



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

(21) BR 102019014475-0 A2



(22) Data do Depósito: 12/07/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 19/01/2021

(54) **Título:** DISPERSÃO SÓLIDA À BASE DE LQIT/GQ-238 PARA TRATAMENTO ESQUISTOSSOMICIDA

(51) **Int. Cl.:** C07D 417/02; A61K 31/427; A61K 9/14; A61K 47/34; A61P 33/12.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** ROSALI MARIA FERREIRA DA SILVA; MARIA DO CARMO ALVES DE LIMA; PEDRO JOSÉ ROLIM NETO; SYMON JONATAN SANTIAGO PAULINO; LUCAS ALISON DO NASCIMENTO SANTOS; THÂMARA CAROLLYNE DE LUNA ROCHA; MÔNICA CAMELO PESSÔA DE AZEVEDO ALBUQUERQUE; ANDRÉ DE LIMA AIRES; VICTOR HUGO BARBOSA DOS SANTOS.

(57) **Resumo:** DISPERSÃO SÓLIDA À BASE DE LQIT/GQ-238 PARA TRATAMENTO ESQUISTOSSOMICIDA. A presente patente de invenção refere-se à dispersão sólida à base de LQIT/GQ-238 para tratamento esquistossomicida. Para o desenvolvimento dessa dispersão, foi utilizada a técnica de solvente e o carreador hidrofílico utilizado foi o PVP-K30. Houve uma significativa melhora na solubilidade e biodisponibilidade oral do LQIT/GQ-238. Nos estudos in vitro, verificou-se que a dispersão sólida aumentou a eficiência em 110,81% quando comparada ao LQIT/GQ-238 na forma livre, frente ao verme adulto. A dispersão à base de LQIT/GQ-238 apresenta maior solubilidade e maior estabilidade, devido ao LQIT/GQ-238 estar dispersa no carreador, dificultando sua cristalização. A dispersão à base de LQIT/GQ-238 é um produto intermediário que pode ser utilizado no desenvolvimento de formulações farmacêuticas para tratamento esquistossomicida.

DISPERSÃO SÓLIDA À BASE DE LQIT/GQ-238 PARA TRATAMENTO ESQUISTOSSOMICIDA

01. A presente invenção refere-se a uma dispersão sólida à base do LQIT/GQ-238 para o tratamento esquistossomicida.
02. O LQIT/GQ-238 (3-(2,6-difluór-benzil)-5-(5-bromo-1H-indol-3-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona) é uma nova entidade química (NEQ), derivado da tiazolidina, que possuem propriedades similares às imidazolidinas, inibindo o crescimento do parasito.
03. Oliveira, em 2013, observou que há o aumento na taxa de morbidade dos parasitos quando insere o bromo no núcleo indólico, e que esse composto apresentou excelente atividade, matando 100% dos parasitos em 24 horas na dose $\mu\text{g.mL}^{-1}$.
04. A maioria das NEQs, assim como o LQIT/GQ-238, apresenta baixa solubilidade em água, o que dificulta a absorção e reduz a biodisponibilidade oral. Para solucionar essa problemática, são utilizadas novas tecnologias, como as dispersões sólidas, técnica escolhida para incremento de solubilidade dessa NEQ.
05. As dispersões sólidas se referem a uma ou mais substâncias ativas em um carreador inerte, que pode ser único, ou uma matriz sólida formada por vários carreadores. Por diminuir o tamanho das partículas e o estado amorfo não cristalino da droga, melhora a solubilidade dessa molécula e sua biodisponibilidade.
06. A presente invenção descreve o desenvolvimento de dispersão sólida, sua caracterização físico-química, estudo de solubilidade e estudos *in vitro* para atividade esquistossomicida.
07. A NEQ LQIT/GQ-238 foi sintetizada no Laboratório de Química e Inovação Terapêutica, da Universidade Federal de Pernambuco (LQIT-UFPE) e foram utilizados como carreadores o PVPK30 para realizar as dispersões, através de técnica de solvente, que é uma mistura da NEQ com o carreador, obtendo a dispersão sólida.
08. A dispersão sólida foi preparada utilizando LQIT/GQ-238 e o PVP-K30, em proporções de 20% da NEQ. Foram separadamente solubilizados em quantidades mínimas da mistura de solventes escolhida. Posteriormente, a solução contendo o NEQ foi vertida sobre a solução contendo o polímero. A mistura foi homogeneizada entre 10 a 20 minutos utilizando ultrassom.

