



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

(21) BR 102014029027-3 A2

(22) Data do Depósito: 21/11/2014

(43) Data da Publicação: 27/09/2016



(54) Título: USO DE NANOFORMULAÇÕES CONTENDO DERIVADOS DE 2-AMINOTIOFENO COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS

(51) Int. Cl.: A61K 9/51; A61K 47/40; A61K 31/38; A61P 31/10

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE, UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO, UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAIBA

(72) Inventor(es): REGINALDO GONÇALVES DE LIMA NETO, PEDRO JOSÉ ROLIM NETO, ROSALI MARIA FERREIRA DA SILVA, LARISSA ARAÚJO ROLIM, REJANE PEREIRA NEVES, DELSON LARANJEIRA, HENRIQUE JOHN PEREIRA NEVES, WENDELL WONS NEVES, DANIELLE PATRÍCIA CERQUEIRA MACÊDO, ANA MARIA RABELO DE CARVALHO PARAHYM, GIOVANNA R.A. ELEAMEN, ELISÂNGELA AFONSO DE MOURA MENDONÇA, ELQUIO ELEAMEN OLIVEIRA, FRANCISCO JAIME BEZERRA MENDONÇA JUNIOR

(57) Resumo: USO DE NANOFORMULAÇÕES CONTENDO DERIVADOS DE 2-AMINOTIOFENO COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS. A presente patente aborda o uso de nanoformulações contendo derivados de 2-amir)otiofeno como agentes antifúngicos, que foi confirmado através da realização da atividade antifúngica in vitro. A avaliação in invitro da sensibilidade de espécies de leveduras dos géneros Candida e Cryptococcus, contra nanoformulações solúveis em água (nanoesferas e nanocápsulas) de 6CN10 e 6CN10 complexado com 2-hidroxipropil-13-ciclodextrina (HPBCD-6CN10). em comparação com o fármaco livre, foi realizada pelo método de microdiluição em caldo. Todos os isolados clínicos de Candida foram sensíveis à droga livre e foram resistentes a todos as nanotormulações á base de 6CN 10. No entanto, isolados clínicos de Cryptococcus neoformans avaliados apresentaram valores de concentração inibitória mínima (CIM) de 0.32-83.33ug.mL' para nanoformulações-6CN10 e 0.1-0.2 ug.ml para nanoformulações-6CN10-HPBCD. sendo até 3.333 vezes mais ativos do que a droga-livre (CIM = 166~66-333.33~Ãg.mL'), além de apresentar uma atividade superior ao antifúngico de referência Anfotericina B (CIM 0,(...))

RELATÓRIO DESCRITIVO

USO DE NANOFORMULAÇÕES CONTENDO DERIVADOS DE 2-AMINOTIOFENO COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS

01. A presente patente aborda o uso de nanoformulações contendo derivados de 2-aminotiofeno como agentes antifúngicos.
02. Estudos demonstraram que uma série de cicloalquílicos derivados de tiofeno apresentaram atividade fungicida contra 40-45 isolados clínicos de *Candida* e *Cryptococcus*, exibindo melhor perfil antifúngico contra *C. neoformans*, sendo o mais ativo a 2 - [(4-nitrobenzilideno)-amino] -4,5,6,7-tetra-hidro-4H-benzo [b] tiofeno-3-carbonitrilo, chamado 6CN10.

