

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

(11) (21) **PI 0602371-1 A**



(22) Data de Depósito: 17/05/2006
(43) Data de Publicação: **15/01/2008**
(RPI 1932)

(51) Int. Cl.:
C07F 9/90 (2008.01)
A61K 31/29 (2008.01)
A61P 33/02 (2008.01)

(54) Título: COMPOSTOS A BASE DE ANTIMÔNIO EM ESTADO DISSOCIADO PARA TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE E OUTRAS DOENÇAS, SEUS PROCESSOS DE OBTENÇÃO E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICOS

(71) Depositante(s): Universidade Federal de Minas Gerais
(BR/MG)

(72) Inventor(es): Frederic Jean Georges Frezard, Alan Lane de Melo, Patrícia Siveira Martins, Cynthia Peres Demicheli

(57) Resumo: COMPOSTOS A BASE DE ANTIMÔNIO EM ESTADO DISSOCIADO PARA TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE E OUTRAS DOENÇAS, SEUS PROCESSOS DE OBTENÇÃO E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS. A presente patente de invenção se refere a processos de preparação de compostos a base de antimônio em estado dissociado, a composições farmacêuticas contendo esses compostos e ao uso dessas composições farmacêuticas para o tratamento por via oral das leishmanioses e de outras doenças, incluindo câncer, infecções, deficiência imune e hepatites B e C.

“COMPOSTOS A BASE DE ANTIMÔNIO EM ESTADO DISSOCIADO PARA TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE E OUTRAS DOENÇAS, SEUS PROCESSO DE OBTENÇÃO E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS”.

O presente pedido de patente de invenção se refere a compostos a base de antimônio em estado dissociado, a processos de obtenção desses compostos, a composições farmacêuticas contendo esses compostos e ao uso dessas composições farmacêuticas para o tratamento por via oral das leishmanioses e de outras doenças, tais como câncer, infecções, deficiência imune e hepatites B e C, não limitante.

No estado da técnica, além das formulações injetáveis de compostos a base de antimônio utilizadas como medicamentos de primeira escolha das leishmanioses, encontram-se também novas formulações baseadas no uso de lipossomas e de ciclodextrinas [US4186183A; EP72234A; WO9604890-A1; US4594241; BR0304952]. A associação de compostos a base de antimônio a ciclodextrinas foi proposta como meio para tornar os compostos ativos pela via oral [BR0304952].

Há várias décadas que derivados de antimônio são utilizados no tratamento das leishmanioses em seres humanos e em cães [Berman JD. 1988 Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. Rev Infect Dis 10, 560-586].

As leishmanioses são doenças parasitárias, que segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), atingem cerca de 12 milhões de pessoas no mundo. No Brasil, dados recentes relatam a ocorrência de cerca de 30.000 novos casos anuais da doença. As leishmanioses são causadas por

várias espécies de protozoários flagelados pertencentes a ordem Kinetoplastidae e ao gênero *Leishmania*. São zoonoses típicas de zonas rurais nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, embora tenha prevalência em subúrbios de algumas grandes cidades. As leishmanioses são transmitidas aos

5 hospedeiros vertebrados pela picada de um inseto que regurgita o parasito na forma promastigota. Esses parasitos são fagocitados por macrófagos, no interior dos quais estes se transformam em amastigotos. Os amastigotos se multiplicam livremente no compartimento ácido dos fagolisossomos e escapam dos sistemas de defesa do hospedeiro. A *Leishmania* corresponde a um

10 complexo de várias espécies diferentes que causam vários tipos de manifestações clínicas que incluem formas cutânea, mucocutânea e visceral (Tabela 1).

Tabela 1. Manifestações clínicas resultantes da infecção por *Leishmania* e distribuição da doença no mundo.

Espécie	Manifestações Clínicas	Distribuição da Doença
<i>L. donovani</i> <i>infantum</i> <i>donovani</i> <i>chagasi</i>	Visceral	Região Mediterrânea África e Ásia América do Sul e Central
<i>L. tropica</i>	Cutânea	Europa, Ásia, Norte da África
<i>L. major</i>	Cutânea	Ásia e África
<i>L. aethiopica</i>	Cutânea	Etiópia e Kênia
<i>L. mexicana</i> <i>mexicana</i> <i>amazonensis</i> <i>pifanoi</i>	Cutânea	América do Sul e Central
<i>L. braziliensis</i> <i>braziliensis</i>	Muco-cutânea	América do Sul
<i>guyanensis</i> <i>panamensis</i>	Cutânea Cutânea	América do Sul América do Sul e Central
<i>L. peruviana</i>	Cutânea	América do Sul

15

No Brasil, ocorrem as leishmanioses tegumentares que são causadas pelos protozoários dos complexos *Leishmania braziliensis* e *mexicana*, e a

leishmaniose visceral que recebe várias denominações, entre elas calazar, Kala-azar (febre-negra), esplenomegalia tropical, anemia esplenomegálica e calazar americano, que é causado por uma única espécie *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* pertencente ao complexo *Leishmania donovani*. A forma

5 PKDL ("Post Kala azar dermal leishmaniasis") é uma manifestação clínica que se desenvolve em 56% dos pacientes com Kala-azar. O cão aparece como hospedeiro vertebrado nas formas cutânea e visceral e particularmente no caso da leishmaniose visceral, tem papel importante como reservatório e fonte de infecção da doença em área endêmica. A leishmaniose visceral apresenta
10 índice de letalidade de 100% nos casos não tratados clinicamente.

A principal medida de controle de todas as formas de leishmanioses no homem continua sendo a quimioterapia [Berman JD. 1997 Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clin Infect Dis 24, 684-703]. Os fármacos mais utilizados são: os
15 derivados do antimônio que, apesar de ser potencialmente tóxicos, têm sido utilizados por mais de 50 anos no tratamento das leishmanioses humanas; a pentamidina e a anfotericina B, que constituem alternativas terapêuticas, mas que também apresentam toxicidade.

Entre os derivados de antimônio, destacam-se os antimoniais
20 pentavalentes, notadamente o antimoniato de meglumina (Glucantime, Rhodia) e o estibogluconato de sódio (Pentostan, Welcome) que são os medicamentos de primeira escolha no tratamento das leishmanioses: antimoniato de meglumina (figura 1) e estibogluconato de sódio (figura 2).

Devido a sua baixa absorção oral, esses compostos devem ser administrados por via parenteral (injeção intravenosa ou intramuscular), num período de 20-40 dias. Porém, as doses diárias de 20 mg Sb Kg⁻¹ às vezes precisam ser administradas por mais de quatro meses, por serem cada vez
5 mais freqüentes os casos de resistência aos antimoniais. Tal conduta vem sendo preconizada no tratamento do Kala-azar e da forma PKDL em áreas endêmicas, onde a resistência pode ocorrer entre 5 à 70% das pessoas tratadas com antimoniais.

A toxicidade dos antimoniais pentavalentes é um problema importante
10 no seu uso na terapêutica das leishmanioses. Apesar de sua rápida excreção pelos rins, o que evitaria à princípio seu acúmulo no organismo, efeitos colaterais são freqüentes. Esses aparecem principalmente ao final do tratamento e incluem náuseas, vômitos, diarréia, artralgias, mialgias, anorexia, elevação dos níveis de enzimas hepáticas, anomalias eletrocardiográficas,
15 convulsões, pancreatite química e nefrotoxicidade [Marsden PD. 1985 Pentavalent antimonials: old drug for new diseases. Rev Soc Bras Med Trop 18, 187-198; Rodrigues MLO, Costa RS, Souza CS, Foss NT, Roselino AMF. 1999 Nephrotoxicity attributed to meglumine antimoniate (Glucantime) in the treatment of generalized cutaneous leishmaniasis. Rev Inst Med trop S. Paulo
20 41, 33-37]. Reclamações de pacientes com sensação de dor no local e no momento da aplicação desses medicamentos são também comuns. No Brasil, o Ministério da Saúde registrou 14 mortes causadas pelo uso de antimoniais em 2000 e o número aumentou para 17 em 2001 [FAPEMIG, Minas Faz Ciências. Belo Horizonte: FAPEMIG, no. 9, p. 12-13, dez 2001 a fev 2002].

Nesse contexto, a Organização Mundial da Saúde não recomenda o tratamento sistêmico da leishmaniose tegumentar, exceto para pacientes com lesões sobre a face e com lesões causadas por *L. (V.) braziliensis* para reduzir o risco de doença muco-cutânea.

5 Um outro fator limitante na terapêutica das leishmanioses no Brasil é a grande ocorrência desta doença em zonas rurais, o que dificulta a assistência aos pacientes que têm que se deslocar até um centro de saúde (e muitas vezes, permanecer) para receber o tratamento sob controle médico. Nesse contexto, os casos de interrupção de tratamento se tornam freqüentes, o que
10 tende a aumentar os reservatórios e o aparecimento de resistência.

Em face dessas limitações, a OMS recomenda, com incentivo inclusive a outras entidades afins, como a Tropical Diseases Research, a pesquisa de novas drogas e formulações, bem como de vias de administração mais simples e seguras, como as vias oral e tópica, tanto para o tratamento das
15 leishmanioses [Leishmaniasis. In: UNDP/World Bank/WHO Special Programme For Research And Training In Tropical Diseases (TDR). Tropical Disease Research Programme Report, 11; progress 1991-92. Geneva: World Health Organization, 1993. p. 77].

Dentre as abordagens mais promissoras para a terapêutica das
20 leishmanioses, encontradas no estado da técnica, podemos citar aquelas obtidas com formulações a base de lipossomas e de ciclodextrinas, substâncias lipofílicas ativas por via oral e em aplicação tópica, formulações para terapia local e combinações sinérgicas de medicamentos.

O uso de lipossomas como veículos de fármacos tem sido uma tendência na indústria farmacêutica e vem abrindo perspectivas para o desenvolvimento de novas drogas leishmanicidas. Essas vesículas esféricas, constituídas de uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídeos, podem armazenar em seu compartimento aquoso interno princípios ativos hidrossolúveis ou terem princípios ativos lipofílicos ou anfifílicos incorporados em suas membranas. Assim, o medicamento é liberado lentamente, evitando, por consequência, sua rápida eliminação pelo organismo. O resultado é um aumento da biodisponibilidade do medicamento, com potencialização da ação e redução da toxicidade. No caso da leishmaniose visceral, as vesículas, por serem rapidamente capturadas pelos macrófagos, conduzem a droga para os sítios de infecção, o que disponibiliza uma maior quantidade da droga para interagir com o parasito. Nesse contexto, foi desenvolvida uma preparação de anfotericina B encapsulada em lipossomas (AmBisome®) [WO9640060-A1] que foi usada com sucesso no tratamento de pacientes não responsivos às drogas antimoniais, o mesmo ocorrendo no tratamento de pacientes com a forma PKDL, sem relato de efeitos colaterais. A eficácia na faixa de 100% em pacientes imunocompetentes rendeu-lhe a aprovação pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) como a primeira apresentação à base de lipossomas a ser reconhecida para tratamento do Kala-azar [Meyerhoff A. 1999 U.S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin) for treatment of visceral leishmaniasis. Clin Infect Dis 28, 42-48]. No caso dos antimoniais, formas encapsuladas em lipossomas foram também desenvolvidas [US4186183A; EP72234A; WO9604890-A1; US4594241]. Em modelo

experimental de Kala-azar, essas preparações se revelaram pelo menos 200 vezes mais eficaz que o antimonial não encapsulado. Entretanto, a baixa estabilidade dessas formulações e relatos de toxicidade têm limitados o desenvolvimento dessas formulações [Frézard F, Michalick MS, Soares CF, Demicheli C. 2000 Novel methods for the encapsulation of meglumine antimoniate into liposomes. Braz J Med Biol Res 33, 841-846]. Um outro fator limitante para o uso das formulações a base de lipossomas no Brasil é seu custo elevado quando comparado ao tratamento convencional.

O estado da técnica relata também a associação de complexos de antimônio com ciclodextrinas para a obtenção de formulações farmacêuticas, visando o tratamento oral das leishmanioses [BR0304952; Demicheli C, Ochoa R, da Silva JBB, de Melo AL, Falcão CAM, Rossi-Bergmann B, Sinisterra RD, Frézard F. 2004 Oral delivery of meglumine antimoniate-beta-cyclodextrin complex for treatment of leishmaniasis. Antimicrob Agents Chemother 48, 100-103]. Entretanto, o uso de ciclodextrina aumenta o custo da formulação final e pode resultar em efeitos colaterais em altas doses da formulação por causa, por exemplo, do efeito hemolítico das ciclodextrinas [Shiotani K, Uehata K, Irie T, Uekama K. 1995 Differential effects of sulfate and sulfobutyl ether of beta-cyclodextrin on erythrocyte membranes in vitro. Pharm Res 12, 78-84].

Princípios ativos de caráter lipofílico apresentam ainda a possibilidade de serem administrados oralmente e/ou em aplicação tópica. É o caso de derivados de fosfolipídeos contendo enxofre na sua composição [WO9402153-A1], de derivados da fosfoetanolamina [EP534445-A1] e de derivados da fosfocolina [WO90937289-A1; EP507337-A2; DE19835611-A1]. Um dos

derivados da fosfocolina, o hexadecilfosfocolina (ou miltefosina), que foi avaliado inicialmente para o tratamento do câncer, se encontra agora em fase de ensaios clínicos na Índia para o tratamento oral do Kala-azar [Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sendermann H, Fischer C, Junke K, Bryceson A, Berman J. 2002 Oral miltefosine for Indian Visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 347, 1739-1746]. Os resultados preliminares desses estudos mostram uma elevada eficácia desse medicamento por via oral, mas, ao mesmo tempo, efeitos tóxicos indesejáveis foram relatados.

Dentre as formulações tópicas testadas, a preparação contendo paromomicina (ou aminosidina) vem sendo as mais efetivas no tratamento de leishmaniose cutânea [Gamier T, Croft SL. 2002 Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Investig Drugs* 3, 538-544]. Vale ressaltar que formulações tópicas do antimonial pentostam não mostraram ação terapêutica satisfatória [Costa JM, Barrios LA, Netto EM, Marsden PD. 1986 Topical pentostam in an attempt to produce more rapid healing of skin ulcers due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Rev Soc Bras Med Trop* 19, 199-200]. Por outro lado, a eficácia do antimoniato de meglumina intralesional [Alkhawajah AM, Larbi E, al-Gindan Y, Abahusseini A, Jain S. 1997 Treatment of cutaneous leishmaniasis with antimony: intramuscular versus intralesional administration. *Ann Trop Med Parasitol* 91, 899-905] sugere que terapia local é uma via promissora para os antimoniais no tratamento das leishmanioses tegumentares.

Várias combinações de medicamentos leishmanicidas se mostraram sinérgicas. A associação da gentamicina à paromomicina aumentou a eficácia

da paromomicina em aplicação tópica [WO9406439-A1]. A combinação de aminosidina com estibogluconato de sódio, por sua vez, mostrou ser uma medida efetiva no tratamento da forma visceral não responsiva ao tratamento convencional. De forma semelhante, a associação desse antimonial com outra

5 droga em avaliação clínica, o alopurinol, se mostrou eficaz até em casos de resistência à antimoniais [Martinez S, Gonzalez M, Vernaza ME. 1997 Treatment of cutaneous leishmaniasis with allopurinol and stibogluconate: Clin Infect Dis 24, 165-169; Leishmaniasis. In: UNDP/World Bank/WHO Special Programme For Research & Training In Tropical Diseases (TDR). Tropical

10 Disease Research Programme Report, 13; progress 1995-96. Geneva: World Health Organization, 1997. cap. 8, p. 100-111]. A imuno-quimioterapia, que associa substâncias imunomoduladores aos antimoniais pentavalentes, se revelou ser uma forma de reduzir a dose aplicada de antimonial, mantendo eficácia do tratamento [Murray HW, Berman JD, Wright SD. 1988

15 Immunochemotherapy for intracellular Leishmania donovani infection: gamma interferon plus pentavalent antimony. J Infect Dis 157, 973-978; Machado-Pinto J, Pinto J, da Costa CA, Genaro O, Marques MJ, Modabber F, Mayrink W. 2002 Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using killed *Leishmania (Leishmania) amazonensis* vaccine plus antimonial. Int J Dermatol

20 41, 73-78].

Foram também encontrados, no estado da técnica, estudos mostrando que o antimonial estibogluconato de sódio inibe a atividade de proteína tirosina fosfatases (PTPases1) e potencializa a resposta de certos tipos celulares a citocinas [Pathak MK, Yi T. 2001 Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of

protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines¹. J Immunol 167, 3391–3397; Yi T, Pathak MK, Lindner DJ, Ketterer ME, Farver C, Borden EC. 2002 Anticancer activity of sodium stibogluconate in synergy with IFNs. J Immunol 169, 5978–5985]. A partir desses resultados, foi reivindicado o uso de composições farmacêuticas dos compostos a base de antimônio para o tratamento de doenças associadas às enzimas de tipo proteína tirosina fosfatases, deficiência imune, câncer, infecções, hepatite B e C [WO03070158; US2003072738; US2003161893; WO03063788; WO02096412; US2003092670].

Em resumo, o estado da técnica mostra que os compostos a base de antimônio têm importante aplicação no tratamento das leishmanioses e têm potencial para o tratamento de outras doenças tais como câncer, deficiência imune, outras infecções, hepatite B e C. Entretanto, vale ressaltar que a terapia antimonial atual sofre várias limitações, as mais sérias sendo a necessidade de administração parenteral, seus efeitos tóxicos indesejáveis e o aparecimento de resistência. Por outro lado, alternativas terapêuticas estão sendo exploradas no tratamento das leishmanioses. Entretanto, o desenvolvimento desses novos produtos foi limitado até hoje, seja pelo seu elevado custo, sua baixa eficácia ou seus efeitos tóxicos indesejáveis.

