

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 13 2024 024556 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: Brasil

Telefone: (31) 3409-6430

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Natureza Patente: 13 - Certificado de Adição (C)

Pedido Original: BR1020220000891

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE LIPOSSOMAS CONJUGADOS A ANFOTERICINA B CONTENDO DICETILFOSFATO, FORMULAÇÃO E USOS

Resumo: A presente tecnologia trata-se de um processo para obtenção de uma formulação da anfotericina B (AmB) em lipossomas contendo dicetilfosfato (DCP) baseado na incorporação do fármaco na membrana de lipossomas pré-formados, que combina os efeitos do pH na solubilidade da anfotericina B e da temperatura na inserção do fármaco na membrana dos lipossomas. A tecnologia trata também do uso do processo e da formulação para produção de medicamentos para o tratamento da leishmaniose e esporotricose, por via oral ou tópica. A utilização do DCP na formulação de lipossomas promove um estado menos agregado da anfotericina B, e potencialmente mais biodisponível, levando a um efeito de liberação significativamente mais rápida da AmB, quando comparado ao da formulação com diestearoil-fosfatidilglicerol (DSPG). Além disso, a eficácia terapêutica e a toxicidade da formulação com DCP foi avaliada em modelo murino para infecção por *Leishmania infantum*, *L. amazonenses* e para infecção fúngica por *Sporothrix brasiliensis*. Os resultados mostraram que a formulação com DCP reduziu significativamente a carga parasitária no fígado e no baço, em comparação com a formulação com DSPG, no tratamento de leishmaniose por administração oral. Também diminuiu a carga fúngica nas patas dos animais, evidenciando sua eficácia terapêutica.

Figura a publicar: 5

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 10

Nome: FRÉDÉRIC JEAN GEORGES FRÉZARD

CPF: 01176053604

Nacionalidade: Francesa

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 94774

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Inventor 2 de 10

Nome: GUILHERME SANTOS RAMOS

CPF: 06364309607

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 94774

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Inventor 3 de 10

Nome: HELANE LÚCIA OLIVEIRA DE MORAIS

CPF: 00133216683

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 94774

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Inventor 4 de 10

Nome: DANIEL DE ASSIS SANTOS

CPF: 03544056674

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 94774

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Inventor 5 de 10

Nome: RICARDO TOSHIO FUJIWARA

CPF: 17126724870

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 94774

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Inventor 6 de 10

Nome: MARTA MARQUES GONTIJO DE AGUIAR

CPF: 00504247697

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 94774

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Inventor 7 de 10

Nome: VIRGÍNIA MENDES RUSSO VALLEJOS

CPF: 05268282697

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 94774

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Inventor 8 de 10

Nome: VICTOR AUGUSTO TEIXEIRA LEOCÁDIO

CPF: 10102290601

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 94774

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Inventor 9 de 10

Nome: DANIELLE LETÍCIA DA SILVA

CPF: 05692126699

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 94774

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Inventor 10 de 10

Nome: THAIS SANTOS TUNES

CPF: 01610940660

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 94774

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	1 Comprovante de pagamento_29409162322583940.pdf
Portaria	2 Portaria 2195-2020 - Prof. Gilberto UFMG.pdf
Relatório Descritivo	3 Relatório Descritivo.pdf
Reivindicação	4 Reivindicações.pdf
Desenho	5 Desenhos.pdf
Resumo	6 Resumo.pdf
Esclarecimento	7 Carta de Esclarecimento.pdf
Cadastros no Sisgen	8 Cadastros no Sisgen.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Positiva de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, realizado a partir de 30 de junho de 2000, e que foram cumpridas as determinações da Lei 13.123 de 20 de maio de 2015, informando ainda:

Número da Autorização de Acesso: A992CED

Data da Autorização de Acesso: 10/10/2020

Origem do material genético e do conhecimento tradicional associado, quando for o caso

A992CED: Leishmania infantum, Leishmania amazonensis - 10/10/2020
A1458F6: Sporothrix brasiliensis - 25/10/2024

Declaração de veracidade

☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

___ SIAFI2024-DOCUMENTO-CONSULTA-CONGRU (CONSULTA GUIA DE RECOLHIMENTO DA UNIAO
02/07/24 16:03 USUARIO : TATIANE
DATA EMISSAO : 02Jul24 TIPO : 1 - PAGAMENTO NUMERO : 2024GR800529
UG/GESTAO EMITENTE : 153254 / 15229 - ADMINISTRACAO GERAL/UFGM
UG/GESTAO FAVORECIDA : 183038 / 18801 - INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDU
RECOLHEDOR : 153254 GESTAO : 15229
CODIGO RECOLHIMENTO : 72200 - 6 COMPETENCIA: JUN24 VENCIMENTO: 05Jul24
DOC. ORIGEM: 153254 / 15229 / 2024NP001376 PROCESSO : 23072.218783/2024
RECURSO : 1
(=) VALOR DOCUMENTO : 70,00
(-) DESCONTO/ABATIMENTO:
(-) OUTRAS DEDUCOES :
(+) MORA/MULTA :
(+) JUROS/ENCARGOS :
(+) OUTROS ACRESCIMOS :
(=) VALOR TOTAL : 70,00
NOSSO NUMERO/NUMERO REFERENCIA : 00029409162322583940
CODIGO DE BARRAS : 89610000000 0 70000001010 3 95523127220 9 00360640000 4
OBSERVACAO
Serviço: 200-Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT.
LANCADO POR : 10518315630 - TATIANE UG : 153254 02Jul2024 15:05
PF1=AJUDA PF3=SAI PF2=DADOS ORC/FIN PF4=ESPELHO PF12=RETORNA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PORTARIA Nº 2195, DE 06 DE ABRIL DE 2020

A REITORA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, no uso de suas atribuições legais e estatutárias, considerando o disposto nos artigos 11 e 12 do Decreto-Lei nº 200, de 25 de fevereiro de 1967,

RESOLVE:

Art. 1º Delegar competência ao Diretor da Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica (CTIT), Professor Gilberto Medeiros Ribeiro, Inscrição UFMG nº 247405 e SIAPE nº 1964486, e a seu substituto eventual para, no âmbito desse Órgão,

- a) assinar, por meio eletrônico ou físico, documentos ou instrumentos jurídicos, concernentes ao exercício das atividades de competência da CTIT, no âmbito da Lei 10.973/04 – Lei de Inovação Tecnológica, da Política de Inovação da UFMG e suas resoluções específicas, tais como Contrato de Transferência de *Know-How*, Contrato de Licenciamento de Tecnologia, Contrato de Partilhamento de Titularidade de Tecnologia, Acordos de Confidencialidade e Termos de Sigilo, Termos de Autorização de Teste e documentos afins;
- b) assinar, por meio eletrônico ou físico, documentação necessária para depósito, processamento, adição, retificação, substituição, modificação, ampliação e resposta de relatórios referentes a objeto de proteção de propriedade intelectual junto aos órgãos competentes, em âmbito nacional e internacional;
- c) autorizar a realização de despesas dentro dos limites orçamentários da CTIT;
- d) autorizar a concessão de suprimento de fundos a servidores da Unidade, bem como determinar a baixa de responsabilidade;
- e) requisitar passagens e transportes em geral, por quaisquer vias, nos limites da dotação orçamentária da CTIT;
- f) autorizar viagens de servidores, a serviço da Unidade, arbitrando-lhes as respectivas diárias, obedecidas as disposições legais pertinentes;
- g) assinar contratos, decorrentes de licitação, de dispensa de licitação ou inexigibilidade, no âmbito da CTIT;
- h) prover arrecadação de receitas em geral, no âmbito da CTIT; e
- i) apurar dívidas de terceiros para com a Universidade, oriundas de contratos de cotitularidade, licenciamento, transferência, dentre outros, adotando as medidas necessárias à regularização delas, no âmbito da CTIT.

Art. 2º Com base no disposto no Decreto nº 10.193, de 27 de dezembro de 2019, e no inciso II do art. 1º e art. 3º da Portaria nº 243, de 12 de fevereiro de 2020, do Ministério da Educação (MEC), subdelegar

competência ao supracitado Diretor e a seu substituto eventual para, no âmbito da CTIT,

I - celebrar novos contratos administrativos decorrentes de licitação, de dispensa de licitação e de inexigibilidade, ou prorrogar contratos em vigor relativos às atividades de custeio cujos valores sejam inferiores a R\$500.000,00 (quinhentos mil reais); e

II - autorizar a realização de despesas relativas às atividades de custeio cujos valores sejam inferiores a R\$500.000,00 (quinhentos mil reais).

Art. 3º Tornar sem efeito a Portaria nº 010, de 24 de janeiro de 2019.

Art. 4º A presente Portaria entra em vigor nesta data.