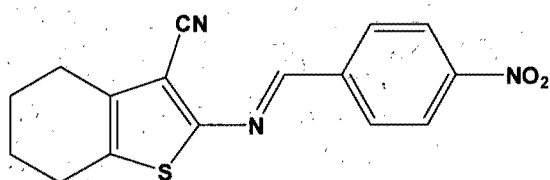


Figura 1. Estrutura química do 6CN10

03. Esta patente objetiva avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de nanoformulações contendo 6CN10 e complexo 6CN10/2-hidroxipropyl- β -cyclodextrina a fim de comparar a sua eficiência contra a droga-livre e anfotericina B, determinando a concentração inibitória mínima (CIM), contra espécies de leveduras patogênicas de *Candida* e *Cryptococcus*.
04. 6CN10 foi sintetizado de acordo com os procedimentos descritos por Mendonça-Junior et al., em 2011, e sua estrutura química foi confirmada através do espectro de NMR¹H. O complexo 6CN10-HPBCD foi preparado de acordo com o descrito por Mendonça et al., em 2013.
05. Quatro diferentes formulações (Tabela 1) foram preparadas usando o método de nanoprecipitação descrito por Fessi et al., em 1989.
06. Para a produção das nanoesferas, 6CN10 puro ou complexado com 2-hidroxipropil- β -cyclodextrina (6CN10-HPBCD) contendo 10-15% de 6CN10 foram vertidos em acetona contendo o polímero poli- ϵ -caprolactona. Posteriormente, esta fase orgânica foi adicionada gota a gota na fase aquosa contendo o surfactante (Tween 80) sob agitação moderada a 20-30°C. O solvente orgânico foi eliminado por rotaevaporação, e o volume final das suspensões foi ajustado para 8-12 mL. Para produzir as nanocápsulas Mygliol 812, foi adicionada a fase

orgânica. A quantidade final de 6CN10 nas formulações foi doseada espectrofotometricamente a 280-282 nm. As nanoformulações foram armazenadas a 2-5°C até a utilização.

07. Quinze isolados de *Candida* (cinco *Candida albicans*, uma *Candida famata*, uma *Candida glabrata*, uma *Candida guilliermondii*, uma *Candida krusei*, cinco *Candida parapsilosis* e uma *Candida tropicalis*) obtidos de pacientes com candidemia, quatro isolados de *Cryptococcus neoformans* obtidos do fluido cérebro-espinhal (CSF) de pacientes imunocomprometidos e o padrão de referência *C. parapsilosis* ATCC 22019 foram avaliados contra o potencial antifúngico de 6CN10 puro, complexo de 6CN10-HPBCD e nanoformulações contendo 6CN10.

08. As amostras clínicas foram processadas para diagnóstico micológico usando métodos padrão (exame direto e isolamento em cultura), no Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. O exame direto foi realizado sem adicionar coloração ou clareamento de amostras de sangue. As culturas foram preparadas utilizando agar Sabouraud Dextrose (SDA) (Difco) com cloranfenicol (40-60 mg.mL⁻¹) e incubadas a 30 e 35°C numa atmosfera aeróbica, durante 4-7 dias. Culturas puras foram transferidas para a superfície de SDA para identificação taxonômica.

09. Placas de microdiluição Referência, contendo droga serial ou diluições de nanoformulações foram preparadas, seguindo as orientações CLSI M27-A3 (CLSI, 2008). Foram utilizadas dispersões de nanosferas e nanocápsulas de 6CN10 (contendo 240-260 µg.mL⁻¹ de 6CN10) e complexo de 6CN10-HPBCD (contendo 80-120 µg.mL⁻¹ de 6CN10). 6CN10 (10,0 mg) puro e complexo de 6CN10-HPBCD, contendo 10-15% de 6CN10 (10,0 mg), foram dissolvidos em 0,8-1,2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), e diluídos em 8,0-1,0 mL de padrão RPMI 1640, tamponado a pH 7,0 com 0,16-0,17M de ácido morfolinopropanosulfônico, resultando, respectivamente, em soluções com concentrações de 0,8-1,2 mg.mL⁻¹ e 130-150 µg.mL⁻¹. As concentrações testadas foram de 0,30-0,32 a 330,00-334,00 µg.mL⁻¹ para 6CN10 puro; de 0,044-0,046 a 45,00-47,00 µg.mL⁻¹ para o complexo 6CN10-HPBCD; de 0,08 a 83,33 µg.mL⁻¹ para nanoesfera e nanocápsula de 6CN10; e de 0,002-0,004 to 3,0-4,0 µg.mL⁻¹ para nanoesfera e nanocápsulas de complexo 6CN10-HPBCD. Anfotericina B foi usada como droga de referência nas concentrações de 0,014-0,016 a 7,0-9,0 µg.mL⁻¹.

