



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

(21) PI 1003990-2 A2



* B R P I 1 0 0 3 9 9 0 A 2 *

(22) Data do Depósito: 04/03/2010

(43) Data da Publicação Nacional: 04/08/2020

(54) Título: FORMULAÇÃO PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES FÚNGICAS

(51) Int. Cl.: A61K 9/127; A61K 31/7048; A61K 47/28.

(30) Prioridade Unionista: 16/10/2009 IN 1258/KOL/09.

(71) Depositante(es): LIFECARE INNOVATIONS PVT. LTD..

(72) Inventor(es): LILY VERMA; JITENDRA NATH VERMA.

(86) Pedido PCT: PCT IN2010000125 de 04/03/2010

(87) Publicação PCT: WO 2011/045809 de 21/04/2011

(85) Data da Fase Nacional: 05/01/2011

(57) Resumo: FORMULAÇÃO PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES FÚNGICAS. Uma formulação nova para o tratamento de infecções fúngicas que é constituída por anfotericina B nanossomal contendo colesterol em uma suspensão salina.

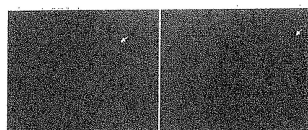


Fig. 1

Imagens cryoEM de amostras de lipossoma (A) sonicado fresco e (B) não sonicado com 2 anos de idade. Lipossomas com duas camadas de membrana (seta branca) e lipossomas com estrutura semelhante à cebola (seta preta). Barra de escala representa 200nm.



Fig. 2

Imagens cryoEM de amostras de lipossoma (A) sonicado fresco e (B) não sonicado com 2 anos de idade mostrando lipossomas unilamelares aprisionados dentro de lipossomas unilamelares maiores (seta preta). Barra de escala representa 200nm.

“FORMULAÇÃO PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES FÚNGICAS”

CAMPO DA INVENÇÃO:

5 A invenção atual refere-se a sistemas novos de administração de fármacos com base em sistemas nasossomais.

Neste estudo foram estudadas amostras de anfotericina B nasossomal contendo colesterol em solução salina, com microscópio crio-eletrônico (CryoEM). Foram analisadas uma amostra nova e uma com dois anos de idade, não sonicadas, assim como após a sonicação. A análise de dados e imagens cryoEM incluiu a distribuição de tamanho e a morfologia geral, tais como a lamelaridade (unilamelar verso multilamelar) e agregação.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO:

15 Incidentes cada vez maiores de micose sistêmica tópica provocados por gêneros diferentes de fungos de leveduras e dermatófitos, em ambos os pacientes imuno-deficientes e imuno-competentes, permanecem sendo um problema médico importante e estudado de forma inadequada. A mortalidade resultante e a quantidade de mortes alarmante-mente prolongada ainda é uma grande preocupação. Em todos os fármacos descobertos até agora, tem havido problemas de espectro limitado, potência pobre, limitações de formulações adequadas, reações adversas ao fármaco e toxidez com risco de vida, e com muita frequência, uma combinação de alguns ou de todos os problemas acima. O grupo de polieno amino-glicosídeos de antibióticos parece ser o de espectro amplo e potente mais promissor. Todavia, a toxidez da maioria destes compostos evitou a sua inclusão como remédios terapêuticos.

25 A anfotericina B tem sido o único macrolídeo de polieno que permaneceu em amplo uso clínico, apesar do fato de várias formulações, tais como a suspensão micelar de deoxicolato de sódio, o complexo de lipídio lipossomal e a dispersão coloidal de lipídios, todos apresentam uma

nefrotoxicidade de risco de vida em várias extensões.

Os objetivos na formulação da anfotericina B, são o de remover a nefrotoxicidade, produzir uma preparação estável, a assegurar a eficiência em doses baixas e isentas de toxicidade e de reações adversas ao fármaco, mesmo em doses elevadas.

Existe um grande número de patentes concedidas/depositadas e publicações descrevendo as formulações da anfotericina B. Exceto pelo descrito abaixo, quatro formulações, e nenhuma outra formulação, são operacionais, porque não foi possível produzir-se essas outras formulações adequadamente nefro-seguras.

Em todas as formulações conhecidas de anfotericina B, os constituintes são escolhidos de uma grande lista de opções de fosfolípidios/lípidios e estabilizantes. Nenhuma preparação é colocada em solução salina, porque a anfotericina B é conhecida como sendo precipitada em solução salina.

1. Anfotericina B convencional: Anfotericina B - Suspensão coloidal de deoxicolato em 5% de dextrose,

Eficácia 33% Nefrotoxicidade 67%

A anfotericina B é insolúvel em meio aquoso. O problema foi superado parcialmente no final dos anos 50 através da dissolução da anfotericina B em deoxicolato e a sua formulação como suspensão micelar em 5% de dextrose em água. A anfotericina B precipita em NaCl e portanto, a anfotericina B em deoxicolato não foi preparada em NaCl nem foi diluída em solução salina. Além disso, esta suspensão foi liofilizada para criar estabilidade para a preparação.

2. Anfotericina B lipossomal diluída em 5% de dextrose

Eficácia 77% Nefrotoxicidade 20%

Uma anfotericina B lipossomal preparada pela combinação de fosfatidilcolina de soja hidrogenada, diestearoilfosfatidilglicerol, colesterol e

alfa tocoferol em 4,5% de sacarose e succinato hexaidrato disódico como solução tampão foi escolhida entre uma quantidade de combinações de fosfolipídios, esteróis, açúcares e estabilizantes de membrana e as suas variadas proporções. Apesar do uso de sacarose estabilizante de membrana, esta preparação foi liofilizada para superar a instabilidade. Esta preparação de anfotericina B lipossomal é relatada como sendo precipitada em solução salina e portanto a diluição em/contato com solução salina é fortemente proibido.

A patente U.S. de número 4766046 relata que:

Devido ao tamanho e à instabilidade dos lipossomas da anfotericina B, não foi possível preparar e estocar os lipossomas de anfotericina B de diâmetro pequeno sem um aumento significativo de tamanho (várias vezes) ao longo de um período de estocagem de várias semanas. Como resultado, devido a ingestão diferente de lipossomas in vivo e às propriedades de liberação de fármaco de toxidez, que são relacionadas com o tamanho do lipossoma, tem sido difícil controlar e avaliar o índice terapêutico dos lipossomas da anfotericina B estocada. O problema de instabilidade de tamanho é especialmente sério, onde são obtidos tamanhos de lipossoma maiores do que 1-2 microns, porque os lipossomas de anfotericina B contendo colesterol são substancialmente mais tóxicos do que os lipossomas de tamanho original menores. O problema da estabilidade do tamanho tem sido resolvido até agora somente através da administração dos lipossomas com tamanho adequado imediatamente após a preparação. É claro que isto não é uma abordagem prática para a administração do fármaco na prática usual clínica.

3. Complexo de lipídio e anfotericina B diluído em 5% de dextrose

Eficácia 34% Nefrotoxidez 63%

Esta preparação é composta por anfotericina B, fosfolipídios sintéticos verso dimiristoilfosfatidil colina e dimiristoil fosfatidil glicerol. A

solução aquosa é diluída em 5% de dextrose antes da administração. O perfil de eficácia e de toxidez não é melhorado em relação à anfotericina B convencional.

4. Dispersão coloidal de anfotericina B diluída em 5% de dextrose

5 Eficácia 46% Nefrotoxidez 40%

Anfotericina B e colesteril sulfato de sódio liofilizado com trometamina, edentato diidrato disódico e HCL monoidrato lactose.

A glicose presente nas formulações de lipídios e anfotericina B reduz marcadamente o efeito benéfico da formulação topicamente aplicada. O mecanismo inibitório da glicose é considerado como sendo relacionado com a viscosidade elevada introduzida pela glicose, ou devido a alterações introduzidas pela glicose na interface lipídio/água das partículas coloidais (Crowe JH et al. 1988 Biochim. Biophys Acta 947: 367 - 384). Mesmo o sucesso terapêutico da anfotericina B lipossomal é, na melhor das hipóteses, de 77%, que é inferior à invenção atual.

Foi portanto imaginado substituir-se a dextrose com solução salina nesta invenção, o que tem vantagens adicionais de reduzir a nefrotoxidez da anfotericina B. Em vista do fato bem conhecido e documentado de que a solução salina provoca a precipitação da anfotericina B¹⁻⁴, a composição de lipídios e a relação entre lipídio e fármaco foram projetados unicamente para assegurar que a anfotericina B nos nasossomas é imobilizada para evitar a precipitação do fármaco nasossomal.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO:

Um objetivo desta invenção é apresentar uma formulação nova de nasossomais contendo colesterol estabilizados em suspensão salina, com nefrotoxidez reduzida.

O outro objetivo desta invenção é propor uma formulação nova de nasossomais contendo colesterol estabilizados em suspensão salina, tendo uma atividade antifúngica aumentada.

Ainda outro objetivo desta invenção é propor uma formulação de nasossomais contendo colesterol estabilizados em suspensão salina, a qual é muito estável.

5 Outro objetivo desta invenção é propor uma formulação nova de nasossomais contendo colesterol estabilizados em suspensão salina, que seja menos tóxica.