A remoção dos solventes foi realizada por evaporação em estufa com ar circulante, sob temperatura controlada (55 - 65°C), por 45 minutos. Em seguida, o produto seco foi pulverizado, misturado em gral de porcelana com o auxílio de um pistilo e sob resfriamento, utilizando aspersão de nitrogênio líquido.

09. O estudo de solubilidade foi realizado seguindo a metodologia preconizada pela Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (BRASIL, 2010).

10. A modelagem molecular (estudo *in silico*) também foi realizada entre a NEQ e o polímero, sendo obtida usando os cálculos B3LYP / 6-31 ++ G (d, p) realizados com o *Spartan Tutorial and User's Guide*, (2016). Os valores de energia intermolecular ΔE foram determinados como a seguinte equação:

$$\Delta E = E(\text{complexo}) - [E(\text{monômero}) + E(\text{GQ-238})]$$

11. Para a caracterização físico-química da dispersão, foram utilizadas as técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Difração de Raio-X (DRX), estudos térmicos, por meio das técnicas de Termogravimetria (TG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), além de espectroscopia de Raman e estudo *in vitro* para avaliação esquistossomicida.

12. No MEV, foi avaliada a morfologia da dispersão através de imagens, que foram obtidas em uma câmara com tensão de excitação de 10000 kV. No DRX, foi obtido o difratograma da dispersão, utilizado intervalo de ângulo de 5-40° e uma velocidade de varredura de 0,02° por segundo. O estudo térmico, na análise termogravimétrica, foi realizado em uma termobalança, utilizando cadinho, num intervalo de temperatura de 5-350°C, nas razões de aquecimento de 10, 20 e 40°C.min⁻¹. Os experimentos foram feitos em uma atmosfera inerte com fluxo de 50 mL.min⁻¹, e 5 mg de amostra. A análise DSC foi realizada em um calorímetro diferencial de varredura, usando um cadinho fechado de alumínio. O equipamento foi calibrado utilizando índio (156,6 ± 0,3 °C) como padrão. Os experimentos foram realizados elevando-se a temperatura 5-350°C nas razões de aquecimento de 2, 5, 10, 20 e 40°C.min⁻¹, em fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹, e 3 mg de amostra. Na espectroscopia de Raman, foi utilizado o feixe de 785 nm com potência de 100 mW, objetiva de 20x, resolução espectral de 3-5 cm⁻¹, faixa espectral de 60 a 2622 cm⁻¹. Foram testados três tempos de aquisição: 5, 15 e 30 segundos.

13. O Estudo *in vitro* para avaliação esquistossomicida da dispersão sólida foi realizada através da infecção de caramujo, obtenção de cercárias e infecção de camundongos com *Schistosoma mansoni* (cepa BH). Para realizar essas avaliações, as fezes infectadas de camundongos infectados foram coletadas e tratadas de acordo com a técnica de sedimentação espontânea ou Hoffman. Em seguida, o sedimento foi exposto à iluminação e à temperatura 28°C, até que pudesse haver eclosão dos miracídios de *Schistosoma mansoni*. Os miracídios foram postos em contato com caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, permanecendo expostos à luz e ao calor por no mínimo 2 horas. Após a infecção, os moluscos foram postos em aquários e livres de exposição luminosa (STANDEN, 1952). Após trinta dias, os moluscos infectados foram novamente expostos à luminosidade, para a eliminação das cercárias. Após 1 hora, de exposição, foi obtida a suspensão cercariana. Os camundongos previamente anestesiados com Xilasina e Ketamina foram infectados por via per cutânea com uma fração da suspensão cercariana contendo em média de 120 cercárias. Os animais permaneceram em contato com a suspensão por aproximadamente 30 minutos, sob luminosidade, para a penetração das cercárias. Recuperados do processo anestésico, os animais foram devolvidos para suas respectivas gaiolas (MANNECK et al, 2010).