10. A fim de se obter um inóculo de levedura contendo 1,0 a 5,0 x 10⁶ UFC.mL⁻¹, cada estirpe foi cultivado em um tubo contendo 15-25 mL de 3-5% de Agar Sabouraud Dextrose (SDA; Difco) adicionado de extrato de levedura, a 30-40°C durante dois dias. As suspensões de leveduras foram preparadas em solução fisiológica estéril (0,80-0,90%), mantidas a 25-30°C, e,

em seguida, ajustadas para 90% de transmitância a 528-532 nm. Duas diluições em série a partir de 1:100 e 1:20 foram feitas para se obter um inóculo final contendo $1,0$ a $5,0 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹.

11. Para os testes de sensibilidade, foram adicionados 100 µL de cada solução (soluções de 6CN10 e complexos de 6CN10-HPBCD, nanoformulações contendo 6CN10 e complexo 6CN10-HPBCD, nanoformulações de drogas-livre e de drogas de referência) aos poços da primeira coluna da Placa de microdiluição Referência, e em seguida, foram realizadas 10 diluições seriadas em poços de microdiluição contendo 80-120 µL de meio padrão RPMI 1640 tamponado a pH 7,0 com 0,16-0,17 M de MOPS. Em seguida, os poços foram inoculadas com 80-120 µL do inóculo previamente obtido. As microplacas foram incubadas a 34-36°C em uma incubadora de livre de CO₂ e foram avaliados visualmente após 24-72 horas de incubação para isolados de *Candida* e 24-72h após a incubação para isolado de *Cryptococcus*. As CIMs corresponderam à diluição menor droga que mostrou inibição de crescimento em comparação com leveduras não tratadas. Todos os testes foram realizados em duplicata e valores de CIM foram expressos como média aritmética.

12. Para cada experiência, os controles de inóculo mostraram crescimento claramente detectável após o período de incubação, indicando que todos os isolados eram viáveis e que as condições utilizadas foram adequados para o crescimento dos fungos. A CIM da estirpe de referência foi 0,4-0,6 µg.mL⁻¹ para Anfotericina B confirmando a reprodutibilidade do ensaio.

13. A Tabela 1 mostra os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da avaliação antifúngica *in vitro* de 6CN10 puro (droga-livre), 6CN10 complexado com 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (6CN10-HPBCD), e quatro nanoformulações (6CN10-nanocápsula, 6CN10-HPBCD-nanocápsula, 6CN10-nanoesfera e 6CN10-HPBCD-nanoesfera) comparado com Anfotericina B (AmpB) contra isolados de *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* (incluindo a estirpe de referência *C. parapsilosis* ATCC 22019). Nanoformulações placebo (livre de droga) também foram usadas como controle e não mostraram nenhuma atividade contra os fungos patógenos.

14. A droga-livre foi capaz de inibir o crescimento de todos os isolados de estirpes em diferentes concentrações. As cepas de *Candida* foram ligeiramente mais suscetíveis aos valores de CIM, mostrando que variam entre 41,00-334,00 µg.mL⁻¹, enquanto as cepas de *Cryptococcus* apresentaram valores de CIM de 165,00 e 334,00 µg.mL⁻¹. Complexo 6CN10-HPBCD apresentaram resultados diferentes, sendo completamente ineficaz para todas as cepas de *Candida* [todas as cepas foram resistentes (R) na maior concentração testada (44,00-47,00

$\mu\text{g.mL}^{-1}$], e mostrando os valores da CIM de 45,00-47,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra todas as cepas de *Cryptococcus*, portanto, quatro vezes mais ativo do que a droga-livre.

15. Esta diferença na sensibilidade entre as duas espécies (*Candida* e *Cryptococcus*) foi repetido para todos as nanoformulações avaliadas, sendo todos os isolados de *Candida* resistentes (nas concentrações mais elevadas testadas), enquanto que as estirpes de *Criptococcus*, mostrando valores de CIM variando 0,1-84,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, portanto, mais ativo do que o fármaco livre, e com valores de CIM comparáveis à Anfotericina B.

16. As nanocápsulas de 6CN10 e complexo 6CN10-HPBCD foram capazes de inibir o crescimento de estirpes de *Cryptococcus* com valores de CMI de 84,00-86,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 0,1-0,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Estes valores mostram que as nanocápsulas de 6CN10 são 2 a 4 vezes mais eficaz do que o fármaco livre e que o complexo nanocápsulas de 6CN10-HPBCD é 230-470 vezes mais ativo do que o complexo 6CN10-HPBCD que é ainda mais eficiente do que a Anfotericina B (medicamento de referência) para todas as estirpes *Cryptococcus*.