Belo Horizonte, 6 de abril de 2020.

Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

Reitora



Documento assinado eletronicamente por **Sandra Regina Goulart Almeida, Reitora**, em 09/04/2020, às 17:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0096203** e o código CRC **04D898C8**.

“PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE LIPOSSOMAS CONJUGADOS A ANFOTERICINA B CONTENDO DICETILFOSFATO, FORMULAÇÃO E USOS”

[01] A presente tecnologia é um certificado de adição ao pedido BR1020220000891, depositado em 04/01/2022, intitulado “PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE LIPOSSOMAS CONJUGADOS A ANFOTERICINA B, FORMULAÇÃO E USOS”. Trata-se de um processo para obtenção de uma formulação da anfotericina B (AmB) em lipossomas contendo dicetilfosfato (DCP) baseado na incorporação do fármaco na membrana de lipossomas pré-formados, que combina os efeitos do pH na solubilidade da anfotericina B e da temperatura na inserção do fármaco na membrana dos lipossomas. A tecnologia trata também do uso do processo e da formulação para produção de medicamentos para o tratamento da leishmaniose e esporotricose, por via oral ou tópica. A utilização do DCP na formulação de lipossomas promove um estado menos agregado da anfotericina B, e potencialmente mais biodisponível, levando a um efeito de liberação significativamente mais rápida da AmB, quando comparado ao da formulação com diestearoil-fosfatidilglicerol (DSPG). Além disso, a eficácia terapêutica e a toxicidade da formulação com DCP foi avaliada em modelo murino para infecção por *Leishmania infantum*, *L. amazonenses* e para infecção fúngica por *Sporothrix brasiliensis*. Os resultados mostraram que a formulação com DCP reduziu significativamente a carga parasitária no fígado e no baço, em comparação com a formulação com DSPG, no tratamento de leishmaniose por administração oral. Também diminuiu a carga fúngica nas patas dos animais, evidenciando sua eficácia terapêutica.

[02] A anfotericina B é um antibiótico polieno, isolado pela primeira vez em 1959 de culturas da bactéria *Streptomyces nodosus*, que apresenta atividade antifúngica e antiparasitária altamente eficaz. No entanto, proporciona nefrotoxicidade grave, levando à insuficiência renal grave, o

que limita sua utilização. Em razão dos seus efeitos colaterais, a pesquisa e o desenvolvimento de novas formulações, como emulsões, nanopartículas e lipossomas, têm sido intensificados, com o objetivo de otimizar o transporte do fármaco ao local desejado, reduzindo a quantidade de AmB livre na corrente sanguínea e, assim, minimizando sua toxicidade.

[03] No mercado há formulações comerciais da AmB, como o lipossoma Ambisome® (Nextar Pharmaceuticals), as suspensões coloidais Amphocil® e Amphotec® (Intermune), o complexo lipídico Abelcet® (Intermune) e a solução de detergente Fungizone®. Dentre essas formulações a mais empregada, atualmente, é a formulação lipossomal Ambisome®, cujas patentes relacionadas expiraram em 2016 (US 5874104 e US 5965156). Essa formulação tem se tornado a escolha preferencial, e de referência, para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas graves e das leishmanioses, devido ao seu perfil de segurança superior em comparação com as formulações convencionais. Inclusive está inserido no grupo dos medicamentos essenciais e está disponível no Sistema Único de Saúde (SUS) por meio do Componente Estratégico da Assistência Farmacêutica.

[04] Uma eficácia moderada do AmBisome® foi relatada no tratamento da leishmaniose tegumentar com taxa de cura inferior a 80%. No entanto, sua administração por via intravenosa tem desvantagens significativas, causando efeitos colaterais, como febre, calafrios, dor óssea, nefrotoxicidade e tromboflebite. Além disso, o tempo de tratamento é extenso, mínimo de 14 dias podendo chegar a quase 40 dias, elevando os custos associados ao tratamento. Essas desvantagens limitam seu uso em países em desenvolvimento em que ocorrem as infecções por Leishmanias. Este contexto tem estimulado a busca de novas formulações

para uma entrega otimizada de AmB, incluindo formas de melhorar a sua biodisponibilidade por via oral e em aplicação tópica.

[05] O estado da técnica mostra diferentes formulações da AmB para o uso na produção de medicamentos para o tratamento de leishmaniose e esporotricose, conforme comentado a seguir.

[06] O documento da patente US20100273728A1, intitulado “*Formulations for the oral administration of therapeutic agents and related methods*”, cuja data de prioridade é 23/05/2008, revela formulações de AmB com sistemas autoemulsificantes para o tratamento via administração oral de infecções fúngicas, incluindo esporotricoses, e por leishmanias. Os sistemas autoemulsionantes são constituídos por ésteres de glicerol, de ácido graxos e fosfolipídios PEGuilados. A principal desvantagem desse tipo de formulação são os efeitos colaterais associados aos componentes oleosos da formulação, que podem causar distúrbios gastrointestinais, como náusea e diarreia, o que limita a adesão do paciente, principalmente porque um regime de dosagem prolongado é necessário.

[07] O trabalho de Ishida, K. *et al.* (Ishida, K. *et al.* Efficacy of a poly-aggregated formulation of amphotericin B in treating systemic sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. Medical Mycology, 56, 288-296, 2018) revela formulação poliagregada de AmB com o desoxicolato para o tratamento via administração oral parenteral de infecções fúngicas por *Sporothrix brasiliensis*. A formulação de AmB com desoxicolato, comercializada como Fungizone®, apresenta várias desvantagens como a nefrotoxicidade, administração intravenosa e o alto custo. A formulação poliagregada desenvolvida nesse trabalho garante uma menor toxicidade em comparação ao Fungizone®, devido à liberação controlada da AmB pelas vesículas lipídicas. Porém não cita nenhum estudo de administração por via oral ou tópica.

[08] O documento de patente BR102017002582, intitulado “Formulação lipossomal para o tratamento das leishmanioses”, cuja data de prioridade é 07/02/2017, reivindica processo para a obtenção de formulações lipossomais de miltefosina e/ou de antimoniato de meglumina com outros fármacos leishmanicidas, como a AmB. Os lipossomas revelados no documento contêm o lipídeo DCP em suas composições, porém seu processo de obtenção apresenta desvantagens, como a complexidade do processo, a necessidade de várias etapas, incluindo uma etapa de liofilização e duas etapas de extrusão na presença dos fármacos, o que pode comprometer a estabilidade e eficiência de encapsulação desses fármacos. Além disso, não apresenta nenhuma formulação eficaz por via oral ou em aplicação tópica.

[09] O documento da patente US20210369615A1, intitulado “*Solid oral formulations of amphotericin B*”, cuja data de prioridade é 31/07/2019, revela formulações sólidas da AmB com pelo menos um componente lipofílico para o tratamento via administração oral de infecções fúngicas, incluindo esporotricoses, e por leishmanias. No entanto, a formulação oral apresenta estrutura organizacional, composição lipídica e características diferentes dos lipossomas da presente invenção.

[10] O documento de patente BR102022000089, intitulado “*Processo para obtenção de lipossomas conjugados a anfotericina b, formulação e usos*”, cuja data de prioridade é 04/01/2022, revela um processo para a obtenção de uma formulação da AmB lipossomal contendo diestearoil-fosfatidilglicerol (DSPG) e seu respectivo uso na produção de medicamentos para o tratamento de leishmaniose em humanos e cães. O documento não prevê a obtenção de lipossomos de AmB contendo DCP nem seu uso para a produção de medicamentos para o tratamento de infecções fúngicas cutâneas como a esporotricose.

[11] No estado da técnica não foi encontrada tecnologia que compreenda formulação lipossomal contendo AmB, formada pelos lipídeos fosfatidilcolina (P90H), colesterol e dicetilfosfato, PEGuilado ou não, permitindo uma terapia efetiva por via oral ou tópica para o tratamento de leishmaniose ou esporotricose, como apresentado na presente invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[12] A **Figura 1** mostra os espectros de dicroísmo de circular (A) e de absorção UV/Vis (B) da AmB nas composições lipossomais LAmB-DCP/COM, LAmB-DCP/PEG, LAmB-DSPG/PEG e do AmBisome®.

[13] A **Figura 2** mostra as cinéticas de liberação da AmB a 37°C a partir das composições LAmB-DSPG/PEG e LAmB-DCP/PEG. Os dados são mostrados como médias \pm EP ($n = 3$). $T_{1/2}$ representa a meia-vida de liberação da AmB, assumindo modelo de liberação mono-exponencial.

[14] A **Figura 3** mostra a estabilidade de tamanho das composições (A) LAmB-DSPG/PEG e (B) LAmB-DCP/PEG não liofilizadas, durante o armazenamento a 4°C. Os dados são mostrados com média \pm EP ($n = 3$).