O estado da técnica relata que os dois complexos de antimônio pentavalente atualmente em uso clínico, o estibogluconato de sódio e o antimoniato de meglumina, se apresentam sob a forma polimerizada em solução aquosa [Berman JD, Grogl M. 1988 *Leishmania mexicana*: chemistry

and biochemistry of sodium stibogluconate (Pentostam). *Exp Parasitol* 67, 96-103; Roberts WL, McMurray WJ, Rainey PM. 1998 Characterization of the Antimonial Antileishmanial Agent Meglumine Antimonate (Glucantime). *Antimicrob Agents Chemother* 42, 1076-1082; Demicheli C, Ochoa R, Lula IS, Gozzo FC, Eberlin M, Frézard, F. 2003 Pentavalent organoantimonial derivatives: two simple and efficient synthetic methods for meglumine antimonate. *Applied Organomet Chem* 17, 226-231]. Estudos por espectrometria de massa (ESI-MS) do antimoniato de meglumina mostraram que este composto consiste de uma mistura de estruturas poliméricas de formula geral, $(\text{meglumina-Sb})_n\text{-meglumina}$ e $(\text{meglumina-Sb})_n$. Foi também mostrado que soluções aquosas do antimoniato de meglumina, obtidas por diluição em água da formulação injetável comercializada, apresentam uma osmolaridade que aumenta lentamente em função do tempo, indicando a ocorrência de um fenômeno de despolimerização e/ou dissociação dos complexos de antimônio presentes no antimoniato de meglumina [Roberts WL, McMurray WJ, Rainey PM. 1998 Characterization of the Antimonial Antileishmanial Agent Meglumine Antimonate (Glucantime). *Antimicrob Agents Chemother* 42, 1076-1082].

A presente invenção compreende novos processos de preparação de compostos a base de antimônio em estado dissociado, que promovem a transformação de complexos de antimônio de elevado peso molecular a espécies de menor peso molecular. Para se obter uma solução aquosa do antimoniato de meglumina em estado dissociado, propomos a utilização de uma solução aquosa do antimoniato de meglumina de concentração menor do

que aquela da formulação comercial do antimoniato de meglumina (Glucantime®), obtida seja por diluição em água da formulação comercializada ou pela dissolução do antimoniato de meglumina em solução aquosa. O processo, objeto da presente invenção, consiste no aquecimento da solução aquosa do composto a base de antimônio em temperatura superior a temperatura ambiente, de forma a obter um aumento rápido de sua osmolaridade, o que significa um aumento da proporção de espécies de baixo peso molecular, tais como o complexo Sb-ligante de estequiometria 1:1. Para se obter o composto dissociado no estado sólido, a solução aquecida é desidratada por qualquer método de secagem, sendo que, industrialmente, os mais viáveis são liofilização ou pulverização. Antes da desidratação, pode ser acrescentado à solução do antimonial um composto contendo grupos hidroxilas com finalidade de manter por tempo prolongado o estado dissociado do composto antimonial. Os grupos hidroxilas contém glicose e também outros açúcares, poli-açúcares, álcoois alifáticos, ácidos e aminas derivadas de açúcares e de álcoois, não limitante.

Quando comparado ao processo proposto por Roberts e Col. (1998), que envolve a diluição em água de uma solução concentrada do antimonial a temperatura ambiente, o processo ora apresentado permite obter o antimonial em estado dissociado em menor tempo (o valor de osmolaridade estabiliza-se dentro de uma hora a 55°C) e permite alcançar níveis maiores de dissociação. Uma outra vantagem do presente processo é que este permite a obtenção de soluções mais concentradas do antimonial em estado dissociado. Além disso, ao contrário de Roberts e Col. (1998), os processos propostos são utilizados

para se obter o composto antimonial dissociado tanto no estado sólido quanto líquido.

A presente invenção refere-se também às preparações obtidas a partir desses processos, que diferem significativamente das preparações comercializadas, pelo fato de apresentarem o antimoniato de meglumina em estado dissociado, ou seja, com uma proporção aumentada dos complexos de antimônio de menor peso molecular, tais como o complexo antimônio-ligante de estequiometria 1:1, e pelo impacto dessa propriedade físico-química na sua biodisponibilidade por via oral.

Uma outra característica da presente invenção é a obtenção de composições farmacêuticas compreendidas pelo composto antimonial dissociado proposto no presente pedido e por um diluente ou excipiente de uso farmacêutico. Vale ressaltar que o antimoniato de meglumina é comercializado na forma de solução aquosa concentrada (80 g/L de antimônio), na qual o composto encontra-se em estado polimerizado⁸ Roberts WL, McMurray WJ, Rainey PM. 1998 Characterization of the Antimonial Antileishmanial Agent Meglumine Antimonate (Glucantime). Antimicrob Agents Chemother 42, 1076-1082].

Entre os compostos à base de antimônio que podem ser obtidos no estado dissociado, encontram-se o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio. Preferencialmente, esses compostos deverão ser obtidos predominantemente na forma de complexos Sb-ligante 1:1.

Foi demonstrado, de acordo com a presente invenção, que a dissociação do composto antimonial, ou seja, a transformação de complexos de antimônio de

elevado peso molecular a espécies de menor peso molecular, resulta no aumento da absorção oral de antimônio em camundongos. Esse aumento de biodisponibilidade do antimônio caracteriza as preparações e as composições farmacêuticas da presente invenção como medicamentos para serem usados preferencialmente por via oral. Podemos ressaltar que os níveis de antimônio alcançados no soro dos animais após administração oral do antimonial dissociado são comparáveis àqueles obtidos com o composto de associação antimonial/beta-ciclodextrina que se mostrou ativa por via oral em modelo de leishmaniose cutânea [Demicheli C, Ochoa R, da Silva JBB, de Melo AL, Falcão CAM, Rossi-Bergmann B, Sinisterra RD, Frézard F. 2004 Oral delivery of meglumine antimoniate-beta-cyclodextrin complex for treatment of leishmaniasis. Antimicrob Agents Chemother 48, 100-103]. Portanto, é esperado para as composições farmacêuticas da presente invenção uma eficácia por via oral semelhante ao potencial da composição antimoniato de meglumina/beta-ciclodextrina. As vantagens adicionais dos compostos a base de antimônio em estado dissociado seriam: i) o seu menor custo, por causa da ausência de ciclodextrina e/ou do uso de excipientes mais baratos na formulação; ii) o seu processo de obtenção mais simples, porque não envolve necessariamente o uso da liofilização; iii) seus efeitos colaterais reduzidos, porque evita possíveis efeitos colaterais decorrentes da administração de elevadas doses de ciclodextrina.

Vale a pena salientar que não foi encontrada, no estado da técnica, nenhuma invenção que relata preparações e formulações de compostos a base de antimônio dissociados com finalidade terapêutica. A presente invenção, ao

contrário de várias alternativas terapêuticas relatadas no estado da técnica, não propõe o desenvolvimento de um novo fármaco, mas sim a modificação de um princípio ativo (o antimônio) já em uso clínico há várias décadas, o que representa uma vantagem em termos de uso. Outra vantagem com relação à
5 outras alternativas terapêuticas relatadas no estado da técnica, é que os antimoniais têm reconhecida e elevada eficácia no tratamento de todas as formas de leishmanioses. Uma terceira vantagem da presente invenção é que associa o uso dessa família de princípio ativo com a possibilidade do uso da via de administração oral.

10 Vale ressaltar ainda as vantagens esperadas de um tratamento oral, quando comparado ao tratamento convencional com injeções intramusculares: i) ausência de dores locais; ii) não há necessidade de internação. Portanto, espera-se que o tratamento com as formulações da presente invenção seja mais simples, de menor custo e menos tóxico do que o tratamento
15 convencional. Outros efeitos benéficos esperados são a redução do número de casos de desistência do tratamento e a redução do risco de aumento do número de casos de resistência. O relato recente é que os antimoniais pentavalentes apresentam atividade contra o câncer, as hepatites B e C e a AIDS [Yan S, Jin L, Sun H, 2005. Antimony in Medicine. In: Gielen M, Tiekink
20 ER (Ed.), *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine*, Vol. 10, John Wiley & Sons, pp. 441-461] abre perspectivas para o uso das composições farmacêuticas da presente invenção para o tratamento dessas doenças.

A presente invenção pode ser melhor entendida pelos seguintes exemplos que não são limitantes.

Exemplo 1 – Processo de preparação de solução aquosa do antimoniato de meglumina em estado dissociado

- 5 Prepara-se uma solução do antimoniato de meglumina em água na concentração de antimônio de 0,1 mol/L, pela diluição de uma solução aquosa concentrada do antimoniato de meglumina (0,7 mol/L de Sb) sintetizado segundo processo descrito por Demicheli e Col. (2003). Imediatamente após diluição, a amostra é dividida em 3 grupos de 3 amostras. O primeiro grupo é
- 10 deixado em temperatura ambiente (25 ± 4 °C); o segundo grupo é incubado a 37°C; o terceiro grupo é incubado a 55°C. A osmolaridade das diferentes amostras é determinada usando um osmômetro de pressão de vapor (Vapro5520 - Wescor®, Utah, USA). Os resultados obtidos são mostrados na Tabela I abaixo.

- 15 Tabela I. Valores de osmolaridade de soluções do antimoniato de meglumina em água após incubação em diferentes temperaturas*

Tempo (horas)	Temperatura ambiente	37°C	55°C
0	$52,0 \pm 6,9$	$67,0 \pm 8,2$	$57,0 \pm 5,7$
1	$57,0 \pm 6,5$	$84,2 \pm 7,6$	$100,5 \pm 6,8$
3	$60,8 \pm 4,0$	$87,6 \pm 6,2$	$103,4 \pm 8,9$
6	$61,2 \pm 5,0$	$87,8 \pm 8,3$	$101,5 \pm 7,1$
24	$61,2 \pm 4,8$	$92,2 \pm 5,8$	$105,4 \pm 8,2$
48	$62,8 \pm 4,5$	$95,2 \pm 6,8$	$110,4 \pm 6,3$

*Os valores são mostrados como as médias \pm desvio padrão (n = 3).

A osmolaridade inicial das soluções foi igual a 0,069 osmole/L, indicando cerca de 1,45 átomos de Sb por partículas em solução. Aumentos de osmolaridade de 10%, 62% e 85% foram observados em 25°C, 37°C e 55°C, respectivamente. O valor final de osmolaridade alcançado em 55°C foi de 0,110 ± 0,007 osmole/L, o que corresponde a um átomo de Sb por partículas em solução e comprova a dissociação, no antimoniato de meglumina, de complexos de elevado peso molecular para espécies de menor peso molecular, tais como o complexo Sb-meglumina de estequiometria 1:1.

Este exemplo comprova que uma solução aquosa de composto a base de antimônio em estado dissociado pode ser obtida, de forma simples e rápida, através do aquecimento de uma solução aquosa do antimonial. Quanto mais elevada for a temperatura, maior o nível de dissociação do antimonial e mais rápida a estabilização do valor da osmolaridade. A partir desses dados, podemos observar que a incubação de uma solução do antimonial a 55°C por pelo menos uma hora é adequada para a obtenção do antimonial em estado dissociado.

Exemplo 2 – Processo de preparação do antimoniato de meglumina dissociado no estado sólido.

O antimoniato de meglumina dissociado pode ser obtido também no estado sólido através da desidratação da solução aquosa do antimoniato de meglumina em estado dissociado, preparada como descrito no Exemplo 1. Verificamos que a liofilização de uma solução em água do antimoniato de meglumina dissociado, preparada na concentração de antimônio de 0,1 mol/L e

submetida a aquecimento por 48 horas a 55°C (como descrito no Exemplo 1),
leva a obtenção de um pó que, após reconstituição com o volume inicial de
água a temperatura ambiente, mostra uma osmolaridade de 0,1 osmole/L. Este
valor de osmolaridade indica que o antimoniato de meglumina encontra-se
5 ainda no estado dissociado, ou seja, que a liofilização preservou o estado
dissociado do antimoniato de meglumina com a predominância de complexos
Sb-meglumina de menor peso molecular.

Exemplo 3 – Influência do estado dissociado do antimoniato de meglumina na
10 absorção de antimônio por via oral em camundongos

Para avaliar a influência do estado dissociado do antimoniato de meglumina na
absorção oral de antimônio, foram utilizados camundongos fêmeas SWISS
(pesando 30 ± 3 g) que receberam por via oral três preparações diferentes:
uma solução em água do antimoniato de meglumina em estado não-
15 dissociado, preparada em temperatura ambiente a partir do antimoniato de
meglumina sintetizado segundo Demicheli e Col. (2003) (AM); uma solução em
água do antimoniato de meglumina em estado dissociado, preparada a partir
do antimoniato de meglumina liofilizado no estado dissociado como descrito no
Exemplo 2 (AMaq); uma solução em água do composto de associação
20 antimoniato de meglumina/ β -ciclodextrina, preparado como descrito por
Demicheli e Col. (2004) (AM/ β -CD), e utilizado como controle devido a sua
capacidade de promover a absorção oral de antimônio. As três preparações
foram administradas na mesma dose de antimônio de 100 mg Sb/kg de peso
corporal. Três horas após a administração, camundongos foram sacrificados (4

em cada grupo). O sangue foi retirado e o soro foi isolado. A concentração de antimônio no soro foi determinada por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, segundo método descrito por Demicheli et al. (2004). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.

- 5 Tabela 2. Concentrações de antimônio no soro de camundongos ($\mu\text{g/L}$) três horas após administração por via oral em dose única (100 mg Sb/kg peso de animal) do antimoníato de meglumina não-dissociado (AM) ou dissociado (AMaq) e do seu composto de associação com β -ciclodextrina (AM β -CD). Os dados são as médias \pm desvio padrão ($n = 4$).

Preparação	Concentração plasmática de Sb após 3 horas
AM	360 ± 145
AMaq	913 ± 149
AM/ β -CD	1535 ± 360

- 10 Comparativamente ao antimoníato de meglumina convencional (não-dissociado) utilizado na clínica, o antimonial dissociado, objeto da presente invenção, promoveu níveis significativamente maiores de antimônio no soro ($P < 0,05$, segundo one-Way ANOVA com Tukey Post test), indicando que o estado dissociado do antimonial favorece a absorção oral de antimônio. Os
- 15 níveis de antimônio alcançados com a forma dissociada foram levemente inferiores aqueles obtidos com a associação antimoníato de meglumina/ β -ciclodextrina.

- Podemos concluir que a administração de composto a base de antimônio em estado dissociado resultou no aumento da biodisponibilidade de antimônio por
- 20 via oral, mostrando o grande potencial desses compostos para o tratamento das leishmanioses e de outras doenças, por essa via de administração.

Exemplo 4 – Absorção oral de antimônio em camundongos a partir do antimoniato de meglumina dissociado, preparado no estado sólido na presença de glicose.

Foi obtida uma preparação do antimoniato de meglumina em estado dissociado, usando o processo descrito no Exemplo 2 com a seguinte modificação. Antes da liofilização da solução de antimoniato de meglumina dissociado, foi acrescentando glicose na relação molar glicose/Sb 8/1. Foi obtido assim um pó de antimoniato de meglumina dissociado na presença de glicose.

- 10 Para avaliar a absorção oral de antimônio a partir desta preparação, foram utilizados camundongos fêmeas SWISS (pesando 30 ± 3 g) que foram divididas em 3 grupos e receberam por via oral as seguintes preparações: uma solução em água do antimoniato de meglumina não-dissociado, preparada em temperatura ambiente a partir do antimoniato de meglumina sintetizado
- 15 segundo Demicheli e Col. (2003) (AM); uma solução em água do antimoniato de meglumina em estado dissociado na presença de glicose, preparado como descrito acima (AM/glicose); uma solução em água do composto de associação com antimoniato de meglumina/ β -ciclodextrina, preparado como descrito por Demicheli e Col. (2004) (AM/ β -CD), e utilizado como controle devido a sua
- 20 capacidade reconhecida de promover a absorção oral de antimônio. As três preparações foram administradas na mesma dose de antimônio de 100 mg Sb/kg de peso corporal. Três horas após a administração, camundongos foram sacrificados (4 em cada grupo). O sangue foi retirado e o soro foi isolado. A concentração de antimônio no soro foi determinada por espectrometria de

absorção atômica com forno de grafite. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Concentrações de antimônio no soro de camundongos ($\mu\text{g/L}$) três horas após administração por via oral em dose única (100 mg Sb/kg peso de animal) do antimoniato de meglumina não-dissociado (AM), do antimoniato de meglumina dissociado na presença de glicose (AM/glicose) ou do seu composto de associação antimoniato de meglumina/ β -ciclodextrina (AM/ β -CD). Os valores são dados como média \pm desvio padrão ($n = 4$).

Preparação	Concentração plasmática de Sb após 3 horas
AM	360 ± 145
AM/glicose	1107 ± 518
AM/ β -CD	1535 ± 360

Comparativamente ao antimoniato de meglumina convencional (não-dissociado) utilizado na clínica, o antimonial dissociado na presença de glicose, objeto da presente invenção, promoveu níveis significativamente maiores de antimônio no soro dos animais ($P < 0,05$, segundo one-Way ANOVA, com Tukey Post test), indicando que o estado dissociado do antimonial, mesma na presença de glicose, favorece a absorção oral de antimônio. Vale ressaltar que os níveis de antimônio alcançados com a forma dissociado não foram significativamente diferentes que aqueles obtidos com a associação antimoniato de meglumina/ β -ciclodextrina ($P > 0.05$, segundo one-Way ANOVA com Tukey Post test).

Podemos concluir que a administração oral de composto a base de antimônio em estado dissociado na presença de açúcar resultou em concentração sérica de Sb aumentada, em nível equivalente àquele alcançado com o antimonial associado a β -ciclodextrina. Este resultado mostra o grande potencial das

composições farmacêuticas contendo composto a base de antimônio dissociado, para o tratamento oral das leishmanioses e de outras doenças.

REIVINDICAÇÕES

1. **COMPOSTOS A BASE DE ANTIMÔNIO EM ESTADO DISSOCIADO PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE E OUTRAS DOENÇAS, SEUS PROCESSOS DE OBTENÇÃO E COMPOSIÇÕES**

5 **FARMACÊUTICAS, caracterizado** pelo aquecimento de uma solução aquosa do composto a base de antimônio em temperatura superior a temperatura ambiente com a obtenção do aumento de sua osmolaridade e, eventualmente, pela desidratação da solução resultante na ausência ou
10 presença de um composto contendo grupos hidroxilas, não pertencente à classe das ciclodextrinas, com a finalidade de manter por tempo prolongado o estado dissociado do composto antimonial.

2. **COMPOSTOS A BASE DE ANTIMÔNIO EM ESTADO DISSOCIADO PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE E OUTRAS DOENÇAS, SEUS PROCESSOS DE OBTENÇÃO E COMPOSIÇÕES**

15 **FARMACÊUTICAS, caracterizado** pelo preparo de uma solução aquosa do composto a base de antimônio na presença de um composto contendo grupos hidroxilas, não pertencente à classe das ciclodextrinas; pelo aquecimento da solução resultante em temperatura superior a temperatura ambiente com a obtenção do aumento de sua osmolaridade; e pela
20 desidratação da solução final.

3. **COMPOSTOS A BASE DE ANTIMÔNIO EM ESTADO DISSOCIADO PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE E OUTRAS DOENÇAS, SEUS PROCESSOS DE OBTENÇÃO E COMPOSIÇÕES**

FARMACÊUTICAS de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado** pelo uso preferencial da liofilização ou da secagem por pulverização, como método de desidratação.

