



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(11) BR 102016029610-2 B1

(22) Data do Depósito: 16/12/2016

(45) Data de Concessão: 03/09/2024

(54) Título: FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO COMPOSTOS TIOXOOXAZOLIDINONAS 3,5 SUBSTITUÍDOS PARA INCREMENTO DE SOLUBILIDADE E USO ANTITUMORAL

(51) Int.Cl.: A61K 47/69; A61K 31/421; A61P 35/00.

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) Inventor(es): RAFAEL RAMOS DA SILVA; IVAN DA ROCHA PITTA; MARIA DO CARMO ALVES DE LIMA; JORGE LUIZ NEVES; MAIRA GALDINO DA ROCHA PITTA; MOACYR JESUS BARRETO DE MELO REGO; REGINALDO GONÇALVES DE LIMA NETO; JAMERSON FERREIRA DE OLIVEIRA; MARINA GALDINO DA ROCHA PITTA; CEZAR AUGUSTO DA CRUZ AMORIM; MARINA FERRAZ CORDEIRO; MARIA DANIELLY LIMA DE OLIVEIRA; CÉSAR AUGUSTO SOUZA DE ANDRADE.

(57) Resumo: FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO COMPOSTOS TIOXOOXAZOLIDINONAS 3,5 SUBSTITUÍDOS PARA INCREMENTO DE SOLUBILIDADE E USO ANTITUMORAL. Os compostos tioxooxazolidinonas 3,5 substituídos, derivados oxazolidínicos (DOx), têm sido descritos como antibióticos de terceira geração e alguns relatos demonstraram seu potencial como agente antitumoral. Entretanto, a sua baixa solubilidade em água, limita sua utilização. Neste contexto, o desenvolvimento de complexos de inclusão baseados em ciclodextrina podem promover um incremento de solubilidade em compostos hidrofóbicos, oferecendo uma maior eficácia e maior biodisponibilidade. Nesta patente desenvolvemos complexos de inclusão baseados em 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina (2-HP β CD) em DOx hidrofóbicos: 3-etil-5-(4-metóxi-benzilideno)-2-tioxooxazolidin-4-ona (LPSF/NB-10) e 5-benzilideno-3-etil-2-tioxooxazolidin-4-ona (LPSF/NB-14). As análises físico-químicas foram realizadas através de estudos de fase de solubilidade, espectroscopia de espectroscopia em infravermelho (FTIR), difração de raios-x (DRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). O estudo de viabilidade celular por MTT também foi conduzido para avaliação e comparação da atividade tumoral em linhagens MCF-7 (câncer de mama) e células controle (fibroblastos HIFF). Os resultados demonstraram que a solubilidade dos compostos foi incrementada em 20 vezes mais se comparados aos compostos puros em água. A análise por MEV também revelou uma mudança significativa na morfologia das moléculas após o processo de inclusão. Adicionalmente, os (...).

**FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO COMPOSTOS
TIOOXAZOLIDINONAS 3,5 SUBSTITUÍDOS PARA INCREMENTO DE
SOLUBILIDADE E USO ANTITUMORAL**

01. A presente patente de invenção caracteriza-se pela obtenção formulações farmacêuticas contendo compostos tiooxazolidinonas 3,5 substituídos e/ou seus derivados sais, ésteres, amidas ou pró-fármacos farmacologicamente aceitáveis que venham a ser utilizados na saúde humana e/ou animal com fins de tratamento, profilaxia, paliativa.

02. Uma característica da presente invenção é o uso dos compostos tiooxazolidinonas 3,5 substituídos associados a ciclodextrina e/ou seus derivados como agentes antitumorais misturados a excipientes farmacêuticamente aceitáveis, em solução ou no estado sólido.

03. Os compostos da presente invenção são úteis em formulações farmacêuticas com carregadores convencionais ou veículos, para a administração a humanos e/ou animais em dosagens nas formas de tabletes, cápsulas, pílulas, pós, grânulos, supositórios, soluções ou suspensões parenterais estéreis, soluções ou suspensões não parenterais estéreis, soluções ou suspensões orais, suspensões óleo em água ou água em óleo, emulsões e as quantidades necessárias de compostos tiooxazolidinonas 3,5 substituídos e seus derivados.

04. O núcleo oxazolidínico, foi descoberto pela empresa DuPont e patenteada em por Fugitt & Luckenbaugh em 1978. Uma outra característica do núcleo oxazolidínico é a capacidade de inibir seletivamente a síntese de proteínas bacterianas através de ligação com a subunidade ribossomal 50S, impedindo a formação de um complexo de iniciação 70S funcional (Zhou et al., 2002; Stevens et al., 2004).

05. O primeiro derivado da oxazolidina, uma oxazolidinona, a ser comercializada foi a Linezolida. Este composto foi aprovado para tratamento de pacientes com infecções causadas por bactérias Gram-positivas (Barrett, 2000; Shaw & Barbachyn, 2011).

06. As oxazolidinas e seus derivados estão presentes em diversas moléculas de interesse farmacêutico. Além da atividade antibacteriana, há relatos na literatura de seus

derivados com atividade antifúngica (Devi *et al.*, 2013), hipoglicêmica (Bodnar *et al.*, 2011), anticonvulsivante (Kombian & Phillips, 2012) e antitumoral (Singh, 2011).