Ainda outro objetivo desta invenção é propor uma formulação nova de nasossomais contendo colesterol estabilizados em suspensão salina, nos quais a dose de anfotericina B usada é muito pequena para a sua atividade anti-infecciosa elevada. Ainda outro objetivo desta invenção é propor uma formulação nova para aplicações diversas, visando a otimização de doses menores de anfotericina B para uma atividade anti-infecciosa maior, e além disso, minimizando a nefrotoxicidade e a preparação estável para várias aplicações, tais como a intravenosa, a oftalmológica e a tópica, etc.

15 BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO:

De acordo com esta invenção, é apresentada uma formulação nova para o tratamento de infecção por fungos, composta por: nasossomais de anfotericina B nasossomal contendo colesterol, em uma suspensão.

20 De acordo com esta invenção, é também apresentado um processo para a preparação da formulação nova de nasossomais contendo colesterol estabilizada em suspensão salina.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO:

25 Em uma solução, a concentração é o número de moléculas de soluto por unidade de volume do solvente, que no caso de injetáveis e infusões ou qualquer outra forma de dose líquida, geralmente é aquosa, enquanto que nas preparações particuladas, incluindo suspensões, tais como suspensões coloidais, a concentração efetiva do fármaco é determinada pelo número de partículas que transportam o fármaco. Tais veículos são conjuntos de lipídios de tamanho nano ou micro diferentes, proteínas ou outros veículos

biodegradáveis, predominantemente para preparações tópicas injetáveis, orais ou inaláveis, transdérmicas, etc, e não biodegradáveis. Nesta invenção, os nasossomais possuem uma relação otimamente elevada entre lipídios e fármaco para aumentar o número de nasossomais que contêm o fármaco para cada quantidade unitária de fármaco, e dessa forma obter uma otimização de eficácia por intermédio da complementação com a nanoficação, antes da administração.

A otimização da relação entre lipídios e fármaco com o tamanho do particulado é baseada em um conceito novo da invenção atual de aumento da concentração efetiva dos produtos farmacêuticos ativos, através do aumento da quantidade de partículas transportadoras dos APIs nas formulações após a produção e antes da administração. Isto é obtido reduzindo-se o tamanho das partículas da formulação contendo mais lipídios. Na formulação, em função da relação otimamente elevada entre lipídios e fármaco, existe um número maior de partículas/mg de fármaco. Mais partículas resultam em uma distribuição do fármaco no corpo melhor/maior. Como existe uma concentração mais efetiva de fármaco em suspensão, existe um número maior de moléculas distribuídas igualmente em todo o corpo. Isto reduzirá os requisitos de dose terapêutica. Como o API, por exemplo, a anfotericina B é tóxica em doses maiores, reduzindo-se os requisitos do API, isto automaticamente reduzirá a toxidez para os animais/pacientes, e portanto levará a uma formulação de fármaco mais segura.

Os APIs na preparação particulada são encapsulados dentro de camadas múltiplas das partículas transportadoras. O fármaco hidrófobo/lipofílico permanece intercalado na camada dupla de lipídios dos nasossomais de lipídio, e portanto, não é liberado para o meio ambiente aquoso in vivo, mesmo após a fragmentação ou quebra de tais nasossomais. Tais fármacos encapsulados em nasossomais de lipídios são transferidos da superfície dos nasossomais para a superfície da célula visada. Em tal caso, os

fármacos encapsulados na lamela interna dos nasossomais não são utilizados terapêuticamente, e terminam sendo fagocitados pelas células do sistema retículo-endotelial e saiam da cadeia terapêutica in vivo. O encapsulamento acumulado do fármaco na lamela interna é várias vezes maior do que o na lamela da superfície dos nasossomais. Se todas as lamelas dois nasossomais multi-lamelares forem separadas para formarem novos nasossomais múltiplos pequenos, a lamela interna que encapsula o fármaco será portanto convertida em uma lamela externa de exposição do fármaco dos nasossomais, e portanto, logicamente pode-se esperar que a concentração efetiva do fármaco seja aumentada, sem qualquer adição de API em tal formulação lamelar misturada. Esta otimização para produzir uma concentração ativa mais elevada para a obtenção de uma eficácia terapêutica mais elevada seria inviável submetendo-se os micro e/ou nasossomais lamelares misturados a uma ruptura ultrasônica ao lado da cama dos pacientes. A partir da população lamelar misturada, cada partícula disponibilizará várias lamelas, cada uma delas sendo convertida em vários nasossomais. Aumentando-se o número de nasossomais, a maioria dos API nas partículas transportadoras é trazido para a superfície, dessa forma multiplicando a eficácia terapêutica em proporção com o aumento do número de nasossomais que transportam o fármaco. No caso atual, a relação entre lipídios e fármaco varia de 45:1 a 45:15, conforme mostrado na tabela abaixo.

Produto	Tipo	Formato	Tamanho	Lipídio: fármaco	Dose	Nefrotoxicidade
Anfotericina B nanossomal em solução salina	Nanossoma	Redondo	0,02 - 2µm	45:1	1 - 3mg/kg	2%
AmBisome	Lipossomal	Redondo	0,08 - 1µm	7:1	3 - 5mg/kg	10 - 20%
Abelcet	Complexo de lipídios	Tira	2 - 5µm	1:1	5mg/kg	42 - 63%
Amphotec	Dispersão coloidal	Disco	0,12 - 0,14µm	1:1	4 - 6mg/kg	25 - 40%

Mais da relação matriz lipídica:fármaco significa que

Maior será o número de lipossomas/mg de fármaco, e portanto melhor alcance.

Processo de nanoficação:

Uma abordagem nova foi inovada para a execução da nanoficação do fármaco ao lado da cama, de acordo com esta invenção, utilizando-se um processador ultrasônico. Esta máquina permite que a operação livre de operador converta as partículas em nanossomas menores e menos lamelares, resultando em uma eficácia terapêutica oticamente aumentada através dos mecanismos enumerados abaixo.

No local da inflamação, os capilares desenvolvem fenestrações e se tornam mais permeáveis, o que permite o movimento de células e substâncias particuladas para migrarem/passarem do sangue em circulação para o local de inflamação próximo. O aumento da administração do fármaco em substâncias particuladas para as áreas inflamadas através de fenestração pode ser facilitado pela conversão das partículas transportadoras maiores em nanossomas. A nanoficação resulta no aumento da eficácia terapêutica, devido ao aumento resultante do número de nanossomas que contêm o fármaco no local visado.

Ainda outra aplicação importante da nanoficação é o da redução da perda das partículas maiores para as células fagocíticas do sistema retículo-endotelial. As partículas maiores são rapidamente identificadas como partículas estranhas pelas células varredoras, e como resultado são fagocitadas e retiradas da circulação rapidamente. A velocidade da fagocitose é inversamente proporcional ao tamanho das partículas que transportam o fármaco. Assim sendo, a redução do tamanho através da conversão das partículas grandes e multilamelares em nanossomas aumentaria a meia vida do plasma e retardaria a perda fagocítica, dessa forma elevando ainda mais a eficácia terapêutica.

A invenção atual refere-se a um produto farmacêutico de liberação controlada utilizando um conjunto de tecnologias de sistemas novos de administração de fármacos, com base em sistemas nanossomais. Neste estudo, as amostras de anfotericina B nanossomais contendo colesterol em

solução salina foram estudadas com microscópio crio-eletrônico (cryoEM). Amostras novas e com dois anos de idade sem serem sonicadas assim como após a sonicação, foram analisadas. A análise das imagens cryo-EM incluiu a distribuição de tamanho e a morfologia geral, tais como a lamelaridade (unilamelar verso multilamelar) e a agregação.

Foram avaliadas as seguintes questões específicas:

Distribuição de tamanho

Caracterização da morfologia geral

Foram feitas imagens da anfotericina B nanossomal contendo colesterol nas amostras em solução salina, frescas e com dois anos de idade, utilizando-se cryo-EM. As amostras foram diluídas dez vezes e foram obtidas imagens não sonicadas e após 45 minutos da sonicação. A sonicação foi feita em um banho de água-gelo que manteve a temperatura da amostra abaixo de 8 °C.

Distribuição de tamanho

A cryoEM das amostras diluídas de nanossomas mostrou um espécime muito heterogêneo, com partículas de várias morfologias e tamanhos. O tamanho das partículas variou de 20 nm a uma escala micrométrica em diâmetro. Conforme poderia ser esperado, quantidades maiores de nanossomas com diâmetros menores, 20 - 200 nm, foram vistas nas amostras sonicadas, comparadas com as amostras não sonicadas. Não foi possível observar diferenças claras nas imagens cryoEM entre as amostras de nanossomas velhos e novos, nem no caso de não sonicadas ou de sonicadas. Como as amostras continham partículas com uma distribuição de tamanho e formato muito ampla, o cálculo e a apresentação dos diâmetros médios não seria relevante e produziria somente uma informação errada.

Morfologia geral

As imagens dos nanossomas através de cryoEM mostrou membranas bem definidas, com uma espessura de aproximadamente 7 nm. As

amostras sonicadas mostraram um grau maior de nanossomas pequenos, que com frequência, eram vistos como partículas separadas, em comparação com as amostras não sonicadas onde os nanossomas estavam quase sempre em contato um com o outro. A membrana mais externa das partículas não sonicadas, tanto nas amostras velhas como frescas, com frequência envolveu mais de um nanossoma, fazendo com que fosse difícil a diferenciação entre os nanossomas vizinhos.