4. **O COMPOSTOS A BASE DE ANTIMÔNIO EM ESTADO DISSOCIADO**

PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE E OUTRAS DOENÇAS,

SEUS PROCESSOS DE OBTENÇÃO E COMPOSIÇÕES

FARMACÊUTICAS de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado**

pelo uso, como composto contendo grupos hidroxilas, de composto

selecionado do grupo incluindo, açúcares, poli-açúcares, álcoois alifáticos,

ácidos e aminas derivadas de açúcares e de álcoois, não limitante.

5. **COMPOSTOS A BASE DE ANTIMÔNIO EM ESTADO DISSOCIADO**

PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE E OUTRAS DOENÇAS,

SEUS PROCESSOS DE OBTENÇÃO E COMPOSIÇÕES

FARMACÊUTICAS de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado**

pelo uso preferencial do antimoniato de meglumina e do estibogluconato de

sódio, como compostos a base de antimônio.

6. **COMPOSTOS A BASE DE ANTIMÔNIO EM ESTADO DISSOCIADO**

PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE E OUTRAS DOENÇAS,

SEUS PROCESSOS DE OBTENÇÃO E COMPOSIÇÕES

FARMACÊUTICAS, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5,

caracterizado pela redução de efeitos colaterais em seu uso no tratamento

de leishmaniose e outras doenças.

7. **COMPOSTOS A BASE DE ANTIMÔNIO EM ESTADO DISSOCIADO PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE E OUTRAS DOENÇAS, SEUS PROCESSOS DE OBTENÇÃO E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS**, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5,

5 **caracterizado** pelo aumento de biodisponibilidade em seu uso no tratamento de leishmaniose e outras doenças.

8. **COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS DE COMPOSTOS A BASE DE ANTIMÔNIO EM ESTADO DISSOCIADO PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE E OUTRAS DOENÇAS**, caracterizada por ter

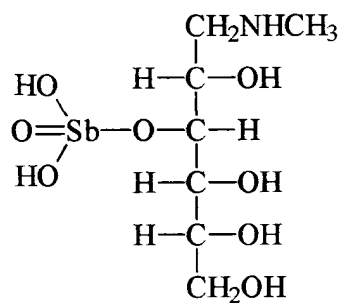
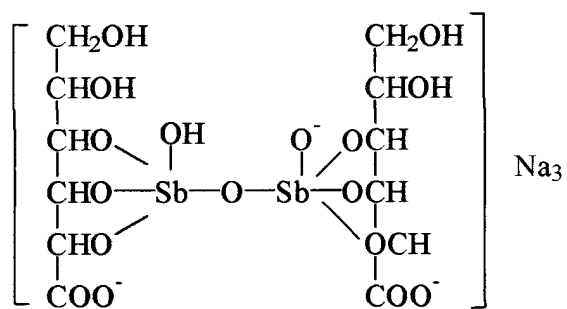
10 biodisponibilidade aumentada e compreender: um composto a base de antimônio em estado dissociado, ou seja, que sofreu previamente uma transformação no seu estado original, que resultou no aumento da proporção dos complexos de antimônio de menor peso molecular com relação aos complexos de maior peso molecular e um diluente, que poderá
15 ser substituído por um excipiente de uso farmacêutico.

9. **COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPOSTOS A BASE DE ANTIMÔNIO EM ESTADO DISSOCIADO PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE E OUTRAS DOENÇAS** com biodisponibilidade aumentada, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada por ser
20 destinada para administrações preferencialmente por via oral.

10. **COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS DE COMPOSTOS A BASE DE ANTIMÔNIO EM ESTADO DISSOCIADO PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE E OUTRAS DOENÇAS** com biodisponibilidade

aumentada, de acordo com as reivindicações 8 e 9, **caracterizada** pelo uso preferencial do antimoniato de meglumina e do estibogluconato de sódio, como compostos a base de antimônio.

- 5 11. **COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS DE COMPOSTOS A BASE DE ANTIMÔNIO EM ESTADO DISSOCIADO PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE E OUTRAS DOENÇAS** com biodisponibilidade aumentada por via oral, de acordo com as reivindicações 8, 9 e 10, **caracterizada** por sua forma sólida ou líquida.

Figura 1**Figura 2**

RESUMO

“COMPOSTOS A BASE DE ANTIMÔNIO EM ESTADO DISSOCIADO PARA TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE E OUTRAS DOENÇAS, SEUS PROCESSOS DE OBTENÇÃO E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS”.

5 A presente patente de invenção se refere a processos de
preparação de compostos a base de antimônio em estado dissociado; a
composições farmacêuticas contendo esses compostos e ao uso dessas
composições farmacêuticas para o tratamento por via oral das leishmanioses e
de outras doenças, incluindo câncer, infecções, deficiência imune e hepatites B
10 e C.



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

(21) PI 1106237-1 A2



(22) Data de Depósito: 23/12/2011
(43) Data da Publicação: 12/11/2013
(RPI 2236)

(51) Int.Cl.:
A61K 47/30
C07F 9/90

(54) Título: MANOCARREADORES FORMADOS POR COMPLEXOS ANFIFÍLICOS DE ANTIMÔNIO(V), PROCESSO DE OBTENÇÃO, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E USO

(73) Titular(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Universidade Federal de Minas Gerais

(72) Inventor(es): Cynthia Peres Demicheli, Flaviana Ribeiro Fernandes, Frederic Jean Georges Frezard, Kelly Cristina Kato, Lucas Miranda Antônio Ferreira, Maria Norma Melo, Weverson Alves Ferreira

(57) Resumo: NANOCARREADORES FORMADOS POR COMPLEXOS ANFIFÍLICOS DE ANTIMÔNIO (V), PROCESSO DE OBTENÇÃO, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E USO. A presente invenção refere-se a manocarregadores formados por complexos anfifílico de antimônio (V), ao processo de obtenção desses complexos e a composições farmacêuticas contendo esses nanocarregadores, para o tratamento das leishmanioses e de outras doenças, tais como câncer, infecções, deficiência imune e hepatites B e C, não limitante.

**NANOCARREADORES FORMADOS POR COMPLEXOS ANFIFÍLICOS DE
ANTIMÔNIO(V), PROCESSO DE OBTENÇÃO, COMPOSIÇÕES
FARMACÊUTICAS E USO**

A presente invenção refere-se a nanocarreadores formados por
5 complexos anfifílicos de antimônio(V), ao processo de obtenção desses
complexos e a composições farmacêuticas contendo esses nanocarreadores, para
o tratamento das leishmanioses e de outras doenças, tais como câncer, infecções,
deficiência imune e hepatites B e C, não limitante.

No estado da técnica, além das formulações injetáveis de compostos a
10 base de antimônio utilizadas como medicamentos de primeira escolha no
tratamento das leishmanioses, encontram-se também novas formulações
baseadas nos nanocarreadores, lipossomas e ciclodextrinas [US4186183A;
EP72234A; WO9604890-A1; US4594241; BR0304952]. A associação de
compostos a base de antimônio a ciclodextrinas foi proposta como meio para
15 tornar os compostos ativos pela via oral [BR0304952]. Outra estratégia para
aumentar a biodisponibilidade do complexo de antimônio(V) por via oral consiste
na preparação deste complexo em estado dissociado [BR200602371].

Há várias décadas que derivados de antimônio são utilizados no
tratamento das leishmanioses em seres humanos e em cães [Berman JD. 1988
20 Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and
future strategies. *Rev Infect Dis* 10, 560-586].

As leishmanioses são doenças parasitárias que, segundo dados da
Organização Mundial de Saúde (OMS), atingem cerca de 12 milhões de pessoas
no mundo. No Brasil, dados recentes relatam a ocorrência de cerca de 30.000
25 novos casos anuais da doença. As leishmanioses são causadas por várias
espécies de protozoários flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastidae e ao
gênero *Leishmania*. São zoonoses típicas de zonas rurais nas regiões tropicais e
subtropicais do mundo, embora tenham prevalência em subúrbios de algumas
grandes cidades. As leishmanioses são transmitidas aos hospedeiros vertebrados
30 pela picada de um inseto que regurgita o parasito na forma promastigota. Esses
parasitos são fagocitados por macrófagos, no interior dos quais estes se
transformam em amastigotas. Os amastigotas se multiplicam livremente no

compartimento ácido dos fagolisossomos e escapam dos sistemas de defesa do hospedeiro. A *Leishmania* corresponde a um complexo de várias espécies diferentes que causam vários tipos de manifestações clínicas que incluem formas cutânea, mucocutânea e visceral (Tabela 1).

5 **Tabela 1-** Manifestações clínicas resultantes da infecção por *Leishmania* e distribuição da doença no mundo.

Espécie	Manifestações Clínicas	Distribuição da Doença
<i>L. donovani</i> <i>Infantum</i> <i>Donovani</i> <i>Chagasi</i>	Visceral	Região Mediterrânea África e Ásia América do Sul e Central
<i>L. tropica</i>	Cutânea	Europa, Ásia, Norte da África
<i>L. major</i>	Cutânea	Ásia e África
<i>L. aethiopica</i>	Cutânea	Etiópia e Kênia
<i>L. mexicana</i> <i>Mexicana</i> <i>Amazonensis</i> <i>Pifanoi</i>	Cutânea	América do Sul e Central
<i>L. braziliensis</i> <i>Braziliensis</i>	Muco-cutânea	América do Sul
<i>Guyanensis</i>	Cutânea	América do Sul
<i>Panamensis</i>	Cutânea	América do Sul e Central
<i>L. peruviana</i>	Cutânea	América do Sul

No Brasil, ocorrem as leishmanioses tegumentares, que são causadas pelos protozoários dos complexos *Leishmania braziliensis* e *mexicana*, e a

leishmaniose visceral, que recebe várias denominações, entre elas calazar, Kala-azar (febre-negra), esplenomegalia tropical, anemia esplenomegálica e calazar americano, que é causado por uma única espécie *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*, pertencente ao complexo *Leishmania donovani*. A forma PKDL ("Post Kala azar dermal leishmaniasis") é uma manifestação clínica que se desenvolve em 56% dos pacientes com Kala-azar. O cão aparece como hospedeiro vertebrado das formas cutânea e visceral e, particularmente no caso da leishmaniose visceral, tem papel importante como reservatório e fonte de infecção da doença em área endêmica. A leishmaniose visceral apresenta índice de letalidade de 100% nos casos não tratados clinicamente.

A principal medida de controle de todas as formas de leishmanioses no homem continua sendo a quimioterapia [Berman JD. 1997 Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis* 24, 684-703]. Os fármacos mais utilizados são: os derivados do antimônio que, apesar de ser potencialmente tóxicos, têm sido utilizados por mais de 50 anos no tratamento das leishmanioses humanas; a pentamidina e a anfotericina B, que constituem alternativas terapêuticas, mas que também apresentam toxicidade.

Entre os derivados de antimônio, destacam-se os antimoniais pentavalentes, notadamente o antimoniato de meglumina (Glucantime®, Aventis) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®, Welcome) que são os medicamentos de primeira escolha no tratamento das leishmanioses no Brasil (Figuras 1 e 2, respectivamente).

Devido a sua baixa absorção oral, esses compostos devem ser administrados por via parenteral (injeção intravenosa ou intramuscular), num período de 20-40 dias. Porém, as doses diárias de 20 mg Sb Kg⁻¹ às vezes precisam ser administradas por mais de quatro meses, por serem cada vez mais freqüentes os casos de resistência aos antimoniais. Tal conduta vem sendo preconizada no tratamento do Kala-azar e da forma PKDL em áreas endêmicas, onde a resistência pode ocorrer entre 5 a 70% das pessoas tratadas com antimoniais.

A toxicidade dos antimoniais pentavalentes é um fator limitante do seu uso na terapêutica das leishmanioses. Apesar de sua rápida excreção pelos rins, o que evitaria a princípio seu acúmulo no organismo, efeitos colaterais são freqüentes. Esses aparecem principalmente ao final do tratamento e incluem náuseas, vômitos, diarreia, atralgias, mialgias, anorexia, elevação dos níveis de enzimas hepáticas, anomalias eletrocardiográficas, convulsões, pancreatite química e nefrotoxicidade [Marsden PD. 1985 Pentavalent antimonials: old drug for new diseases. *Rev Soc Bras Med Trop* 18, 187-198; Rodrigues MLO, Costa RS, Souza CS, Foss NT, Roselino AMF. 1999 Nephrotoxicity attributed to meglumine antimoniate (Glucantime) in the treatment of generalized cutaneous leishmaniasis. *Rev Inst Med trop S. Paulo* 41, 33-37]. Reclamações de pacientes com sensação de dor no local e no momento da aplicação desses medicamentos são também comuns. No Brasil, o Ministério da Saúde registrou 14 mortes causadas pelo uso de antimoniais em 2000 e o número aumentou para 17 em 2001 [FAPEMIG, Minas Faz Ciências. Belo Horizonte: FAPEMIG, no. 9, p. 12-13, dez 2001 a fev 2002]. Nesse contexto, a Organização Mundial de Saúde não recomenda o tratamento sistêmico da leishmaniose tegumentar, exceto para pacientes com lesões sobre a face e com lesões causadas por *L. (V.) braziliensis*, para reduzir o risco de doença muco-cutânea.

Outro fator limitante na terapêutica das leishmanioses no Brasil é a grande ocorrência desta doença em zonas rurais, o que dificulta a assistência aos pacientes, que têm que se deslocar até um centro de saúde (e muitas vezes, permanecer) para receber o tratamento sob controle médico. Nesse contexto, os casos de interrupção de tratamento se tornam freqüentes, o que tende a aumentar os reservatórios e o aparecimento de resistência.

Em face dessas limitações, a OMS recomenda, com incentivo inclusive a outras entidades afins, como a Tropical Diseases Research, a pesquisa de novas drogas e formulações, bem como de vias de administração mais simples e seguras, como as vias oral e tópica, para o tratamento das leishmanioses [Leishmaniasis. In: UNDP/World Bank/WHO Special Programme For Research And Training In Tropical Diseases (TDR). *Tropical Disease Research Programme Report*, 11; progress 1991-92. Geneva: World Health Organization, 1993. p. 77].

Dentre as abordagens mais promissoras para a terapêutica das leishmanioses, encontradas no estado da técnica, podemos citar aquelas obtidas com formulações nanoestruturais à base de lipossomas e de ciclodextrinas [Frézard F & Demicheli C. 2010 New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. *Expert Opin. Drug Deliv.* 7, 1343-1358], substâncias lipofílicas ativas por via oral e em aplicação tópica, formulações para terapia local e combinações sinérgicas de medicamentos.

O uso de lipossomas como veículos de fármacos tem sido uma tendência na indústria farmacêutica e vem abrindo perspectivas para o desenvolvimento de novas drogas leishmanicidas. Essas vesículas esféricas, constituídas de uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídeos, podem armazenar em seu compartimento aquoso interno princípios ativos hidrossolúveis ou terem princípios ativos lipofílicos ou anfifílicos incorporados em suas membranas. Assim, o medicamento é liberado lentamente, evitando, por consequência, sua rápida eliminação pelo organismo. O resultado é um aumento da biodisponibilidade do medicamento, com potencialização da ação e redução da toxicidade. No caso da leishmaniose visceral, as vesículas, por serem rapidamente capturadas pelos macrófagos, conduzem a droga para os sítios de infecção, o que disponibiliza uma maior quantidade da droga para interagir com o parasito. Nesse contexto, foi desenvolvida uma preparação de anfotericina B encapsulada em lipossomas (AmBisome®) [WO9640060-A1] que foi usada com sucesso no tratamento de pacientes não responsivos às drogas antimoniais, o mesmo ocorrendo no tratamento de pacientes com a forma PKDL, sem relato de efeitos colaterais. A eficácia na faixa de 100% em pacientes imunocompetentes rendeu-lhe a aprovação pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) como a primeira apresentação à base de lipossomas a ser reconhecida para tratamento do Kala-azar [Meyerhoff A. 1999 U.S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin) for treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 28, 42-48]. No caso dos antimoniais, formas encapsuladas em lipossomas foram também desenvolvidas [US4186183A; EP72234A; WO9604890-A1; US4594241]. Em modelo experimental de Kala-azar, essas preparações se revelaram pelo menos 200 vezes mais eficazes que o antimonial não encapsulado. Entretanto, a

baixa estabilidade dessas formulações e relatos de toxicidade têm limitado o desenvolvimento dessas formulações [Frézard F & Demicheli C. 2010 New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. *Expert Opin. Drug Deliv.* 7, 1343-1358]. Outro fator limitante para o uso das formulações à base de lipossomas no Brasil é seu custo elevado, quando comparado ao tratamento convencional.

O estado da técnica relata também a associação de complexos de antimônio com ciclodextrinas para a obtenção de formulações farmacêuticas, visando o tratamento oral das leishmanioses [BR0304952; Demicheli C, Ochoa R, da Silva JBB, de Melo AL, Falcão CAM, Rossi-Bergmann B, Sinisterra RD, Frézard F. 2004 Oral delivery of meglumine antimoniate-beta-cyclodextrin complex for treatment of leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 100-103]. Foi explorada, nessas formulações, a formação de um complexo ternário ciclodextrina-Sb(V)-meglumina e a propriedade de dissociação lenta deste complexo [Frézard F & Demicheli C. 2010 New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. *Expert Opin. Drug Deliv.* 7, 1343-1358]. Entretanto, a formulação não mostrou atividade significativa em modelo murino de leishmaniose visceral e a baixa solubilidade da beta-ciclodextrina foi considerada uma limitação importante desta formulação para sua aplicação em animais de grande porte. Além disto, essa formulação poderia resultar em efeitos colaterais em altas doses da formulação por causa, por exemplo, do efeito hemolítico das ciclodextrinas [Shiotani K, Uehata K, Irie T, Uekama K. 1995 Differential effects of sulfate and sulfobutyl ether of beta-cyclodextrin on erythrocyte membranes in vitro. *Pharm Res* 12, 78-84].

Outro processo investigado para aumentar a biodisponibilidade do antimônio(V) por via oral consiste no aquecimento de soluções concentradas de antimonial pentavalente, seguido de liofilização, o que promove a despolimerização dos oligômeros encontrados nessas soluções [BR200602371]. Entretanto, este processo leva a um aumento modesto da biodisponibilidade de antimônio(V) por via oral [Ribeiro RR, Ferreira WA, Martins PS, Neto RL, Rocha OGF, Le Moyec L, Demicheli C, Frézard F. 2010 *Biopharm. Drug Dispos.* 31, 109-119].

