



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

Número do Processo: BR 10 2018 010542 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 48031918000124

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Quirino de Andrade, 215

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 01049-010

País: Brasil

Telefone: 11 56270217

Fax: 11 56270103

Email: auin@unesp.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): SÍNTESE DE COMPOSTOS GUANIDÍNICOS E COMPOSTOS GUANIDÍNICOS SINTETIZADOS PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE

Resumo: A presente patente de invenção descreve a síntese de compostos guanidínicos e os respectivos compostos guanidínicos sintetizados para o tratamento de leishmanioses, cujos testes, em formas promastigotas e amastigotas em *L. amazonensis*, resultaram em alta atividade e alto índice de seletividade, solucionando o problema da alta toxicidade e pouca eficácia dos medicamentos atualmente em uso.

Figura a publicar: 1

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Sérgio Victor Mastrorocco

Numero OAB: 296946SP

Numero API: 1705

CPF/CNPJ: 02990560823

Endereço: Rua Amaral Gama, 333 - Conjunto 164 - Santana

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 02018-001

Telefone: (11) 2639-7200

Fax: (11) 2973-5032

Email: sergio@mastrorocco.com.br

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 4

Nome: EDUARDO RENE PEREZ GONZALEZ

CPF: 21623042879

Nacionalidade: Cubana

Qualificação Física: Físico, químico, meteorologista, geólogo, oceanógrafo e afins

Endereço: Rua Claudionor Sandoval, 681 - Vila Rosa

Cidade: Presidente Prudente

Estado: SP

CEP: 19023-200

País: BRASIL

Telefone: (11) 562 70217

Fax: (11) 562 70103

Email: auin@unesp.br

Inventor 2 de 4

Nome: RAFAEL DIAS DO ESPÍRITO SANTO

CPF: 32559041880

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Físico, químico, meteorologista, geólogo, oceanógrafo e afins

Endereço: Rua José Alfredo da Silva, 1405 - Vila Tazitsu

Cidade: Presidente Prudente

Estado: SP

CEP: 19023-210

País: BRASIL

Telefone: (11) 562 70217

Fax: (11) 562 70103

Email: auin@unesp.br

Inventor 3 de 4

Nome: MARCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA

CPF: 17998438827

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Rua Dr. Aldo Lupo, 55 - Vila Harmonia

Cidade: ARARAQUARA

Estado: SP

CEP: 14802-520

País: BRASIL

Telefone: (11) 562 70217

Fax: (11) 562 70103

Email: auin@unesp.br

Inventor 4 de 4

Nome: ANGELA MARIA ARENAS VELÁSQUEZ

CPF: 23469584842

Nacionalidade: Colombiana

Qualificação Física: Físico, químico, meteorologista, geólogo, oceanógrafo e afins

Endereço: Rua Luiz Saia, 51, Apto 21 - Parque Arnold Schmidt

Cidade: São Carlos

Estado: SP

CEP: 13564-010

País: BRASIL

Telefone: (11) 562 70217

Fax: (11) 562 70103

Email: auin@unesp.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	FUNDUNESP GRU DEPÓSITO PI 004 - 29409161709989989.pdf
Procuração	procuracao FUNDUNESP para o INPI.pdf
Documento de Cessão	17AUIIN016- TERMO DE CESSÃO ASSINADO.pdf
DECLARAÇÃO NEGATIVA DE ACESSO	17AUIIN016-certidao negativa.pdf
Relatório Descritivo	160518_relatorio.pdf
Reivindicação	160518_reivindicacao.pdf
Desenho	160518_desenhos.pdf
Resumo	160518_resumo.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

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

INSTRUÇÕES:

A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal. O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo. Serviço: 200-Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Física.

Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Jurídica.

					001-9					00190.00009 02940.916170 09989.989174 1 73580000007000				
Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço														
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO CPF/CNPJ: 48031918000124														
RUA QUIRINO DE ANDRADE 215, SAO PAULO -SP CEP:01049010														
Sacador/Avalista														
Nosso-Número			Nr. Documento			Data de Vencimento			Valor do Documento			(=) Valor Pago		
29409161709989989			29409161709989989			29/11/2017			70,00					
Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ/Endereço														
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088.0001-37														
PRACA MAUA 7 - 14 ANDAR - SALA 1415 , RIO DE JANEIRO - RJ CEP: 20081240														
Agência/Código do Beneficiário										Autenticação Mecânica				
2234-9 / 333028-1														

					001-9					00190.00009 02940.916170 09989.989174 1 73580000007000				
Local de Pagamento										Data de Vencimento				
PAGÁVEL EM QUALQUER BANCO ATÉ O VENCIMENTO										29/11/2017				
Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ										Agência/Código do Beneficiário				
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088.0001-37										2234-9 / 333028-1				
Data do Documento		Nr. Documento		Espécie DOC		Aceite		Data do Processamento		Nosso-Número				
31/10/2017		29409161709989989		DS		N		31/10/2017		29409161709989989				
Uso do Banco		Carteira		Espécie		Quantidade		xValor		(=) Valor do Documento				
29409161709989989		17		R\$						70,00				
Informações de Responsabilidade do Beneficiário										(-) Desconto/Abatimento				
A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal.														
O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo.														
Serviço: 200-Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT										(+) Juros/Multa				
										(=) Valor Cobrado				

Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço										Código de Baixa				
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO CPF/CNPJ: 48031918000124										Autenticação Mecânica				
RUA QUIRINO DE ANDRADE 215,										-				
SAO PAULO-SP CEP:01049010										Ficha de Compensação				
Sacador/Avalista														



FUNDACAO PARA O DESENVOLVIMENTO DA UNESP Agência: 0239 Conta Corrente: 13-002549-6

DETALHE DO COMPROMISSO

Convênio: 0033-0239-004900019792 **Conta de Débito:** 0239-000130027340

Tipo de Pagamento: BLQ Outros

Código de Barras: 00190000090294091617009989989174173580000007000

No. compromisso banco: 1026378000300004 **No. compromisso cliente:** 989989/DS1 1011

Nome/Razão Social do Beneficiário Original: 000009853INPI - INST. NACIONAL

Nome/Razão Social do Pagador Efetivo: FUNDACAO PARA O DESENVOLVIMENT

CPF/CNPJ do Pagador Efetivo: 57.394.652/0001-75

Valor Nominal: 70,00

Desc./ Abat.: 0,00 **Juros:** 0,00

Data de Vencimento: 27/11/2017

Data de Pagamento: 27/11/2017

Situação: Efetivado

No. Lista de Débito: **No. Protocolo:** PGTFORNB27112017900124686

Autenticação: 11CBC4E201ED592F005238B

Valor a Pagar: 70,00[retornar](#)**Central de Atendimento
Santander Empresarial**4004-2125 (Regiões Metropolitanas)
0800 726 2125 (Demais Localidades)**SAC 0800 762 7777
Ouvidoria 0800 726 0322**[imprimir](#)

P R O C U R A Ç Ã O

Por este instrumento, a **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30/01/1976, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, CEP 01049-010, São Paulo/SP, inscrita no CNPJ do MF sob o nº 48.031.918/0001-24, doravante designada simplesmente **UNESP**, neste ato, representada por seu Magnífico Reitor, de acordo com o Art. 34, I de seu Estatuto, Prof. Dr. **SANDRO ROBERTO VALENTINI**, brasileiro, professor universitário, portador do RG nº 10.289.419-X SSP/SP, inscrito no CPF/MF sob o nº 083.891.058-02, ou quem legalmente o substitua, nomeia e constitui seus procuradores, **1) LEOPOLDO CAMPOS ZUANETI**, brasileiro, advogado, devidamente inscrito na Ordem dos Advogados do Brasil Seção de São Paulo sob o número 235.031; **2) SÉRGIO VICTOR MASTROROCCHO**, brasileiro, advogado, devidamente inscrito na Ordem dos Advogados do Brasil Seção de São Paulo sob o número 296.946, e **3) VITOR GARCIA KOPP**, brasileiro, engenheiro, portador do RG nº 36.688.444-X SSP/SP, inscrito no CPF/MF sob o nº 375.214.338-07, outorgando-lhes poderes para representá-la perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, para o fim de requerer e processar direitos de propriedade intelectual, tais como patentes de invenção, de modelos de utilidade, desenhos industriais, registros de marcas de produto, de serviço, coletivas ou de certificação, de indicações geográficas, cultivares, direitos de autor, de programas de computador e mantê-los em vigor com amplos e ilimitados poderes para assinar petições, autorizações para cópia, termos de cessão de direitos, acordos de gestão e compartilhamento de propriedade intelectual, documentos diversos relacionados ao processo administrativo de proteção de direitos de propriedade industrial, incluindo, mas não se limitando aos documentos já utilizados pelo INPI, bem como àqueles que vierem a ser adotados e utilizados para instrução processual de patentes, modelos de utilidades, marcas, desenhos industriais e programas de computador, pagar taxas, retribuições, impostos, fazer prova de uso das invenções patenteadas ou das marcas registradas, efetuar pagamentos e receber restituições, dando as respectivas quitações, apresentar oposições, recursos, réplicas, desistir, renunciar, anotar, averbar contratos de licença e transferências de tecnologia, elaborar notificações extrajudiciais, requerer prorrogação dos prazos de proteção, fazer declarações, opor, protestar, impugnar, recorrer, pedir reconsideração, manifestar-se sobre oposições e recursos, obter vista de processos, cumprir exigências, apresentar defesas escritas ou orais, desistir, replicar, transigir, receber, juntar e retirar documentos, requerer caducidade e contestar pedido de caducidade, requerer e contestar nulidade administrativa e licença compulsória, preencher qualquer tipo de formalidade, requerer anotação e averbação de cessão, alterações de nome e de sede, proceder à publicação de editais de chamamento para instruir, elaborar, firmar e acompanhar contratos de transferência de tecnologia e/ou licenciamento com exclusividade ou não, e praticar para o fim mencionado todos os atos necessários perante as autoridades administrativas competentes no Brasil em benefício da Outorgante.

Este instrumento é válido até 30 de junho de 2018.

São Paulo, 27 de junho de 2017.