Lamellaridade

A cryoEM mostrou que os nanossomas aparecem tanto como unilamelares como multilamelares. Foram encontrados mais nanossomas unilamelares nas amostras sonicadas, em comparação com as amostras não sonicadas. O número de camadas de membrana envolvendo as partículas multi-lamelares variou de 2 lamelas até estruturas semelhantes a uma cebola, com mais de dez camadas de membrana. Isso parece também como se as partículas grandes pudessem esconder as menores, onde as membranas não são próximas. No entanto, é possível que a espessura do gelo permita que estes nanossomas escondidos sejam localizados, especialmente ao longo do eixo.

Agregação

A cryoEM não mostrou muitos agregados de nanossomas com três dimensões em qualquer das amostras. As partículas nas amostras não sonicadas estavam principalmente em contato estreito e com frequência, era difícil diferenciar-se onde termina um nanossoma e começa outro, porque com frequência, eles compartilhavam a camada/camadas de membrana mais externa.

Conclusão

As amostras de nanossomas mostraram um espécime muito heterogêneo com partículas de várias morfologias e diâmetros que variavam de 20 nm até a escala micrométrica. Os nanossomas unilamelares com

diâmetros menores, 20 - 200 nm, eram vistos com muito mais frequência nas amostras sonicadas, em comparação com as amostras não sonicadas. Parece que a sonicação quebra efetivamente as partículas grandes multilamelares vistas nas amostras não sonicadas, em nanossomas pequenos unilamelares.

5 No entanto, ainda foram observados lipossomas grandes multi- lamelares nas amostras sonicadas e eles, com frequência, eram separados de uma forma melhor, em comparação com as partículas multilamelares grandes nas amostras não sonicadas. A sonicação prolongada poderá resultar em uma ruptura mais completa das partículas grandes. Não haviam diferenças visíveis
10 entre as amostras de nanossomas velhos contra os novos, comparando-se as amostras não sonicadas ou as sonicadas.

Importância da solução salina na redução da nefrotoxicidade AmB

A toxicidade relacionadas com a dose, especialmente a nefrotoxicidade, tem sido o principal empecilho na administração parenteral da
15 anfotericina B. A anfotericina B é conhecida como ligando-se nas membranas ricas em esterol e sofrem a formação de poros auto-montados, levando à lise destas células. Os rins, sendo ricos no conteúdo de colesterol e macrolídeos de polieno, como a anfotericina B tendo uma alta afinidade com colesterol, apresentam um cenário complexo, limitando o uso de tais compostos como
20 agentes terapêuticos. O encapsulamento da anfotericina B e em uma formulação de lipídios contendo colesterol tem sido uma vantagem inadequada (ver a Tabela 2 abaixo)

Formulação de anfotericina N	Nefrotoxicidade ¹ (%)
Lipossomal Amp B	10 - 20
Dispersão coloidal Amp B	25 - 40
Complexo de lipídios anfotericina B	42 - 63
Deoxicolato de anfotericina B	34 - 60 ²

Além disso, está sendo obtido o remédio aparente para superar a toxicidade da anfotericina B através da formulação como uma suspensão em
25 solução salina, onde se sabia que uma anfotericina anterior precipitaria em solução salina. Nesta invenção, a anfotericina B foi imobilizada na matriz que

continha colesterol, evitando a movimentação e a precipitação conseqüente. O produto desta invenção - anfotericina B nanossomal contendo colesterol em suspensão salina, reduz drasticamente a nefrotoxicidade.

5 Embora os nanossomas contendo ergosterol possam permitir concentrações maiores de anfotericina B e possam ser de valor somente para o tratamento de Leishmaniase visceral, conforme apresentado por esta invenção, a substituição de

10 Ergosterol com colesterol em anfotericina B nanossomal em suspensão salina é requerida para atividade potente contra leveduras, mofo e dermatófitos, assim como leishmania.

15 A invenção para incluir uma solução salina como meio de suspensão é baseada na hipótese de que a interrupção da função renal causada pela anfotericina B em comparação com a azotemia, é associada com uma redução na velocidade de filtração glomerular (GFR) e com o fluxo do sangue renal, redução na habilidade de concentração, acidulação urinária alterada, e perda de potássio. A nefrotoxicidade da anfotericina B é relacionada com as suas propriedades ionóforas sobre membranas biológicas. (Schell R E: Amphotericin B induced nephrotoxicity: Influence of Sodium Status (Letter). Nephron 1992; 60:52).

20 A toxicidade glomerular pode se desenvolver rapidamente após uma única dose de anfotericina B ou se desenvolver lentamente após dias a semanas de terapia com anfotericina B, dependendo do status da hidratação e da sustentação da função renal do paciente. É relatado que a administração da solução salina intravenosa antes e após as infusões de anfotericina B, uma prática conhecida como “carga de sódio” interfere com a velocidade de
25 filtração glomerular causada pela anfotericina B (R Sabra & R A Branch (1991) Mechanism of Amphotericin B - Induced Decrease in Glomerular Filtration Rate in Rats. Antimicrobial Agents and Chemotherapy: 35; 2509 - 2514).

LD₅₀

Aumentando-se a relação entre lipídios e o fármaco e também o uso de solução salina para a colocação em suspensão dos nanossomas, isto fez com que estes nanossomas ficassem muito seguros. Durante os estudos de toxidez pré-clínica de animais, o LD₅₀ não pôde ser determinado, porque nenhum animal morreu até 60 mg/kg e não podiam ser administradas mais de 60 mg/kg. Estes nanossomas estão prontos para serem usados em uma suspensão líquida e assim sendo, não podem ser administrados como dose concentrada e os animais não poderiam tolerar um volume maior do que uma dose de 60 mg. Foi observado que nem colesterol sem a solução salina como na anfotericina lipossomal B (fazer referência a toxidez da AmBisoma/referência de composição mostrada acima) nem a solução salina sem colesterol conforme no complexo de lipídios e anfotericina B (fazer referência à toxidez do Abelcet/referência de composição mostrada acima) reduzem a nefrotoxidez a níveis insignificantes, como a nossa composição única de nanossomas com relação elevada entre lipídios e o fármaco, em suspensão salina contendo colesterol. A eficácia in vitro da anfotericina B nanossomal contendo colesterol em solução salina é várias vezes maior (em locais, 10 vezes) (MIC muitas vezes menor) do que a anfotericina B convencional contra o grande número de isolatos clínicos de leveduras e mofos. A razão da atividade maior é que estes nanossomas, assim como a membrana de fungos, ambos têm um ambiente hidro-lipofílico semelhante e favorável, de forma que a transferência da molécula do nanossoma para o fungo é fácil.

25 Estabilização de nanossomas em colesterol & solução salina

A estabilidade dos nanossomas de anfotericina B nanossomal contendo colesterol em solução salina sem qualquer outro agente de estabilização, tornou-se possível através da composição nova da invenção atual. A anfotericina B nanossomal da invenção atual, por si própria, é estável

durante pelo menos 24 meses contados da data de fabricação. Assim sendo, é definido que o colesterol e a solução salina têm uma função importante no aumento da estabilidade da composição.

EXEMPLOS:

5 EXEMPLO 1: 1 - 15 mg de encapsulamento do fármaco

Na anfotericina nanossomal contendo colesterol em quantidade diferente de solução salina, i.e., 1 mg a 15 mg de anfotericina B/ml podiam ser intercaladas com sucesso sem aumentar a quantidade de lipídios, significando que para cada 1 a 15 mg/ml de formulações de anfotericina B, a quantidade de lipídios é fixada em 45 mg, i.e., a relação entre lipídios e o fármaco varia de 45:1 a 45:15.

Determinação da “Relação fármaco:lipídios nos nanossomas” e “Anfotericina B no sobrenadante” das formulações inovadas:

	Detalhes da amostra	:	Código do produto
15	1 mg/ml		NAmB-C/1
	3 mg/ml		NAmB-C/3
	5 mg/ml		NAmB-C/5
	10 mg/ml		NAmB-C/10
	15 mg/ml		NAmB-C/15

20 O ensaio da anfotericina B e dos teores residuais de metanol foram determinados, e os resultados são apresentados abaixo.

Observações:

(A) Determinação da anfotericina B em líquido sobrenadante:

25 Todas as amostras foram centrifugadas e o líquido sobrenadante foi retirado para se executar o ensaio para a anfotericina B. A leitura a 405 nm em espectrofotômetro visível em UV foi determinada como sendo negligível, o que estabelece a ausência da anfotericina B no líquido sobrenadante, significando que não existe nenhuma anfotericina B não encapsulada na formulação inovada.

(B) Relação fármaco:lipídios em nanossomas

Relação determinada de fármaco:lipídios nos nanossomas das formulações acima. As observações são apresentadas abaixo:

	Código do produto	Concentração	Relação fármaco/lipídios
5	NAmB-C/1	1 mg/ml	1:44.6
	NAmB-C/3	3 mg/ml	3:44.4
	NAmB-C/5	5 mg/ml	5:45.3
	NAmB-C/10	10 mg/ml	10:45.01
	NAmB-C/15	15 mg/ml	15:45.8
10	EXEMPLO 2: Nefrotoxicidade relativa da anfotericina B nanossomal em solução salina versus suspensão de dextrose:		

A nefrotoxicidade inerente da anfotericina B tem sido o maior obstáculo na liberação do potencial total deste fármaco antifúngico potente de espectro amplo. Apesar dos deméritos conhecidos da dextrose na ação do fármaco, conforme elaborado anteriormente, e a possibilidade das vantagens da solução salina, a dextrose não podia ser substituída pela solução salina porque ironicamente a anfotericina B é bem conhecida como sendo precipitada em solução salina. O projeto único desta anfotericina B nanossomal permite a formulação estável em suspensão salina, através da imobilização da anfotericina B em matriz nanossomal. Para avaliar a nefrotoxicidade da dextrose versus solução salina, foram executadas as seguintes experiências:

As experiências foram executadas em dois grupos de camundongos albinos suíços, cada grupo constituído por 6 machos e 6 fêmeas. Um grupo foi administrado com uma formulação salina e outro com dextrose, em uma dose diária de 3 mg/kg para os primeiros 8 dias, que foi posteriormente aumentada para 5 mg/kg/dia para o nono e o décimo dia. O sangue foi coletado em dias alternados da metade do número de cada grupo de animais, e o soro de creatinina foi determinado a partir do segundo dia até

o 11º dia, diariamente.