Princípios ativos de caráter lipofílico e/ou anfifílicos apresentam ainda a possibilidade de serem administrados oralmente e/ou em aplicação tópica. É o caso de derivados de fosfolipídeos contendo enxofre na sua composição [WO9402153-A1], de derivados da fosfoetanolamina [EP534445-A1] e de derivados da fosfocolina [WO90937289-A1; EP507337-A2; DE19835611-A1]. Um dos derivados da fosfocolina, o hexadecilfosfocolina (ou miltefosina), que foi avaliado inicialmente para o tratamento do câncer, teve sucesso em ensaios clínicos na Índia para o tratamento oral do Kala-azar [Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sendermann H, Fischer C, Junke K, Bryceson A, Berman J. 2002 Oral miltefosine for Indian Visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 347, 1739-1746]. Os resultados desses estudos mostram uma elevada eficácia desse medicamento por via oral, mas, ao mesmo tempo, efeitos tóxicos indesejáveis foram relatados.

Dentre as formulações tópicas testadas, a preparação contendo paromomicina (ou aminosidina) vem sendo a mais efetiva no tratamento de leishmaniose cutânea [Gamier T, Croft SL. 2002. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Investig Drugs* 3, 538-544]. Vale ressaltar que formulações tópicas do antimonial pentostam não mostraram ação terapêutica satisfatória [Costa JM, Barrios LA, Netto EM, Marsden PD. 1986 Topical pentostam in an attempt to produce more rapid healing of skin ulcers due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Rev Soc Bras Med Trop* 19, 199-200]. Por outro lado, a eficácia do antimoniato de meglumina intralesional [Alkhawajah AM, Larbi E, al-Gindan Y, Abahussein A, Jain S. 1997 Treatment of cutaneous leishmaniasis with antimony: intramuscular versus intralesional administration. *Ann Trop Med Parasitol* 91, 899-905] sugere que a terapia local é uma via promissora para os antimoniais no tratamento das leishmanioses tegumentares.

Várias combinações de medicamentos leishmanicidas se mostraram sinérgicas. A associação da gentamicina à paromomicina aumentou a eficácia da paromomicina em aplicação tópica [WO9406439-A1]. A combinação de aminosidina com estibogluconato de sódio, por sua vez, mostrou ser uma medida efetiva no tratamento da forma visceral não responsiva ao tratamento convencional. De forma semelhante, a associação desse antimonial com outra droga em avaliação clínica, o alopurinol, se mostrou eficaz até em casos de

resistência a antimoniais [Martinez S, Gonzalez M, Vernaza ME. 1997 Treatment of cutaneous leishmaniasis with allopurinol and stibogluconate: *Clin Infect Dis* 24, 165-169; Leishmaniasis. In: UNDP/World Bank/WHO Special Programme For Research & Training In Tropical Diseases (TDR). *Tropical Disease Research Programme Report*, 13; progress 1995-96. Geneva: World Health Organization, 1997. cap. 8, p. 100-111]. A associação antimonial pentavalente – alopurinol é um dos protocolos mais utilizado na Espanha no tratamento da leishmaniose visceral canina. A imuno-quimioterapia, que associa substâncias imunomoduladores aos antimoniais pentavalentes, revelou ser uma forma de reduzir a dose aplicada de antimonial, mantendo a eficácia do tratamento [Murray HW, Berman JD, Wright SD. 1988 Immunochemotherapy for intracellular *Leishmania donovani* infection: gamma interferon plus pentavalent antimony. *J Infect Dis* 157, 973-978; Machado-Pinto J, Pinto J, da Costa CA, Genaro O, Marques MJ, Modabber F, Mayrink W. 2002 Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using killed *Leishmania (Leishmania) amazonensis* vaccine plus antimonial. *Int J Dermatol* 41, 73-78].

Foram também encontrados, no estado da técnica, estudos mostrando que o antimonial estibogluconato de sódio inibe a atividade de proteína tirosina fosfatases (PTPases1) e potencializa a resposta de certos tipos celulares a citocinas [Pathak MK, Yi T. 2001 Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines1. *J Immunol* 167, 3391–3397; Yi T, Pathak MK, Lindner DJ, Ketterer ME, Farver C, Borden EC. 2002 Anticancer activity of sodium stibogluconate in synergy with IFNs. *J Immunol* 169, 5978–5985]. A partir desses resultados, foi reivindicado o uso de composições farmacêuticas dos compostos a base de antimônio para o tratamento de doenças associadas às enzimas de tipo proteína tirosina fosfatases, deficiência imune, câncer, infecções, hepatite B e C [WO03070158; US2003072738; US2003161893; WO03063788; WO02096412; US2003092670].

Em resumo, o estado da técnica mostra que os compostos à base de antimônio têm importante aplicação no tratamento das leishmanioses e têm potencial para o tratamento de outras doenças, tais como câncer, deficiência imune, outras infecções, hepatite B e C. Entretanto, vale ressaltar que a terapia

antimonial atual sofre várias limitações, as mais sérias sendo a necessidade de administração parenteral, seus efeitos tóxicos indesejáveis e o aparecimento de resistência. Por outro lado, novas formulações e alternativas terapêuticas estão sendo investigadas para melhorar a terapêutica atual das leishmanioses.

5 Entretanto, o desenvolvimento desses novos produtos foi limitado, até hoje, seja pelo seu elevado custo, sua baixa eficácia ou seus efeitos tóxicos indesejáveis.

Os nanossistemas micelares são apontados como sistemas carreadores muito promissores para fármacos anfifílicos e lipofílicos. Entretanto, a eficiência deste tipo de nanossistema depende da sua estabilidade termodinâmica e cinética

10 após diluição nos fluidos biológicos [Torchilin VP. 2007 *Pharm. Res.* 24,1-16]. Vale ressaltar que as micelas formadas por tensoativos comuns ou detergentes são sistemas simples e de baixo custo, mas não apresentam estabilidade cinética e, por isto, liberam rapidamente o fármaco incorporado após diluição nos fluidos biológicos. Por outro lado, micelas poliméricas ou micelas formadas por

15 tensoativos com cabeça polar polimérica, por apresentarem estabilidade cinética, não sofrem essa limitação. Essas últimas estão sendo estudadas intensivamente para o tratamento de câncer, mas não há relato de uso para o tratamento das leishmanioses.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

20 **Figura 1** – Fórmula estrutural do antimoniato de meglumina.

Figura 2 – Fórmula estrutural do estibogluconato de sódio.

Figura 3 - Espectros de dicroísmo circular do ligante L8 e das misturas físicas Sb + L8 1:1 e 1:3, registrados na região de 190 a 250 nm (caminho óptico da cubeta = 0,2mm – [L8] = 7,5 mM).

25 **Figura 4** - Espectros de dicroísmo circular do ligante L8, da mistura física 1: 3 Sb + L8 e do complexo Sb-L8, registrados na região de 190 a 250 nm (caminho óptico da cubeta = 0,2mm – [L8] = 7,5 mM).

Figura 5 - Espectro ESI-MS do complexo Sb-L8, registrado no modo negativo, em solução aquosa.

30 **Figura 6** - Morfologia dos nanoagregados formados pelo complexo Sb-L8, analisada por microscopia eletrônica de transmissão, após deposição em

película de formvar e fixação com acetato de uranila 5% (A), e por microscopia de força atômica, após deposição em lamina de mica (B).

Figura 7 - Cinéticas de evolução do sinal de dicroísmo circular do complexo Sb-L8 a 25°C e 37°C, após diluição de solução do complexo em água, de 600 mM para 7,5 mM de L8.

Figura 8 - Coeficientes de partição n-octanol/água do Sb, a partir dos complexos anfifílicos de Sb(V). Os dados representam as médias \pm desvio padrão (n=2).

Figura 9 - Fotografias das formulações de L8 e Sb-L8 incorporando a AmB a 0,2%.

Figura 10 - Espectros de absorção UV/VIS da AmB em água e das formulações de AmB incorporadas no L8 e no Sb-L8 em água na concentração de 0,005 g/L.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA TECNOLOGIA

A presente invenção compreende novos nanossistemas carreadores de antimônio(V), caracterizados por compreenderem nanoagregados formados por complexos de antimônio(V) com um tensoativo ou por complexos de antimônio(V) mistos com dois ou três tensoativos diferentes.

A relação antimônio(V)/tensoativo(s) na formação do complexo antimônio(V)-tensoativo pode variar, mas os complexos que mostram os melhores resultados são aqueles obtidos na relação molar antimônio(V)-tensoativo(s) 1:3. Vale ressaltar que não foi encontrado no estado da técnica relato de nanoagregados formados por complexos de antimônio(V) com tensoativo(s).

Este sistema pode ser preparado com qualquer tensoativo dispersível em água e que apresenta uma parte hidrofílica com pelo menos dois grupos hidroxilas, capazes de complexar o antimônio(V). Resultados satisfatórios podem ser obtidos com alquil-N-metil-glucamida ou tensoativo de cabeça polar derivada do glicerol como os alquil-poliglicerol-éteres, exemplos não limitantes.

De forma surpreendente, a complexação com antimônio(V) confere estabilidade cinética aos nanoagregados do(s) tensoativo(s), ou seja, os nanossistemas mantêm sua organização por tempo prolongado após diluição em solução aquosa. As conseqüências da formação desses complexos e

nanoagregados são coeficiente de partição octanol/água do antimônio(V) aumentado e uma maior facilidade para atravessar membranas biológicas, tais como a membrana plasmática dos macrófagos nos quais se localiza o parasito *Leishmania*.

5 Neste sentido, estes sistemas se diferenciam consideravelmente dos nanossistemas contendo antimônio(V), descritos no estado da técnica (lipossomas e complexos antimonial-ciclodextrina), pelo seu caráter anfifílico, permitindo sua dispersão, tanto em meios aquosos quanto em meios apolares, e sua permeação através das membranas biológicas.

10 Uma característica adicional da presente invenção é a obtenção de composições farmacêuticas que compreendem: o nanocarreador, como descrito acima, e diluentes ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis. Exemplos não limitantes desses diluentes ou excipientes são: água, solução salina, solução tampão, solução de dextrose, soluções de açúcares, solução de polietileno glicol, 15 um óleo, etiloleato, triglicerídeo, carboximetilcelulose, sorbitol, dextrana, timerosal, m-or o-cresol, formalina, álcool benzílico e albumina.

 Uma propriedade importante destas composições farmacêuticas é sua capacidade de direcionar o antimônio(V) para o fígado quando administradas por via oral. Essa propriedade é de grande interesse para o tratamento de doenças 20 que afetem o fígado, como leishmaniose visceral, hepatites e câncer de fígado. Neste aspecto, mostramos que os nanossistemas formados por complexos de antimônio(V) com octanoil-N-metilglucamida (cadeia hidrofóbica de 8 carbonos) ou com decanoil-N-metilglucamida (cadeia hidrofóbica de 10 carbonos) foram capazes de reduzir significativamente a carga parasitária hepática em modelo de 25 leishmaniose visceral murino quando administrados por via oral. Vale ressaltar que tal eficácia não foi encontrada com o Glucantime administrado segundo o mesmo protocolo (mesmas dose e via), nem com o antimoniato de meglumina despolimerizado ou associado com ciclodextrina. Vale ressaltar ainda a solubilidade extremamente elevada em água dos nanossistemas objetos desta 30 invenção, permitindo alcançar concentrações de antimônio(V) de 0,7 mol/L. Esta característica é essencial para viabilizar a administração da formulação em animais de grande porte. Portanto, o sistema objeto da presente invenção

diferencia-se consideravelmente dos sistemas carreadores de antimônio propostos previamente no estado da técnica, tanto do ponto de vista da sua estrutura e propriedades inovadoras, quanto do ponto de vista da sua eficácia por via oral.

A estabilidade cinética dos nanossistemas objetos da presente invenção bem como a formação de microambiente hidrofóbico são características favoráveis para a incorporação de fármacos lipofílicos ou anfifílicos e o uso deste nanossistemas como carreadores deste tipo de fármaco por via oral. A viabilidade da incorporação deste tipo de fármaco foi estabelecida usando o difenilhexatrieno como modelo de fármaco lipofílico e o fármaco anfifílico anfotericina B. Portanto, a presente invenção compreende também novos sistemas carreadores para fármacos anfifílico ou lipofílico, estabilizados cineticamente pela complexação do antimônio(V) com o tensoativo. Exemplos desses fármacos, não limitantes, são a anfotericina B, a miltefosina, o alopurinol e a sinvastatina. No caso específico da leishmaniose, espera-se também um efeito sinérgico da ação combinada do antimônio(V) com qualquer um desses fármacos.

Outra característica da presente invenção refere-se a um processo para obtenção dos nanossistemas carreadores descritos acima. Este processo caracteriza-se pela mistura em solução aquosa de sal do antimônio(V) com um tensoativo ou com dois ou três tensoativos diferentes; do aquecimento da solução aquosa, acima da temperatura ambiente, até secagem da solução; da reidratação do produto seco; opcionalmente, da adição de fármaco lipofílico ou anfifílico e incubação até incorporação; e, opcionalmente, da desidratação da suspensão resultante, por exemplo, por liofilização ou por secagem por pulverização. Foi mostrado que a primeira etapa de secagem aumenta a taxa de complexação do antimônio(V). Exemplos de sal do antimônio(V), não limitantes, são o hexahidroxoantimoniato de potássio e o hexahidroxoantimoniato de sódio.

Vale a pena salientar que não foi encontrada, no estado da técnica, nenhuma invenção que relata nanossistemas estabilizados por antimônio(V) com as características apresentadas e com finalidade terapêutica.

Vale ressaltar ainda as vantagens esperadas de um tratamento oral, quando comparado ao tratamento convencional com injeções intramusculares: i) ausência de dores locais; ii) não há necessidade de internação. Portanto, espera-

se que o tratamento com as formulações da presente invenção seja mais simples, de menor custo e menos tóxico do que o tratamento convencional. Outros efeitos benéficos esperados são a redução do número de casos de desistência do tratamento e a redução do risco de aumento do número de casos de resistência. O

5 relato recente de que os antimoniais pentavalentes apresentam atividade contra o câncer, as hepatites B e C e a AIDS [Yan S, Jin L, Sun H, 2005. Antimony in Medicine. In: Gielen M, Tiekink ER (Ed.), *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine*, Vol. 10, *John Wiley & Sons*, pp. 441-461] abre perspectivas para o uso das composições farmacêuticas

10 da presente invenção para o tratamento dessas doenças.

A presente invenção pode ser melhor entendida pelos seguintes exemplos, que não são limitantes da tecnologia.

Exemplo 1. Demonstração da formação de complexos entre Sb(V) e alquil-N-metil-glucamida

15 A formação de um complexo entre o Sb(V) e os tensoativos do grupo alquil-N-metil-glucamida de cadeia de 8 e 10 carbonos (L8 e L10, respectivamente) foi evidenciada por dicróismo circular, pelo deslocamento da banda negativa do ligante L8 (199 para 205 nm) e o aumento de intensidade dessa banda (-2,54 para -3,70), quando o ligante e o sal $\text{KSb}(\text{OH})_6$ foram

20 misturados em água na relação molar de 3:1 (Figura 3).

Por outro lado, quando o ligante L8 e o sal $\text{KSb}(\text{OH})_6$ foram misturados na relação molar 1:1, uma banda positiva apareceu no espectro de dicróismo circular, evidenciando a formação de estrutura diferente daquela formada na relação molar de 3:1.

25 **Exemplo 2. Processo de preparo de nanoagregados formados de complexos Sb(V)-alquil-N-metil-glucamida**

Descrevemos abaixo, a título de ilustração, um processo eficiente para o preparo de nanoagregados formados de complexos de antimônio(V) com alquil-N-metil-glucamida. O processo conta com as seguintes etapas sucessivas:

30 1- Preparo de uma solução aquosa contendo o $\text{KSb}(\text{OH})_6$ e o tensoativo na relação molar Sb/tensoativo 1:3;

2- Aquecimento da solução a 60°C com agitação, sob vácuo ou não, de forma a promover a evaporação do solvente, o que leva à formação de um filme na parede do recipiente;

3- Re-solubilização do filme em água em temperatura ambiente na
5 concentração desejada.

Vale ressaltar que a solução resultante obtida a partir do octanoil-N-metil-glucamida (L8) mostrou um espectro de dicroísmo circular com banda mais intensa que aquela da mistura do $\text{KSb}(\text{OH})_6$ com L8 em água na relação 1:3 após aquecimento por 1 hora a 60°C (-5,14 vs. -3,70), indicando uma maior taxa de
10 formação dos complexos Sb-L8 pelo processo descrito (Figura 4).

A formação de complexos Sb(V)-L8 1:3 (m/z 1078,87), 1:2 (m/z 775,7) e 2:5 (m/z 919,13) na solução resultante foi demonstrada por ESI-MS no modo negativo, sendo que espécie Sb(V)-ligante 1:3 foi aquela que gerou o pico de maior intensidade (Figura 5).

15 O conjunto desses dados indica uma maior eficiência de formação dos complexos Sb(V)-alquil-N-metil-glucamida usando o processo reivindicado.

Exemplo 3. Evidência para a formação de nanoagregados estabilizados cineticamente, com capacidade para incorporar moléculas lipofílicas

A formação de nanoagregados na solução aquosa do complexo Sb-L8,
20 preparada de acordo com o processo descrito no Exemplo 2, foi demonstrada por microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de força atômica (Figura 6 A e B).

Nanoestruturas esféricas de diâmetro médio de 20nm foram evidenciadas, capazes de se agregar, formando estruturas maiores, de diâmetro
25 médio de 200nm. A existência de ambiente hidrofóbico foi evidenciada usando a sonda lipofílica difenilhexatrieno, que se dissolveu em solução de Sb-L8, mas não em solução de L8, na concentração de 7,5 mM.

A dissociação lenta dos nanoagregados formados pelos complexos Sb-L8 foi evidenciada por dicroísmo circular. Após diluição de solução concentrada dos complexos Sb-L8 da concentração de 0,6 mol/L para 7,5 mmol/L de L8, o sinal
30 de dicroísmo circular característico do complexo não sofreu mudança em função

do tempo a 25°C, mas diminui lentamente a 37°C indicando uma dissociação lenta (Figura 7).

Exemplo 4. Partição água-octanol dos complexos formados entre Sb(V) e os alquil-N-metil-glucamida

Foram determinados os coeficientes de partição água-octanol dos complexos formados entre antimônio(V) e os alquil-N-metil-glucamida (preparados de acordo com processo descrito no Exemplo 2), os quais foram comparados com aqueles do antimoniato de meglumina e do $\text{KSb}(\text{OH})_6$ (Figura 8).