07. Em relação a atividade antitumoral, a oxazolidina têm estado presente em diversos derivados: derivados do Perileno (patente GB8313571, 1983), derivados da sulfonil ureia (EP0291269, 1988), ésteres e sais da rizoxina (CN86102020, 1986), taxoides (IL117636, 1996), derivados heteroarila fenil substituídos (IL117636, 1996), oxazolidinas aromáticas quirais N-substituídas (WO2014036623, 2012) e 2-tiooxazolidínicos-N-substituídos (BR1020150160607, 2015).

08. Na patente, WO2014036623, as oxazolidinadionas 3,4-dissubstituídas apresentaram atividade citotóxica em linhagem celular HL-60 ATTC®CCL-240 (leucemia promielocítica). Segundo os autores, a origem da diferença de atividade entre os compostos testados não seria devida simplesmente a propriedades físicas como lipofilicidade ou polaridade, mas às características estruturais únicas de cada composto. Os autores afirmaram ainda que a morte das células ocorreu por apoptose, correlacionando-a à degradação do DNA.

09. Os mesmos mecanismos foram observados na patente BR1020150160607, 2015 desenvolvidas por nosso grupo de pesquisa. Os compostos apresentaram atividade citotóxica significativa nas linhagens celular: leucemia promielocítica (HL-60, ATTC®CCL-240) leucemia linfoblástica aguda (CCRF-CEM, ATCC®CCL-119), leucemia de células T (JURKAT, ATCC®TIB152). O efeito citotóxico foi superior a 90% numa concentração menor de 30µM para todas a linhagens testadas.

10. Embora estes compostos apresentam atividade antitumoral comprovada e significativa, eles apresentam uma utilização limitada devido a sua alta lipofilicidade. Essa limitação pode ser solucionada através do desenvolvimento de complexos de inclusão que resultem num incremento de solubilidade destes compostos.

11. Uma das estratégias bem estabelecidas nas ciências farmacêuticas são a utilização das ciclodextrinas. Estas moléculas são oligossacarídeos que apresentam em sua cavidade interna, a capacidade de incorporar drogas hidrofóbicas.

12. As ciclodextrinas também oferecem outras vantagens como uma melhor farmacocinética, estabilidade química e baixa citotoxicidade (Tiwari *et al.*, 2010).

13. Dentre elas a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) é uma das ciclodextrinas mais utilizadas. Esta molécula além de aumentar consideravelmente a solubilidade de compostos hidrofóbicos, é toxicologicamente benigno. Além do mais a HP- β -CD pode ser administrada em formulações farmacêuticas por via parenteral, oral, oftálmica e nasal (Challa et al., 2005; Rasheed et al., 2008).

14. Em seu primeiro aspecto, nesta patente, utilizamos dois compostos (Fig.3.1 e Fig.3.2) obtidos através síntese estabelecida no pedido de patente BR1020150160607 (2015) de nosso grupo de pesquisa e preparamos os complexos de inclusão baseados em ciclodextrina (Fig.3.3) visando o incremento de solubilidade e/ou seus sais, derivados misturados a excipientes farmacêuticamente aceitáveis em soluções ou no estado sólido.

15. Outro aspecto desta patente foi a sua avaliação de atividade em células tumorais de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7, ATCC®HTB-22) através do teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina).

16. Portanto, a presente invenção tem como principal objetivo contribuir com o incremento de solubilidade dos derivados 5-benzilideno-3-etil-2-tioxooxazolidin-4-onas através de complexos de inclusão baseados em ciclodextrina, que podem ser utilizados no tratamento, profilaxia, paliativa.

17. A presente invenção descreve formulações farmacêuticas compreendendo compostos tioxooxazolidinonas 3,5 substituídos visando o incremento de solubilidade destes compostos. As formulações farmacêuticas e/ou seus sais, derivados misturados a excipientes farmacêuticamente aceitáveis em soluções ou no estado sólido são aplicáveis em linhagens tumorais.

18. Entre as vantagens, estão a fácil preparação dos complexos LPSF/NB:2-HP- β -CD 2), aumento da solubilidade 20 vezes maior do que em água em relação aos compostos puros.

19. A seguir, a invenção será descrita em maiores detalhes com o auxílio de exemplos de forma de apresentação apresentados em Figuras e Tabelas.

20. Se mostra:

21. Na figura 1, demonstra-se a estrutura dos derivados oxazolidínicos utilizados nas composições farmacêuticas baseadas em 2-HP- β : 1) 3-etil-5-(4- metóxi-benzilideno)-2-tioxooxazolidin-4-ona (LPSF/LPSF/NB-10), 2) 5-benzilideno-3-etil-2-tioxooxazolidin-4-ona (LPSF/NB-14).

22. Na figura 2, está presente o diagrama de fase de solubilidade para LPSF/NB-10 (a) e LPSF/NB-14 (b) em função de concentrações de HP- β -CD em água a 25°C.

23. Na figura 3, está o espectro de infravermelho do LPSF/NB-10:HP- β -CD (linha vermelha, 4a), LPSF/NB-14:HP- β -CD (linha azul, 4b) através de mistura mecânica e a metodologia aplicada para os complexos de inclusão.