DADOS DA QUÍMICA CLÍNICA EM ANIMAIS INDIVIDUAIS

Anfotericina B nanossomal em 5% de dextrose dose: 3 mg/kg/dia

5 mg/kg/dia desde o dia 8

5 Tabela 3

ID do animal	Creatinina mg/dl)										
	Dia										
	0	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Mb4941	0,30	0,25		0,17		0,22		0,11	0,25		0,12
Mb4942	0,28	0,17		0,25		0,12		0,23	0,17		0,19
Mb4943	0,16	0,15		0,13		0,17		0,34	0,25		0,16
Mb4944	0,24		0,21		0,22		0,16	0,22		0,18	
Mb4945	0,12		0,19		0,19		0,17	0,16		0,12	
Mb4946	0,20		0,23		0,22		0,18	0,2		0,22	
Mb4947	0,18	0,14		0,15		0,19		0,16	0,14		0,12
Mb4948	0,16	0,19		0,10		0,21	Morto	-	-	-	-
Mb4949	0,13	0,20	Morto	-	-	-		-	-	-	-
Mb4950	0,14		0,14		0,19		0,25	0,12		0,18	
Mb4951	0,18		0,17		0,25		0,17	0,14		0,06	
Mb4952	0,14		0,13		0,24		0,14	0,07		0,08	
Média	0,19	0,18	0,18	0,16	0,22	0,18	0,18	0,18	0,20	0,14	0,15
DP	0,06	0,04	0,04	0,06	0,02	0,04	0,04	0,08	0,06	0,06	0,03
N	12	6	6	5	6	5	6	10	4	6	4

ID de animal - Mb4949 - encontrado morto no dia 2 após a coleta de amostra de sangue

ID de animal - Mb 4948 - encontrado morto no dia 6 após a coleta da amostra de sangue

Tabela 4

Anfotericina B nanossomal em solução salina normal Dose: 3 mg/kg/dia

5 mg/kg/dia desde o dia 8

ID do animal	Creatinina mg/dl)										
	Dia										
	0	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Mb4953	0,16	0,17		0,20		0,10		0,08	0,16		0,15
Mb4954	0,21	0,19		0,24		0,19		0,15	0,13		0,22
Mb4955	0,15	0,27		0,21		0,12		0,12	0,11		0,23
Mb4956	0,13		0,09		0,12		0,08	0,09		0,02	
Mb4957	0,13		0,20		0,06		0,19	0,27		0,13	
Mb4958	0,15		0,26		0,15		0,22	0,11		0,20	
Mb4959	0,12	0,19		0,09		0,08		0,08	0,11		0,21
Mb4960	0,24	0,19		0,11		0,11		0,06	0,15		0,05
Mb4961	0,12	0,21		0,14		0,16		0,11	0,16		0,24
Mb4962	0,13		0,13		0,10		0,04	0,22		0,15	
Mb4963	0,19		0,18		0,17		0,16	0,14		0,27	
Mb4964	0,13		0,24		0,12		0,15	0,07		0,20	
Média	0,16	0,20	0,18	0,17	0,12	0,13	0,14	0,13	0,14	0,16	0,18
DP	0,04	0,04	0,06	0,06	0,04	0,04	0,07	0,06	0,02	0,08	0,07
N	12	6	6	6	6	6	6	12	6	6	6

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de

soro de creatinina em qualquer grupo que necessitam de experiências com doses maiores e maior duração.

Nesta experiência, dois grupos de camundongos eram constituídos de 50 camundongos com igual número de machos e fêmeas. A dose diária foi substituída por uma administração de uma dose de 10 mg/kg em dias alternados, um grupo recebendo a anfotericina B nanossomal em 5% de dextrose e o outro, em solução salina normal. Para a determinação dos níveis de soro de creatinina, o sangue foi coletado em base semanal.

Tabela 5

Anfotericina B nanossomal	Concentração de soro de creatinina em mg/dl						
	0 dia	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana	5ª semana	6ª semana
em 5% dextrose	0,19 ± 0,04	0,19 ± 0,04	0,20 ± 0,04	0,21 ± 0,07	0,23 ± 0,06	0,25 ± 0,07	0,25 ± 0,06
em solução salina normal	0,18 ± 0,05	0,18 ± 0,03	0,18 ± 0,04	0,17 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,16 ± 0,04	0,18 ± 0,04

No grupo de dextrose não foram vistas diferenças significativas até a segunda semana, e mesmo posteriormente, até seis semanas a elevação dos níveis de soro de creatinina não era significativa. O aumento no soro de creatinina além do dobro da linha de referência é visto em dois animais na quarta semana, três animais na quinta semana e um animal na sexta semana. Em um animal, na terceira semana e em outro na quinta semana, a morte parece ser relacionada com a toxidez renal do fármaco. Em geral, foi vista a nefrotoxidez em 14% dos animais.

No grupo de solução salina, os níveis de soro de creatinina permaneceram consistentes durante toda a duração da experiência de seis semanas. Somente em um animal a elevação do nível de soro de creatinina excedeu o dobro da linha de referência após seis semanas de administração. A nefrotoxidez geral é vista somente em 2% dos casos. Cinco dos camundongos morreram durante a experiência, mas a morte não parece estar relacionada com o fármaco.

EXEMPLO 3: Estabilização de nanossomas em colesterol & solução salina

A estabilidade da anfotericina B nanossomal contendo colesterol em solução salina, sem qualquer outro agente de estabilização de

membrana, durante dois anos, foi possível pela composição única relatada nesta invenção.

Teste de estabilidade em tempo real no produto acabado

- 5 Produto: Anfotericina B nanossomal contendo colesterol em solução salina
- Vida de prateleira: Esta anfotericina B nanossomal é estável pelo menos 24 meses a partir da data da fabricação
- 10 Prazo de expiração proposto: 24 meses
- Estocagem: Estocado a 2 - 8 °C
- Bateladas de controle: O teste de estudo de estabilidade da anfotericina nanossomal B foi executado em três bateladas

	Batelada nr	data de fabricação	data de expiração
15	50F07-147	08/2007	07/2009
	50F07-148	08/2007	07/2009
	50F07-149	08/2007	07/2009

Condição de estocagem: Para o estudo da estabilidade a longo prazo, os produtos são mantidos a 2 - 8 °C.

- 20 Intervalos de teste: As amostras estocadas são retiradas em intervalos predeterminados, os intervalos são como se segue:

- mês 0
- mês 3
- mês 6
- 25 mês 12
- mês 18
- mês 24

Dados do estudo de estabilidade em tempo real da anfotericina B nanossomal contendo colesterol em solução salina

Batelada nr : 50FO7-147

Data de fabricação: 08/2007

Data de expiração: 07/2009

Tabela 6

Tempo	Descrição	Material particulado	Identificação	Teor de metanol	Teor de lipídios	Ensaio
0 mês	Suspensão de cor amarela	Isento de partículas	Positivo para a anfotericina B	734,3 ppm	35,25 mg	0,996 mg
3 meses	Suspensão de cor amarela	Isento de partículas	Positivo para a anfotericina B	733,6 ppm	35,05 mg	0,994 mg
6 meses	Suspensão de cor amarela	Isento de partículas	Positivo para a anfotericina B	732,5 ppm	34,9 mg	0,991 mg
12 meses	Suspensão de cor amarela	Isento de partículas	Positivo para a anfotericina B	730,8 ppm	34,73 mg	0,987 mg
18 meses	Suspensão de cor amarela	Isento de partículas	Positivo para a anfotericina B	728,5 ppm	34,5 mg	0,984 mg
24 meses	Suspensão de cor amarela	Isento de partículas	Positivo para a anfotericina B	725,0 ppm	34,2 mg	0,980 mg

5 Dados do estudo de estabilidade em tempo real de anfotericina B lipossomal contendo colesterol em solução salina

Batelada nr : 50FO7-148

Data de fabricação: 08/2007

Data de expiração: 07/2009

10 Tabela 7

Legendas da tabela e primeiras quatro colunas da esquerda para direita: iguais à tabela anterior

Tempo	Descrição	Material particulado	Identificação	Teor de metanol	Teor de lipídios	Ensaio
0 mês	Suspensão de cor amarela	Isento de partículas	Positivo para a anfotericina B	720 ppm	35,5 mg	0,9976
3 meses	Suspensão de cor amarela	Isento de partículas	Positivo para a anfotericina B	718,5 ppm	35,35 mg	0,996
6 meses	Suspensão de cor amarela	Isento de partículas	Positivo para a anfotericina B	716,8 ppm	35,25 mg	0,9952
12 meses	Suspensão de cor amarela	Isento de partículas	Positivo para a anfotericina B	712,5 ppm	35,06 mg	0,993
18 meses	Suspensão de cor amarela	Isento de partículas	Positivo para a anfotericina B	708 ppm	34,85 mg	0,9905
24 meses	Suspensão de cor amarela	Isento de partículas	Positivo para a anfotericina B	705 ppm	34,6 mg	0,988

