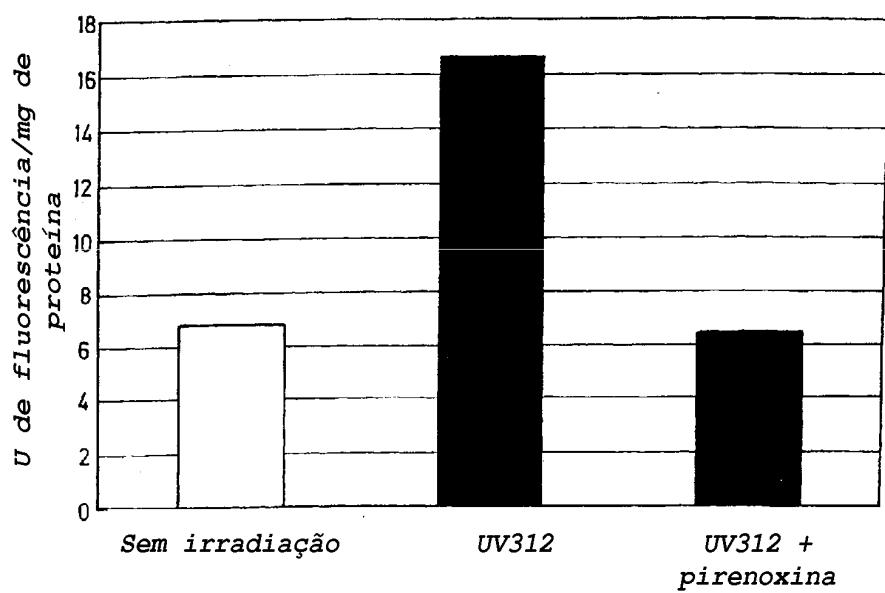


FIG. 2

FIG. 3