SANDRO ROBERTO VALENTINI

TERMO DE CESSÃO DE DIREITOS SOBRE PROPRIEDADE INTELECTUAL

Cedentes: 1. **EDUARDO RENE PEREZ GONZALEZ**, cubano, em união estável, professor universitário, inscrita no CPF/MF sob o nº 216.230.428-79, portadora do documento de identidade V223273-9, DPF-ESP, residente em Presidente Prudente (SP), na Rua Claudionor Sandoval, 681, Vila Rosa, CEP 19.023-200; 2. **RAFAEL DIAS DO ESPÍRITO SANTO**, brasileiro, solteiro, químico, inscrito no CPF/MF sob o nº 325.590.418-80, portador do documento de identidade RG nº 27.624.988-4, SSP/SP, residente em Presidente Prudente (SP), na Rua José Alfredo da Silva, 1405, Vila Tazitsu, CEP 19.023-210; 3. **MARCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA**, brasileira, divorciada, professora universitária, inscrita no CPF/MF sob o nº 179.984.388-27, portadora do documento de identidade RG nº 21.412.547-6, SSP/SP, residente em Araraquara (SP), na Rua Dr. Aldo Lupo, 55, Vila Harmonia, CEP 14.802-520; 4. **ANGELA MARIA ARENAS VELÁSQUEZ**, colombiana, divorciada, química, inscrita no CPF/MF sob o nº 234.695.848-42, portadora do documento de identidade V728747-4, CGPI/DIREX/DPF, residente em São Carlos (SP), na Rua Luiz Saia, 51, Apartamento 21, Parque Arnold Schimidt, CEP 13.564-010;

Cessionária: **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30.01.1976, devidamente inscrita no CNPJ/MF sob o nº 48.031.918/0001-24, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, São Paulo (SP), CEP 01.049-010.

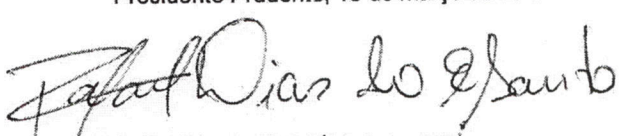
Pelo presente instrumento, nesta e na melhor forma de direito, os Cedentes autorizam a Cessionária a depositar o pedido de patente intitulado "**COMPOSTOS GUANIDÍNICOS COMO NOVOS AGENTES LEISHMANICIDAS**" junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial, cedendo todos os direitos patrimoniais a ele relativos na forma e para os fins do disposto na Lei 9.279 de 14.05.1996 e Lei 8.666 de 21.06.1993, Artigo 111, a título gratuito, sem qualquer restrição quanto à forma, tempo ou lugar, desde já ficando autorizadas quaisquer alterações que venham a ser consubstanciadas em futuras atualizações, modificações ou derivações tecnológicas.

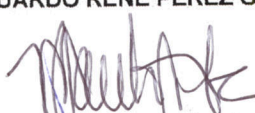
Por ser a expressão da verdade, este documento é firmado na presença de duas testemunhas que também o assinam.

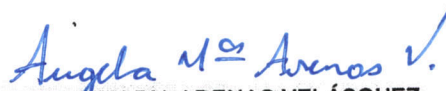
Presidente Prudente, 13 de março de 2018.

Cedentes:

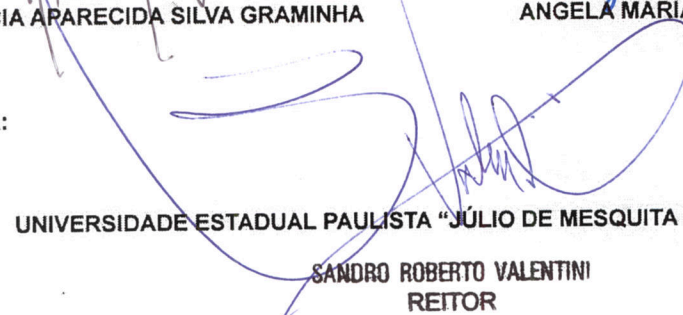

EDUARDO RENE PEREZ GONZALEZ


RAFAEL DIAS DO ESPÍRITO SANTO


MARCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA


ANGELA MARIA ARENAS VELÁSQUEZ

Cessionária:


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP

SANDRO ROBERTO VALENTINI
REITOR

Testemunhas:


1. Keyla Santos Bento
CPF/MF: 323.669.268-55


2. Sabrina Paduan
CPF/MF: 389.723.218-93

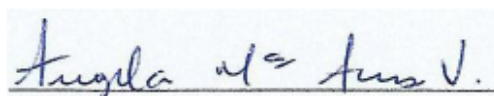
17AUI016

DECLARAÇÃO NEGATIVA DE ACESSO A RECURSOS DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

Título: Compostos Guanidínicos como Novos Agentes Leishmanicidas
Titulares: Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho"
Inventores: Eduardo Rene Perez Gonzalez, Rafael Dias do Espírito Santo, Angela Maria Arenas Velásquez e Marcia Aparecida Silva Graminha

Nós, inventores abaixo assinados, declaramos que, nos termos da Resolução nº 34, de 12 de fevereiro de 2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético – CGEN, e da Resolução nº 207, de 24 de abril de 2009, do Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso a amostra de componente do patrimônio genético nacional, realizado a partir de 30 de junho de 2000.