Dados do estudo de estabilidade em tempo real de anfotericina B lipossomal contendo colesterol em solução salina

15 Batelada nr : 50FO7-149

Data de fabricação: 08/2007

Data de expiração: 07/2009

Tabela 8

Tempo	Descrição	Material particulado	Identificação	Teor de metanol	Teor de lipídios	Ensaio
0 mês	Suspensão de cor amarela	Isento de partículas	Positivo para a anfotericina B	744 ppm	35,4 mg	1,006 mg
3 meses	Suspensão de cor amarela	Isento de partículas	Positivo para a anfotericina B	742,5 ppm	35,3 mg	1,002 mg
6 meses	Suspensão de cor amarela	Isento de partículas	Positivo para a anfotericina B	741,4 ppm	35,15 mg	0,998 mg
12 meses	Suspensão de cor amarela	Isento de partículas	Positivo para a anfotericina B	738,8 ppm	34,95 mg	0,994 mg
18 meses	Suspensão de cor amarela	Isento de partículas	Positivo para a anfotericina B	736,0 ppm	34,7 mg	0,9905 mg
24 meses	Suspensão de cor amarela	Isento de partículas	Positivo para a anfotericina B	732,5 ppm	34,4 mg	0,988 mg

5 EXEMPLO 4: Comparação da atividade in vitro da anfotericina B convencional e da anfotericina B nanossomal contendo colesterol em solução salina (anfotericina B N)

As experiências foram executadas para a determinação do espectro antifúngica e do MIC da anfotericina B nanossomal verso antifúngicas usados comumente.

10 Anfotericina B, Voriconazola, Itraconazola e Fluconazola para verificar a eficácia contra leveduras e mofos patogênicos, incluindo dermatófitos.

Os seguintes isolatos clínicos foram testados:

Fungos	Nr de isolatos
Candida albicans	20
Candida tropicalis	20
Outro diferente de Albicans Candida	20
Cryptococcus neoformans	20
Trichosporon sp.	10
Zygomycetes	25
Aspergillus sp.	25
Dematiaceous Hyphomycetes	20
Fusarium species	10
Scedodporium sp.	5
Paecilomyces sp.	5
Sporothrix schenckii	10
<u>Penicillium marneffeii</u>	<u>10</u>
Total	200

15 A atividade in vitro da anfotericina B nanossomal contendo colesterol em solução salina é várias vezes maior (em alguns casos, 10 vezes

& MIC muito menor) do que a anfotericina B convencional contra o grande número de isolatos clínicos de leveduras e mofos. Além disso, a anfotericina B era até agora conhecida por não ser efetiva contra dermatófitos, enquanto que a anfotericina B nanossomal é efetiva contra dermatófitos, como o *Trichophyton rubrum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum gypseum*, e *Epidermophyton floccosum*. A razão da atividade maior poderá ser porque estes nanossomas, assim como a membrana de fungos, ambos têm ambiente hidro-lipofílico semelhante e favorável, e assim sendo, a transferência da molécula de anfotericina B do nanossoma para o fungo é fácil.

As observações também suportam a possibilidade de redução da dose quando a anfotericina B é administrada como nanossomas contendo colesterol. A anfotericina B convencional, que é uma suspensão coloidal do fármaco em deoxicolato de sódio, é administrada como uma dose diária de 1 mg/kg de peso do corpo/dia, enquanto as suas formulações de lipídios disponíveis comercialmente desenvolvidas para superarem a toxidez que limita a dose, possuem doses que variam de 3 - 6 mg/kg de peso do corpo/dia. Doses elevadas afetam a economia do tratamento e fazem com que o fármaco seja inacessível, enquanto que a anfotericina B nanossomal contendo colesterol auxilia a reduzir a dose terapêutica e por seu lado faria com que o tratamento fosse acessível.

Dermatófitos:

1. *Trichophyton rubrum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes*.
2. *Microsporum gypseum*
3. *Epidermophyton floccosum*

Infecção da pele causada por fungos:

1. *Candida*, *Aspergillus*, *Mucor*

Espécies resistentes a azolas:

1. *Candida albicans*: N anfotericina B: Ativa (0,03-0,25)

		Anfotericina B: Ativa (0,125-1)
		Fluconazola: Variável (0,125-64)
		Voriconazola: Variável (0,03-8)
		Itraconazola: Variável (0,03-8)
5	2. Cryptococcus	N anfotericina B: Ativa (0,03-0,25)
		neoformans: Anfotericina B: Ativa (0,25-1)
		Fluconazola: Variável (0,125-16)
		Voriconazola: Variável (0,03-16)
		Itraconazola: Intermediária (0,03-4)
10	3. Aspergillus flavus	N anfotericina B: Ativa (0,03-0,5)
	A. fumigatus	Anfotericina B: Ativa (0,5-2)
		Fluconazola: Resistente (32-64)
		Voriconazola: Ativa (0,125-1)
		Itraconazola: Variável (0,03-16)
15	4. Aspergillus oryzae	N anfotericina B: Ativo (1-2)
		Anfotericina B: intermediário (2-4)
		Fluconazola: resistente (64)
		Voriconazola: intermediário (0,5-4)
		Itraconazola: ativo (0,125-0,5)
20	5. Fusarium spp.	N anfotericina B: Ativo (0,06-0,5)
		Anfotericina B: Ativo (0,5-1)-4)
		Fluconazola: Resistente (16-64)
		Voriconazola: intermediário (0,5-4)
		Itraconazola: Resistente (8-32)
25	6. Pseudallescheria boydii	N anfotericina B: Ativo (0,125-1)
		Anfotericina B: Ativo (0,5-1)
		Fluconazola: Resistente (8-32)
		Voriconazola: Ativo
		Itraconazola: Ativo

	7. <i>Rhizopus arrhizus</i> , <i>R. pusilus</i>	N anfotericina B: Ativo (0,125-0,5) Anfotericina B: Ativo (0,5-2) Fluconazola: Resistente (8-64) Voriconazola: Variável (1-8) Itraconazola: Resistente (8-16)
5		
	8. <i>Absidia corymbifera</i>	N anfotericina B: Ativo (0,06) Anfotericina B: Ativo (0,5) Fluconazola: Resistente (64) Voriconazola: Variável (2-16) Itraconazola: Resistente (16)
10		
	9. <i>Mucor spp</i>	N anfotericina B: Ativo (0,5-1) Anfotericina B: Ativo (1-2) Fluconazola: Resistente (64) Voriconazola: Resistente (8-16) Itraconazola: Resistente (0,03-8)
15		
	10. <i>Apophysomyces elegans</i>	N anfotericina B: Ativo (1) Anfotericina B: Ativo (2) Fluconazola: Resistente (64) Voriconazola: Intermediário (8) Itraconazola: Resistente (16)
20		
	11. <i>Curvularia spp.</i>	N anfotericina B: Ativo (0,03-0,125) Anfotericina B: Ativo (0,125-1) Fluconazola: Resistente (8-64) Voriconazola: Ativo (1-2) Itraconazola: Resistente (8-16)
25		
	12. <i>Alternaria spp.</i>	N anfotericina B: Ativo (0,25) Anfotericina B: Ativo (1-2) Fluconazola: Resistente (32-64) Voriconazola: Ativo (0,5-1)

		Itraconazola: Ativo (1-2)
5	13. <i>Cladophialophora bantiana</i>	N anfotericina B: Ativo (0,25-0,5) Anfotericina B: Ativo (0,5-1) Fluconazola: Resistente (32-64) Voriconazola: Ativo (0,25-2) Itraconazola: Ativo (0,5-2)
10	14. <i>Phialophora verrucosa</i>	N anfotericina B: Ativo (2) Anfotericina B: Intermediário (4) Fluconazola: Resistente (16) Voriconazola: Ativo (1) Itraconazola: Resistente (16)
15	15. <i>Scytalidium dimidatum</i>	N anfotericina B: Ativo (0,03) Anfotericina B: Ativo (0,5) Fluconazola: Resistente (32) Voriconazola: Ativo (0,5) Itraconazola: Resistente (16)
20	16. <i>Sporothrix schenckii</i>	N anfotericina B: Ativo (0,125-0,25) Anfotericina B: Ativo (0,5-1) Fluconazola: Resistente (8-64) Voriconazola: Variável (0,03-16) Itraconazola: Variável (0,03-16)
25	17. <i>Penicillium marneffeii</i>	N anfotericina B: Ativo (0,125-0,5) Anfotericina B: Ativo (0,25-1) Fluconazola: Resistente (32-64) Voriconazola: Ativo (0,25-1) Itraconazola: Ativo (1-2)
	18. <i>Trichophyton rubrum</i>	N anfotericina B: Ativo (0,06-0,125) Anfotericina B: Ativo (0,25-1) Fluconazola: Variável/resistente (4-32)

		Voriconazola: Ativo (0,25-0,5)
		Itraconazola: Resistente (8-16)
5	19. <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	N anfotericina B: Ativo (0,125-0,5) Anfotericina B: Ativo (0,5-2) Fluconazola: Resistente (32-64) Voriconazola: Ativo (0,5-1) Itraconazola: Ativo (1-2)
10	20. <i>Microsporium gypseum</i>	N anfotericina B: Ativo (0,125) Anfotericina B: Ativo (0,5) Fluconazola: Resistente (64) Voriconazola: Ativo (0,125-0,5) Itraconazola: Ativo (0,25-0,5)
15	21 <i>Paecilomyces</i> spp.	N anfotericina B: Variável (0,25-16) Anfotericina B: Intermediário (1-4) Fluconazola: Resistente (64) Voriconazola: Variável (0,125-8) Itraconazola: Variável (0,06-16)

20 Espécies resistentes a Fluconazola: *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Penicillium marneffeii*, *Sporothrix schenckii*, *Scytalidium dimidatwn*, *Phialophora verruosa*, *Cladophialophora bantiana*, *Alternaria* spp., *Cumularia* spp., *Apophysomyces elegans*, *Mucor* spp., *Absidia corymbifera*, *Rhizopus arrhizus*, *R. pusilus*, *Pseudallescheria boydii*, *Pusarium* spp., *Aspergillus fkwus*, *A. fumigatus*, *A. oryzae*, *Paecilomyces* spp.