É interessante observar que os complexos de antimônio com os alquil-N-metil-glucamidas mostraram uma partição aumentada na fase octanol, quando comparada àquela do antimoniato de meglumina ou do $\text{KSb}(\text{OH})_6$. A partição na fase octanol mostrou-se aumentada com o aumento do tamanho da cadeia hidrofóbica. Esses resultados sugerem que os novos complexos terão permeação aumentada através das membranas biológicas.

Exemplo 5. Elevada incorporação de antimônio em macrófagos peritoneais a partir dos nanoagregados formados pelo complexo Sb-L8

Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos *Swiss* foram incubados a 37°C com diferentes compostos antimoniais, incluindo os nanoagregados de Sb-L8 (preparados como descrito no Exemplo 2), na concentração de 0,8 mmol/L de Sb por 4 horas e a quantidade de Sb incorporada foi determinada por absorção atômica com forno de grafite. Os resultados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Incorporação de Sb em macrófagos peritoneais a partir de diferentes compostos antimoniais (os dados são mostrados como a média \pm desvio padrão, $n = 8$).

Composto	Sb-L8	$\text{KSb}(\text{OH})_6$	Glucantime
Concentração intracelular de Sb (nmole de Sb/ 10^6 células)	$2,93 \pm 0,66$	$0,85 \pm 0,60$	$0,34 \pm 0,28$

Os resultados mostram uma captura intracelular aumentada a partir do complexo Sb-L8, quando comparado ao antimônio não complexado ($\text{KSb}(\text{OH})_6$) ou ao antimonial comercial (Glucantime).

Essa diferença pode ser explicada pelo caráter único anfífilo do Sb-L8, que pode estar facilitando a passagem do complexo através da membrana plasmática da célula.

Como a *Leishmania* é um parasito obrigatório dos macrófagos, podemos antecipar um acesso facilitado a partir do complexo objeto da presente invenção.

Exemplo 6. Direcionamento do Sb para o fígado de camundongos a partir dos nanoagregados formados pelo complexo Sb-L8 administrado por via oral

Camundongos Swiss receberam, por via oral, diferentes compostos antimoniais, incluindo os nanoagregados de Sb-L8 (preparados como descrito no Exemplo 2), na dose de 100 mg Sb/kg peso corporal. Uma hora depois da administração, os animais foram sacrificados (8 por grupo), o fígado foi coletado, pesado, submetido a digestão com ácido nítrico e a concentração de antimônio foi determinada por absorção atômica com forno de grafite.

As misturas físicas consistem do $\text{KSb}(\text{OH})_6$ e do L8 (octanoil-N-metilglucamida) em água na relação molar 1:3 ou 1:1, pré-aquecidas por 1 hora, a 60°C, antes da administração a 25°C.

A Tabela 3 apresenta os valores das concentrações de Sb encontradas no fígado para os diferentes compostos.

Tabela 3 - Concentração de Sb encontrada no fígado de camundongos Swiss, 1 hora após administração por via oral de diferentes compostos antimoniais na dose de 100 mg Sb/kg (os dados são mostrados como a média \pm desvio padrão, n = 8).

Composto	Glucantime	Sb-L8	$\text{KSb}(\text{OH})_6$	Mistura física Sb+L8 1:1	Mistura física Sb+L8 1:3
[Sb] $\mu\text{g/g}$	$1,4 \pm 0,9$	$22,1 \pm 18,3$	$1,7 \pm 1,2$	$7,2 \pm 6,1$	$7,4 \pm 8,4$

O valor mais elevado foi obtido com o Sb-L8, que foi significativamente mais elevado de que os valores obtidos com Glucantime e o $\text{KSb}(\text{OH})_6$.

Os valores obtidos com as misturas físicas foram mais baixos do que aquele após Sb-L8, o que mostra a importância do processo apresentado no

Exemplo 2 para obter nanoagregados com maior eficiência de direcionamento de Sb para o fígado.

Exemplo 7. Atividade anti-leishmania em modelo murino de leishmaniose visceral

5 Camundongos BALB/c fêmeas foram infectados com 10^6 promastigotas de *L.(L.) infantum chagasi* (cepa BH46) por via intravenosa e o tratamento começou 8 dias após a infecção, com doses diárias durante 20 dias. Os grupos contendo 5-10 camundongos BALB/c receberam por gavagem as seguintes formulações: grupo 1- nanoagregados formados pelos complexos Sb-L8 ou Sb-
10 L10 em dose de 200 mgSb/kg/dia; grupo 2- salina (controle negativo); e o grupo 3- antimonial comercial - Glucantime® (200 mgSb/kg/dia). Foi incluído também um grupo controle positivo (grupo 4), que recebeu o antimonial comercial - Glucantime® - por via intraperitoneal (80 mgSb/kg/dia). Após a quimioterapia (21^o dia contado após o início do tratamento), os animais foram sacrificados para a
15 coleta de baço e fígado. Os órgãos foram pesados em balança analítica e processados para utilização nos protocolos de quantificação de parasitas pela técnica de diluição limitante.

A tabela 4 mostra a carga parasitária hepática média determinada nos diferentes grupos experimentais, incluindo aquele tratado com o novo complexo
20 Sb-L8.

Tabela 4 - Carga parasitária no fígado de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum*, após tratamento com diferentes complexos de antimônio, por via oral, na dose de 200 mgSb/kg/dia, durante 20 dias (um grupo recebeu o antimonial comercial - Glucantime® - por via intraperitoneal na dose de
25 80 mgSb/kg/dia). Os dados são mostrados como média \pm desvio padrão.

Complexo de Sb	Salina	Glucantime oral	Sb-L8 oral	Glucantime i.p.
Carga parasitária Log (no. parasito +1) / mg tecido	0,033 \pm 0,006	0,026 \pm 0,005	0,017 \pm 0,006	0,016 \pm 0,006

A tabela 5 mostra também a carga parasitária hepática média determinada em diferentes grupos experimentais, incluindo aquele tratado com o novo complexo Sb-L10.

Tabela 5 - Carga parasitária no fígado de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum*, após tratamento durante 20 dias com Sb-L10, por via oral, na dose de 200 mgSb/kg/dia, e Glucantime®, por via intraperitoneal, na dose de 80 mgSb/kg/dia. Os dados são mostrados como média \pm desvio padrão.

Complexo de Sb	Salina	Glucantime ip	Sb-L10 oral
Carga parasitária Log (no. parasito +1) / mg tecido	0,020 \pm 0,025	0,0051 \pm 0,0015	0,0041 \pm 0,0014

O conjunto desses resultados estabelece a eficácia terapêutica por via oral dos nanoagregados formados pelos complexos Sb-L8 e do Sb-L10, quando administrados em doses repetidas de 200 mg Sb/kg/dia. Em ambos os casos, o tratamento promoveu uma redução significativa da carga parasitária no fígado, quando comparado ao grupo não tratado. O nível de supressão do parasito no fígado foi equivalente àquele observado como o Glucantime administrado por via intraperitoneal na dose de 80 mg Sb/kg/dia. Como esperado, o Glucantime não se mostrou efetivo por via oral na dose de 200 mg Sb/kg.

Exemplo 8. Incorporação de anfotericina B nos nanoagregados formados pelo complexo anfifílico Sb-L8

Diferentes concentrações de anfotericina B (AmB) (0,1; 0,2 e 0,5% m/v) foram incorporadas nos nanoagregados formados pelo complexo Sb-L8 (preparado como descrito no Exemplo 2) e nas micelas formadas pelo L8 na concentração de 0,6 mol/L de L8, sob agitação constante em temperatura ambiente. Após um minuto, o pH do sistema micelar foi aumentado por meio de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH 1N), até a dissolução completa da AmB, que ocorreu em torno de pH 10. Posteriormente, o pH foi reduzido para 7 com uma solução de ácido clorídrico (HCl 1N). O teor total de AmB no complexo anfifílico de Sb foi determinado usando um método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A fase móvel consistiu na mistura de solução de edetato

dissódico 20 mM e acetonitrila na proporção de 65:35. A fase estacionária consistiu numa coluna de fase reversa C8; 250 x 4,6 mm; 5 μ m. O fluxo foi de 1,2 mL/min, o volume de injeção foi de 20 μ L e o comprimento de onda de detecção 405 nm. Utilizou-se módulo de bomba isocrática Waters 515; injetor automático
5 Waters 717 Plus e detector UV-Vis Waters TM 486. A concentração de AmB foi obtida pela comparação da ASC dos picos de absorção de AmB obtidos das soluções preparadas a partir das formulações contendo complexo anfifílico Sb com a ASC dos picos de absorção de AmB obtido a partir das soluções-padrão do fármaco na mesma concentração teórica.

10 O ensaio de incorporação da AmB foi realizado por sua solubilização em diferentes concentrações nas soluções de L8 (0,6 mol/L) e do complexo Sb-L8 (0,2 mol/L de Sb). De acordo com a observação visual das amostras, e levando em consideração a opacidade do meio, as concentrações de 0,1% e 0,2% (p/v) de AmB apresentaram melhor solubilização nas soluções de L8 e Sb-L8. Fotografias
15 foram registradas das preparações com AmB 0,2%, é possível observar que mesmo após a adição da solução de ácido clorídrico para neutralizar o meio, as soluções se mantiveram translúcidas ou transparentes (Figura 9).

A taxa de incorporação da AmB na solução de L8, determinada pela técnica de CLAE, foi de $93 \pm 1\%$ e no complexo Sb-L8 foi de 97%.

20 Quando as formulações foram diluídas em água na concentração de AmB de 0,005 g/L, o espectro de absorção UV/VIS registrado para a AmB incorporada em L8 mostrou-se muito semelhante àquele da AmB em água, com banda de absorção intensa em 326 nm, característica da AmB na forma agregada (Figura 10). Por outro lado, o espectro registrado para a AmB incorporada no
25 complexo Sb-L8 mostrou uma banda pouco intensa em 326 nm e uma banda intensa em 412 nm, característica da AmB na forma monomérica (Figura 10). Este último resultado mostra que os nanoagregados Sb-L8, ao contrário das micelas de L8, foram capazes de manter a AmB na forma monomérica, mesmo após diluição em solução aquosa.

REIVINDICAÇÕES

1. **NANOCARREADORES, caracterizados por** compreenderem nanoagregados formados por complexos de antimônio(V) com um tensoativo ou por complexos de antimônio(V) mistos, com dois ou três tensoativos diferentes,
5 incorporando ou não um fármaco de caráter lipofílico e/ou anfifílico.
2. **OS NANOCARREADORES, de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pelo(s)** tensoativo(s) ser(em) dispersível(is) em água e apresentar(em) uma parte hidrofílica com pelo menos dois grupos hidroxilas.
3. **OS NANOCARREADORES, de acordo com a reivindicação 1,**
10 **caracterizados pelo(s)** tensoativo(s) ser(em) preferencialmente do grupo da alquil-N-metil-glucamida ou de tensoativos de cabeça polar derivada do glicerol.
4. **OS NANOCARREADORES, de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pelo** complexo antimônio(V)-tensoativo(s) ser preparado, preferencialmente, na relação molar antimônio(V)/tensoativo(s) 1:3.
- 15 **5. OS NANOCARREADORES, de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pelo** fármaco lipofílico ou anfifílico ser preferencialmente a anfotericina B, a miltefosina, o alopurinol e/ou a sinvastatina.
6. **USO DOS NANOCARREADORES, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por** ser na preparação de um medicamento para o tratamento de
20 indivíduos acometidos por, infecções, leishmanioses, câncer, deficiência imune ou hepatite.
7. **UM PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM NANOCARREADOR caracterizado por** compreender os seguintes passos sucessivos:
 - a. mistura em solução aquosa de sal de antimônio(V) com um
25 tensoativo ou com dois ou três tensoativos diferentes;
 - b. aquecimento da solução aquosa, acima da temperatura ambiente, até secagem da solução;
 - c. reidratação do produto seco;
 - d. opcionalmente, adição de fármaco lipofílico e/ou anfifílico e
30 incubação até incorporação;
 - e. opcionalmente, desidratação da suspensão resultante.

8. O PROCESSO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo sal de antimônio(V) ser preferencialmente o hexahidroxoantimoniato de potássio ou o hexahidroxoantimoniato de sódio.

9. O PROCESSO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo(s) tensoativo(s) ser(em) dispersível(is) em água e apresentar(em) uma parte hidrofílica com pelo menos dois grupos hidroxilas.

10. O PROCESSO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo(s) tensoativo(s) ser(em) preferencialmente do grupo do alquil-N-metil-glucamida ou um tensoativo de cabeça polar derivada do glicerol.

10 11. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, caracterizada por compreender: (i) um nanocarreador, de acordo com as reivindicações de 1 a 6; e (ii) diluentes ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

12. A COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelos diluentes ou excipientes serem preferencialmente água, solução salina, solução tampão, solução de dextrose, soluções de açúcares, solução de polietileno glicol, um óleo, etiloleato, triglicerídeo, carboximetilcelulose, sorbitol, dextrana, timerosal, m-or o-cresol, formalina, álcool benzílico e/ou albumina.

13. A COMPOSIÇÃO, de acordo com as reivindicações 11 e 12, caracterizada por poder ser administrada pelas vias oral, tópica, intramuscular, intravenosa, subcutânea, via inalação ou por dispositivo implantável.

14. USO DA COMPOSIÇÃO, de acordo com as reivindicações 11 a 13, caracterizado por ser na preparação de um medicamento para o tratamento de indivíduos acometidos por infecções, leishmanioses, câncer, deficiência imune ou hepatite.