24. Na figura 4, estão presentes os difratogramas de raios-X de LPSF/NB-10 (5a, linha preta), LPSF/NB-14 (5b, linha vermelha), HP- β -CD puro (linhas azuis) e de seus complexos de inclusão com HP- β -CD (a1, linha preta e b1, linha vermelha).

25. Na figura 5 observa-se as imagens de MEV do LPSF/NB-10 (a,a1) e LPSF/NB-14 (6b,b1), HP- β -CD (6c,c1) e complexos de inclusão LPSF/NB-10/ HP- β -CD (6d, d1) e NB-14/ HP- β -CD (6e,e1).

26. Na tabela 1 demonstra-se os valores médios e desvios-padrão em percentual da viabilidade celular de células tumorais (MCF-7) na presença dos derivados oxazolidinicos e seus complexos de inclusão com HP- β -CD.

TABELAS

Tabela 1.

Concentração	LPSF/ NB-10	LPSF/NB- 10:HP- β - CD	Valor de p	LPSF/ NB-14	LPSF/NB- 14:HP- β - CD	Valor de p
1 μ M	97,80 (0,01)	70,22 (0,01)		100,00 (0)	77,93 (0,01)	
10 μ M	87,56 (0,02)	72,24 (0,01)		87,74 (0,02)	71,79 (0)	
25 μ M	78,71 (0,02)	67,57 (0,00)	0,357	72,70 (0,03)	65,45 (0,01)	0,008
50 μ M	67,68 (0,02)	61,46 (0,01)		69,68 (0)	50,98 (0,01)	
75 μ M	55,13 (0,02)	74,00 (0,01)		70,52 (0,01)	49,37 (0)	
100 μ M	64,56 (0,02)	66,70 (0,02)		71,37 (0,01)	46,42 (0,01)	

27. Na tabela 2 demonstra-se valores médios e desvios-padrão em percentual da viabilidade celular de células controle (fibroblastos, HIFF) na presença dos derivados oxazolidinicos e seus complexos de inclusão com HP- β -CD.

Tabela 2

Concentração	LPSF/NB-10	LPSF/NB-10:HP- β -CD	Valor de p	LPSF/NB-14	LPSF/NB-14:HP- β -CD	Valor de p
1 μ M	100 (0)	76,87 (0,03)		98,58 (0,11)	96,02 (0,09)	
10 μ M	100 (0)	83,62 (0,03)		100,00 (0)	86,25 (0,07)	
25 μ M	100 (0)	82,60 (0,01)		100,00 (0)	82,12 (0,01)	
50 μ M	97,69 (0,08)	93,78 (0,02)	0,281	100,00 (0)	81,49 (0,07)	0,8450
75 μ M	89,04 (0,05)	81,24 (0,05)		100,00 (0)	80,90 (0,02)	
100 μ M	66,41 (0,05)	86,01 (0,05)		88,27 (0,01)	79,88 (0,01)	

28. Na figura 2, foi realizado o estudo de fase de solubilidade obtido a partir de LPSF/NB-10:HP- β -CD (a) e LPSF/NB-14:HP- β -CD (b). Os comportamentos dos valores demonstraram curvas do tipo AL que corresponde a uma razão estequiométrica (K1:1) entre a molécula e a HP- β -CD. As constantes de solubilidade (K1:1) de LPSF/NB-10 e LPSF/NB-14 em solução de HP- β -CD a 25°C foi de 0.320 e 0.316 respectivamente. O incremento da solubilidade destes compostos foi de 12.50 mM e 12.62 mM respectivamente. Isso corresponde a um aumento 20 vezes maior que a solubilidade de LPSF/NB-10 e LPSF/NB-14 em água (0.60 mM e 0.64 mM respectivamente).

29. Na figura 3, está o espectro da HP- β -CD as absorções em 3,411 cm^{-1} , 2,931 cm^{-1} , 1,157 cm^{-1} , 1,089 cm^{-1} , e 1,029 cm^{-1} foram atribuídas às vibrações $\nu(\text{O}-\text{H}$ alongamento vibracional), $\nu(\text{C}-\text{H}$ alongamento vibracional), $\nu(\text{C}-\text{H}$ e $\text{C}-\text{O}$ alongamento vibracional). No espectro de infravermelho (IV) do LPSF/NB-10 (a) as absorções em 1750-1735 cm^{-1} foram atribuídas às vibrações $\nu(\text{C}=\text{O}$ alongamento), as absorções 1600–1585 cm^{-1} às vibrações $\nu(\text{C}-\text{C}$ alongamento, aromático), as absorções 1360–1290 cm^{-1} às vibrações $\nu(\text{C}-\text{N}$ alongamento, aminas alifáticas), e por fim as

absorções em 1050-1200 cm^{-1} às vibrações $\nu(\text{C}=\text{S}$ alongamento). As absorções semelhantes no espectro de infravermelho do LPSF/NB-14 (b) foram observadas. Absorções em 3,016 cm^{-1} atribuídas às vibrações $\nu(\text{C}-\text{H}$ alongamento vibracional), absorções em 1,745 e 1,695 cm^{-1} às vibrações $\nu(\text{C}=\text{O}$ alongamento), e absorções em 1,631 cm^{-1} às vibrações $\nu(\text{C}=\text{C}$ alongamento). Os resultados mostraram que formação de complexos de inclusão foram bem-sucedidos, considerando a diminuição da intensidade das bandas (linha vermelha em a e b) de absorção dos grupos funcionais dos compostos tiooxazolidina 3,5 substituídos.