14. Foi realizada a avaliação da susceptibilidade *in vitro* dos esquistossômulos com 3 horas de idade, após 30 dias de infecção. Os caramujos *Biomphalaria glabrata* foram expostos à luminosidade artificial por pelo menos 1 hora para obtenção das cercárias. A suspensão cercariana foi submetida à ação mecânica para transformação das cercárias em esquistossômulos, conforme Ramalho-Pinto (1974). Em seguida, os esquistossômulos foram lavados em meio RPMI-1640 acrescido de HEPES 20mM pH = 7,5, suplementado com penicilina (100UI/ml), estreptomicina (100µg/mL) e soro bovino fetal a 10% e transferidos para placas de 24 poços contendo o mesmo meio e incubados em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. A estimativa do número de esquistossômulo foi de 50 por poço. Após 3 horas da obtenção dos esquistossômulos, o GQ-238 isolado e a Dispersão foram adicionados aos poços nas concentrações que nortearem em 200-12.5µM. Em seguida, as placas foram novamente incubadas em estufa sob as mesmas condições. Foram realizadas duplicatas para cada concentração avaliada. Os poços contendo DMSO a 1,6% e apenas meio RPMI-1640

suplementado foram utilizados como controles negativos. Os poços contendo o praziquantel (200 μ M) foram utilizados como controles positivos.

15. Foi realizada a avaliação da susceptibilidade *in vitro* dos vermes adultos machos com 50 dias frente a GQ-238 e a Dispersão a 20% de GQ-238, no 50º dia, os camundongos infectados foram eutanasiados por deslocamento cervical. Por meio da perfusão do sistema porta-hepático, os vermes foram recuperados e lavados em meio RPMI-1640 acrescido de HEPES 20mM pH = 7,5 suplementado com penicilina (100UI/ml), estreptomicina (100 μ g/mL) e soro bovino fetal a 10%. Em seguida, os vermes adultos machos foram transferidos para placas de 24 poços contendo o mesmo meio incubados em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Para o ensaio, foram adicionados 5 vermes por poço. Após o período de 2 horas de adaptação ao meio, foram adicionados nas placas contendo os vermes adultos machos a GQ-238 e dispersão em concentrações que variaram de 200-12.5 μ M. Em seguida, as placas foram novamente incubadas em estufa sob as mesmas condições. Foram realizadas quadruplicatas para cada concentração avaliada. Os poços contendo DMSO a 1,6% e apenas meio RPMI-1640 suplementado foram utilizados como controles negativos. Os poços contendo o praziquantel (10 μ M) foram utilizados como controle positivo.

16. Os critérios de avaliação, o monitoramento dos esquistossômulos foi estabelecido dentro do intervalo de 24 horas, sendo avaliados após 3, 6, 12 e 24 horas de exposição aos fármacos, já os vermes adultos machos foram monitorados durante 5 dias a cada 24 horas. Com auxílio do microscópio invertido, os parâmetros avaliados foram atividade motora, alterações de tegumento e taxa de mortalidade. Foram considerados mortos os vermes que não apresentaram nenhum movimento durante 2 minutos de observação. A motilidade foi classificada utilizando o sistema de pontuação em uma escala de 0-3. Sendo *score* 3, vermes que apresentam movimentos típicos, exibindo peristaltismo dos órgãos internos, ventosas em movimento, aderindo ao fundo ou lados da placa de cultura; descrições típicas de vermes do controle negativo; *score* 2, movimentos reduzidos em todo o corpo, peristaltismo dos órgãos internos e ventosas; *score* 1, movimentos apenas nas extremidades ou em apenas uma das extremidades (região anterior e / ou posterior), com ausência de peristaltismo dos órgãos internos e não aderência das ventosas; *score* 0, ausência completa de movimentos e tegumento com ou sem alterações de coloração.

17. Dos solventes utilizados, o que melhor solubilizou tanto a NEQ, quanto o polímero foram acetona e clorofórmio, que foram utilizados na proporção de acetona e clorofórmio 2:1 (v/v).

18. Na modelagem molecular, os resultados demonstraram que a energia intermolecular ΔE calculada para o complexo molécula GQ-238 e o monômero PVP apresentou estabilidade da interação.