Presidente Prudente, 17 de janeiro de 2018.

**EDUARDO RENE PEREZ GONZALEZ****RAFAEL DIAS DO ESPÍRITO SANTO****MARCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA****ANGELA MARIA ARENAS VELÁSQUEZ**

SÍNTESE DE COMPOSTOS GUANIDÍNICOS E COMPOSTOS GUANIDÍNICOS SINTETIZADOS PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE

[001] CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente patente de invenção descreve a síntese de compostos guanidínicos e os respectivos compostos guanidínicos sintetizados para o tratamento de leishmanioses. Mais especificamente compreende compostos guanidínicos sintetizados cujos testes, em formas promastigotas e amastigotas em *Leishmania amazonensis*, resultaram em alta atividade e alto índice de seletividade, solucionando o problema da alta toxicidade e pouca eficácia dos medicamentos atualmente em uso.

[003] ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[004] As leishmanioses são doenças causadas por espécies do gênero *Leishmania*. As três principais formas de infecção são: leishmaniose visceral ou calazar; leishmaniose cutânea e leishmaniose mucocutânea. Este conjunto de doenças afeta principalmente pessoas pobres na África, Ásia e América Latina, sendo estimados cerca de 1,3 milhões de novos casos anualmente, podendo levar os indivíduos à morte, caso não sejam adequadamente tratados.

[005] Há poucas opções terapêuticas para o tratamento das leishmanioses, sendo os antimoniais pentavalentes os fármacos de primeira escolha desde a década de 20. O tratamento realizado com os antimoniais é administrado por via parenteral, longo, ineficaz e apresenta efeitos colaterais graves e persistentes. Alternativamente, como fármacos de segunda escolha, tem-se a anfotericina B, formulações lipossomais de anfotericina B, pentamidina, paromomicina e miltefosina (ALAVI-NAINI, R.; FAZAELI, A.; O'DEMPSEY, T. Topical

treatment modalities for old world cutaneous leishmaniasis: a review. Prague Medical Report, v. 113, n. 2, p. 105-118, 2012.) e (FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. Molecules, v. 14, n. 7, p. 2317-2336, 2009.), porém estes também exibem alta toxicidade, mostrando que os problemas associados com a terapêutica atual das leishmanioses impossibilitam um controle adequado da doença.

[006] As guanidinas são compostos altamente alcalinos, solúveis em água, que podem ser obtidas por diferentes fontes naturais tais como algas, esponjas e microrganismo, porém também podem ser sintetizadas.

[007] Moléculas contendo o núcleo guanidínico apresentam várias atividades biológicas como, por exemplo, dilatadores cardiovasculares (Short, J.H., Wayne Ours, c., Ranus, W. J; J. Med. Chem. 1968; 11, 1120 – 1135.), anti-histamínicos (Satoh, T., Muramatu, M., Ooi, Y., Miyataka, H., Nakajima, T., Umeyama, M., Chem. Pharm. Bull. 1985; 33, 647 – 654.) agentes anti-inflamatórios (Miyamoto, Y., Hirose, H., Matsuda, H., Nakano, S., Ohtani, M., Kaneko, M., Sishigaki, K., Nomura, F., Kitamura, H., Kawashima, Y.; Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs. 1985; 31, 508 – 511.; Omura K., Kiyohara Y., Komada F., Iwakawa S., Hirai M., Fuwa T., Pharm. Res. 1990; 7, 1289 – 1293.), anti-diabéticos (Muramatsu, I. Oshita M., Yamanaka K.J., Pharmacol. 1983; 227, 194 – 198.), anti-bactericidas, antifúngicos (Umezawa S., Takahashi Y., Usui T., Tsuchiya T., J. Antibiot. 1974; 27, 997 – 999.) e anti-parasitário (Marriner, S.; Anthelmintic drugs. Vet. Rec. 1986; 118, 181 – 184.).

[008] Vários compostos do tipo guanidinas são estudados para o tratamento de doenças tropicais negligenciadas, sendo que alguns

estudos testaram a efetividade de compostos guanidínicos contra leishmanioses (Santo R D E, Machado M G M, Santos J L, González E R P and Chin M C (2014) Use of guanidine compounds in the treatment of neglected tropical diseases. *Curr Org Chem* 18:2572-2602.); (Stephens, C.E.; Brun, R.; Salem, M.M.; Werbovetz, K.A.; Tanious, F.; Wilson, W.D.; Boykin, D.W. The activity of diguanidino and 'reversed' diamidino 2,5-diarylfurans versus *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, 13, 2065-2069.); (Hua, H.; Peng, J.; Fronczek, F. R.; Kelly, M.; Hamann, M. T. Crystallographic and NMR studies of antiinfective tricyclic guanidine alkaloids from the sponge *Monanchora unguifera*. *Bioorg. Med. Chem.*, 2004, 12, 6461-6464.); (Costa, E.V.; Pinheiro, M.L.B.; Xavier, C.M.; Silva, J.R.A.; Amaral, A.C.F.; Souza, A.D.L.; Barison, A.; Campos, F.R.; Ferreira, A. G.; Machado, G.M.C.; Leon, L.L.P. A pyrimidine- β -carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. *J. Nat. Prod.*, 2006, 69, 29 -294.).