30. Na figura 4, a difração de raio-X do LPSF/NB-10 apresentou estes padrões em 12,5 e 25 θ (linha preta em a). No entanto, LPSF/NB-14 apresentou também picos de intensidade em 7,5 e 15 θ (linha vermelha em b). Isso reflete que uma característica típica de sólidos cristalinos. Em contraste, HP- β -CD naturais e sintéticas não possuem essa característica (linha azul em a1 e b1) são amorfos. Nos compostos de inclusão, os difratogramas sugerem a formação de sistemas mais organizados com uma diminuição nos picos de intensidade se comparadas as moléculas LPSF/NB-10 (a1) e LPSF/NB-14 (b1).
31. Na Figura 5, as imagens de MEV do LPSF/NB-10 (a,a1) e LPSF/NB-14 (b,b1) claramente apresentaram formas cristalinas aciculares, enquanto HP- β -CD (c, c1) apresentou formas esféricas. As imagens relacionadas aos complexos de inclusão para LPSF/NB-10:HP- β -CD (d, d1) e NB-14/ HP- β -CD (e,e1) revelaram uma mudança significativa na morfologia.
32. Na tabela 1, considerando a viabilidade celular da linhagem tumoral MCF-7, percebe-se que houve uma diminuição significativa para os compostos LPSF/NB-14 em relação ao LPSF/NB-10. Os complexos de inclusão demonstram atividade antitumoral até mesmo na mais baixa concentração. A análise estatística demonstrou que a diferença foi mais significativa entre LPSF/NB-14 e seu complexo de inclusão em relação ao LPSF/NB-10 e seu complexo de inclusão.
33. Na Tabela 2 é possível perceber através da análise estatística, que as diferenças entre os valores não foram significativas entre si. Os fibroblastos são utilizados como modelo de células padrão (normais) para comparar os efeitos citotóxicos em linhagens tumorais sólidas.

REIVINDICAÇÕES

1) FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO COMPOSTOS TIOXOOXAZOLIDINONAS 3,5 SUBSTITUÍDOS PARA INCREMENTO DE SOLUBILIDADE E USO ANTITUMORAL, **caracterizado por** compostos 2-tioxo-oxazolidin-4-ona 3,5-disubstituídos associado em sistemas de liberação controlada do tipo α -ciclodextrina, β -ciclodextrina e γ -ciclodextrina e seus derivados.

2) FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO COMPOSTOS TIOXOOXAZOLIDINONAS 3,5 SUBSTITUÍDOS PARA INCREMENTO DE SOLUBILIDADE E USO ANTITUMORAL, **caracterizado pela** composição farmacêutica conter os complexos de inclusão entre ciclodextrina e os compostos tioxooxazolidinonas 3,5 substituídos e/ou seus sais, derivados misturados a excipientes farmacêuticamente aceitáveis em soluções ou no estado sólido, em associação a outros insumos.

3) FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO COMPOSTOS TIOXOOXAZOLIDINONAS 3,5 SUBSTITUÍDOS PARA INCREMENTO DE SOLUBILIDADE E USO ANTITUMORAL, **caracterizado pelo** uso de quaisquer composições farmacêuticas, dos complexos de inclusão entre ciclodextrina e a sua associação com compostos tioxooxazolidinonas 3,5 disubstituídos, os quais podem ser disponibilizados em formas farmacêuticas do tipo tabletes, cápsulas, pílulas, pós, grânulos, supositórios, soluções ou suspensões parenterais estéreis, soluções ou suspensões não parenterais estéreis, soluções ou suspensões orais, suspensões óleo em água ou água em óleo, emulsões.