19. No teste de microscopia eletrônica de varredura, foi observada uma intensa mudança estrutural, sugerindo uma mistura homogênea entre o NEQ e o PVP K-30, que pode evidenciar uma conversão do estado cristalino em um novo estado físico, devido às possíveis interações químicas entre as fases componentes da dispersão. Na difração de raios-X, foi observado que os picos cristalinos foram reduzidos.

20. Nos estudos térmicos da dispersão, não foi observado o pico endotérmico característico da NEQ, sugerindo a obtenção de um estado amorfo na dispersão, corroborando com os resultados obtidos nas análises de DRX e MEV.

21. No estudo de espectroscopia Raman, foi observado que, na dispersão sólida, as principais bandas da NEQ foram mantidas, evidenciando a manutenção da estrutura química da molécula no novo estado físico.

22. Nos estudos *in vitro*, verificou-se que a dispersão sólida aumentou a eficiência em 110,81% quando comparada à NEQ na forma livre, frente ao verme adulto. 18. A dispersão à base de LQIT/GQ-238 apresenta maior solubilidade e maior estabilidade, devido à NEQ estar dispersa no carreador, dificultando sua cristalização.

23. A dispersão à base de LQIT/GQ-238 é um produto intermediário que pode ser utilizado no desenvolvimento de formulações farmacêuticas para tratamento esquistossomídeo.

REVINDICAÇÕES

1. **DISPERSÃO SÓLIDA À BASE DE LQIT/GQ-238 PARA TRATAMENTO ESQUISTOSSOMICIDA**, caracterizado por conter como nova entidade química (NEQ) o LQIT/GQ-238 (3-(2,6-difluor-benzil)-5-(5-bromo-1H-indol-3-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona).
2. **DISPERSÃO SÓLIDA À BASE DE LQIT/GQ-238 PARA TRATAMENTO ESQUISTOSSOMICIDA**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar o PVP-K30 como carreador hidrofílico.
3. **DISPERSÃO SÓLIDA À BASE DE LQIT/GQ-238 PARA TRATAMENTO ESQUISTOSSOMICIDA**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por melhorar a solubilidade e conseqüentemente a biodisponibilidade do LQIT/GQ-238.
4. **DISPERSÃO SÓLIDA À BASE DE LQIT/GQ-238 PARA TRATAMENTO ESQUISTOSSOMICIDA**, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado por conter PVP-K30 como carreador.
5. **DISPERSÃO SÓLIDA À BASE DE LQIT/GQ-238 PARA TRATAMENTO ESQUISTOSSOMICIDA**, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, caracterizado por utilizar a técnica de solvente.
6. **DISPERSÃO SÓLIDA À BASE DE LQIT/GQ-238 PARA TRATAMENTO ESQUISTOSSOMICIDA**, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por apresentar uma excelente atividade esquistossomicida *in vitro*, no verme adulto macho e esquistossômulos.
7. **DISPERSÃO SÓLIDA À BASE DE LQIT/GQ-238 PARA TRATAMENTO ESQUISTOSSOMICIDA**, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 e 6 caracterizado por apresentar maior solubilidade e, conseqüentemente, maior biodisponibilidade, tornando essa dispersão um promissor candidato a fármaco.

RESUMO**DISPERSÃO SÓLIDA À BASE DE LQIT/GQ-238 PARA TRATAMENTO ESQUISTOSSOMICIDA**

A presente patente de invenção refere-se à dispersão sólida à base de LQIT/GQ-238 para tratamento esquistossomicida. Para o desenvolvimento dessa dispersão, foi utilizada a técnica de solvente e o carreador hidrofílico utilizado foi o PVP-K30. Houve uma significativa melhora na solubilidade e biodisponibilidade oral do LQIT/GQ-238. Nos estudos *in vitro*, verificou-se que a dispersão sólida aumentou a eficiência em 110,81% quando comparada ao LQIT/GQ-238 na forma livre, frente ao verme adulto. A dispersão à base de LQIT/GQ-238 apresenta maior solubilidade e maior estabilidade, devido ao LQIT/GQ-238 estar dispersa no carreador, dificultando sua cristalização. A dispersão à base de LQIT/GQ-238 é um produto intermediário que pode ser utilizado no desenvolvimento de formulações farmacêuticas para tratamento esquistossomicida.