[009] Um dos principais benefícios de sintetizar as guanidinas é a possibilidade de serem obtidos compostos cada vez mais puros, em maior número e com uma maior diversidade estrutural (CUNHA, S. D.; COSTA, M. B.; NAPOLITANO, H. B.; LARIUCCI, C.; VENCATO, I., *Tetrahedron*, V. 57, p. 1671-1675, 2001.).

[010] Os métodos mais tradicionais para obtenção das guanidinas utilizam tioureias como material de partida, uma amina e um agente de guanilação (CUNHA, S. D.; COSTA, M. B.; NAPOLITANO, H. B.; LARIUCCI, C.; VENCATO, I., *Tetrahedron*, V. 57, p. 1671-1675, 2001.). Os agentes de guanilação são utilizados como promotores da guanilação das tioureias, os principais são os sais de óxidos de metais pesados, tais como HgCl_2 e $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, porém possuem a desvantagem

de produzir resíduos tóxicos (BRITO, Tiago de Oliveira; PEREIRA, André Juck Faustino; FÁTIMA, Ângelo de. Síntese de benzoilguanidinas promovida por terc-butil hidroperóxido, 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, Maio. 2015).

[011] O estado da técnica descreve alcaloides tricíclicos contendo o núcleo guanidínico derivado de produtos naturais, com atividade leishmanicida (MARTINS, Ligia F., et al. Analogues of Marine Guanidine Alkaloids Are in Vitro Effective against Trypanosoma cruzi and Selectively Eliminate Leishmania (L.) infantum Intracellular Amastigotes. Journal of Natural Products., 2016, 79 (9), pp 2202–2210.

[012] Nesta anterioridade, os compostos são alcalóides tricíclicos contendo núcleo guanidínico derivados de produtos naturais, resultando em várias etapas sintéticas, com etapas de purificação demoradas e complexas, e temperatura em torno de -78°C.

[013] No entanto, o estado da técnica não descreve nem sugere o uso de compostos guanidínicos no tratamento das leishmanioses, com índice de seletividade 130 vezes mais seletivo para o parasito do que para a célula do hospedeiro, resultando em compostos significativamente menos citotóxicos para células de mamíferos, sendo uma alternativa para compor o arsenal terapêutico para eliminação do parasito no hospedeiro, sem que estes apresentem toxicidade ao paciente durante o tratamento, onde os compostos são sintetizados em 24 horas, com etapa de purificação simples e partindo de moléculas comerciais de fácil manipulação e baixo custo.

[014] Desta forma, é objeto da presente patente de invenção um processo de síntese de compostos guanidínicos e os respectivos compostos guanidínicos sintetizados para o tratamento de

leishmanioses. Mais especificamente compreende compostos guanidínicos sintetizados com alta atividade e alto índice de seletividade em formas promastigotas e amastigotas em *L. amazonensis*.

[015] BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[016] A figura 1 apresenta a representação da reação entre as diferentes tiouréias e benzilamina para a geração dos compostos LQOF-G1 a LQOF-G10.

[017] A figura 2 apresenta a representação da reação entre as diferentes tiouréias e 4-aminobutanol para a geração dos compostos LQOF-G11 a LQOF-G19.

[018] DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[019] Para as finalidades da presente invenção, são utilizadas as seguintes siglas:

[020] MTT = brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio];

[021] PMS = metassulfato de fenazina

[022] Os compostos guanidínicos, objeto da presente invenção, foram sintetizados utilizando como catalisador o nitrato de bismuto pentahidratado, pela maior facilidade de trabalhar com os resíduos do catalisador e também por este ser um catalisador acessível comercialmente e de fácil manuseio por ser um sólido cristalino estável e resistente à umidade.

[023] A síntese de compostos guanidínicos compreende a reação de 1 parte de tiouréia dissolvido em dimetilformamida (DMF), 2 partes de amina, 4 partes de trietilamina e 1 parte de nitrato de bismuto pentahidratado ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), aquecida a 100°C por 24 horas. Findo o tempo reacional, a solução atinge a temperatura ambiente, sendo a suspensão filtrada. Em seguida, são removidas as impurezas do filtrado

através de extração com água. A fase orgânica é seca com sulfato de magnésio anidro e, após filtragem, é evaporada. O resíduo cru obtido após a evaporação do solvente é recristalizado em uma mistura éter etílico/éter de petróleo na proporção de 8:2.

[024] Bioensaios de atividade leishmanicida

[025] Para os bioensaios de atividade leishmanicida, foram utilizadas formas promastigotas da cepa (MPRO/BR/1972/M1841-LV-79) de *L. amazonensis* cultivadas em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) (FERNANDES, J. F.; CASTELLANI, O. Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, v. 18, n. 2, p. 195-202, 1966.) pH 7,2; 68,4 mM de NaCl; 5,4 mM de KCl; 56,3 mM de Na₂HPO₄; 111 mM de Dextrose; 0,3% de meio Liver Infusion Broth; 0,5% de Tryptose; 25 mg/L de Haemin; 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) em estufa a 28°C, até a fase logarítmica tardia de crescimento (1×10⁷ parasitas/mL).