FIGURAS

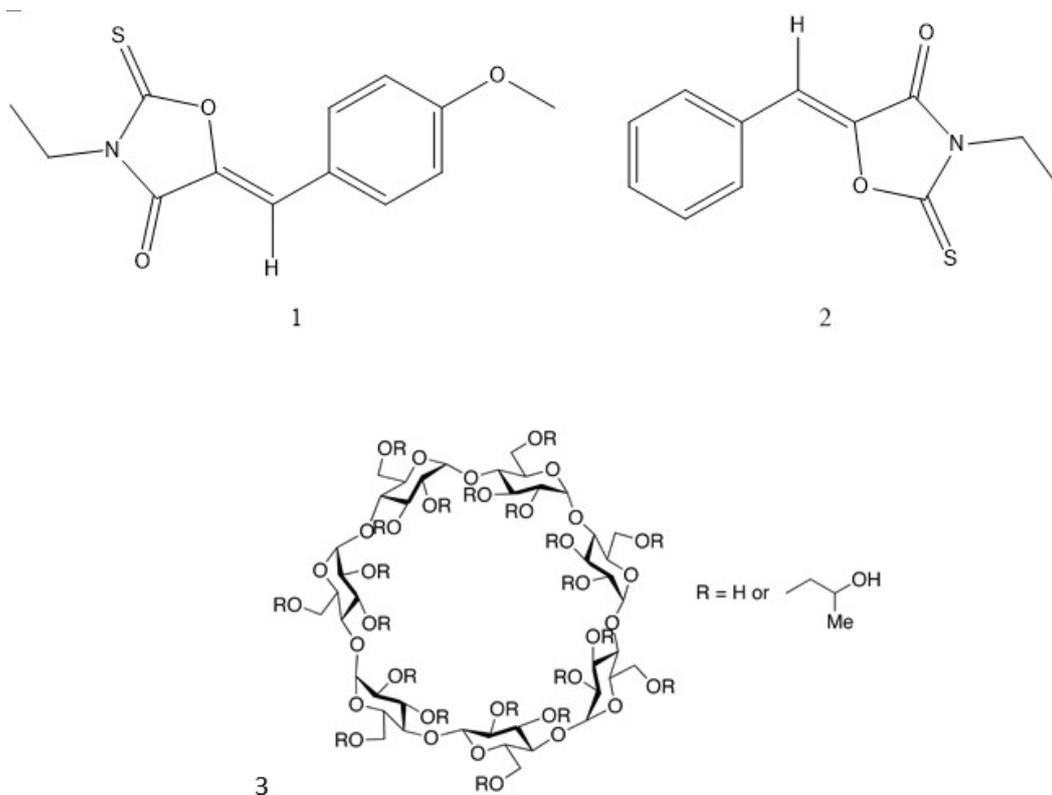


Figura 1

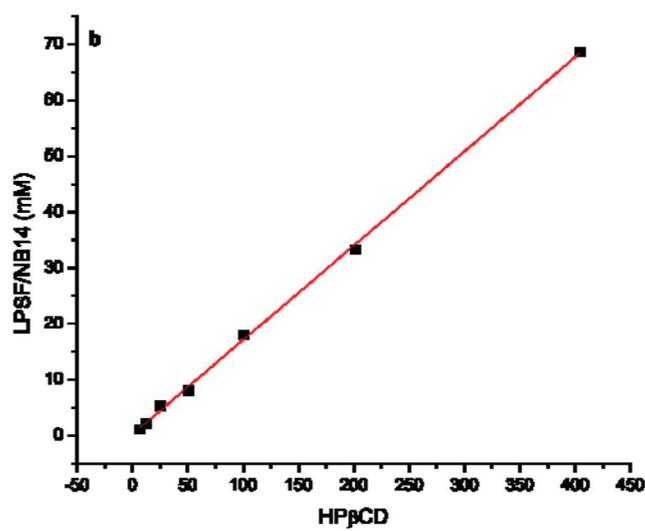
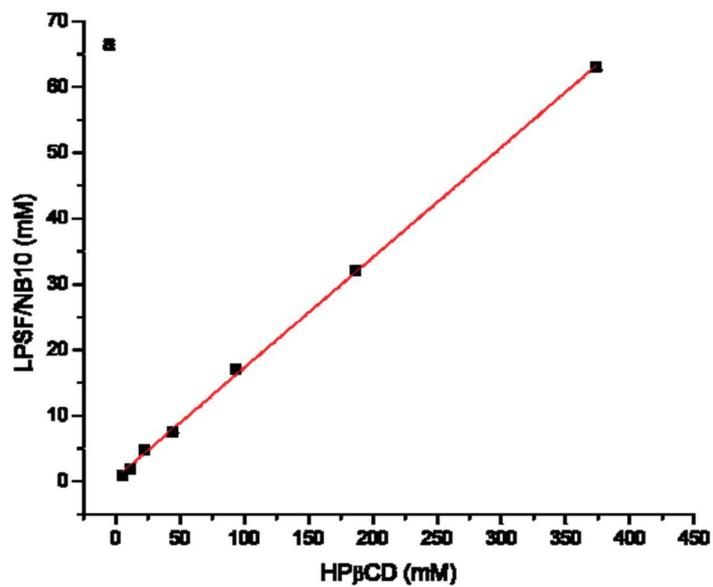