FIGURAS

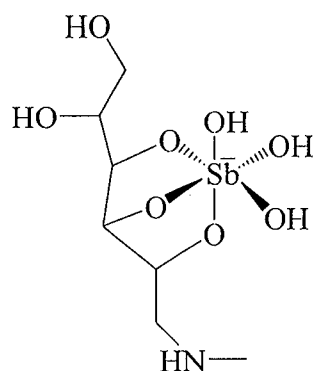


Figura 1

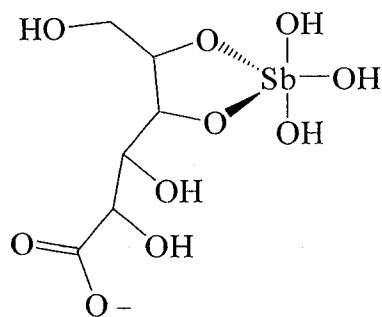


Figura 2

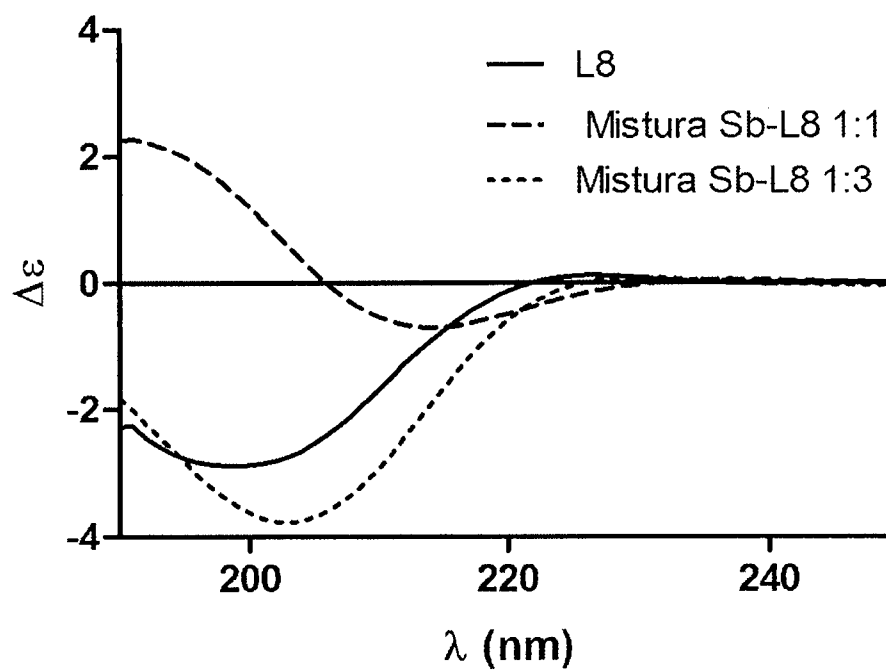


Figura 3

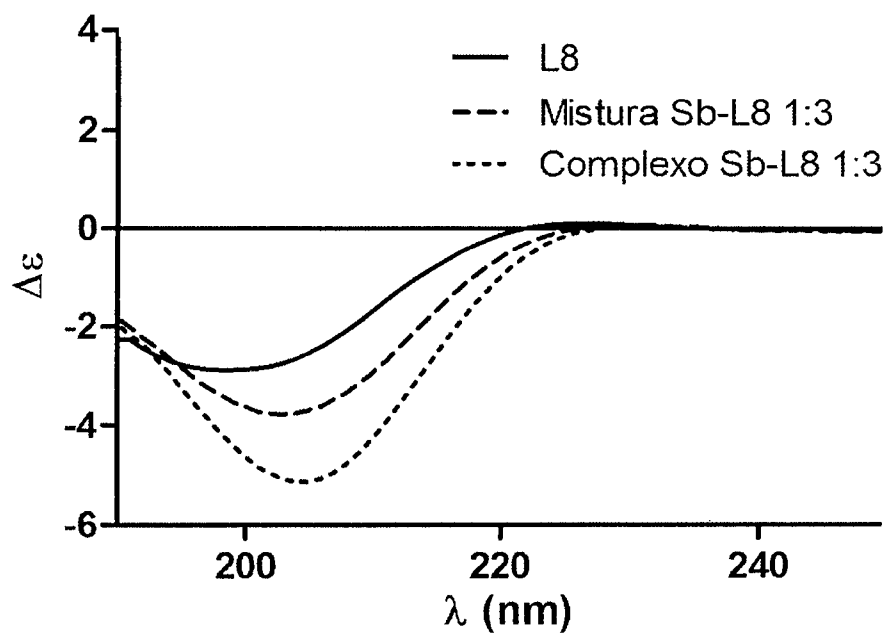


Figura 4

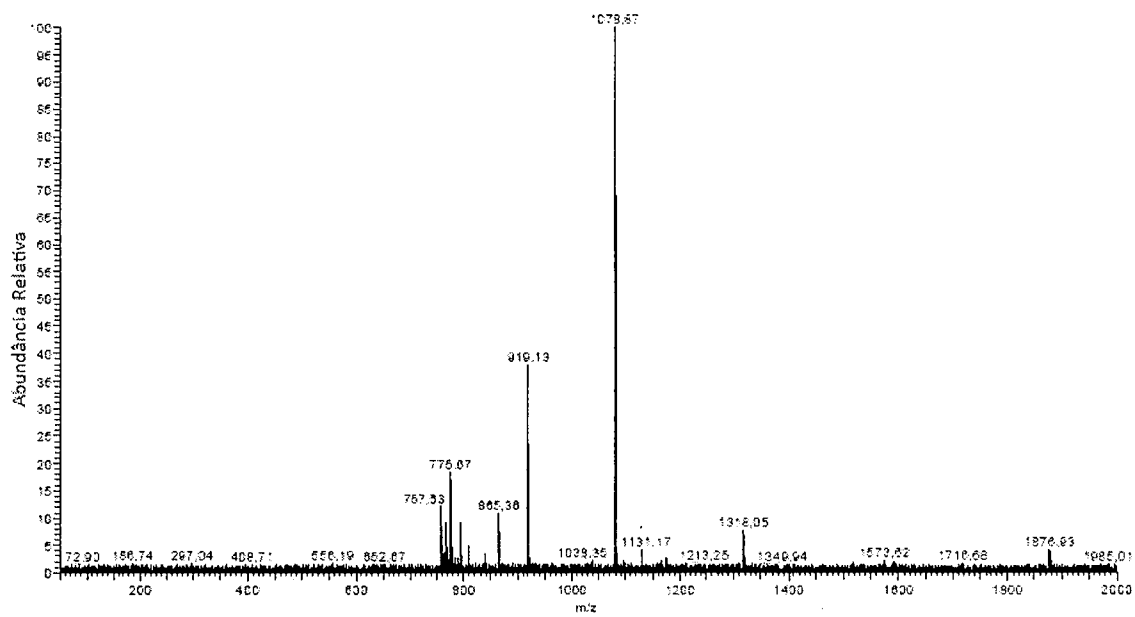


Figura 5

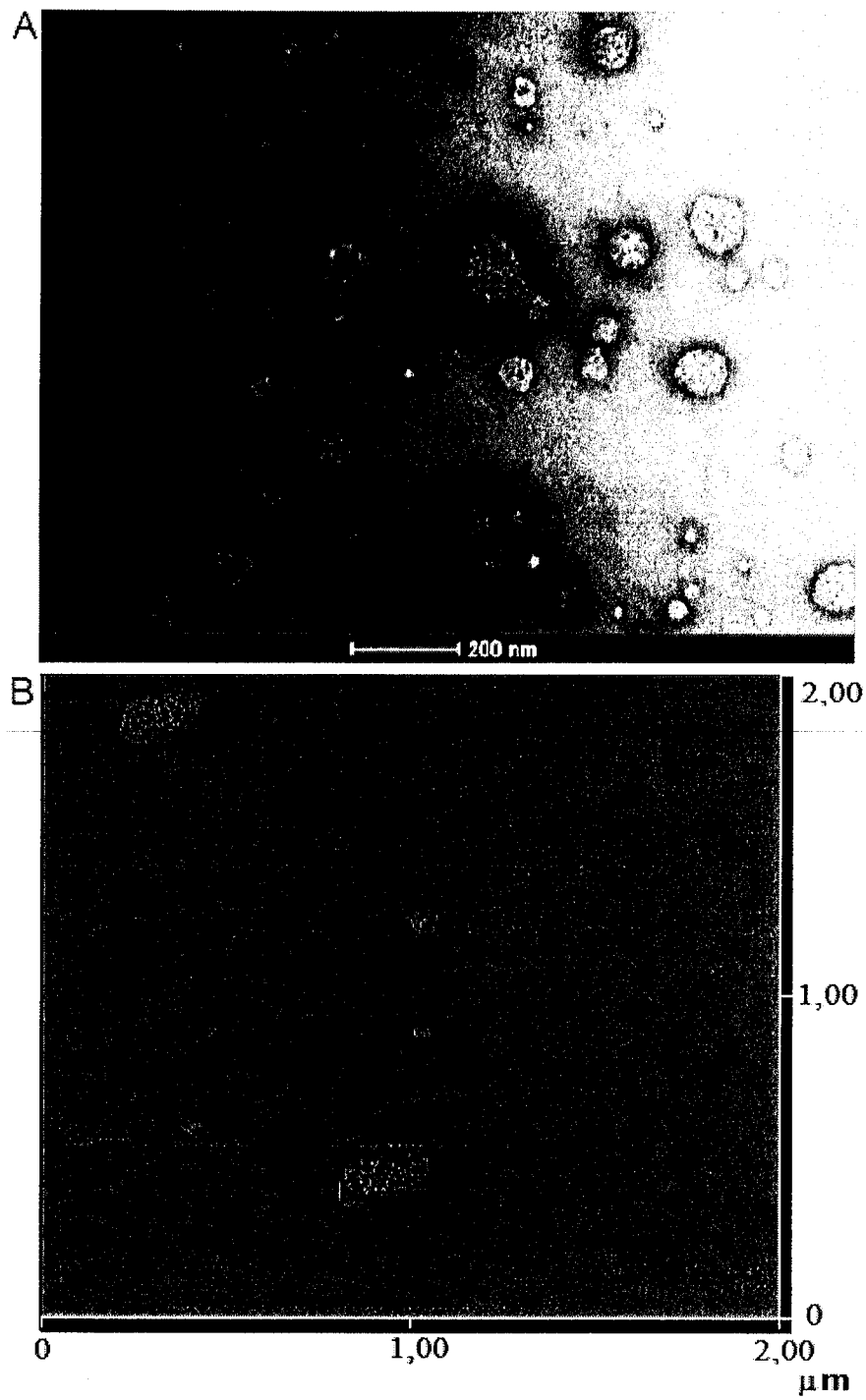


Figura 6

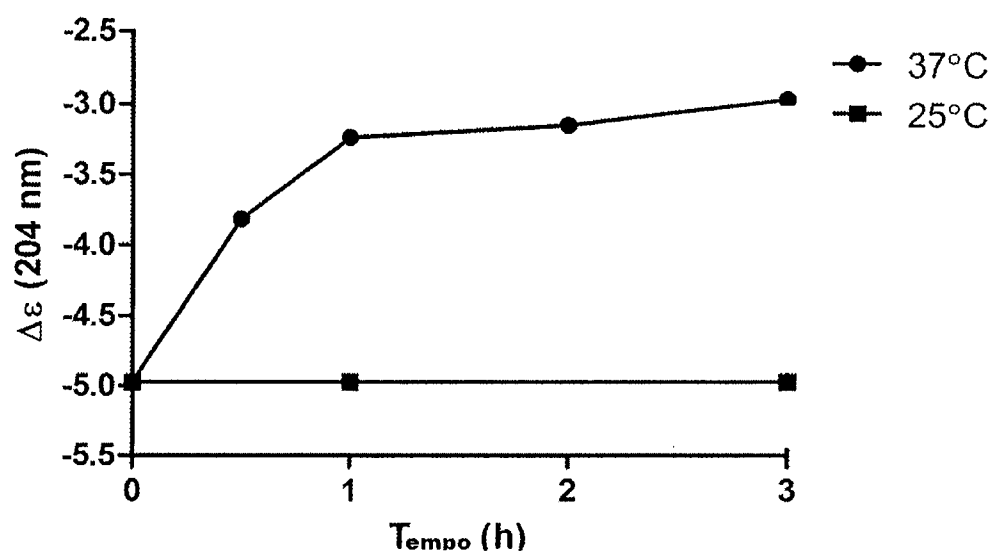


Figura 7

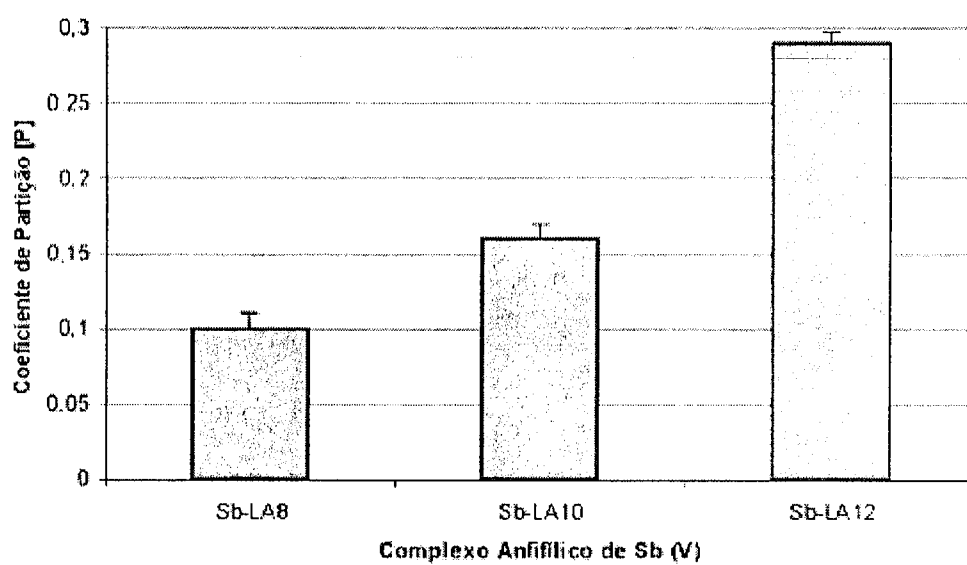


Figura 8

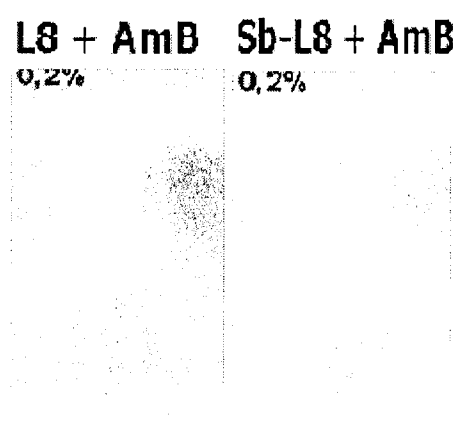


Figura 9

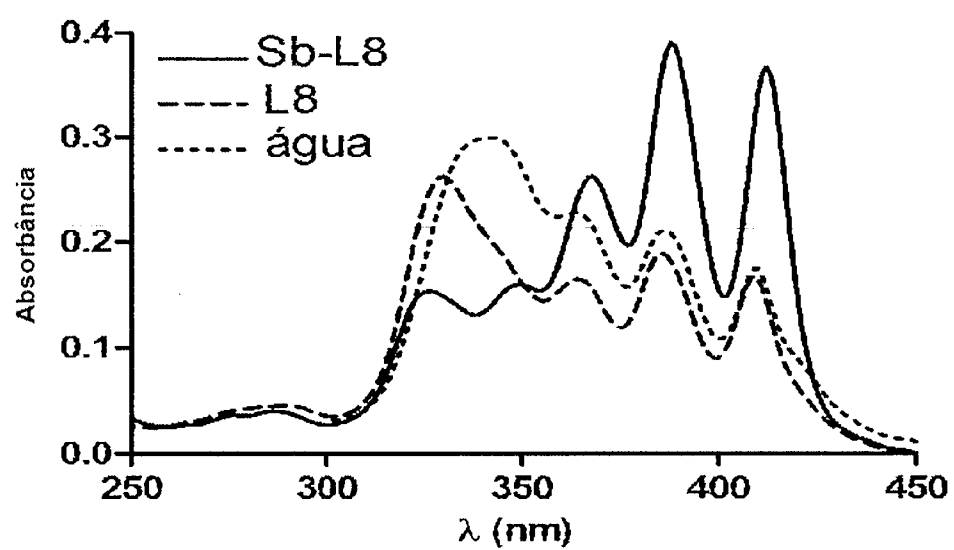


Figura 10

RESUMO
NANOCARREADORES FORMADOS POR COMPLEXOS ANFIFÍLICOS DE
ANTIMÔNIO(V), PROCESSO DE OBTENÇÃO, COMPOSIÇÕES
FARMACÊUTICAS E USO

- 5 A presente invenção refere-se a nanocarreadores formados por complexos anfifílicos de antimônio(V), ao processo de obtenção desses complexos e a composições farmacêuticas contendo esses nanocarreadores, para o tratamento das leishmanioses e de outras doenças, tais como câncer, infecções, deficiência imune e hepatites B e C, não limitante.

Synthesis and characterization of bismuth(III) and antimony(V) porphyrins: high antileishmanial activity against antimony-resistant parasite

Marcela Luísa Gomes¹ · Gilson DeFreitas-Silva¹ · Priscila Gomes dos Reis² · Maria Norma Melo³ · Frédéric Frézard² · Cynthia Demicheli¹ · Ynara Marina Idemori¹

Received: 16 December 2014 / Accepted: 14 April 2015 / Published online: 1 May 2015
© SBIC 2015

Abstract Two bismuth(III) porphyrins—5,10,15,20-tetrakis(phenyl)porphyrinatobismuth(III) nitrate, [Bi(III)(TPP)]NO₃, and the unprecedented 5,10,15,20-tetrakis(4-carbomethoxyphenyl)porphyrinatobismuth(III) nitrate, [Bi(III)(T4CMPP)]NO₃, and two unprecedented antimony(V) porphyrins dichlorido(5,10,15,20-tetrakis(phenyl)porphyrinato)antimony(V) bromide, [Sb(V)(TPP)Cl₂]Br, and dibromido(5,10,15,20-tetrakis(4-carbomethoxyphenyl)porphyrinato)antimony(V) bromide, [Sb(V)(T4CMPP)Br₂]Br,—were synthesized by reacting the corresponding porphyrin ligand with Bi(NO₃)₃·5H₂O or SbCl₃. All compounds were characterized by UV–vis, ¹H NMR spectroscopy, and mass spectrometry. The new compounds were also characterized by elemental analysis. Because antimony and bismuth compounds have been widely applied in medicine, the activity of these complexes was tested against Sb-sensitive and -resistant *Leishmania amazonensis* parasites. [Sb(V)(T4CMPP)Br₂]Br was more active against the promastigote form of Sb-resistant

mutant strain as compared to the sensitive parental strain, with IC₅₀ in the micromolar range. These data contrasted with those obtained using the Sb(III) drug potassium antimony tartrate, which displayed IC₅₀ of 110 μmol L⁻¹ against the Sb-sensitive parasite and was almost inactive against the Sb-resistant strain. The H₂T4CMPP ligand also showed antileishmanial activity against Sb-resistant and -sensitive strains, but with IC₅₀ at least tenfold greater than that of the complex. The Sb(V)-porphyrin complex was also active against intracellular amastigotes and showed a higher selectivity index than the conventional Sb(V) drug glucantime, in both Sb-sensitive and -resistant strains. The greater antileishmanial activity of this complex could be attributed to an increased cellular uptake of Sb. Thus, [Sb(V)(T4CMPP)Br₂]Br constitutes a new antileishmanial drug candidate.

Keywords Antimony(V) porphyrins · Bismuth(III) porphyrins · Leishmania

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00775-015-1264-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Ynara Marina Idemori
ynara@ufmg.br

¹ Departamento de Química, ICEx, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

² Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

³ Departamento de Parasitologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

Abbreviations

αMEM	Minimum essential culture medium
BALB/c	Albino mice
BSS	Bismuth subsalicylate
CBS	Bismuth subcitrate
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
FBS	Fetal calf serum
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PBS	Phosphate-buffered saline
Phen	1,10-Phenanthroline

RPMI	Roswell Park Memorial Institute (cell culture medium)
TMS	Tetramethylsilane
TA	Potassium antimony(III) tartrate
[Bi(III)(TPP)]NO ₃	5,10,15,20-Tetrakis(phenyl)porphyrinatobismuth(III) nitrate
[Bi(III)(T4CMPP)]NO ₃	5,10,15,20-Tetrakis(4-carbomethoxyphenyl)porphyrinatobismuth(III) nitrate
[Sb(V)(TPP)Cl ₂]Br	Dichlorido(5,10,15,20-tetrakis(phenyl)porphyrinato)antimony(V) bromide
[Sb(V)(T4CMPP)Br ₂]Br	Dibromido(5,10,15,20-tetrakis(4-carbomethoxyphenyl)porphyrinato)antimony(V) bromide

Introduction

Although researchers have demonstrated that most metals can coordinate to the porphyrin macrocycle, for many years, they have focused their attention on porphyrin complexes with transition metals. More recently, interest in the chemistry of main group elements has resurfaced, motivated by the search for new conducting materials and chemotherapeutic agents [1]. Metal and metalloid porphyrin derivatives of elements belonging to group 15 have been the object of many studies over the past 30 years [2], but works on the characterization of bismuth(III) complexes are scarce.

In 1969 and 1974, respectively, Treibs and Buchler reported on the first bismuth porphyrin complexes [3, 4]. Since then, authors have investigated bismuth complexation with various porphyrin ligands [5]. Complexation of this type of macrocycle with heavier (and larger) elements of groups 13–15 (thallium, lead, and bismuth) results in complexes in which the metal localizes outside the ring plan [6]. The Bi atom lies out of the N₄ plane by 1.12 Å [7]. Therefore, the main issue regarding the medicinal application of bismuth porphyrins is the in vivo stability of these complexes. For this reason, it is essential to study the process through which these complexes originate and to assess their stability in terms of macrocycle functionalization.

Antimony porphyrins are examples of metalloid porphyrins. In 1969, antimony insertion into porphyrins such as mesoporphyrin dimethyl ester and etioporphyrin afforded the first instances of porphyrin complexes containing elements belonging to group 15 [3]. Bismuth and antimony compounds have countless applications in medicine. Bismuth(III) salts are considered to be safe and non-toxic,

probably due to their insolubility in neutral aqueous solutions, like biological fluids [8]. On the basis of their antacid and astringent properties, bismuth compounds are commonly used to treat a variety of gastrointestinal disorders. The main biological target of bismuth-based drugs is the bacterium *Helicobacter pylori*, the suspected causative agent of gastric diseases. *H. Pylori* produces a large amount of enzymes (urease, lipase) and bismuth compounds probably inhibit their syntheses. Traditional bismuth salts include bismuth salicylate, Pepto-Bismol (BSS), and De-Nol (CBS) [9].

In Brazil, hydrosoluble pentavalent antimony complexes with *N*-methylglucamine (meglumine antimoniate or Glucantime®) or sodium gluconate (sodium stibogluconate or Pentostam®) are the first-choice medications to treat all the clinical forms of leishmaniasis in humans. The metal (Sb(V)) is the active species in these pharmaceuticals. Because antimonial drugs require repeated parenteral injections and exert toxicities, patients frequently interrupt the treatment, causing resistant microorganisms to emerge [10]. In this context, the World Health Organization (WHO) has recommended the search for new drugs and formulations, as well as the development of simpler and safer administration routes, like oral administration and topical application [11].