[15] A **Figura 4** mostra o índice de polidispersão (IP) das composições (A) LAmB-DSPG/PEG e (B) LAmB-DCP/PEG não liofilizadas, durante o armazenamento a 4°C. Os dados são mostrados com média \pm EP ($n = 3$).

[16] A **Figura 5** mostra a eficácia terapêutica das formulações de AmB com lipossomas PEGuilados, contendo DSPG ou DCP, em modelo de leishmaniose visceral em hamsters, com base nas cargas parasitárias no fígado (A) e no baço (B). Hamsters machos *Mesocricetus auratus* foram infectados com *Leishmania infantum* por injeção intraperitoneal e, após 84 dias de infecção, foram tratados diariamente durante 10 dias com as seguintes formulações de AmB: LAmB-DSPG/PEG por via oral ou intraperitoneal na dose de 5 mg AmB/kg/dia; LAmB-DCP/PEG por via oral na dose de 5 mg AmB/kg/dia; formulação liposomal comercial Ambisome por via intraperitoneal na dose de 5 mg AmB/kg/dia. O grupo controle

permaneceu sem tratamento. A carga parasitária foi determinada por qPCR. Os dados são mostrados como medianas \pm intervalo de confiança 95% (n = 6 por grupo). *p<0,05 e **p<0,01 para comparação com o grupo não tratado pelo teste Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunns.

[17] A **Figura 6** mostra o perfil dos marcadores séricos da função hepática, transaminase oxalacética (A) e transaminase pirúvica (B), e da função renal, ureia (C) e creatina (D), após tratamento de hamsters infectados com *Leishmania infantum* com diferentes formulações lipossomais da AmB. Hamsters machos *Mesocricetus auratus* foram infectados com *Leishmania infantum chagasi* (BH401) por injeção intraperitoneal e, após 84 dias de infecção, foram tratados diariamente durante 10 dias com as seguintes formulações de AmB: LAmB-DSPG/PEG por via oral ou intraperitoneal na dose de 5 mg AmB/kg/dia; LAmB-DCP/PEG por via oral na dose de 5 mg AmB/kg/dia; formulação liposomal comercial Ambisome por via intraperitoneal na dose de 5 mg AmB/kg/dia. O grupo controle permaneceu sem tratamento. Após eutanásia, o soro foi coletado para a determinação dos níveis de transaminase oxalacética (TGO), transaminase pirúvica (TGP), ureia e creatinina. Os resultados de TGO e TGP são mostrados como medianas \pm intervalo de confiança 95% (n=6 por grupo). *p<0,05 para comparação com o grupo não tratado pelo teste Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunns. Os resultados de ureia e creatinina são mostrados como médias \pm EP (n=6 por grupo). *p<0,05 para comparação com o grupo não tratado pelo teste One-Way ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnett's.

[18] A **Figura 7** mostra a eficácia terapêutica do tratamento tópico com o hidrogel lipossomal de anfotericina B contendo DCP em modelo murino de leishmaniose cutânea. Camundongos BALB/c foram infectados na base da cauda com *Leishmania amazonensis*. 70 dias depois da infecção, iniciou-se o tratamento realizado com aplicações diárias durante 25 dias.

Grupos experimentais receberam: 50 uL do hidrogel lipossomal de AmB aplicados no local da lesão (LAmB-DCP/PEG); 50 uL do hidrogel de lipossomas PEGuilados “vazios” aplicados no local da lesão na mesma dose de lipídeo que o grupo LAmB-DCP/PEG (LVazio-DCP/PEG); miltefosina por via oral na dose de 10mg/kg/dia (controle positivo). Um grupo controle permaneceu sem tratamento. (A) evolução do tamanho de lesão durante o tratamento. (B) carga parasitária na lesão de camundongos infectados por *Leishmania amazonensis*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ para comparação com o controle negativo (A, Two-way ANOVA com pós-teste de Dunnett's; B, Brown-Forsythe ANOVA test, com pós-teste de Dunnett's T3).

[19] A **Figura 8** mostra a carga fúngica na pata de camundongos C57/BL6 machos após 10 dias de infecção intraplantar com *Sporothrix brasiliensis* IC189 e tratamentos iniciados 24 horas após infecção. Foram utilizadas as seguintes formulações de anfotericina B: LAmB-DOPG/PEG por via oral na dose de 10 mg/kg/dia; LAmB-DCP/PEG por via oral na dose de 10 mg/kg/dia; formulação comercial Anfotericina B por via intraperitoneal na dose de 5 mg/kg/dia-alternado. O grupo não tratado permaneceu sem tratamento. Os dados são mostrados como média \pm EP ($n = 4-5$ por grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ para comparação pelo teste One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA TECNOLOGIA

[20] A presente tecnologia trata-se de um processo para obtenção de uma formulação da anfotericina B (AmB) em lipossomas contendo dicetilfosfato (DCP) baseado na incorporação do fármaco na membrana de lipossomas pré-formados, que combina os efeitos do pH na solubilidade da anfotericina B e da temperatura na inserção do fármaco na membrana dos lipossomas. A tecnologia trata também do uso do processo e da formulação para produção de medicamentos para o tratamento da

leishmaniose e esporotricose, por via oral ou tópica. A utilização do DCP na formulação de lipossomas promove um estado menos agregado da anfotericina B, e potencialmente mais biodisponível, levando a um efeito de liberação significativamente mais rápida da AmB, quando comparado ao da formulação com diestearoil-fosfatidilglicerol (DSPG). Além disso, a eficácia terapêutica e a toxicidade da formulação com DCP foi avaliada em modelo murino para infecção por *Leishmania infantum*, *L. amazonenses* e para infecção fúngica por *Sporothrix brasiliensis*. Os resultados mostraram que a formulação com DCP reduziu significativamente a carga parasitária no fígado e no baço, em comparação com a formulação com DSPG, no tratamento de leishmaniose por administração oral. Também diminuiu a carga fúngica nas patas dos animais, evidenciando sua eficácia terapêutica.

[21] Mais especificamente, o processo para obtenção de lipossomas conjugados a anfotericina B compreende as seguintes etapas:

- a. Preparar uma suspensão de vesículas contendo fosfatidilcolina (PC), colesterol (COL), dicetilfosfato (DCP), com tamanho calibrado entre 30 e 350 nm e índice de polidispersão (IP) inferior a 0,3;
- b. Dissolver a anfotericina B em concentração de 1 a 30 mg/mL, em solução aquosa alcalina com pH variando entre 10 e 13;
- c. Adicionar à solução de anfotericina B obtida na etapa “b” a suspensão de lipossomas obtida na etapa “a” pré-aquecida em temperatura na faixa de 25 a 90°C, na razão molar fármaco/lipídeo variando entre 1:50 e 1:5, e manter a mistura sob aquecimento a uma temperatura de 25 a 90 °C por 1 a 5 minutos;
- d. Neutralizar o pH da suspensão obtida na etapa “c” para valor entre 6 e 8, seguido de aquecimento em temperatura de 25 a 90°C por 1 a 180 minutos.

[22] Na etapa “a”, a fosfatidilcolina (PC), o colesterol (COL) e o dicetilfosfato (DCP) devem estar, preferencialmente nas proporções molares de 40 a 95%, 0 a 40% e 5 a 30 %, respectivamente.

[23] Ainda na etapa “a”, os lipossomas podem ser PEGuilados, ou seja, pode incorporar, além dos lipídeos usados nos lipossomas convencionais descritos acima, um lipídeo PEGuilado na proporção molar de 3 a 10 % em relação aos lipídeos totais.

[24] Os lipossomas PEGuilados são compostos, em uma configuração preferencial, por PC, COL, DCP e diestearoil-fosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG 2000) com proporções molares de 50 %, 25 %, 20 % e 5 %, respectivamente, em relação aos lipídeos totais.

[25] A suspensão obtida na etapa “d” pode ser liofilizada após adição de solução de açúcar crioprotetor na razão mássica açúcar/lipídeo entre 1:1 e 4:1, sendo os açúcares crioprotetores selecionados do grupo compreendendo sacarose, trealose, lactose, maltose, glicose e derivados de ciclodextrina.

[26] Uma formulação contendo os lipossomas de anfotericina B obtidos conforme processo definido acima caracteriza-se por compreender anfotericina B incorporada na membrana de lipossomas formados por fosfatidilcolina (P90H), colesterol (COL), dicetilfosfato (DCP), convencionais ou PEGuilados, e excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

[27] A formulação lipossomal da presente tecnologia pode compreender excipientes para administração oral, intranasal, inalatória, subcutânea, intramuscular ou aplicação tópica.