[026] A metodologia do bioensaio para avaliar atividade leishmanicida *in vitro* foi baseada no método do MTT (MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1/2, p. 55-63, 1983.), que está baseado na capacidade das células vivas reduzirem o sal MTT em um produto colorido chamado formazan; este, por sua vez, é produzido pela atividade da enzima succinato desidrogenase no meio mitocondrial.

[027] Inicialmente, foram preparadas soluções estoque dos compostos a 20 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO). Para o uso *in vitro*, os compostos foram diluídos em concentrações apropriadas (1 a 100 µg/mL) no meio de cultivo dos parasitos para a realização dos ensaios colorimétricos. Três microlitros de cada composto (concentrações finais

de 100 a 1 µg/mL) foram adicionados a 97 µL de meio LIT (contendo as formas promastigotas de *L. amazonensis*). A placa foi incubada em câmara úmida a 28°C (BOD) por 72 h. A seguir, foi adicionado 10 µL de solução MTT/PMS (MTT 2,5 mg/mL e PMS 0,22 mg/mL) em todos os poços e a placa novamente foi incubada, ao abrigo da luz, por 75 min a 28°C.

[028] O PMS foi utilizado como um carregador intermediário de elétrons, catalisando o processo de geração de formazan (DUTTA, A.; BANDYOPADHYAY, S.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitology International*, v. 54, n. 2, p. 119-122, 2005.). Os cristais de formazan foram dissolvidos com uma solução de SDS-HCl (dodecil sulfato de sódio a 10% em HCl 1 mol/L) e, após este passo, as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 min ao abrigo da luz.

[029] A leitura da densidade ótica foi realizada em espectrofotômetro de placas (Infinite M200Pro, TECAN) a 492 nm. Os resultados foram obtidos em absorbância.

[030] A porcentagem de parasitos mortos e porcentagem de citotoxicidade (%C) foram calculadas segundo a equação 1 (MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology Research*, v. 86, n. 12, p. 999-1002, 2000.).

[031] Equação 1: porcentagem de parasitos mortos e de toxicidade

$$\%C = \left[\frac{G_c - G_p}{G_c} \right] \times 100$$

[032] Onde:

[033] GC= AC-AM;

[034] GP= AP–APM;

[035] GC representa o número de parasitos/mL nos poços controles;

[036] GP representa o número de parasitos/mL detectados em diferentes concentrações das amostras;

[037] AC corresponde ao valor de absorbância nos poços controle (na ausência de amostra) com parasitos;

[038] AM representa o valor da absorbância nos poços controle (na ausência de amostra) sem parasitos;

[039] AP representa o valor da absorbância nos testes;

[040] APM corresponde ao valor da absorbância das diferentes concentrações das amostras na ausência dos parasitos.

[041] Para a realização dos bioensaios, foram realizados dois controles: (A) ausência dos parasitos e (B) ausência dos compostos, mas contendo os parasitos. Como controle positivo foram incluídos os fármacos pentamidina e anfotericina B, convencionalmente utilizados no tratamento das leishmanioses.

[042] Os valores de IC₅₀ (metade da concentração inibitória máxima) foram determinados a partir dos dados de absorbância obtidos e calculados por regressão não linear para cada composto, utilizando-se o programa Origin 7.0 (WASS, J. A. Origin 7.0. Biotech Software and Internet Report, v. 3, n. 5/6, p. 130-133, 2004.).

[043] Determinação da citotoxicidade

[044] Para a obtenção dos macrófagos foi injetado, via intraperitoneal, 3,0 mL de solução de tioglicolato de sódio a 3% em camundongos Swiss (machos, com 6 a 8 semanas de idade, pesando entre 25 e 30 g) para a migração de macrófagos à região peritoneal (PAIVA, F. P. de; MAFFILI, V. V.; SANTOS, A. C. S. Curso de manipulação de animais de laboratório. Salvador: Fiocruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz,

2005. Disponível em: <www.cpqgm.fiocruz.br/arquivos/bioterio/bioterio_apostilha.pdf>.).

[045] Após 3 a 4 dias da estimulação/ativação, os animais foram eutanasiados sendo retirado o exsudado peritoneal. Seguindo a metodologia técnica (CARLOS, I. Z.; CARLI, C. B. A.; MAIA, D. C. G.; BENZATTI, F. P.; LOPES, F. C. M.; ROESE, F. M.; WATANABE, M.; MICHELETTI, A. C.; SANTOS, L. C. dos; VILEGAS, W.; HONDA, N. K. Immunostimulatory effects of the phenolic compounds from lichens on nitric oxide and hydrogen peroxide production. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 4, p. 847-852, 2009.), depois da contagem diferencial e ajuste para 5×10^6 macrófagos/mL, 100 µL da suspensão celular em meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB inativado, 25 mM HEPES e 2 mM L-glutamina foram adicionados em cada poço de uma placa estéril de poliestireno contendo 96 cavidades (VELÁSQUEZ, A. M. A.; SOUZA, R. A. de; PASSALACQUA, T. G.; RIBEIRO, A. E. R.; SCONTRI, M.; CHIN, C. M.; ALMEIDA, L. de; CISTIA, M. L. del; ROSA, J. A. da; MAURO, A. E.; GRAMINHA, M. A S. Antiprotozoal activity of the cyclopalladated complexes against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 27, n. 6, p. 1032-1039, 2016.).