Figura 2

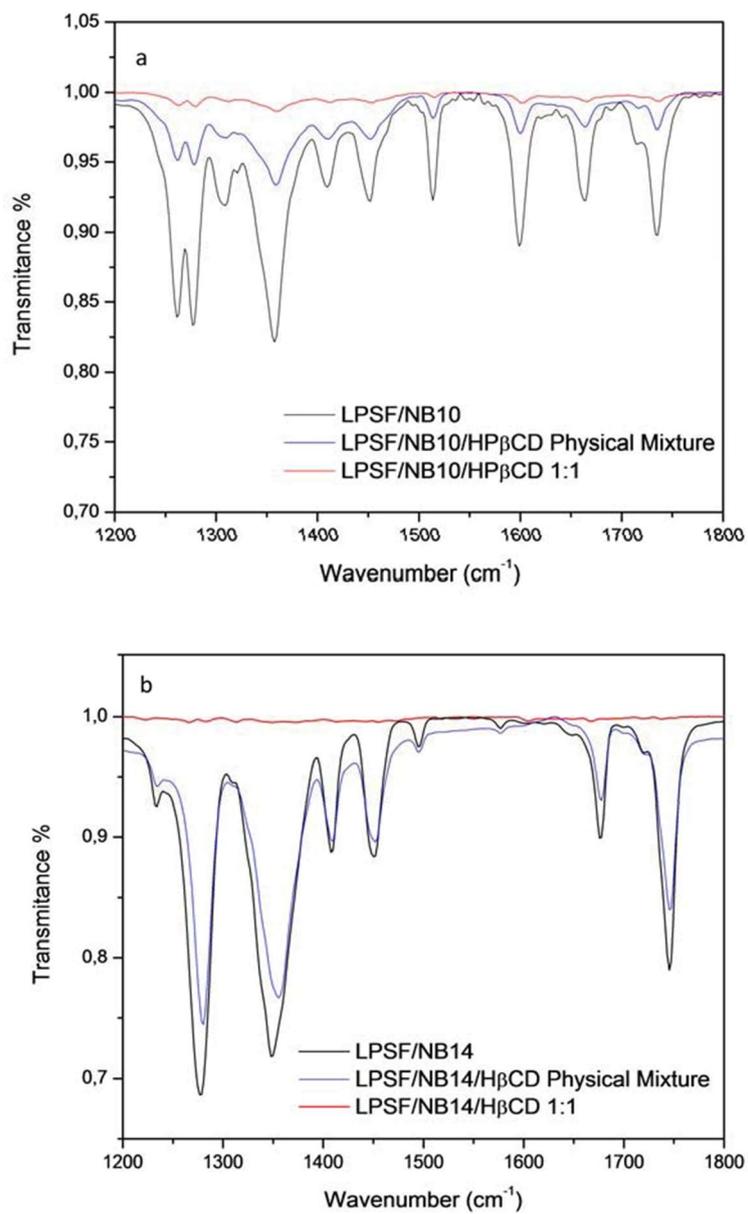


Figura 3

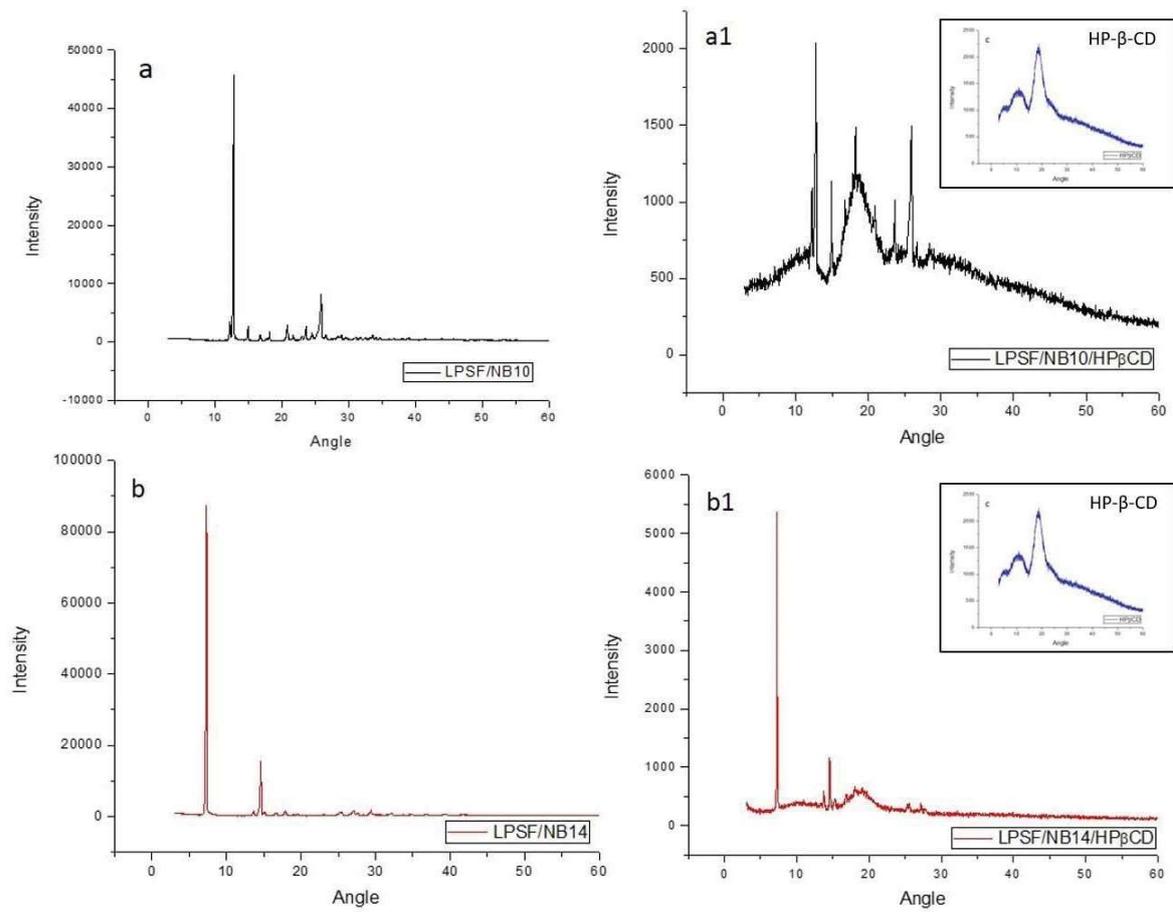
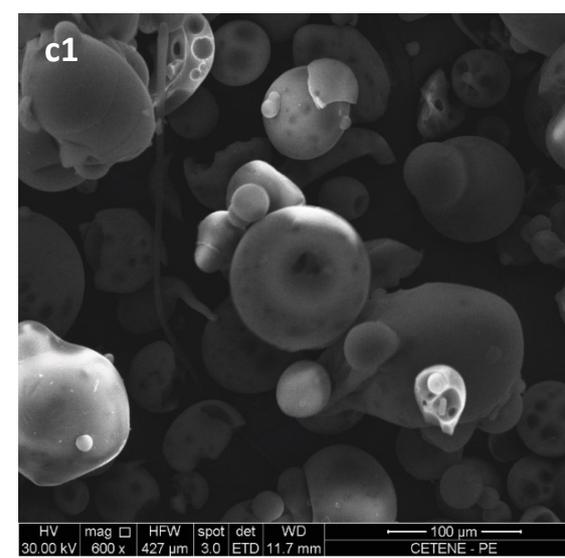
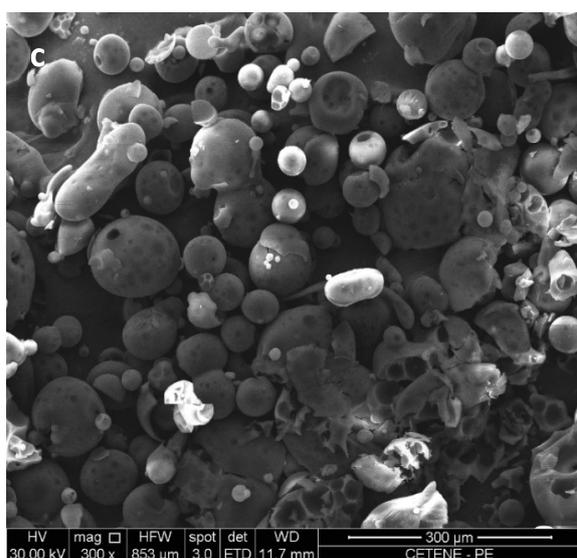