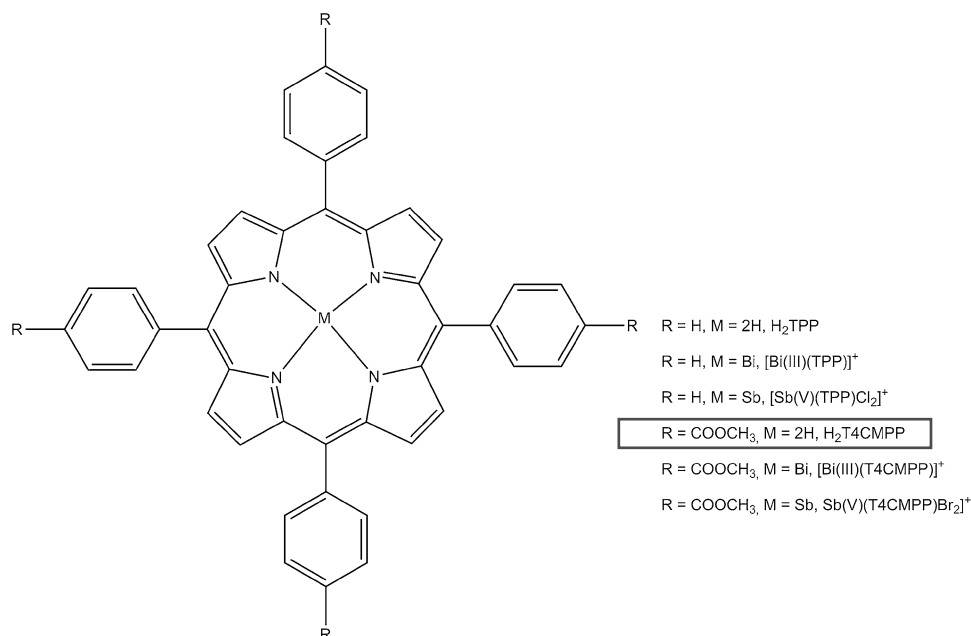
The mechanism through which antimonials act remains to be elucidated [10]. The drug might operate as a pro-drug in which Sb(V) reduction leads to formation of Sb(III), the more toxic form of the metal [12, 13]. There is an increasing body of evidence that this reduction occurs in the host submitted to conventional treatment with antimonials [10, 13]. Recently, it has been suggested that glutathione (the main thiol in the cytosol of mammalian cells) may be the reducing agent in vivo [14]. It has also been shown that trypanothione (T(SH)₂), the main thiol present in the parasite, can promote Sb(V) reduction to Sb(III) and form a complex with Sb(III) [15, 16].

Other studies have suggested the participation of an parasite-specific enzyme in the process of reduction of Sb(V) to Sb(III), thiol-dependent reductase (TDR1) [17], and/or antimoniate reductase (ACR2) [18].

In addition, trivalent antimony can replace zinc in protein domains known as “zinc fingers” [19]. Indeed, the leishmania parasite bears a number of proteins with “zinc fingers” domains, which are essential during transcription. On the other hand, it was also proposed that Sb(V) may be active by itself, for instance through complexation with ribonucleosides [20].

Considering the importance of obtaining novel compounds of Sb and Bi, the present work describes the synthesis, characterization, and leishmanicidal activity evaluation of antimony(V) and bismuth(III) porphyrin complexes (Fig. 1).

Fig. 1 Porphyrin ligands, antimony(V) and bismuth(III) complexes



Materials and methods

Materials

Chloroform ($CHCl_3$, Vetec), dichloromethane (CH_2Cl_2 , Vetec), and methanol (MeOH, Vetec) were dried over $CaCl_2$. *N,N*-dimethylformamide (C_3H_7NO , Vetec) was stored over molecular sieves (4 Å). *n*-Hexane (C_6H_{14} , Vetec), antimony(III) trichloride ($SbCl_3$, Aldrich), bismuth(III) nitrate pentahydrate ($Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$, Carlo Erba), potassium antimony(III) tartrate ($K_2Sb_2(C_4H_2O_6)_2 \cdot 3H_2O$, Sigma-Aldrich), and H_2TPP (Sigma-Aldrich) were used without further purification. $H_2T4CMPP$ had been previously synthesized in the laboratory [21]. Meglumine antimoniate or glucantime was obtained from Sanofi-Aventis (São Paulo, SP, Brazil).

Mass spectra were acquired on an ESI spectrometer from Thermo Scientific, model LCQ Fleete, equipped with ion trap analyzer. UV–vis electronic absorption spectra were recorded on an HP spectrophotometer, model 8453, using quartz or glass cuvettes with optical path length of 10 mm. 1H NMR spectra were registered on Bruker spectrometers, models DRX-400 (400 MHz) and DPX-200 (200 MHz), using $CDCl_3$ and TMS as solvent and internal reference, respectively. A Neubauer chamber and a common light microscope were used to count the parasites. Elemental analysis was performed on an CHN Perkin-Elmer analyzer.

Synthesis of the complexes

$[Bi(III)(TPP)]NO_3$: H_2TPP (50.0 mg, 0.0813 mmol) and $Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$ (394 mg, 0.813 mmol) were added to DMF (30 mL). The mixture was kept under reflux for 100 min.

The synthesis was carried out under nitrogen atmosphere. The solvent was completely removed at the rotary evaporator. The product was dissolved in CH_2Cl_2 and chromatographed (SiO_2 , $CH_2Cl_2/MeOH$ 80:1). Yield 77 %. UV–vis ($CHCl_3$) λ_{max} (log ϵ): 469 (5.04), 599 (4.09), 647 (4.07). 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.78–7.79 (12H, m, meta + para- C_6H_5), δ = 8.02–8.26 (8H, m, ortho- C_6H_5), δ = 9.07 (8H, s, β -pyrr.). Mass spectrum (intensity): m/z 821.16 $[Bi(III)(TPP)]^+$ (100 %).

$[Bi(III)(T4CMPP)]NO_3$: $H_2T4CMPP$ (50.0 mg, 0.0591 mmol) and $Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$ (287 mg, 0.591 mmol) were added to DMF (30 mL). The mixture was kept under reflux for 120 min. The synthesis was carried out under nitrogen atmosphere. The solvent was completely removed at the rotary evaporator. The product was dissolved in CH_2Cl_2 and chromatographed (Al_2O_3 , $CH_2Cl_2/MeOH$ 80:1). Yield 57 %. UV–vis ($CHCl_3$) λ_{max} (log ϵ): 469 (4.94), 598 (3.90), 647 (3.98). 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.15 (12 H, s, methyl), δ = 7.98–8.40 (8H, m, ortho- C_6H_5 ; 8 H, m, meta- C_6H_5), δ = 8.79 (8H, s, β -pyrr.). Mass spectrum (intensity): m/z 1053.17 $[Bi(III)(T4CMPP)]^+$ (100 %). Anal. Calcd for $C_{52}H_{36}N_5O_{11}Bi \cdot CH_2Cl_2 \cdot H_2O$: C, 52.23; H, 3.31; N, 5.75. Found: C, 52.79 H, 3.40; N, 5.59.

$[Sb(V)(TPP)Cl_2]Br$: H_2TPP (10.0 mg, 0.0163 mmol), $SbCl_3$ (37.2 mg, 0.163 mmol), and 2,4,6-collidine (0.15 mL) were added to CH_2Cl_2 (30 mL). The mixture was kept under reflux for 60 min. Br_2 (0.10 mL) was added to the mixture, and the heating was turned off. Then, *n*-hexane (20 mL) was added, and the complex precipitated. The product was filtered, dissolved in CH_2Cl_2 , and chromatographed (Al_2O_3 , $CH_2Cl_2/MeOH$ 70:1). Yield 96 %. UV–vis (CH_2Cl_2) λ_{max} (log ϵ): 424 (4.93), 558

(3.98), 599 (3.91). ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ = 8.0 (12H, m, meta- +para- C_6H_5), δ = 8.35 (8H, m, ortho- C_6H_5), δ = 9.66 (8H, s, β -pyrr.). Mass spectrum (intensity): m/z 805.10 $[\text{Sb(V)(TPP)Cl}_2]^+$ (100 %). Anal. Calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{28}\text{BrCl}_2\text{N}_4\text{Sb}\cdot 2\text{CH}_3\text{OH}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 56.07; H, 4.09; N, 5.69. Found: C, 57.63; H, 4.25; N, 5.83.

$[\text{Sb(V)(T4CMPP)Br}_2]\text{Br}$: $\text{H}_2\text{T4CMPP}$ (10.0 mg, 0.0118 mmol), SbCl_3 (27.0 mg, 0.118 mmol) and 2,4,6-collidine (0.15 mL) were added to CH_2Cl_2 (30 mL). The mixture was kept under reflux for 60 min. Br_2 (0.10 mL) was added to the mixture, and the heating was turned off. Then, n -hexane (20 mL) was added, and the complex precipitated. The product was filtered, dissolved in CH_2Cl_2 , and chromatographed (Al_2O_3 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 70:1). Yield 92 %. UV-vis (CH_2Cl_2) λ_{max} (log ϵ): 425 (4.82), 554 (3.90), 601 (3.98). ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ = 4.16 (12 H, s, CH_3), δ = 8.49–8.70 (8H, m, ortho- C_6H_5 ; 8 H, m, meta- C_6H_5), δ = 9.63 (8H, s, β -pyrr.). Mass spectrum (intensity): m/z 1125.10 $[\text{Sb(V)(T4CMPP)Br}_2]^+$ (100 %). Anal. Calcd for $\text{C}_{52}\text{H}_{36}\text{Br}_3\text{N}_4\text{O}_8\text{Sb}$: C, 51.77; H, 3.01; N, 4.64. Found: C, 51.15; H, 2.54; N, 4.33.

Cytotoxicity assay against murine peritoneal macrophages

The cytotoxicity of the compounds toward murine peritoneal macrophages was evaluated using the classical 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method [22]. The protocol was approved by the Internal Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA) of the Federal University of Minas Gerais (Protocol 231/2014). In brief, macrophages were obtained by lavage of the peritoneal cavity of Swiss mice with 10 mL of cold RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen NY, USA) without FBS. After washing, the cell suspension (4.0×10^6 cells mL^{-1}) was seeded (0.1 mL) in 96-well flat bottom plates. Macrophages were allowed to adhere for 1 h at 37 °C, and non-adherent cells were removed by washing with RPMI. The assayed compounds ($[\text{Sb(V)(T4CMPP)Br}_2]\text{Br}$, $\text{H}_2\text{T4CMPP}$, glucantime) were then added to the wells at varying concentrations and the cells were further cultured in RPMI supplemented with 10 % FBS at 38 °C for 24 h, under humidified 5 % CO_2 atmosphere. Thereafter, the medium was replaced with fresh RPMI containing MTT at 0.5 mg mL^{-1} , and the plates were incubated for additional 4 h. Supernatants were aspirated, and the resulting formazan crystals were dissolved in 100 μL of DMSO. After 15 min of incubation at room temperature, the absorbance of the solubilized MTT formazan product was measured by UV-vis spectroscopy, at 570 nm. Cell viability was calculated from the ratio of the absorbance of the well-treated with the drug to that of the non-treated well. The concentration of drug that decreased cell viability by 50 % (CC_{50}) was determined.

In vitro antileishmanial assay

Parasite strains

Leishmania (Leishmania) amazonensis (strains MHOM/BR/1989/BA199, sensitive and resistant to Sb(III) at concentrations up to 2700 $\mu\text{mol L}^{-1}$) promastigotes were maintained in minimum essential culture medium (αMEM) (Gibco, Invitrogen NY, USA) supplemented with 10 % (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (FBS, Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 100 mg mL^{-1} kanamycin, 50 mg mL^{-1} ampicillin, 2 mmol L^{-1} L-glutamine, 5 mg mL^{-1} hemin, and 5 mmol L^{-1} bioppterin (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), at pH 7.0 and 25 °C. *L. amazonensis* was selected for its resistance to Sb(III), as described previously [23]. The Sb-resistant mutants *L. amazonensis* were selected in 25- cm^2 flasks containing 5 mL of αMEM in the presence of potassium antimony(III) tartrate at increasing Sb concentrations up to 2700 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The concentration that inhibited parasite growth by 50 % (IC_{50}) was calculated by non-linear regression using the Graph-Pad Prism 5 software.

Anti-promastigote activity

Compounds were evaluated for their activity against both Sb-sensitive and -resistant leishmania parasites in vitro, as described previously [24]. In brief, log-phase *Leishmania amazonensis* promastigotes (1×10^6 parasites mL^{-1}) were seeded in 24-well cell culture plates containing 1.5 mL of αMEM . The cells were incubated at 25 °C for 72 h, under shaking, in the presence of different concentrations of the tested compounds ($\text{H}_2\text{T4CMPP}$, $[\text{Bi(III)(T4CMPP)}]\text{NO}_3$, $[\text{Sb(V)(T4CMPP)Br}_2]\text{Br}$, and potassium antimony(III) tartrate). Non-treated parasites were established for growth comparison. Stock solutions of the drugs were prepared in DMF (250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) and diluted in αMEM to obtain the range of concentrations to be tested. The final DMF concentration did not exceed 0.1 %, which is known to be non-toxic to leishmania parasites. For the drug susceptibility assays, the number of viable promastigotes from each well was determined in a Neubauer chamber. Antileishmanial activity is expressed as $\text{IC}_{50}/72$ h, which is the concentration of compound that reduced cell growth by 50 % as compared to untreated control (relative growth). All the experiments were performed in triplicate.

Anti-amastigote activity

The resident macrophages were obtained from the peritoneum of BALB/c, and allowed to adhere directly on glass microscope coverslips at a cell density of 5×10^5 cells per well. After 2 h, cells were washed gently twice with PBS

to remove non-adherent cells. Adherent cells were cultured in α MEM (supplemented with 10 % FBS and 100 units penicillin/streptomycin) at 34 °C under a 5 % CO₂ atmosphere. Macrophages were infected with late-stationary-phase *L. amazonensis* promastigotes at a ratio of 10:1 (parasite:macrophage). After 4 h, macrophage monolayers were washed with α MEM to remove free parasites. Treatment of infected cells was carried out after 24 h of infection with different concentrations of the compounds ([Sb(V)(T4CMPP)Br₂]Br, H₂T4CMPP and glucantime), for 72 h at 34 °C under 5 % CO₂ atmosphere. The cells were then washed with PBS and stained with panoptic kit (Laborclin) according to the manufacturer's instructions. For each coverslip, about 250 macrophages and the average number of parasites per macrophage were counted. Individual amastigotes were clearly visible in the cytoplasm of infected macrophages. The results were expressed as the Infection Index (II), which is obtained by the formula: $II = (\% \text{ infected macrophages}) \times (\text{amastigotes/infected macrophages}/100)$. The inhibitory index was obtained.

Sb incorporation in promastigotes

The Sb incorporation assay was performed as previously described by Moreira et al. [25]. Log-phase Sb-sensitive and -resistant *Leishmania amazonensis* promastigotes were washed twice with HEPES/Glucose (HG) buffer (20 mmol L⁻¹ HEPES, 0.15 mol L⁻¹ NaCl, 10 mmol L⁻¹ glucose, pH 7.2) and resuspended in this buffer at a density of 1.0×10^8 cells/mL. The volume of 1 mL of this parasite suspension was aliquoted into tubes in triplicate: tubes containing only parasites (blank) and tubes with parasites in the presence of 500 μ mol L⁻¹ of Sb, as glucantime, [Sb(V)(T4CMPP)Br₂]Br or potassium antimony(III) tartrate. Cells were incubated for 1 h at 25 °C under agitation. After this period, the cell viability was confirmed by motility. Subsequently, the cells were centrifuged at 3500 rpm for 5 min at 4 °C and washed three times with HG buffer. Pellets were then resuspended with 100 μ L HG buffer. One aliquot of 10 μ L of each tube was used for normalization (parasite quantification) and the remaining volume (90 μ L) was submitted to digestion with nitric acid (65 %). Antimony concentration was quantified using Perkin-Elmer AAnalyst 600 Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometer.

Results and discussion

Synthesis of the complexes

Because bismuth porphyrins are poorly stable, we conducted bismuth insertion into the macrocycles under

nitrogen atmosphere, to ensure the absence of oxygen. This procedure maintained the integrity of the reagents and the products. After 20 min of reaction, the UV–vis absorption spectrum of the reaction mixture started to change. The Soret band of the free-base porphyrin, around 418 nm, began to decrease. A new Soret band emerged at 469 nm, which indicated formation of the bismuth porphyrin. Percolation of [Bi(III)(T4CMPP)]NO₃ and [Bi(III)(TPP)]NO₃ through a neutral alumina column and a silica gel column, respectively, effectively purified the complexes.

Concerning antimony porphyrins, addition of the porphyrin ligand and SbCl₃ to the solvent dichloromethane promptly elicited free-base porphyrin protonation; the solution became light green. It was necessary to add collidine to the reaction mixture, to deprotonate the resulting species and make the nitrogen atoms on the macrocycle available for coordination with antimony. The antimony(III) porphyrins are very unstable and then they could not be tested as antileishmanial agents. It was required addition of Br₂(l), which oxidized Sb(III) to Sb(V). The antimony(V) porphyrins are very stable [26] and the complexed Sb(V) does not reduce to Sb(III) under air atmosphere, as demonstrated by UV–vis absorption spectroscopy.

Characterization of the metalloporphyrins

UV–vis and ¹H NMR spectroscopies and mass spectrometry aided characterization of bismuth and antimony porphyrins.

The Bi(III) porphyrins displayed spectra of the hyper p-type [27], which is characteristic of porphyrin derivatives of main group element of lower oxidation state: besides the Soret band around 400 nm and the less intense Q bands between 500 and 700 nm, extra absorption bands arose at $\lambda \sim 320$ nm (Fig. 2). The Sb(V) porphyrins exhibited normal absorption spectrum, with the Soret band around 425 nm as well as the Q bands (Fig. 3).

The ¹H NMR spectrum of [Sb(V)(T4CMPP)Br₂]Br (supplementary material, Figure S1) presented signals relative to methylic and β -pyrrolic hydrogens (supplementary material, Figure S2), and aromatic protons with slightly different chemical shifts as compared to the signals in the ¹H NMR spectrum of the corresponding free-base porphyrin (supplementary material, Figure S3).

The signal referring to the *N*-pyrrolic hydrogens was absent from the ¹H NMR spectrum of [Sb(V)(T4CMPP)Br₂]Br, indicating that the metal ion coordinated to the porphyrin nitrogens.