25 Espécies variáveis de Fluconazola: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*

25 Espécies resistente a Voriconazola: *Mucor* spp.

Espécies variáveis de Voriconazola: *Sporothrix schenckii*, *Absidia Corymbifera*, *Rhizopus arrhizus*, *R. pusilus*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida Albicans*, *Paecilomyces* spp.

Espécies resistentes a Itraconazola: *Trichophyton rubrum*, *Curvularia* spp.,

Fusarium spp., *Absidia Corymbifera*, *Mucor* spp., *Apophysomyces elegans*, *Curvularia* spp., *Rhizopus arrhizus*, *R. pusilus*, *Phialophora verrucosa*, *Scytalidium dimidatum*.

Espécies variáveis de Itraconazola: *Sporothrix schencicii*, *Aspergillus flavus*,
5 *A. fumigatus*, *Candida albicans*, *Paecilomyces* spp.

Espécies variáveis de anfotericina B nanossomal: *Paecilomyces* spp.

EXEMPLO 5: TEM & fratura por congelamento SEM pré e pós-sonicação

Efeito do lipídio: Proporção de fármaco na contagem de partículas/ml, Efeito da sonicação na contagem de partículas/ml:

10 As amostras de nanossoma mostraram um espécime muito heterogêneo com partículas de várias morfologias e diâmetros, variando de 20 nm até a escala micrométrica. Os nanossomas unilamelares com diâmetros menores, 20 a 200 nm, eram vistos com muito mais frequência nas amostras sonicadas, em comparação com as amostras não sonicadas. Parece que a
15 sonicação quebra efetivamente as grandes partículas multilamelares vistas nas amostras não sonicadas em nanossomas pequenos unilamelares. No entanto, algumas partículas grandes multilamelares ainda são observadas nas amostras sonicadas, e elas serão separadas, em comparação com as partículas grandes multilamelares nas amostras não sonicadas. A sonicação prolongada poderá
20 resultar em uma quebra mais completa de partículas grandes.

Não existem diferenças claras visíveis entre as amostras velhas verso as novas, comparando-se ambas as amostras não sonicadas e/ou sonicadas. As amostras, portanto, parecem ser estáveis ao longo do período de tempo (dois anos) investigado, conforme mostrado nas figuras 1 & 2.

25 EXEMPLO 6: Uso oftamológico tópico de suspensão salina de anfotericina B nanossomal contendo colesterol:

A anfotericina B nanossomal contendo colesterol em solução salina também é estudada topicamente em olhos e descobriu-se que é segura e efetiva. Modelo de queratite *Aspergillus fumigatus* tratado com anfotericina B

nanossomal e convencional com concentrações diferentes e controles não tratados. Os resultados mostram que metade da concentração da anfotericina B nanossomal contendo colesterol em solução salina é tão efetiva quanto a anfotericina B convencional de concentração total.

5 Avaliação da eficácia e toxidez da formulação de anfotericina B nanossomal contendo colesterol em solução salina durante o tratamento de queratite fúngica experimental em coelhos.

Objetivos:

10 a. Avaliar a eficácia da anfotericina B nanossomal tópica no tratamento da queratite fúngica induzida em modelos experimentais de coelhos.

 b. Comparar a eficácia da anfotericina B nanossomal B a 0,1% e 0,05% de concentração com a anfotericina B convencional a 0,1% de concentração.

15 c. Avaliar qualquer toxidez ocular em coelhos devido ao tratamento com anfotericina B nanossomal e comparar a mesma com a toxidez devida pela aplicação tópica de anfotericina B com concentração de 0,1%.

Métodos

20 Indivíduos: coelhos brancos da Nova Zelândia - 72

 Isolato de fungo: *Aspergillus fumigatus* (ATCC 13073), *Candida albicans*, *Fusarium solani*

25 O *Aspergillus fumigatus* e o *Fusarium solani* foram cultivados em uma placa de agar com dextrose de batata a 30 °C durante 3-10 dias. Foi preparada uma suspensão conidial raspando-se suavemente a cultura com uma extensão e transferindo-se a mesma para uma solução salina estéril em um tubo cônico de 15 ml. A concentração final de conidia foi ajustada para a obtenção de 10⁶ conídias/ml. A *Candida albicans* foi cultivada em uma placa de agar com dextrose de batata durante 24h a 35 °C. Cinco colônias com > 1

mm de diâmetro foram retiradas e colocadas em suspensão em 5 ml de solução salina estéril a 0,85% em um tubo cônico estéril de 15 ml. A suspensão foi girada e as células foram contadas usando-se um hemocitômetro. A suspensão de trabalho das células de levedura foi preparada em solução salina estéril para se obter uma concentração final de 10^6 CFU/ml.

Indução e tratamento de queratite

Foi utilizado um total de 72 coelhos no estudo, dos quais 60 coelhos estavam infectados com inóculo de *Aspergillus fumigatus*, dos quais 22 coelhos foram infectados utilizando-se o modelo de lente de contato, enquanto 38 foram infectados utilizando-se a técnica intra-estromal. 8 coelhos foram infectados com isolatos clínicos de *Candida albicans* (4 coelhos com 10^8 leveduras/ml e 2 com 10^9 células/ml, através das inoculação intra-estromal e 2 coelhos foram infectados usando-se o modelo de lente de contato com 10^9 células/ml). Quatro coelhos foram infectados com isolato clínico de *Fusarium Solani* com dose de inóculo de (10^6 esporos/ml) através de técnica intra-estromal.

Indução de queratite usando lente de contato: Os coelhos foram anestesiados com quetamina e xilazina intramuscular. A anestesia da córnea foi aplicada utilizando-se proparacaína tópica a 0,5%. A membrana de pestanejar do olho direito foi removida através de dissecação penetrante. Um disco de papel de filtro de 7 mm umidificado com álcool isopropílico a 99% (Merck, USA) foi colocado no centro da córnea durante 30 segundos e o epitélio da córnea foi removido sem trauma. O olho foi rinsado com solução de lactato de sódio para remover quaisquer traços restantes do álcool isopropílico. Foi feito um padrão de abrasões com agulha na córnea centrale. O inóculo foi transferido para a córnea desnuda utilizando-se uma ponta de pipeta com furo grande e o inóculo foi retido na córnea colocando-se a lente de contato estéril (diâmetro, 14,0 mm) (Pure vision, Bosch and Lomb, Ireland). Para evitar a extrusão da lente de contato, as tampas foram fechadas

executando-se tarsorrafia com suturas de seda de 5,0. Os olhos foram examinados após 48h removendo-se a lente de contato e posteriormente, depois de cada 48h. O botão da córnea de cada um destes coelhos foi obtido e submetido a investigação microbiológica e histopatológica.

5 Indução de queratite através de injeção intra-estromal de inóculo: Os coelhos foram anestesiados com quetamina e xilazina intramuscular. A anestesia da córnea foi feita com proparacaína tópica a 0,5%. 20 litros de inóculo micótico (10^6 esporos/ml) foram injetados intra-estromalmente utilizando-se uma agulha de insulina 30G inclinada com a
10 ajuda de lâmpada de fenda. Os coelhos foram examinados após cada dois dias em relação a sinais de queratite.

Avaliação de antimicóticos: Como foi vista uma infecção persistente com o modelo de injeção intra-estromal de inóculo, o estudo do tratamento foi executado com este modelo. Para o tratamento, os coelhos
15 foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, cada um deles contendo quatro coelhos.

Os grupos inoculados com *Aspergillus fumigatus* eram:

Grupo 1) Tratado com anfotericina B nanossomal a 0,1%,

Grupo 2) Tratado com anfotericina B convencional a 0,1%,

20 Grupo 3) Tratado com 0,05% de anfotericina B nanossomal,

Grupo 4) Instilação de solução salina normal estéril (controles não tratados).

As infecções antes e após a terapia foram avaliadas atribuindo-se uma avaliação do composto por sinais clínicos diferentes, determinados
25 utilizando-se um microscópio de lâmpada de fenda.

As avaliações clínicas foram tabuladas para cada grupo, e foi feita a sua média.