[046] Cada placa foi incubada por 4h em estufa a 37°C com 5% de CO₂ para adesão dos macrófagos no fundo de cada poço. Após esse tempo de incubação, todos os poços foram lavados com meio RPMI à temperatura ambiente para serem retiradas as células não aderidas, entre elas eventuais linfócitos e hemácias. Posteriormente, foi realizada a inserção das amostras – em uma série de concentrações de 1 a 300 µg/mL por 24h – nos poços, junto aos macrófagos, para o ensaio de citotoxicidade, utilizando-se a técnica colorimétrica do MTT.

[047] Os ensaios foram realizados frente a macrófagos peritoneais, em triplicatas, para cada amostra. A leitura da placa foi realizada em leitor de placa (Infinite M200Pro, TECAN), a 540 nm de filtro e 620 nm de referência. A intensidade da coloração, a partir da absorbância medida, é proporcional ao percentual de macrófagos vivos, que foi determinado utilizando regressão linear e expressado como CC₅₀.

[048] Avaliação in vitro da atividade antiprotozoa de compostos ativos contra formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*

[049] Para a avaliação da atividade antiparasitária contra formas amastigotas intracelulares, formas promastigotas de *L. amazonensis* foram utilizadas numa concentração de 1×10^7 parasitos/mL (VELÁSQUEZ, A. M. A.; SOUZA, R. A. de; PASSALACQUA, T. G.; RIBEIRO, A. E. R.; SCONTRI, M.; CHIN, C. M.; ALMEIDA, L. de; CISTIA, M. L. del; ROSA, J. A. da; MAURO, A. E.; GRAMINHA, M. A S. Antiprotozoal activity of the cyclopalladated complexes against Leishmania amazonensis and Trypanosoma cruzi. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 27, n. 6, p. 1032-1039, 2016.).

[050] Depois da contagem e ajuste para 1×10^5 macrófagos/mL em meio RPMI, 200 µL da suspensão celular foram adicionados em cada poço sobre lamínulas redondas (13 mm de diâmetro, previamente esterilizadas), em uma placa estéril de poliestireno contendo 24 cavidades. Após incubação de 4h da placa em estufa (37°C, 5% de CO₂) para ser promovida a aderência dos macrófagos, parasitos foram adicionados na proporção 5:1 (promastigotas:macrófagos). A partir do melhor tempo de invasão de 18 a 24h, e remoção dos parasitos não interiorizados, pela lavagem da placa com meio de cultura RPMI, a placa foi incubada para permitir a replicação dos parasitos no interior

do macrófago. Ao final desta etapa, as concentrações adequadas de cada amostra testada foram colocadas na presença dos macrófagos infectados por 24h. Depois da incubação, as lamínulas contendo o material celular foram removidas das placas e coradas com Giemsa para observação em microscopia ótica comum e contagem do número de amastigotas intracelulares em cada 100 macrófagos (PASSALACQUA, T. G.; DUTRA, L.; ALMEIDA, L. de; VELÁSQUEZ, A. M. A.; TORRES, F. A. E.; YAMASAKI, P. R.; SANTOS, M. B. dos; REGASINI, L. O.; MICHELS, P. A. M.; BOLZANI, V. da S.; GRAMINHA, M. A. S. Synthesis and evaluation of novel prenylated chalcone derivatives as anti-leishmanial and anti-trypanosomal compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 25, n. 16, p. 3342-3345, 2015; VELÁSQUEZ, A. M. A.; SOUZA, R. A. de; PASSALACQUA, T. G.; RIBEIRO, A. E. R.; SCONTRI, M.; CHIN, C. M.; ALMEIDA, L. de; CISTIA, M. L. del; ROSA, J. A. da; MAURO, A. E.; GRAMINHA, M. A. S. Antiprotozoal activity of the cyclopalladated complexes against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 27, n. 6, p. 1032-1039, 2016.). Com estes valores, foi realizado o cálculo da concentração, que diminui em 50% o crescimento em comparação com o controle, que foi determinado utilizando regressão linear e expressado como IC₅₀.

[051] Cálculo do Índice de seletividade (IS)

[052] Baseado nos resultados de citotoxicidade dos macrófagos peritoneais de camundongo (CC₅₀) e dos parasitos (IC₅₀ nas duas formas, promastigotas e amastigota), a relação CC₅₀/IC₅₀ foi utilizada para determinar o índice de seletividade (IS) (BOLLINI, M.; CASAL, J. J.; ALVAREZ, D. E.; BOIANI, L.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H.; BRUNO, A. M. New potent imidazoisoquinolinone derivatives as anti-

Trypanosoma cruzi agents: biological evaluation and structure-activity relationships. Bioorganic and Medicinal Chemistry, v. 17, n. 4, p. 1437-1444, 2009).