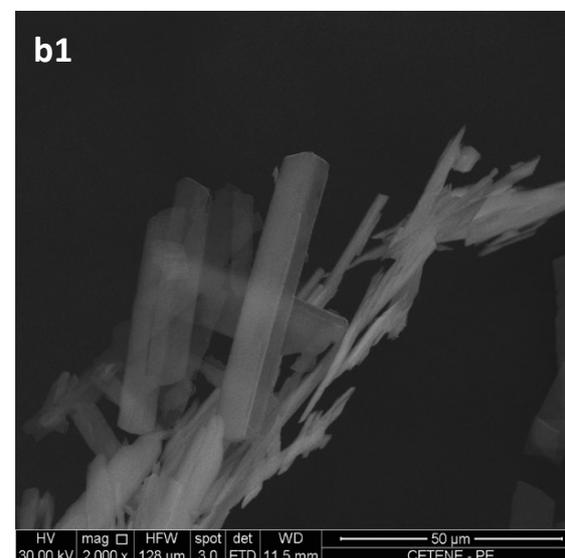
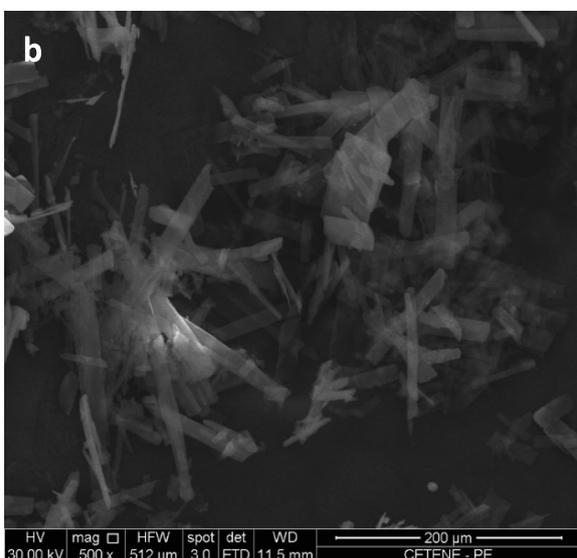
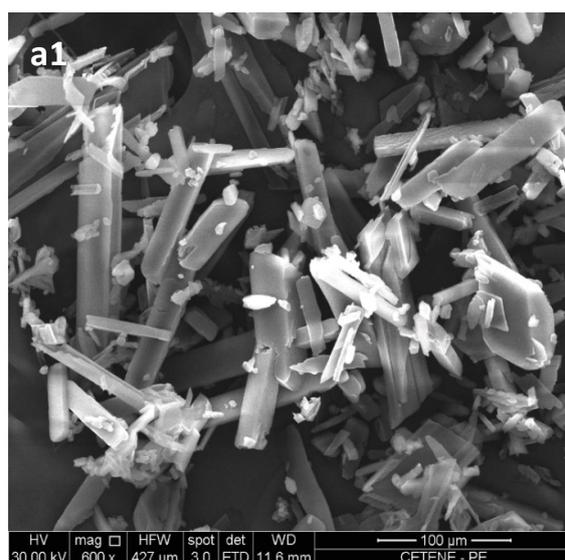
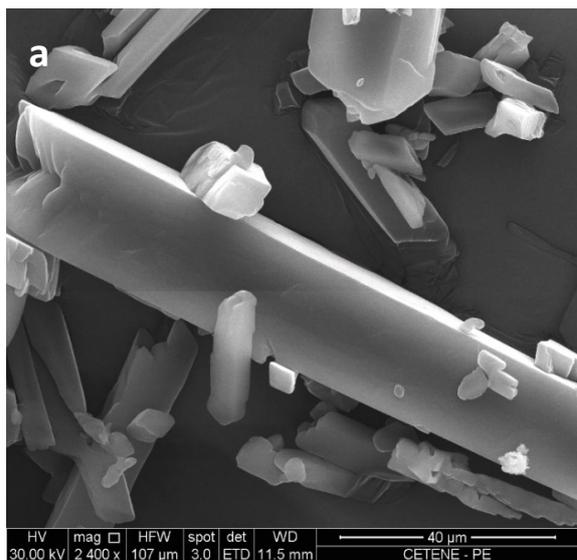