17. Os melhores resultados de inibição foram observados com as nanoesferas, que apresentaram valores de CIM de 41,00-0,33 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as nanosferas de puro 6CN10 (4 a 1040 vezes mais ativos do que o fármaco livre), e de 0,2 a 0,1 mg.mL^{-1} para a nanoesfera do complexo 6CN10-HPBCD, sendo 3-5 vezes mais ativo do que o da droga-livre e de 2 a 5 vezes mais ativo do que a Anfotericina B (para *C. neoformans* URM 6895 e URM 6901).

18. Este estudo confirmou o potencial de derivados de 2-aminotiofeno como agentes antifúngicos.

19. As nanoformulações conferiram uma solubilidade aquosa para 6CN10 sem alterar a estrutura química da droga, isto fez com que houvesse a necessidade de uma menor quantidade de droga para assegurar a atividade antifúngica, que certamente minimiza a possibilidade de ocorrência de efeitos secundários quando forem executados os estudos *in vivo*.

20. Esses fatos, associados ao aumento significativo na atividade anti-criptocócica (mais de 3000 vezes em comparação com o fármaco livre), resultando em valores de CIM inferior ao medicamento de referência Anfotericina B (até 5 vezes mais ativo), leva-nos a crer que, após a realização de estudos para garantir a eficácia, o modo de ação ao nível molecular e a segurança, que alguns destes nanosistemas contendo 6CN10 possam ser utilizados na medicina clínica como um tratamento alternativo contra criptococose.

Tabela 1. Atividade antifúngica da droga-livre (6CN10), complexo 6CN10-HPBCD, nanoformulações à base de 6CN10 e Anfotericina B contra isolados clínicos de *Candida* e *Cryptococcus* obtidos de pacientes com candidemia e neurocriptococcose, respectivamente, em dois hospitais públicos terciários de Recife, Brasil, entre Julho de 2012 a Junho de 2013.

Micro-organismos	Estirpes ou número de pacientes	Compostos e Nanoformulações – valores da CIM em $\mu\text{g.mL}^{-1}$						
		Nanocápsulas de 6CN10	Nanocápsulas 6CN10-HPBCD	Nano-esfera 6CN10	Nano-esfera 6CN10-HPBCD	Complexo 6CN10-HPBCD	Droga-livre 6CN10	Anfotericina B
<i>C. albicans</i>	99	R***	R	R	R	R	41.66	0.25
<i>C. albicans</i>	122	R	R	R	R	R	41.66	0.25
<i>C. albicans</i>	4451	R	R	R	R	R	41.66	1
<i>C. albicans</i>	8299	R	R	R	R	R	166.66	2
<i>C. albicans</i>	9925	R	R	R	R	R	166.66	2
<i>C. famata</i>	5623	R	R	R	R	R	333.33	2
<i>C. glabrata</i>	8340	R	R	R	R	R	166.66	0.5
<i>C. guilliermondii</i>	632	R	R	R	R	R	83.33	0.5
<i>C. krusei</i>	14206	R	R	R	R	R	333.33	1
<i>C. tropicalis</i>	7866	R	R	R	R	R	83.33	1
<i>C. parapsilosis</i>	290	R	R	R	R	R	83.33	1
<i>C. parapsilosis</i>	7736	R	R	R	R	R	83.33	1
<i>C. parapsilosis</i>	9968	R	R	R	R	R	333.33	2
<i>C. parapsilosis</i>	13531	R	R	R	R	R	83.33	0.25
<i>C. parapsilosis</i>	451	R	R	R	R	R	83.33	1
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC* 22019	R	R	R	R	R	83.33	0.5
<i>C. neoformans</i>	URM** 6895	83.33	0.2	0.65	0.1	46.66	333.33	0.5
<i>C. neoformans</i>	URM 6901	83.33	0.1	0.32	0.1	46.66	333.33	0.25
<i>C. neoformans</i>	URM 6907	83.33	0.1	41.66	0.2	46.66	166.66	0.125
<i>C. neoformans</i>	URM 6909	83.33	0.1	41.66	0.2	46.66	166.66	0.125