Resultados

Modelo de lente de contato: Para a padronização inicial de

queratite fúngica, dos 22 coelhos usados, foram infectados oito coelhos com inóculo contendo somente suspensão de esporos de *Aspergillus fumigatus*, pelo seguinte modelo de lente de contato. No entanto, isto não apresentou nenhuma evidência de infecção clínica ou microbiológica (ambas as áreas de

5 culturas eram negativas, Tabela 1). Posteriormente, foram infectados quatorze coelhos com uma mistura de esporos e micélio, o que produziu uma infecção consistente nos coelhos, conforme visto na Tabela 1. Apesar de haver uma

10 Assim sendo, o modelo de injeção intra-estromal foi adotado para experiências posteriores, e o tratamento com antimicóticos foi iniciado no quinto dia de infecção.

Tabela 9

15 Resultados da indução de queratite fúngica nos olhos de coelhos usando o modelo de lente de contato

Número ID do coelho	Inóculo utilizado	Característica clínica	KOH/Calcioflúor microscopia	Cultura fúngica	Procedimento
SD-1	somente esporos	Ausente	-ve	-ve	Nenhuma abrasão
SD-2	somente esporos	Ausente	-ve	-ve	Nenhuma abrasão
SD-3	somente esporos	Ausente	-ve	-ve	Nenhuma abrasão
SD-4	somente esporos	Ausente	-ve	-ve	Nenhuma abrasão
SD-5	somente esporos	Ausente	-ve	-ve	Abrasão
SD-6	somente esporos	Ausente	-ve	-ve	Abrasão
KR-01	somente esporos	Ausente	-ve	-ve	Abrasão
KR-02	somente esporos	Ausente	-ve	-ve	Abrasão
KR-03	esporos + micélio	Ausente	-ve	-ve	Abrasão
KR-04	esporos + micélio	Presente	-ve	-ve	Abrasão
KR-05	esporos + micélio	Presente	-ve	+ve	Nenhuma abrasão com disco
KR-06	esporos + micélio	Presente	+ve	+ve	Abrasão com disco
KR-07	esporos + micélio	Presente	+ve	+ve	Abrasões com disco + antibiótico

Número ID do coelho	Inóculo utilizado	Característica clínica	KOH/Calcioflúor microscopia	Cultura fúngica	Procedimento
KR-08	esporos + micélio	Presente	+ve	+ve	Abrasões com disco + antibiótico
KR-09	esporos + micélio	Presente	-ve	+ve	Abrasões + disco + antibiótico
KR-10	esporos + micélio	Presente	-ve	+ve	Abrasões + disco + antibiótico
KR-11	esporos + micélio	Presente	-ve	+ve	Abrasões + disco + antibiótico
KR-12	esporos + micélio	Ausente	-ve	+ve	Abrasões + disco + antibiótico
KR-13	esporos + micélio	Presente	+ve	+ve	Abrasões + disco + antibiótico
KR-14	esporos + micélio	Presente	-ve	+ve	Abrasões + disco + antibiótico
KR-15	esporos + micélio	Presente	-ve	+ve	Abrasões + disco + antibiótico
KR-16	esporos + micélio	Presente	-ve	+ve	Abrasões + disco + antibiótico

Avaliação da terapia antifúngica utilizando modelo intra-estromal: Coelhos não tratados tinham uma avaliação média de $16,1 \pm 4,1$ no dia 15. No entanto, os coelhos tratados com anfotericina B nanossomal a 0,1% tinham uma avaliação média de $8,6 \pm 2,37$ SD, o que estatisticamente é significativo, quando comparado com o grupo não tratado ($p < 0,001$). Da mesma forma, os grupos tratados com anfotericina B nanossomal a 0,05% e anfotericina B convencional a 0,1% tinham uma avaliação média de $8,8 \pm 2,37$ SD e $8,4 \pm 2,0$ SD, respectivamente.

Havia uma diferença significativa na cura quando os coelhos foram tratados com os três fármacos, quando comparado com o grupo não tratado, e era estatisticamente significativo ($p < 0,001$). No entanto, a avaliação clínica do composto de 0,05% da formulação nanossomal é semelhante ao 0,1% do fármaco convencional para a queratite por *Aspergillus*.

Tabela 10

S.No	Antimicóticos	Avaliação média do composto clínico (n=38)							
		DO	D2	D4	D5	D7	D9	D 11	D15
1	Anfotericina B nanossomal a 0,1%	0	7,2	13,1	13,6	17,88	14,23	12,05	8,66
2	Anfotericina B nanossomal a 0,05%	0	8,35	13,43	13,7	14,45	13,1	10,78	8,8
3	Anfotericina B convencional a 0,1%	0	8,3	13,6	14,5	14,5	12,3	11,5	8,4
4	Controles não tratados	0	8,4	14,4	16,1	16,5	16,1	16,3	16,1

EXEMPLO 7: Evidência experimental de “administração dérmica de anfotericina B mediada por nanossoma de colesterol-fosfolipídios” projetada

de forma inovada

A anfotericina B, bem conhecida por não ser absorvida através da pele, tem um desenvolvimento limitado de uma formulação tópica efetiva que foi superado por esta invenção através do encapsulamento inovado da anfotericina B em nanossomas de fosfolipídios/colesterol. A penetração e a administração dérmica da anfotericina B encapsulada/nanossomas poderá ser atribuída às vantagens específicas dos nanossoma de fosfolipídios-colesterol, i.e., à interação dos fosfolipídios com lipídios intercelulares; na presença de umidade em conjunto com lipídios; e as alterações nas propriedades psicoquímicas, tais como a solubilidade e a quebra das moléculas de anfotericina B, conforme for desejado. Além disso, como foi observado, a retenção obtida de anfotericina B na pele durante a aplicação de anfotericina B nanossomal em formulação inovada é uma das mais procuradas após a atuação para uma interação melhorada de receptor-fármaco, assim como para a ação prolongada da anfotericina B.

Os resultados, conforme obtido após o estudo do comportamento de permeação na pele e análise fotográfica marcada fluorescente, convincentemente aponta na direção da superioridade da formulação de anfotericina B nanossomal, vis-a-vis o creme de anfotericina B preparado convencionalmente. Isto forma a base da novidade na anfotericina B nanossomal para a administração dérmica tópica da anfotericina B.

Objetivos:

Estudar a influência dos nanossomas contendo colesterol em formulação salina sobre a administração dérmica de anfotericina B em comparação com o desenvolvimento de creme de anfotericina B convencional do meio de estudo adequado para estudos de permeação

Método de desenvolvimento e validação para análise

Estudos de permeação in vitro usando célula de difusão de Franz

Determinação da retenção do fármaco na pele

Monitoração do transporte do fármaco (estudos de fluorescência marcada)

A anfotericina B está de acordo com a classe IV de fármacos da BCS, e portanto é difícil de penetrar em qualquer barreira biológica, incluindo a pele. Por várias razões são incluídos os seguintes:

5 Problemas específicos do fármaco

Solubilidade

Divisão

Problema específico na pele (barreira dura resistente de queratina)

Interações fármaco-pele

10 Interações não apropriadas devido a diferença nas propriedades psicoquímicas do fármaco e da pele

Apesar das tentativas anteriores para se executar uma aplicação tópica útil, a molécula volumosa de anfotericina B é difícil de ser absorvida através da pele. Como resultado, ninguém pôde atingir este objetivo com sucesso. O problema fundamental da molécula é a sua propriedade psicoquímica, assim como a barreira da pele. Isto gera uma necessidade de se expor o potencial do sistema nanossomal para a administração tópica. Aqui, a hipótese é baseada no princípio de que o fármaco dentro do ambiente vesicular aqua-lipoidal requereria um conjunto de propriedades psicoquímicas diferentes para interagir favoravelmente, para migrar mais profundamente para dentro das camadas da pele. A umidade dentro das vesículas, juntamente com a molécula lipídica, é a responsável principal da função na transferência melhorada do fármaco, vis-a-vis os sistemas convencionais. Além disso, a integração de fosfolipídios com os lipídios da pele ajuda a produzir um meio favorável para uma administração melhorada.

25 Metodologia

Estudos de difusão e retenção: A permeação na pele da anfotericina B utilizando sistemas diferentes de veículos foi estudada utilizando-se a célula de difusão de Franz. A área efetiva de permeação da

célula de difusão e da célula receptora era a de 3,14 cm² e os volumes das células respectivas eram 10 ml e 30 ml. A temperatura do fluido receptor foi mantida em 32 ± 1 °C. O compartimento receptor continha Briz-25 (5%) + docusato sódico (DOS) (1%) em água destilada, para facilitar a condição de penetração.

A pele abdominal do camundongo Laca macho (quatro a seis semanas de idade) foi montada, após a remoção dos pêlos e a retirada de gordura da pele, entre o doador e o compartimento receptor. Uma formulação equivalente a 358,5 µg (creme nanossomal/convencional) foi aplicada sobre o compartimento do doador, após o equilíbrio da pele com o meio de mergulho, durante 2h. As amostras (1 ml) foram retiradas através da conexão de amostragem do compartimento receptor, com substituição, em intervalos predeterminados, e foi analisada por espectrofotometria UV depois de diluição apropriada.

O caráter fluorescente inerente ao estudo de migração marcado com fluorescência da anfotericina B foi explorado para se visualizar a migração e a localização do fármaco com o tempo. Os camundongos Laca tiveram os pêlos raspados utilizando-se creme de remoção de pêlos um dia antes do estudo. Os camundongos foram seccionados sem sofrimento em intervalos predeterminados, e a pele foi imediatamente lavada com PBS pH 7,4 e guardada em formalina a 10% a 20 °C, até o crio-microseccionamento. As seções foram vistas sob microscópio de fluorescência com filtro F2.