Figura 4



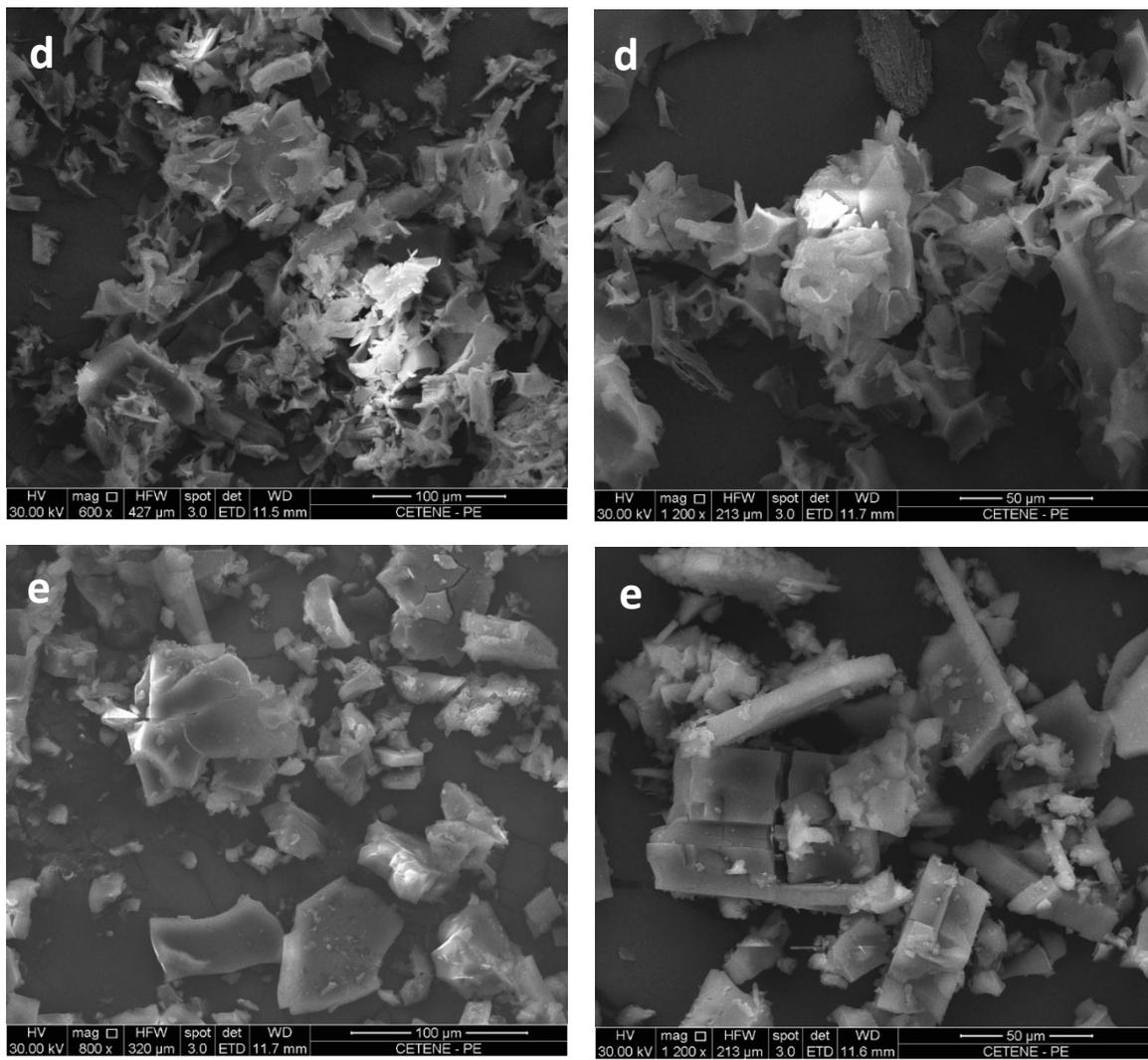


Figura 5