*ATCC - American Typical Culture Collection

**URM – Coleção de Cultura URM

***R - resistente

REIVINDICAÇÕES

1. **USO DE NANOFORMULAÇÕES CONTENDO DERIVADOS DE 2-AMINOTIOFENO COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS**, caracterizado por incorporar os derivados de 2-aminotiofeno em diferentes sistemas de liberação (complexos com ciclodextrinas, nanoesferas, nanocápsulas e nanoesferas de droga complexada à ciclodextrina).
2. **USO DE NANOFORMULAÇÕES CONTENDO DERIVADOS DE 2-AMINOTIOFENO COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por aumentar a solubilidade dos derivados de 2-aminotiofeno sem alteração de sua estrutura química.
3. **USO DE NANOFORMULAÇÕES CONTENDO DERIVADOS DE 2-AMINOTIOFENO COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por serem administradas pela via vaginal (interna/externa) e em outras regiões genitais contaminadas pelo vírus.
4. **USO DE NANOFORMULAÇÕES CONTENDO DERIVADOS DE 2-AMINOTIOFENO COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS**, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado por possibilitar a execução de testes antifúngicos *in vivo*, através da administração por via interna (intravenosa, intraperitonal e oral, por exemplo), visto que o fármaco agora tem maior possibilidade de ser absorvido e distribuído pelo organismo, permitindo o tratamento de infecções fúngicas a nível interno do organismo. O fármaco puro (não complexado ou encapsulado) não seria absorvido pelo organismo e só possibilitaria a administração *in vivo*, sob a forma de cremes, pomadas, ou seja, só poderia ser utilizado para tratamento de infecções fúngicas superficiais (cutâneas).
5. **USO DE NANOFORMULAÇÕES CONTENDO DERIVADOS DE 2-AMINOTIOFENO COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS**, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, caracterizado por melhorar a solubilidade (e consequente alteração do perfil farmacocinético) e facilitar a execução dos ensaios biológicos e demais análises químicas.
6. **USO DE NANOFORMULAÇÕES CONTENDO DERIVADOS DE 2-AMINOTIOFENO COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS**, de acordo com as

reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5, caracterizado por permitir que uma menor quantidade de fármaco fosse suficiente para resultar numa atividade biológica satisfatória, promovendo uma exacerbação da atividade em especial frente a leveduras capsuladas a exemplo do gênero *Cryptococcus*, demonstrado *in vitro*, onde pode ser constatada diminuição da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em comparação com a molécula pura, chegando ao ponto de ter atividade antifúngica comparável aos fármacos antifúngicos comercialmente disponíveis como a anfotericina B.

RÉSUMO

USO DE NANOFORMULAÇÕES CONTENDO DERIVADOS DE 2-AMINOTIOFENO COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS

A presente patente aborda o uso de nanoformulações contendo derivados de 2-aminotiofeno como agentes antifúngicos, que foi confirmado através da realização da atividade antifúngica *in vitro*. A avaliação *in vitro* da sensibilidade de espécies de leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, contra nanoformulações solúveis em água (nanoesferas e nanocápsulas) de 6CN10 e 6CN10 complexado com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPBCD-6CN10), em comparação com o fármaco livre, foi realizada pelo método de microdiluição em caldo. Todos os isolados clínicos de *Candida* foram sensíveis à droga livre e foram resistentes a todos as nanoformulações à base de 6CN10. No entanto, isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* avaliados apresentaram valores de concentração inibitória mínima (CIM) de 0,32-83.33 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para nanoformulações-6CN10 e 0,1-0,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para nanoformulações-6CN10-HPBCD, sendo até 3,333 vezes mais ativos do que a droga-livre (CIM = 166,66-333.33 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), além de apresentar uma atividade superior ao antifúngico de referência Anfotericina B (CIM = 0,5-0.125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). O estudo *in vitro* mostrou que nanoformulações alteraram as propriedades físico-químicas da 6CN10 e proporcionaram aumento da eficiência da droga contra *Cryptococcus* em comparação com a droga-livre. Estes resultados nos permitem vislumbrar a possibilidade de nanoformulações à base de 6CN10 se tornarem uma futura alternativa para o tratamento da infecção fúngica criptococose.