Mass spectrometry confirmed the synthesis of the [Bi(III)(TPP)]⁺, [Bi(III)(T4CMPP)]⁺, [Sb(V)(TPP)Cl₂]⁺ and [Sb(V)(T4CMPP)Br₂]⁺ species. The peak *m/z* 821.16 (positive mode, calculated value 821.70) corresponded to the [Bi(III)(TPP)]⁺ species. The peak *m/z* 1053.17 (positive

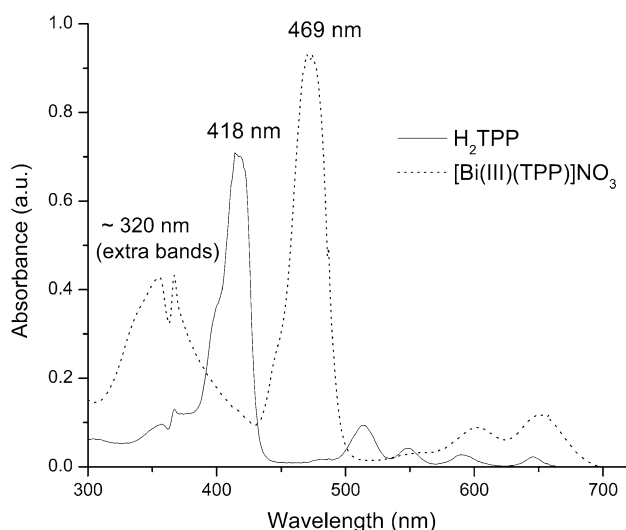


Fig. 2 UV-vis spectra of H_2TPP and $[Bi(III)(TPP)]NO_3$, in $CHCl_3$

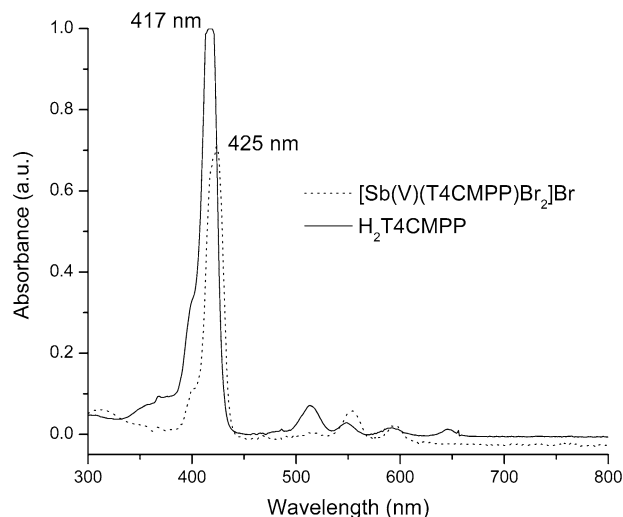


Fig. 3 UV-vis spectra of $H_2T4CMPP$ and $[Sb(V)(T4CMPP)Br_2]Br$, in CH_2Cl_2

mode, calculated value 1053.23) corresponded to the $[Bi(III)(T4CMPP)]^+$ species. The peak m/z 805.10 (positive mode, calculated value 805.39) corresponded to the $[Sb(V)(TPP)Cl_2]^+$ species. The peak m/z 1125.10 (positive mode, calculated value 1125.55) corresponded to the $[Sb(V)(T4CMPP)Br_2]^+$ species.

Aqueous $AgNO_3$ solution was added to the metalloporphyrins' solution in methanol to determinate the complexes' counter ion. The formed light yellow precipitate was solubilized in 1 mol L^{-1} aqueous NH_3 solution. 2 mL of chloroform was added to the solution. Then was added, dropwise, chloro water, a sodium hypochlorite solution acidified with HCl (2 mL sodium hypochlorite + 2 mL

HCl 1 mol L^{-1}) until color change. The procedure used is described in the literature [28].

The Cl_2 , from the chloro water, oxidizes de Br^- ion to Br_2 , which passes into the organic phase (chloroform) making it orange. That proves that Br^- is the porphyrins' counter ion.

The oxidation of the $[Sb(III)TPP]^+$ to $[Sb(V)TPP]^{3+}$ results in Cl^- as an axial ligand, whereas with the $[Sb(V)T4CMPP]^{3+}$, Br^- is the axial ligand. This could be because the $-COOCH_3$ group is electron withdrawing and, with the occurrence of the oxidation of Sb(III) to Sb(V), we suggest that the bromide ion, for being more polarizable, may better stabilize the charge distribution in the porphyrin structure.

Biological activities of $H_2T4CMPP$ and its complexes

Anti-promastigote activity

The activities of the free-base porphyrin ligand $H_2T4CMPP$ and its Sb(V) and Bi(III) complexes were first evaluated against the promastigote form of Sb-sensitive and -resistant leishmania strains of *L. amazonensis* species, the species that accounts for the cutaneous form of the disease in the New World [29].

Sb(V) and Bi(III) complexes of H_2TPP are not satisfactorily soluble in any solvent compatible for biological tests, so we did not assay them. The presence of the carbomethoxy groups improves hydrophilicity of the $H_2T4CMPP$ complexes.

Surprisingly, $H_2T4CMPP$ ligand exerted antileishmanial activity (Table 1), with IC_{50} values of approximately 50 and $100\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ against Sb-resistant and -sensitive strains, respectively. The porphyrin ligand was 1.78 times more active toward the resistant strain.

To assess how much complexation of $H_2T4CMPP$ with Sb(V) and Bi(III) impacted its antileishmanial activity, we compared the IC_{50} values obtained for the free-base porphyrin ligand and its complexes (Table 1).

Strikingly, the Sb(V) complex was found to be much 20- to 40-fold more active than the ligand against both leishmania strains. As in the case of $H_2T4CMPP$, the Sb(V) complex was three- to fourfold more active against the Sb-resistant mutant than the parental sensitive strain (Table 1). These results contrasted with those obtained for the conventional potassium antimony(III) tartrate, which showed IC_{50} value close to that of $H_2T4CMPP$ ligand for the wild-type line and was almost inactive against the Sb-resistant mutant (Table 1). It is also noteworthy that the conventional antimony(V) drug, meglumine antimoniate, is also inactive in this leishmania promastigote model (data not shown).

Complexation of $H_2T4CMPP$ with bismuth(III) resulted in lower activity as compared to the free-base porphyrin ligand. At the maximum concentration that was feasible to assess, $100\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, we did not detect any antileishmanial activity.

Table 1 Growth inhibitory concentrations of H₂T4CMPP and its Sb(V) and Bi(III) complexes toward antimony-sensitive and -resistant New World *L. amazonensis* strains

Compound	<i>L. amazonensis</i> (SbS)	<i>L. amazonensis</i> (SbR)
IC ₅₀ ± SEM (μmol L ⁻¹)		
H ₂ T4CMPP	93.8 ± 1.2	52.4 ± 1.2
[Bi(III)(T4CMPP)]NO ₃	>100	>100
[Sb(V)(T4CMPP)Br ₂]Br	4.4 ± 1.2	1.2 ± 0.2
TA	110 ± 1	>3000

IC₅₀ concentration of the compound that inhibited 50 % of parasite growth, SEM standard error of the mean, SbS Sb-sensitive, SbR Sb-resistant, TA potassium antimony(III) tartrate (IC₅₀ based on Sb concentration)

The fact both Sb(III)-sensitive and -resistant strains were highly sensitive to low concentration of [Sb(V)(T4CMPP)Br₂]Br suggests a different mode of action of this complex, when compared with conventional pentavalent antimonial drug. It is generally considered that the standard drug exerts its activity after reduction of Sb(V) to Sb(III) and that trivalent antimony is the final active form of the drug [15]. Such mechanism of action most probably does not take place in the case the new Sb(V) complex, otherwise one would expect a reduced sensitivity of the Sb(III)-resistant strain when compared with parental strain, as observed in the case of TA. On the other hand, the similar activity patterns of the complex and the ligand, showing higher activity against the resistant strain, support the model that the ligand and complex may exhibit a similar mechanism of action and that the ligand may be responsible for the antileishmanial action of the complex. Accordingly, complexation may increase the stability, favor the cellular uptake or preserve the activity of the ligand in the biological environment. One important difference between the ligand and the Sb complex is the positive charge of the complex, which may favor its interaction with the negatively charged surface of plasma membrane. This difference in sensitivity between the resistant and parental strains may also be explained by different drug metabolism. Since bismuth complex was poorly active contrary to antimony complex, the possibility of antimony(V) contributing to antileishmanial action of the complex still exists. According to the latter hypothesis, the lipophilic ligand may favor the uptake of Sb(V) by the parasite.

Anti-amastigote activity

Due to the good performance of [Sb(V)(T4CMPP)Br₂]Br against the promastigote form, this compound was further tested against intracellular amastigotes in the macrophage-infected model, which reproduces more closely the condition

of infection in the mammalian host. The complex showed 50 % reduction of the infection index at $72.8 \pm 1.3 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $53.0 \pm 1.2 \mu\text{mol L}^{-1}$, for the resistant and sensitive strains, respectively. Strikingly, the complex was much more active than the conventional drug, glucantime, with 50 % reduction of infection index at $6797 \pm 836 \mu\text{mol L}^{-1}$ of Sb for the sensitive strain and no significant reduction at concentration as high as 16 mmol L⁻¹ of Sb for the resistant strain. The ligand was active at a concentration higher than 100 μmol L⁻¹, but the value could not be determined precisely because of solubility limitation of H₂T4CMPP.

As possible explanations for the lower activity of the complex against the intracellular amastigote form, compared to the promastigote form, the complex may be partially inactivated by the macrophage, its uptake by the parasites may be limited because of their intracellular localization within the parasitophorous vacuole or the amastigotes may present lower intrinsic drug sensitivity compared to promastigotes.

Cytotoxicity against murine peritoneal macrophages and drug selectivity

Since only H₂T4CMPP complexation with Sb(V) resulted in an active compound, we investigated the cytotoxicity of both H₂T4CMPP and [Sb(V)(T4CMPP)Br₂]Br against macrophages, the host mammalian cells in which the leishmania parasite resides, and determined their parasite-to-host selectivity index (SI) (Table 2).

Complexation of the porphyrin ligand with Sb(V) slightly enhanced (less than twofold) its cytotoxicity (Table 2). Even though [Sb(V)(T4CMPP)Br₂]Br was more cytotoxic than glucantime, the Sb(V)-porphyrin complex was found to be more selective regarding both Sb-sensitive and -resistant leishmania cells (see SI values in Table 2). Thus, [Sb(V)(T4CMPP)Br₂]Br emerges as a promising drug candidate to treat both Sb-sensitive and -resistant leishmaniasis.

Future studies should investigate strategies to further enhance the antileishmanial activity of antimony(V)-porphyrin complexes against intracellular amastigotes and reduce toxicity to the host cell. This may be achieved through the incorporation of the compound in a drug nano-carrier, so as to improve the complex stability and its intracellular delivery to the parasite [30].

Sb incorporation in promastigotes

To test the hypothesis that the greater activity of the Sb(V)-porphyrin complex compared to conventional antimonial drugs may be due to an improved cellular uptake of Sb, the intracellular accumulation of Sb in sensitive and resistant promastigotes was determined from this complex, glucantime and TA.

Table 2 Cytotoxicity of the porphyrin ligand and its Sb(V) complex against mouse peritoneal macrophages and the resulting selectivity index

Compound	CC ₅₀ (μmol L ⁻¹) macrophages	SI (<i>L. amazonensis</i>) SbS	SI (<i>L. amazonensis</i>) SbR
H ₂ T4CMPP	467.5 ± 1.2	<4.6	<4.6
[Sb(V)(T4CMPP)Br ₂]Br	262.9 ± 7.8	5.0	3.6
Glucantime	26310 ± 400	3.9	<1.65

CC₅₀ concentration of the compound that killed 50 % of the macrophages in the MTT assay, SI selectivity index calculated as the ratio between CC₅₀ in murine macrophages and IC₅₀ in intracellular amastigotes

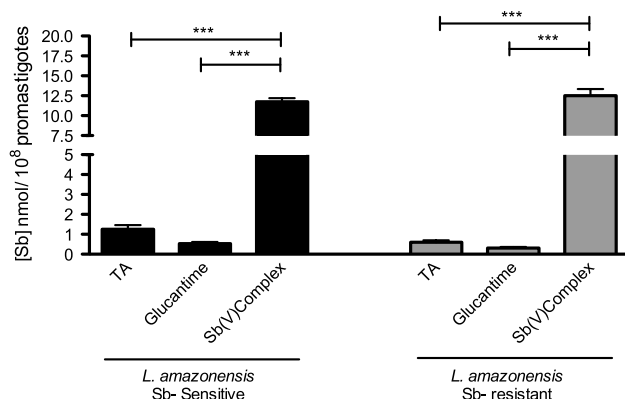


Fig. 4 Antimony incorporation in promastigote form of antimony-sensitive and -resistant lines of *Leishmania amazonensis*. Cells were incubated for 1 h at 25 °C in the presence of different antimony complexes at 500 μmol L⁻¹ of Sb: potassium antimony(III) tartrate (TA), glucantime and [Sb(V)(T4CMPP)Br₂]Br (Sb(V)Complex). Intracellular antimony was quantified by graphite furnace atomic absorption spectrometry after cell washing and subsequent digestion with nitric acid. The assay was performed in triplicate. The data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test (****p* < 0.001)

Our results show that both SbS and SbR lines exhibited at least tenfold higher levels of intracellular Sb when exposed to [Sb(V)(T4CMPP)Br₂]Br, in comparison to glucantime or TA (Fig. 4). Interestingly, the sensitive and resistant strains showed similar intracellular concentrations of Sb after [Sb(V)(T4CMPP)Br₂]Br, indicating that the mechanisms responsible for cellular resistance to Sb(III) do not affect the uptake of Sb from this complex. This is in contrast with TA and glucantime that showed lower levels of Sb in the resistant strain, compared to the parental strain. This data support the model that the lipophilic ligand favors the uptake of Sb(V) by the parasite, resulting in increased Sb-mediated cytotoxicity.

Conclusion

Bi(III)-porphyrin complexes are poorly stable, due to the large size of the Bi(III) cation. In turn, Sb(V) complexes are very resistant to demetallation. The antimony complex

[Sb(V)(T4CMPP)Br₂]Br displays high antileishmanial activity, with IC₅₀ in the micromolar range, against both Sb-sensitive and -resistant *Leishmania amazonensis* strains. The Sb(V)-porphyrin complex showed a higher selectivity index than the conventional antimonial drug glucantime. The greater antileishmanial activity of this complex could be attributed to an improved intracellular accumulation of Sb. This is the first report of a synthetic metalloporphyrins showing antileishmanial activity. Furthermore, this compound emerges as a new antileishmanial drug candidate capable of bypassing the mechanisms responsible for the resistance of *Leishmania* to Sb-based drugs.

Acknowledgments We thank CNPq, CAPES, and FAPEMIG for the financial support.

References

- Barbour T, Belcher WJ, Brothers PJ, Rickard CEF, Ware DC (1992) Inorg Chem 31:746–754
- Michaudet L, Fasseur D, Guillard R, OU Z, Kadish KM, Dahaoiu S, Lecomte C (2000) J Porphyrins Phthalocyanines 4:261–270
- Treibs A (1969) Justus Liebigs Ann Chem 728:115–148
- Buchler JW, Lay KL (1974) Inorg Nucl Chem Lett 10:297
- Halime Z, Michaudet L, Razavet M, Ruzié C, Boitrel B (2003) Dalton Trans 4250–4254
- Boitrel B, Breede M, Brothers PJ, Hodgson M, Michaudet L, Rickard CEF, Salim NA (2003) Dalton Trans 9:1803–1807
- Balasanthiran V, Chisholm MH (2014) Angew Chem Int Ed 53:1594–1597
- Salvador JAR, Pinto RMA, Silvestre SM (2009) Curr Org Synth 6:426–470
- Bharti SK, Singh SK (2009) Pharm Lett 1:39–51
- Frézard F, Demicheli C, Ribeiro RR (2009) Molecules 14:2317–2336
- Modabber F (1993) Leishmaniasis. In: Tropical Disease Research. Progress 1991–92. UNDP/World Bank/WHO Special Programme For Research And Training In Tropical Diseases. Geneva: World Health Organization, 77
- Goodwin LC, Page JE (1943) Biochem J 22:236–240
- Miekeley N, Mortari SR, Schubach AO (2002) Anal Bioanal Chem 372:495–502
- Frézard F, Demicheli C, Ferreira CS, Costa MAP (2001) Antimicrob Agents Chemother 45:913–916
- Ferreira CS, Martins PS, Demicheli C, Brochu C, Ouellette M, Frezard F (2003) Biometals 16:441–446
- Yan S, Li F, Ding K, Sun H (2003) J Biol Inorg Chem 8:689–697
- Denton H, McGregor JC, Coombs GH (2004) Biochem J 381:405–412

18. Zhou Y, Messier N, Ouellette M, Rosen BP, Mukhopadhyay R (2004) *J Biol Chem* 279:37445–37451
19. Demicheli C, Frézard F, Mangrum JB, Farrell NP (2008) *Chem Commun* 30:4828–4830
20. Demicheli C, Frézard F, Lecouvey M (2002) *Garnier-Suillerot. Biochim Biophys Acta* 1570:192–198
21. Rebouças JS, Spasojevic I, Batinic-Haberle I (2008) *J Biol Inorg Chem* 13:289–302
22. Mosmann T (1983) *J Immunol Methods* 65:55–63
23. Monte-Neto RL, Coelho AC, Raymond F, Légaré D, Corbeil J, Frézard F, Ouellette M (2011) *PLoS Neglected Trop Dis* 5:e1167
24. Lizarazo-Jaimes EH, Monte-Neto RL, Reis PG, Fernandes NL, Speziali MN, Melo MN, Frézard F, Demicheli C (2012) *Molecules* 17:12622–12635
25. Moreira D, Neto RLM, Andrade JM, Santi AMM, Reis PG, Frézard F, Murta SMF (2013) *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 3:143–153
26. Kadish KM, Smith KM, Guillard R (2000) *The porphyrin handbook: inorganic, organometallic and coordination chemistry*, vol 3. Elsevier, p 40
27. Knor G (1994) *Vogler. Inorg Chem* 33:314–318
28. Vogel AI (1981) *Química analítica qualitativa*. São Paulo, Mestre Jou, p 359
29. Marzochi MC, Marzochi KB (1994) *Cad Saude Publica* 10:359–375
30. Frézard F, Demicheli C (2010) *Expert Opin Drug Deliv* 7:1343–1358