[28] A formulação lipossomal de anfotericina B da presente tecnologia pode ser utilizada para produzir medicamentos para o tratamento de leishmaniose em humanos e cães ou para produzir medicamentos para o tratamento de esporotricose em humanos e gatos.

[29] O processo da presente tecnologia pode ser utilizado para produzir medicamentos para o tratamento de leishmaniose em humanos e cães ou para produzir medicamentos para o tratamento de esporotricose em humanos e gatos.

[30] A presente invenção pode ser mais bem compreendida através dos exemplos que se seguem, não limitantes.

EXEMPLO 1 - PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSIÇÕES DA ANFOTERICINA B COM LIPOSSOMAS CONVENCIONAIS E PEGUILADOS CONTENDO DICETILFOSFATO

[31] Para o preparo das composições de lipossomas convencionais (LAmB-DCP/CON) e PEGuilados (LAmB-DCP/PEG) da anfotericina B (AmB), foram utilizadas as seguintes composições lipídicas. Para LAmB-DCP/CON, os lipídeos empregados foram fosfatilcolina (Phospholipon®90H, P90H), colesterol (COL) e dicetilfosfato (DCP) na razão molar 5,3, 2,7 e 2,0, respectivamente. Para LAmB-DCP/PEG, foram P90H, COL, DCP e diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG2000) na razão molar 5,1, 2,5, 1,9 e 0,5, respectivamente.

[32] Preparou-se a fase orgânica composta pelos lipídeos (P90H; COL; DCP; DSPE-PEG2000) dissolvidos em etanol a 65 °C e uma fase aquosa constituída de solução de NaOH 0,007M em água aquecida a 65 °C, mantida sob agitação. Em 5 mL da fase aquosa foi adicionado 1,1 mL da fase orgânica, gota a gota lentamente. Esse sistema foi mantido sob agitação durante 5 min a 65 °C. Após essa etapa, o tamanho dos lipossomas foi calibrado por meio de filtração da suspensão empregando uma extrusora (Lipex® Extruder, Burnaby Canadá) e membranas de policarbonato sucessivamente de poro de diâmetro 200 e 100 nm. A suspensão foi dialisada por 3 horas a 25 °C para a retirada no etanol com uma membrana de diálise MWCO 10kDa. Posteriormente, a solução de AmB em NaOH 0,1 M (10 mg em 0,8 mL) foi adicionada a 2 mL da

suspensão de lipossomas calibrados, com uma proporção molar de AmB para lipídeo de 1:10. A mistura obtida foi aquecida a 60°C e protegida da luz, por 2 min. O pH inicialmente em 12, foi ajustado para 6,5 com uma solução de HEPES ácido (preparada com HCl 0,1 M) sob agitação constante, permanecendo nessas condições por mais 5 min a 60 °C. Em seguida, a sacarose foi adicionada à mistura na razão mássica açúcar/lipídeo 3:1 e a suspensão resultante foi congelada e liofilizada (Liotop L101, São Carlos, Brasil).

[33] Após liofilização, as formulações de AmB com lipossomas convencionais e PEGuilados (LAmB-DCP/PEG e LAmB-DCP/CON) foram caracterizadas com relação ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial zeta (Zetasizer Nano ZS 90, Malvern Instruments, Malvern®, UK). A eficiência e o teor de encapsulação mediante a dosagem da AmB foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A quantificação de AmB foi realizada em um cromatógrafo Agilent série 1260, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD). As análises foram realizadas utilizando vazão de 1 mL/min, coluna Discovery® C18 (250 × 4,6 mm; 5 µm) e fase móvel composta por acetonitrila: metanol: solução de ácido cítrico (4,2 g/L) pH 6 (48:12:40) com gradiente. A detecção da AmB foi realizada medindo absorbância no comprimento de onda de 405 nm. Como mostrado na Tabela 1, as formulações apresentam nanopartículas com diâmetros hidrodinâmicos médios inferiores a 140 nm e índice de polidispersão (IP) em torno de 0,1. Notou-se redução acentuada no potencial zeta do (LAmB-DCP/PEG) para o (LAmB-DCP/CON) de -3,8 para -13,5 mV, em função do revestimento da superfície de nanopartículas por polímero de PEG hidrofílico. Observa-se também que o potencial zeta de LAmB-DCP/CON foi menos negativo àquele dos lipossomas branco (LAmB-DCP/CON-Br), o que sugere a interação eletrostática da AmB com o DCP na superfície das vesículas. A

dosagem da AmB evidenciou eficiências e teores de encapsulação acima de 90% (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição do tamanho das partículas, Índice de Polidispersão (IP), potencial zeta (PZ), eficiência de encapsulamento de fármaco (EE%) e teor total (TT%) das formulações lipossomais PEGuiladas (LAmB-DCP/PEG) e convencional (LAmB-DCP/CON).

Formulação	Diâmetro (nm) \pm DP ^{1,2}	IP \pm DP ^{1,2}	PZ (mV) \pm DP ^{1,2}	EE(%) \pm DP ^{1,2}	TT(%) \pm DP ^{1,2}
LAmB-DCP/PEG	131,0 \pm 8,7	0,09 \pm 0,04	-3,8 \pm 0,6	96,0 \pm 2,9	99,8 \pm 4,9
LAmB-DCP/CON	137,0 \pm 4,9	0,12 \pm 0,05	-13,5 \pm 3,6	99,1 \pm 5,2	92,9 \pm 9,5
LAmB-DCP/PEG-Br	97,0 \pm 5,7	0,05 \pm 0,09	-3,3 \pm 0,5	-	-
LAmB-DCP/CON-Br	97,0 \pm 3,1	0,05 \pm 0,02	-25,1 \pm 1,2	-	-

¹DP: desvio padrão; ² Média e DP de 7 lotes independentes. O diâmetro hidrodinâmico médio e IP foram determinados após diluição da suspensão em glicose 5%. O potencial zeta foi medido após diluição em PBS (NaCl 150 mM, fosfato 10 mM, pH 7,2).

[34] Como resultado importante deste estudo, mostramos que AmB é incorporada de forma eficiente em lipossomas contendo DCP, preparados pelo método de injeção de solução etanólica. Este processo de preparo se destaca pela sua maior simplicidade e pelo grande potencial para escalonamento, quando comparado àquele usado para o preparo de lipossomas contendo DSPG.

[35] Para investigar o estado de agregação da AmB nas composições lipossomais convencionais e PEGuiladas, foram utilizadas as técnicas de espectroscopia de absorção UV-Visível (UV-Vis) e de dicroísmo circular. Em consonância com Ramos et al. (2022), o AmBisome®, anfotericina B comercial, apresentou um sinal DC de tipo duplete centrado em 330 nm,

enquanto LAmB-DSPG/PEG mostrou sinal bem menos intenso na mesma região (Figura 1A). As composições LAmB-DCP/CON e LAmB-DCP/PEG apresentaram também sinais DC de tipo duplete centrados em 335 nm. De forma surpreendente, o duplete se mostrou invertido nas composições com DCP, em comparação ao duplete do AmBisome®, e foi muito mais intenso para o LAmB-DCP/PEG que o LAmB-DCP/CON (Figura 1A).

[36] A comparação dos espectros de absorção UV/Vis (Figura 1B) mostra um deslocamento do pico máximo de absorção UV das formulações lipossomais, em relação ao AmBisome®. Além disso, as composições mostraram bandas de absorção mais intensas em 363–365, 383–384 e 406–409 nm, que são atribuídas à forma monomérica da AmB (Frézard e colaboradores, 2023). Observou também que essas bandas são mais intensas para as composições contendo DCP que para a composição contendo DSPG.

[37] Portanto, os dados de espectroscopia indicam um estado menos agregado da AmB nas composições contendo DCP, em comparação à formulação contendo DSPG. Mostram também conformações distintas da forma agregada da AmB, entre as duas composições com DCP e DSPG.

[38] Foram comparadas as cinéticas de liberação in vitro da AmB a 37 °C e tampão isotônico pH 7,2, a partir das composições lipossomais PEGuiladas com DCP e DSPG, em condição diálise na presença de gama-ciclodextrina 5%, conforme descrito por Frézard et colaboradores (Pharmaceutics.2022;15(1):99. doi: 10.3390/pharmaceutics15010099). Como mostrado na Figura 2, a composição contendo DCP apresentou liberação significativamente mais rápida da AmB, quando comparada àquela contendo DSPG. Essa liberação mais rápida é condizente com o estado menos agregado da AmB na composição com DCP. Isto caracteriza a composição lipossomal de AmB com DCP como potencialmente mais biodisponível.