Observações

Estudos de difusão e retenção: Foi tentada uma faixa de sistemas de solventes e finalmente um sistema composto de Briz-35 (5%) + docusato sódico (1%) foi escolhido como meio para o mergulho. O objetivo deste estudo era avaliar a penetração, retenção e permeação do fármaco para dentro, na e através das camadas da pele, respectivamente. A observação principal é que acontece uma retenção apreciável do fármaco dentro das

camadas da pele depois da aplicação nanossomal (i.e., $1,291 \pm 0,04$) vis-avis o creme convencional ($0,142 \pm 0,05$). No entanto, com relação à permeação, o fármaco anfotericina B não conseguiu penetrar através das camadas da pele (em ambos os casos dos sistemas nanossomal e do convencional), sendo insignificante, conforme mostrado na figura 3.

Figura 3. Seção transversal fluorescente da pele após a aplicação de (a) creme de anfotericina B convencional na meia hora; (b) creme de anfotericina B convencional em 1h; (c) creme de anfotericina B convencional em 2h; (d) formulação de anfotericina B nanossomal em meia hora (e) formulação de anfotericina B nanossomal em 1h (f) formulação de anfotericina B nanossomal em 2h.

Tabela 11

Liberação e retenção do fármaco de anfotericina B

S.No.	Formulação	Meio utilizado	% de permeação do fármaco	Fármaco retido (μg por cm^2)
1	Anfotericina B nanossomal	5% Briz35 + 1% DOS em DW	$0,3 \pm 0,015$	$1,291 \pm 0,04$
2	Creme de anfotericina B convencional	5% Briz35 + 1% DOS em DW	$0,1 \pm 0,017$	$0,142 \pm 0,05$

Estudo de migração marcada fluorescente: o estudo de marcação fluorescente (após a aplicação das formulações convencional e nanossomal) para monitorar a penetração do fármaco na camada da pele, foi mostrado na figura 1. Ele constitui a monitoração em intervalos de tempo diferentes, i.e., 0,5, 1,0, 2,0 horas. O estudo revelou uma diferença apreciável nestes intervalos. A diferença mais importante foi encontrada após 2h de estudo.

A conclusão dos estudos de comportamento de permeação (célula de difusão de Franz) e dos estudos de penetração (estudos da pele marcada fluorescente) aponta para a habilidade das vesículas nanossomais para melhorarem a administração da anfotericina B. Conforme mostrado pelos dados de retenção do fármaco, assim como a figura da histologia da pele após 2h, a anfotericina B contida nos nanossomas é capaz de penetrar apreciavelmente, em comparação com a formulação do fármaco

convencional. A permeação pobre da anfotericina B nanossomal, assim como da formulação do fármaco convencional, revela que o fármaco não consegue atravessar a camada da pele e portanto não é adequado para a administração transdérmica do fármaco de anfotericina B. Assim sendo, a anfotericina B nanossomal mostrou um bom potencial para a administração dérmica. A penetração pobre serve mesmo como uma vantagem, porque ela não permite que a anfotericina B seja absorvida sistemicamente.

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação para o tratamento de infecções fúngicas, caracterizada pelo fato de ser constituída por: Anfotericina B contendo colesterol em uma suspensão.
- 5 2. Formulação de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato da relação entre lipídios e anfotericina B variar de 45:1 a 45:15.
3. Formulação de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato da suspensão usada ser uma suspensão salina.
4. Formulação de acordo com a reivindicação 1, caracterizada
10 pelo fato da anfotericina B ser sonicada para converter as partículas em menos e menores nanossomas lamelares, dentro de diâmetros de 20 - 200 nm.

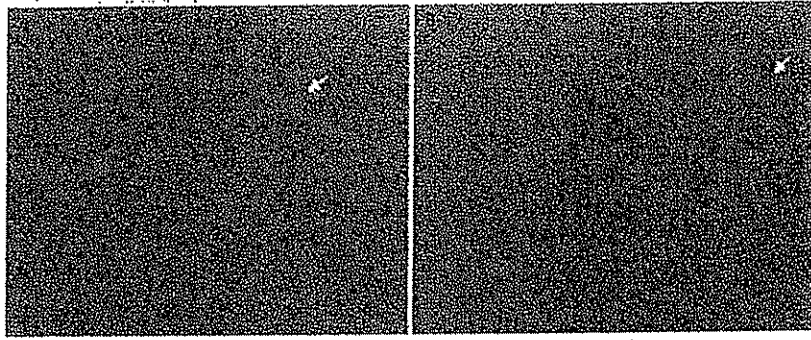


Fig. 1

Imagens cryoEM de amostras de lipossoma (A) sonificado fresco e (B) não sonificado com 2 anos de idade. Lipossomas com duas camadas de membrana (seta branca) e lipossomas com estrutura semelhante à cebola (seta preta). Barra de escala representa 200nm.

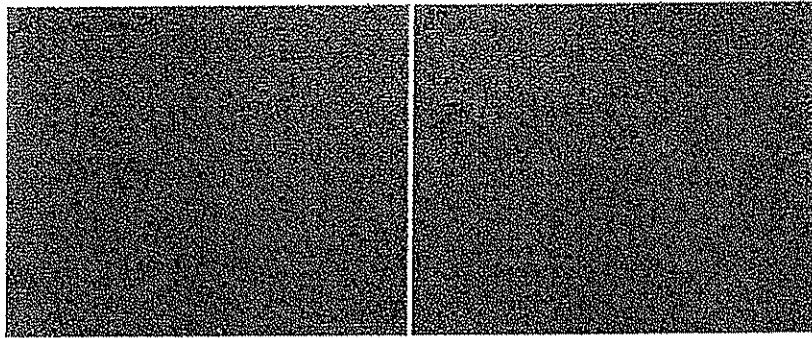


Fig. 2

Imagens cryoEM de amostras de lipossoma (A) sonificado fresco e (B) não sonificado com 2 anos de idade mostrando lipossomas unilamelares aprisionados dentro de lipossomas unilamelares maiores (seta preta). Barra de escala representa 200nm.

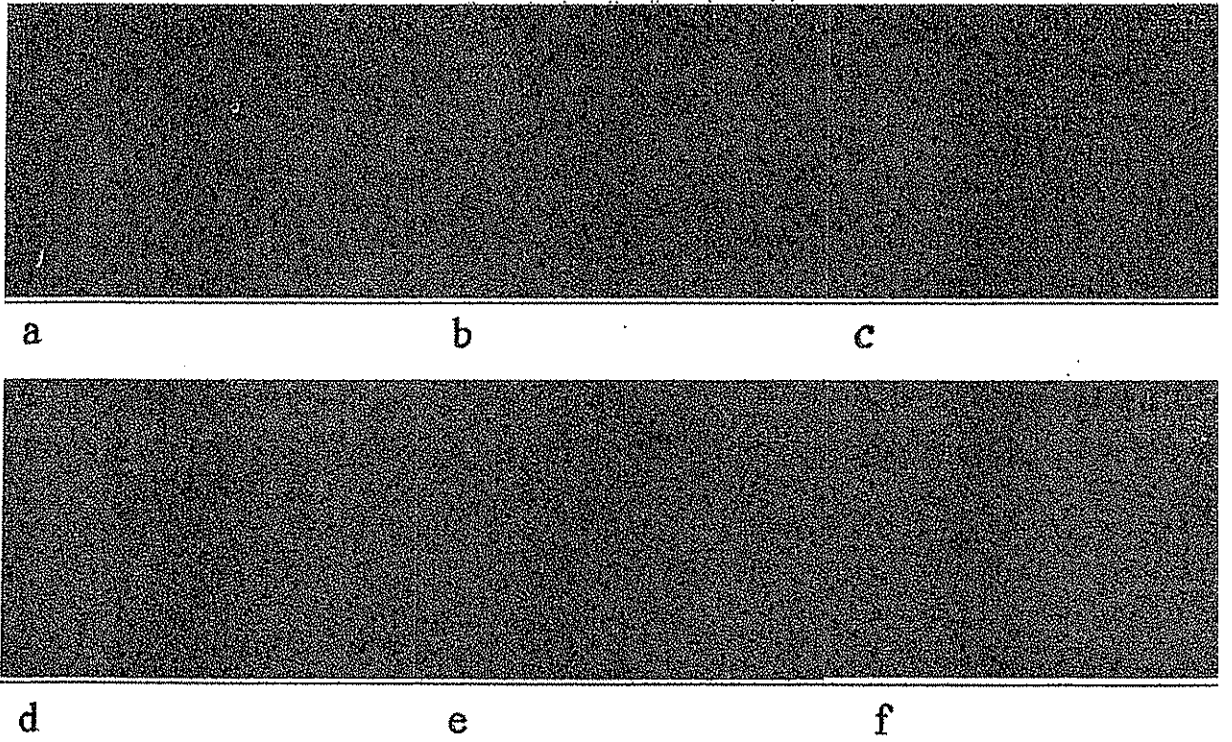


Fig. 3

RESUMO

“FORMULAÇÃO PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES FÚNGICAS”

5 Uma formulação nova para o tratamento de infecções fúngicas que é constituída por anfotericina B nanossomal contendo colesterol em uma suspensão salina.