[39] Com o objetivo de avaliar o comportamento das formulações lipossomais em ambiente similar ao estômago, foi realizado ensaio de estabilidade utilizando fluido gástrico simulado sem enzima (FGS) em pH ajustado para $1,2 \pm 0,1$. Foi realizada uma comparação com a formulação mantida em PBS em pH 7,2. Os resultados de caracterização de tamanho de partículas estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição do tamanho das partículas (diâmetro), Índice de Polidispersão (IP) e pH da composição lipossomal PEGuilada (LAmB-DCP/PEG) e convencional (LAmB-DCP/CON) após diluição em FGS e PBS e incubação por 2h a 37°C.

	LAmB-DCP/CON		LAmB-DCP/PEG	
	FGS	PBS	FGS	PBS
Diâmetro (nm) \pm DP ^{1,2}	207,0 \pm 3,8	126,9 \pm 5,2	106,3 \pm 0,1	100,4 \pm 2,9
IP \pm DP ^{1,2}	0,53 \pm 0,10	0,098 \pm 0,02	0,22 \pm 0,02	0,130 \pm 0,03
pH	1,20	7,22	1,28	7,12

¹DP: desvio padrão; ² Média e DP de 2 lotes independentes.

[40] Os dados mostram diferenças mínimas do diâmetro e do IP da composição LAmB-DCP/PEG, entre os meios FGS e PBS. Por outro lado, a composição baseada em lipossomas convencionais (LAmB-DCP/CON) apresenta diâmetro e índice de polidispersão elevados no FGS em comparação ao PBS, mostrando a agregação das vesículas lipídicas no meio FGS. Portanto, os resultados de análise de tamanho indicam maior estabilidade da formulação LAmB-DCP/PEG no FGS em comparação à formulação com lipossomas convencionais, apontando para o maior potencial da composição PEGuilada para administração oral de AmB.

[41] Com o objetivo de comparar a estabilidade coloidal dos lipossomas PEGuilados nas composições com DCP e DSPG, o preparo foi realizado

até a etapa de incorporação da AmB. Em seguida, as suspensões aquosas foram armazenadas entre 2 e 8°C e o diâmetro e o IP foram determinados ao longo do tempo.

[42] Como mostrado nas Figuras 3 e 4, a composição LAmB-DSPG/PEG mostrou aumento significativo do diâmetro dos lipossomas, evidenciando instabilidade, ao contrário da composição LAmB-DCP/PEG.

[43] Em conclusão, quando comparada à composição contendo DSPG preparada conforme Ramos e colaboradores (Ramos G. S. *et al.* Formulation of amphotericin B in pegylated liposomes for improved treatment of cutaneous leishmaniasis by parenteral and oral routes. *Pharmaceutics*, 5, 989, 2022), a composição lipossomal PEGuilada contendo DCP preparada pelo método de injeção etanólica, além de permitir um processo de preparo simplificado, mostrou menor estado de agregação da AmB, liberação mais rápida da AmB, e estabilidade coloidal aumentada na forma de suspensão aquosa em condição de armazenamento.

EXEMPLO 2. AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA TERAPÊUTICA E TOXICIDADE DE COMPOSIÇÃO DA ANFOTERICINA B COM LIPOSSOMAS PEGUILADOS CONTENDO DICETILFOSFATO EM MODELO EXPERIMENTAL DE LEISHMANIOSE VISCERAL, APÓS ADMINISTRAÇÃO ORAL

[44] O estudo de eficácia terapêutica por via oral das composições de AmB com lipossomas PEGuilados contendo DCP e DSPG foi realizado em modelo de leishmaniose visceral (LV) com hamsters. Hamsters *Mesocricetus auratus* machos com idade entre 7 e 8 semanas foram infectadas com 107 *Leishmania infantum* (MCAN/BR/2002/BH401 isolada do baço de hamster) por via intraperitoneal (i.p). O tratamento com duração de 10 dias foi iniciado 84 dias depois da infecção. Os animais foram alocados nos seguintes grupos experimentais (n=6). Segue a

identificação dos grupos experimentais. Grupo 1: recebendo a composição da AmB em lipossomas PEGuilados (LAmB-DSPG/PEG preparada conforme Ramos e colaboradores (2022)) por via oral de 5mg/kg/dia; Grupo 2: recebendo a composição da AmB em lipossomas PEGuilados (LAmB-DCP/PEG preparada conforme Exemplo 1) por via oral na dose de 5mg/kg/dia; Grupo 3: recebendo AmBisome®, por via i.p na dose de 5,0 mg/Kg/dia (controle positivo); Grupo 4: recebendo a composição de AmB em lipossomas PEGuilados (LAmB-DSPG/PEG) por via i.p na dose 5mg/kg/dia; Grupo 5: não tratado (controle negativo).

[45] Após quatro dias do término do tratamento, os animais foram submetidos à anestesia geral e a eutanásia. As amostras de sangue, baço fígado, intestino, medula e rins foram removidas e armazenadas a -20 °C até o uso. Os baços e fígados foram homogeneizados em PBS e o DNA extraído através de kit comercial para avaliação da carga parasitária por qPCR, conforme descrito por Silva e colaboradores (da Silva, S. M. *et al.* Efficacy of combined therapy with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol in treatment of canine visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*, 56, 2858-2867, 2012). Sequência de primers foram escolhidas para amplificação de região de aproximadamente 120 pb do kDNA da *Leishmania*. A quantificação da carga parasitária nas amostras foi feita através de curva padrão estabelecida com diferentes diluições de suspensão de promastigotas de *L. infantum* (BH401). A carga parasitária, expressa como número de *Leishmania* por ng de DNA total, está mostrada na Figura 5.

[46] Na Figura 5, observa-se a redução significativa da carga parasitária no fígado nos grupos tratados com LAmB-DSPG/PEG por via intraperitoneal e LAmB-DCP/PEG por via oral, em relação ao grupo controle não tratado, em nível comparável ao grupo tratado com AmBisome®. No baço podemos observar redução da carga parasitária nos

grupos tratados com LAmB-DSPG/PEG por via intraperitoneal e com LAmB-DCP/PEG por oral, em relação ao grupo não tratado. Por outro lado, a composição LAmB-DSPG/PEG por via oral não reduziu significativamente a carga parasitária, nem no fígado, nem no baço.

[47] Portanto, este estudo estabelece a superioridade terapêutica por via oral da composição LAmB-DCP/PEG, em comparação à composição LAmB-DSPG/PEG, num modelo experimental consagrado de leishmaniose visceral.

[48] Marcadores séricos da função hepática (transaminase oxalacética ou TGO; transaminase pirúvica ou TGP) e da função renal (ureia e creatinina) também foram avaliados após o final do tratamento. Como mostrado na Figura 6, o tratamento com as composições orais não promoveu alteração nos parâmetros hepáticos ou renais, em relação ao grupo não tratado. Por outro lado, a composição LAmB-DSPG/PEG dada por via intraperitoneal causou aumento significativo dos níveis de TGP e de ureia, indicando toxicidades renal e hepática. Portanto, as composições orais de AmB se destacam pela sua menor toxicidade em comparação ao tratamento parenteral.

[49] Portanto, a composição da AmB com lipossomas PEGuilados contendo DCP se destacam pela sua elevada eficácia por via oral, assim como pela ausência de toxicidade.

EXEMPLO 3. PREPARO DE UM HIDROGEL COM ANFOTERICINA B INCORPORADA EM LIPOSSOMAS PEGUILADOS CONTENDO DICETILFOSFATO E AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA TERAPÊUTICA DESSA FORMULAÇÃO NO TRATAMENTO TÓPICO EM MODELO MURINO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA.

[50] Lipossomas PEGuilados foram preparados a partir dos lipídeos Phospholipon90H (P90H), colesterol (COL) e dicetilfosfato (DCP) e diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG2000)

na razão molar 5,1, 2,5, 1,9 e 0,5, respectivamente. Para isto, preparouse a fase orgânica composta pelos lipídeos (P90H; COL; DCP; DSPE-PEG2000) dissolvidos em etanol a 65 °C e de uma fase aquosa constituída de solução de NaOH 0,007M em água aquecida a 65 °C, mantida sob agitação. 1,1 mL da fase orgânica foi gotejado lentamente em 5 mL da fase aquosa. Esse sistema foi mantido sob agitação durante 5 min a 65 °C. Após essa etapa, o tamanho dos lipossomas foi calibrado por meio de filtração da suspensão usando uma extrusora (Lipex® Extruder, Burnaby Canadá) empregando membranas de policarbonato sucessivamente de poro de diâmetro 200 e 100 nm. Posteriormente, a solução de AmB em NaOH 0,1 M (10 mg em 0,8 mL) foi adicionada a 2 mL da suspensão de lipossomas calibrados, com uma proporção molar de AmB para lipídeo de 1:10. A mistura foi aquecida a 60 °C, protegida da luz, por 2 min. O pH inicialmente em 12, foi ajustado para 6,5 com uma solução de HEPES ácido (preparada com HCl 0,7 M) sob agitação constante, permanecendo nessas condições por mais 5 min a 60 °C. A suspensão lipossomal foi então gelificada com adição de 10 mg de hidroxietilcelulose (Natrosol®) para a obtenção do hidrogel LAmB-DCP/PEG na concentração final de AmB de 0,38% (m/m). Foi preparada também uma formulação com lipossomas vazios (LVazio-DCP/PEG), empregando o mesmo método de preparo e omitindo apenas o fármaco, para utilização como controle nos ensaios de eficácia.

[51] A eficácia terapêutica da formulação LAmB-DCP/PEG foi avaliada por via tópica em modelo murino de leishmaniose cutânea. Camundongos BALB/c fêmeas com idade entre 7 e 8 semanas foram infectados com 4×10^6 promastigotas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) por via intradérmica na base da cauda. O tratamento foi iniciado após o estabelecimento das lesões (70 dias depois da infecção) e realizado com aplicações tópicas diárias da formulação lipossomal durante 25 dias. Os

animais foram alocados nos seguintes grupos experimentais (n=10): grupo recebendo 50 uL do hidrogel lipossomal de AmB aplicado no local da lesão (LAmB-DCP/PEG); grupo recebendo 50 uL do hidrogel de lipossomas PEGuilados “vazios” aplicado no local da lesão na mesma dose de lipídeo que o grupo LAmB-DCP/PEG (LVazio-DCP/PEG); grupo recebendo miltefosina por via oral na dose de 10mg/kg/dia (controle positivo); grupo não tratado (controle negativo). A eficácia terapêutica foi avaliada pelo acompanhamento do tamanho de lesão e pela avaliação da carga parasitária por qPCR, 8 dias depois do final do tratamento.

[52] A Figura 7 apresenta os resultados de evolução do tamanho de lesão, assim como a carga parasitária depois do tratamento. Os resultados demonstram a eficácia terapêutica do tratamento tópico com a formulação de anfotericina B incorporada em lipossomas PEGuilados contendo DCP, em modelo de leishmaniose cutânea, como evidenciado pelo crescimento significativamente menor do tamanho de lesão e pela redução significativa da carga parasitária, em comparação ao controle negativo (não tratado).

[53] Este exemplo amplia o potencial terapêutico da composição lipossomal LAmB-DCP/PEG, por demonstrar a sua eficácia no tratamento tópico da leishmaniose cutânea. A via tópica é uma via de administração não invasiva, alternativa à via oral, e muito procurada para aumentar a adesão dos pacientes ao tratamento.

EXEMPLO 4. AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA TERAPÊUTICA DE COMPOSIÇÃO DA ANFOTERICINA B COM LIPOSSOMAS PEGUILADOS CONTENDO DICETILFOSFATO EM MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO FÚNGICA, APÓS ADMINISTRAÇÃO ORAL

[54] Foi realizado um estudo comparativo de eficácia terapêutica por via oral das composições de AmB com lipossomas PEGuilados contendo DCP e dioleilfosfatidilglicerol (LAmB-DOPG/PEG), em modelo murino de

esporotricose. As formulações LAmB-DCP/PEG e LAmB-DOPG/PEG foram preparadas conforme descrito no Exemplo 1, com a mesma razão molar de lipídeos, substituindo apenas o DCP pelo dioleilfosfatidilglicerol (DOPG) na formulação LAmB-DOPG/PEG. Camundongos C57BL/6 machos com idade entre 7 e 8 semanas foram infectados com 5×10^6 leveduras de *Sporothrix brasiliensis* IC189 na região plantar da pata traseira direita. O tratamento foi iniciado 24 horas após a infecção e realizado durante 10 dias com os seguintes grupos experimentais: Grupo 1: recebendo LAmB-DCP/PEG por via oral na dose de 10 mg/kg/dia; Grupo 2: recebendo LAmB-DOPG/PEG por via oral na dose de 10 mg/kg/dia; Grupo 3: recebendo Anforicin B®, por via i.p na dose de 5 mg/kg/dia-alternado (controle positivo); Grupo 4: não tratado (controle negativo). Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados, a pata infectada foi coletada, triturada e diluída para determinação da carga fúngica.

[55] Como mostrado na Figura 8, os resultados de carga fúngica na pata dos animais demonstram a eficácia terapêutica da formulação LAmB-DCP/PEG em nível equivalente àquela do tratamento com a formulação comercial injetável da anfotericina B (Anforicin B). Por outro lado, a formulação contendo o DOPG, ao contrário daquela contendo o DCP, não mostrou eficácia terapêutica significativa no modelo experimental.

[56] Os resultados mostram que o tratamento com a composição LAmB-DCP/PEG foi superior àquela com LAmB-DOPG/PEG e tão eficaz quanto o tratamento padrão na redução e eliminação da carga fúngica nos animais infectados com *S. brasiliensis*. Este exemplo reforça o grande potencial da composição LAmB-DCP/PEG para o tratamento oral de infecções fúngicas.

[57] É importante ressaltar que, apesar da semelhança na redução e eliminação da carga fúngica, o tratamento administrado por via oral

constitui uma grande vantagem em relação àqueles administrados por via intraperitoneal, uma vez que eliminam a necessidade de internação do paciente, melhorando significativamente sua qualidade de vida e reduzindo custos inerentes à internação. Ressalta-se a carência, no mercado, de uma formulação oral de anfotericina B.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE LIPOSSOMAS CONJUGADOS A ANFOTERICINA B, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- a. Preparar uma suspensão de vesículas contendo fosfatidilcolina, colesterol, dicetilfosfato, com tamanho calibrado entre 30 e 350 nm e índice de polidispersão (IP) inferior a 0,3;
- b. Dissolver a anfotericina B em concentração de 1 a 30 mg/mL, em solução aquosa alcalina com pH variando entre 10 e 13;
- c. Adicionar a solução de anfotericina B obtida na etapa “b” à suspensão de lipossomas obtida na etapa “a” pré-aquecida em temperatura na faixa de 25 a 90°C, na razão molar fármaco/lipídeo variando entre 1:50 e 1:5, e manter a mistura sob aquecimento a uma temperatura de 25 a 90 °C por 1 a 5 minutos;
- d. Neutralizar o pH da suspensão obtida na etapa “c” para valor entre 6 e 8, seguido de aquecimento em temperatura de 25 a 90°C por 1 a 180 minutos.

2. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE LIPOSSOMAS CONJUGADOS A ANFOTERICINA B, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por, na etapa “a”, os lipossomas serem formados por fosfatidilcolina, colesterol, dicetilfosfato, com proporções molares de 40 a 95%, 0 a 40% e 5 a 30%, respectivamente.

3. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE LIPOSSOMAS CONJUGADOS A ANFOTERICINA B, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por, na etapa “a”, os lipossomas incorporarem um lipídeo PEGuilado na proporção molar de 3 a 10 % em relação aos lipídeos totais.

4. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE LIPOSSOMAS CONJUGADOS A ANFOTERICINA B, de acordo com a reivindicação

1, caracterizado pela suspensão obtida na etapa “d” ser liofilizada após adição de solução de açúcar crioprotetor na razão mássica açúcar/lipídeo entre 1:1 e 4:1, sendo os açúcares crioprotetores selecionados do grupo compreendendo sacarose, trealose, lactose, maltose, glicose e derivados de ciclodextrina.

5. FORMULAÇÃO lipossomal de anfotericina B, obtida pelo processo definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada por compreender anfotericina B incorporada na membrana de lipossomas formados por fosfatidilcolina, colesterol, dicetilfosfato, convencionais ou PEGuilados, e excipientes farmacologicamente aceitáveis.

6. FORMULAÇÃO lipossomal de anfotericina B, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada por compreender excipientes para administração oral, intranasal, inalatória, subcutânea, intramuscular ou aplicação tópica.

7. USO da formulação definida em qualquer uma das reivindicações 5 a 6, caracterizado por ser para produzir medicamentos para o tratamento de leishmaniose em humanos e cães.

8. USO do processo definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado por ser para produzir medicamentos para o tratamento de leishmaniose em humanos e cães.

9. USO da formulação definida em qualquer uma das reivindicações 5 a 6, caracterizado por ser para produzir medicamentos para o tratamento de esporotricose em humanos e gatos.

10. USO do processo definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado por ser para produzir medicamentos para o tratamento de esporotricose em humanos e gatos.

DESENHOS

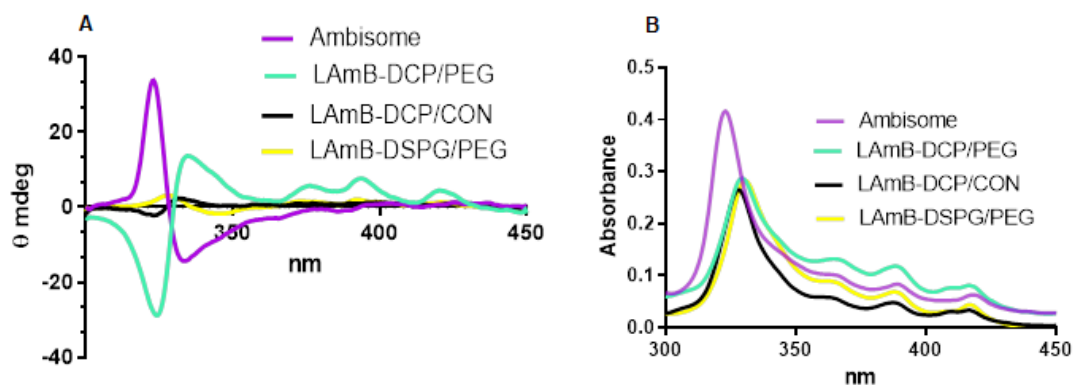


FIGURA 1

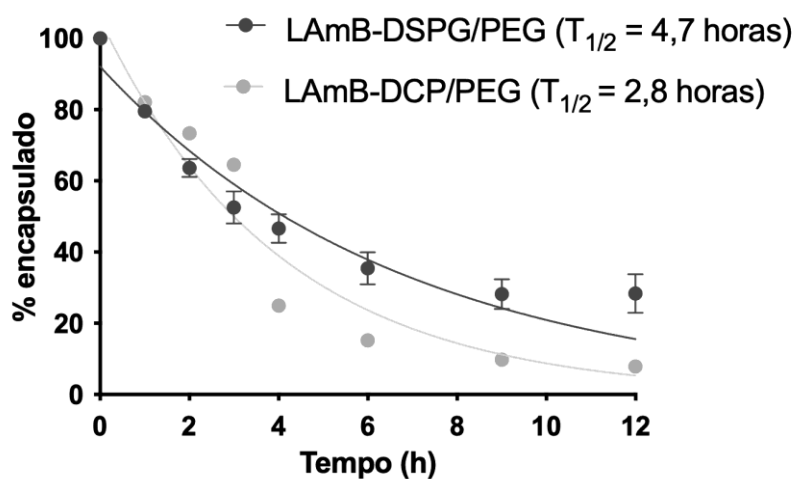


FIGURA 2

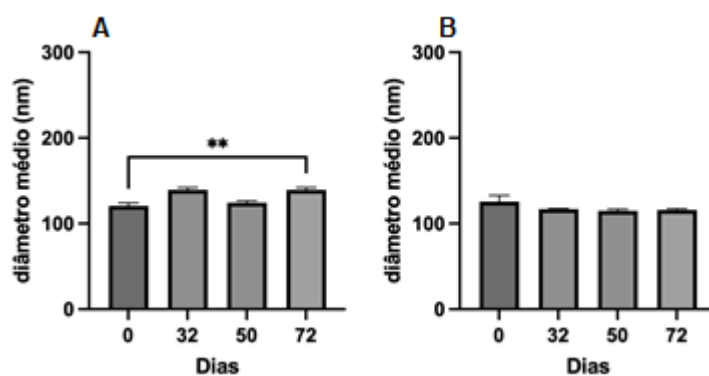


FIGURA 3

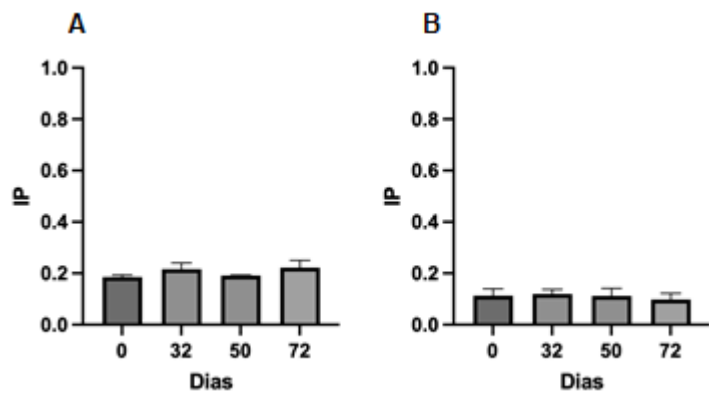


FIGURA 4

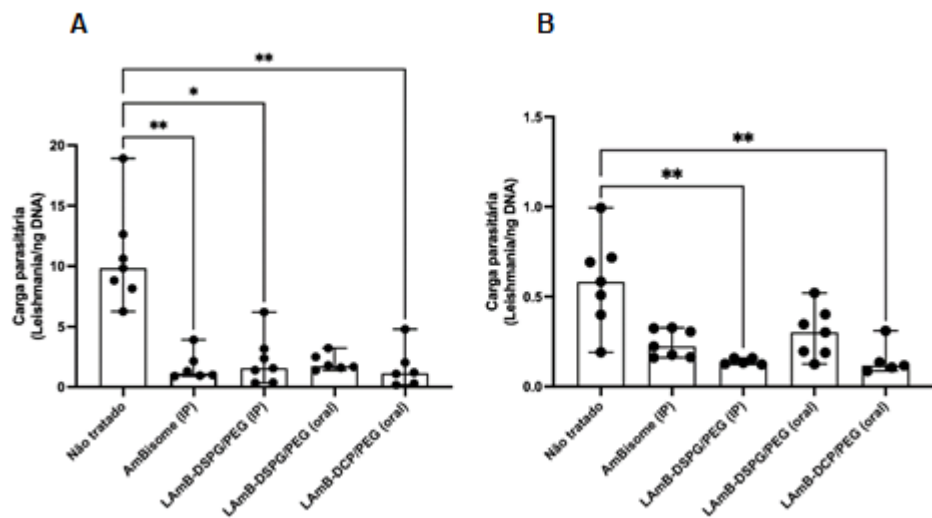


FIGURA 5

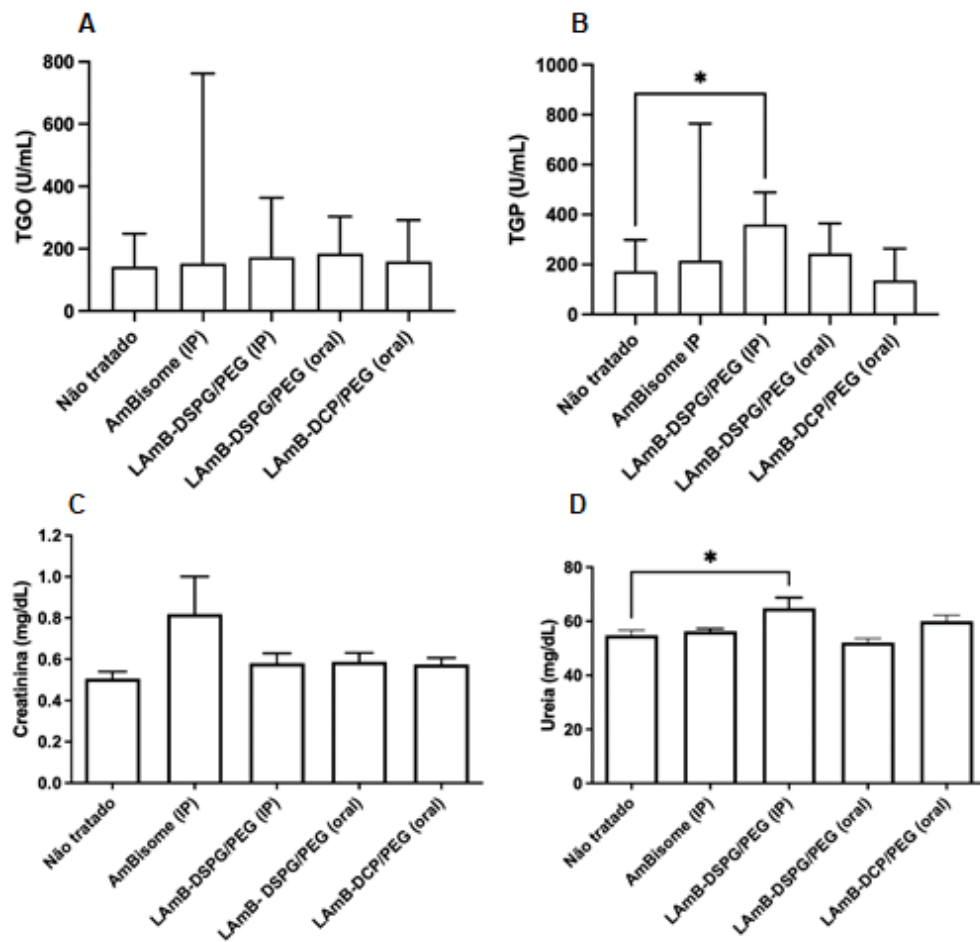


FIGURA 6

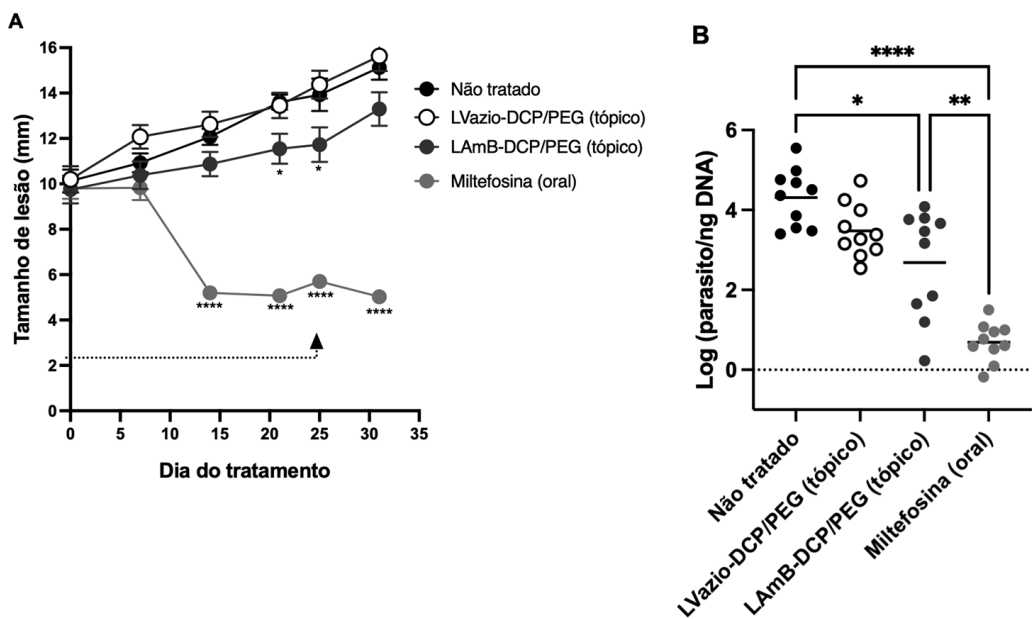


FIGURA 7

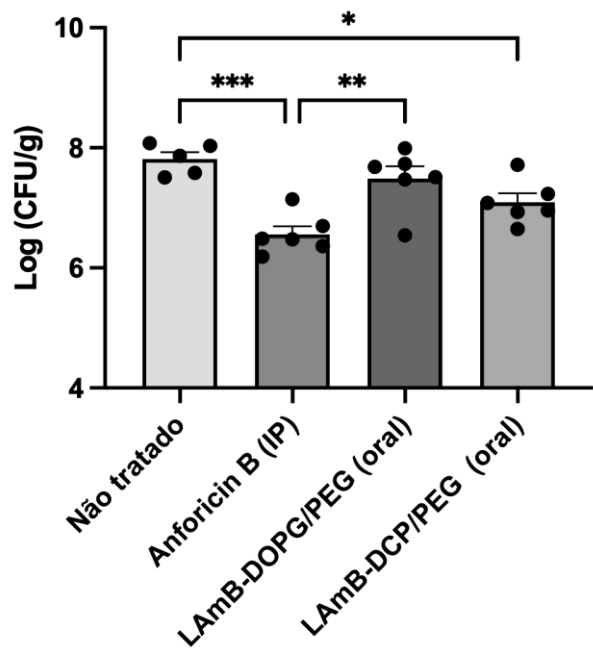


FIGURA 8

RESUMO

“PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE LIPOSSOMAS CONJUGADOS A ANFOTERICINA B CONTENDO DICETILFOSFATO, FORMULAÇÃO E USOS”

A presente tecnologia trata-se de um processo para obtenção de uma formulação da anfotericina B (AmB) em lipossomas contendo dicetilfosfato (DCP) baseado na incorporação do fármaco na membrana de lipossomas pré-formados, que combina os efeitos do pH na solubilidade da anfotericina B e da temperatura na inserção do fármaco na membrana dos lipossomas. A tecnologia trata também do uso do processo e da formulação para produção de medicamentos para o tratamento da leishmaniose e esporotricose, por via oral ou tópica. A utilização do DCP na formulação de lipossomas promove um estado menos agregado da anfotericina B, e potencialmente mais biodisponível, levando a um efeito de liberação significativamente mais rápida da AmB, quando comparado ao da formulação com diestearoil-fosfatidilglicerol (DSPG). Além disso, a eficácia terapêutica e a toxicidade da formulação com DCP foi avaliada em modelo murino para infecção por *Leishmania infantum*, *L. amazonenses* e para infecção fúngica por *Sporothrix brasiliensis*. Os resultados mostraram que a formulação com DCP reduziu significativamente a carga parasitária no fígado e no baço, em comparação com a formulação com DSPG, no tratamento de leishmaniose por administração oral. Também diminuiu a carga fúngica nas patas dos animais, evidenciando sua eficácia terapêutica.

CARTA DE ESCLARECIMENTO
SOBRE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO

Depositante: Universidade Federal de Minas Gerais

Inventores: Frédéric Jean Georges Frézard / Guilherme Santos Ramos / Helane Lúcia Oliveira De Moraes / Daniel de Assis Santos / Ricardo Toshio Fujiwara / Marta Marques Gontijo de Aguiar / Virgínia Mendes Russo Vallejos / Victor Augusto Teixeira Leocádio / Danielle Letícia da Silva / Thais Santos Tunes

Título: “PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE LIPOSSOMAS CONJUGADOS A ANFOTERICINA B CONTENDO DICETILFOSFATO, FORMULAÇÃO E USOS”

A depositante esclarece que o objeto do pedido de certificado de adição em referência foi obtido em decorrência de acesso ao Patrimônio Genético das espécies *Leishmania infantum*, *Leishmania amazonenses*, e *Sporothrix brasiliensis*.

O cadastro de acesso ao patrimônio genético foi realizado em 10/10/2020 para as espécies *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonenses* (número A992CED) e o acesso à espécie *Sporothrix brasiliensis* foi cadastrado posteriormente, em complementação (número A1458F6, com data de 25/10/2024).

Por essa razão, a depositante envia, em documentos anexos, os dois comprovantes de cadastro.

Certa da devida compreensão, a depositante encaminha a documentação para depósito do certificado de adição junto ao INPI.



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A992CED

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A992CED**
Usuário: **Universidade Federal de Minas Gerais**
CPF/CNPJ: **17.217.985/0001-04**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Leishmania infantum
Leishmania amazonensis

Título da Atividade: **Formulações de fármacos com lipossomas para o tratamento das leishmanioses cutânea e visceral**

Equipe

Frederic Jean Georges Frezard	Universidade Federal de Minas Gerais
Rubens Lima do Monte Neto	Fundação Oswaldo Cruz
Lucas Antonio Miranda Ferreira	Universidade Federal de Minas Gerais
Ricardo Toshio Fujiwara	Universidade Federal de Minas Gerais
Maria Norma Melo	Universidade Federal de Minas Gerais
Cynthia Peres Demicheli	Universidade Federal de Minas Gerais
Guilherme Santos Ramos	Universidade Federal de Minas Gerais
Ana Carolina Borges de Oliveira	Universidade Federal de Minas Gerais

Virginia Mendes Carregal Vallejos
Cristiano Cheim Peixoto dos Santos

Universidade Federal de Minas Gerais
Universidade Federal de Minas Gerais

Parceiras no Exterior

Université Paris-Saclay

Resultados Obtidos

Outros resultados

Data do Cadastro: **10/10/2020 14:33:55**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **13:19** de **16/11/2024**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A1458F6

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A1458F6**
Usuário: **Universidade Federal de Minas Gerais**
CPF/CNPJ: **17.217.985/0001-04**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Sporothrix brasiliensis

Título da Atividade: **PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE LIPOSSOMAS CONJUGADOS A ANFOTERICINA B, FORMULAÇÃO E USOS**

Equipe

Daniel de Assis Santos	Universidade Federal de Minas Gerais
Frederic Jean Georges Frezard	Universidade Federal de Minas Gerais
Danielle Letícia da Silva	Universidade Federal de Minas Gerais
Victor Augusto Teixeira Leocádio	Universidade Federal de Minas Gerais

Data do Cadastro: **25/10/2024 09:09:25**
Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **18:54** de **14/11/2024**.



**SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - SISGEN**