[053] A tabela 1 apresenta os valores de atividade leishmanicida in vitro dos compostos, assim como os valores de citotoxicidade e índices de seletividade.

[054] Tabela 1: Atividade antiparasitária (IC_{50} , μM), toxicidade em células de mamífero (CC_{50} , μM) e índice de seletividade ($SI = CC_{50}/IC_{50}$) dos compostos guanidínicos. Cada valor corresponde a média de três experimentos independentes realizados em triplicatas $\pm$ desvio padrão.

Composto	Promastigota		Amastigota		Macrófago		Promastigota	Amastigota
	IC_{50} (μM)	$\pm$	IC_{50} (μM)	$\pm$	CC_{50} (μM)	$\pm$	IS	IS
LQOF-G1	11.51	0.70	22.05	3.35	801.91	0.32	69.67	36.37
LQOF-G2	19.59	0.19	5.6	2.5	737.92	1.42	37.66	131.77
LQOF-G3	19.70	0.04	41.2	4.1	827.36	1.59	42.00	20.08
LQOF-G4	22.58	1.12	ND		35.96	5.63	1.59	ND
LQOF-G5	20.89	0.47	24.2	5.2	876.09	1.68	41.94	36.2
LQOF-G6	25.90	0.99	17.2	2.1	1118.9 2	105.44	43.21	65.05
LQOF-G7	15.91	0.93	7.1	0.8	618.70	70.25	38.88	87.14
LQOF-G8	25.43	1.54	21.1	3.6	836.58	1.61	32.90	39.65
LQOF-G9	21.90	1.79	19.0	4.6	865.51	1.66	39.52	45.55
LQOF-G10	6.83	0.21	21.35	0.62	18.62	2.94	2.73	0.87
LQOF-G12	49.85	3.55	ND		391.46	11.35	7.85	ND
LQOF-G13	103.13	2.34	ND		142.38	18.45	1.38	ND
LQOF-G15	108.57	3.42	ND		924.62	1.78	8.52	ND
LQOF-G17	39.39	0.11	ND		199.73	27.70	5.07	ND
Pentamidina	7.62	0.10	5.07	1.14	35.69	6.84	4.68	7.04
Anfotericina B	3.22	0.03	4.92	0.14	23.10	2.52	7.17	4.70

[055] ND: não determinado

[056] Conforme pode ser observado na Tabela 1, os compostos com valores de índice de seletividade (IS) ≥ 10 são promissores para o tratamento da Leishmaniose causada por *L. amazonensis*, pois são pouco tóxicos em células de mamíferos e altamente tóxicos para o parasito, sendo eles: LQOF-G1, LQOF-G2, LQOF-G3, LQOF-G5, LQOF-G6, LQOF-G7, LQOF-G8 e LQOF-G9

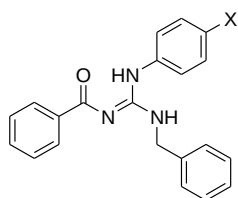
[057] Os compostos, objeto da presente patente de invenção, são potencialmente úteis para tratamento de doenças virais, cardiovasculares, inflamatórias, metabólicas, bacterianas, fúngicas, câncer, bem como outras doenças consideradas negligenciadas, como a tripanossomíase americana e tripanossomíase africana, causada pelos protozoários *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, bem como a outras espécies do gênero *Leishmania*, todos pertencentes à família Trypanosomatidae.

[058] Além disso, poderá ser aplicada nanotecnologia para produção de nanoformulações para reduzir ainda mais qualquer efeito tóxico que possa ser identificado em estudos clínicos futuros, fornecer liberação controlada dos compostos para obtenção de biodisponibilidade ótima, além de proteger os compostos do metabolismo do paciente, o que poderia afetar a eficácia dos compostos, permitindo que os compostos permaneçam por mais tempo no corpo do paciente, prolongando seus efeitos terapêuticos e, assim, garantindo que o tempo de administração entre uma dose e outra ocorra em grandes intervalos de tempo.

[059] Os compostos objeto da presente patente de invenção são potencialmente úteis para a terapêutica humana e para uso veterinário.

REIVINDICAÇÕES:

1. SÍNTESE DE COMPOSTOS GUANIDÍNICOS caracterizado por compreender as etapas de:
 - a) reação de 1 parte de tiouréia dissolvido em dimetilformamida (DMF), 2 partes de amina, 4 partes de trietilamina e 1 parte de nitrato de bismuto penta-hidratado ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$);
 - b) aquecimento da mistura a 100°C por 24 horas;
 - c) resfriamento da mistura à temperatura ambiente;
 - d) filtragem da suspensão;
 - e) remoção das impurezas do filtrado através de extração com água;
 - f) secagem da fase orgânica com sulfato de magnésio anidro e, após filtragem, é evaporada;
 - g) recristalização do resíduo cru obtido após a evaporação do solvente em uma mistura éter etílico/éter de petróleo, na proporção de 8:2.
2. COMPOSTOS GUANIDÍNICOS SINTETIZADOS PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSES, obtido mediante síntese reivindicada em 1, caracterizado por ter a forma estrutural



, onde X compreende NO_2 , 66%; Br, 71%; Cl, 69%; CH_3 , 53%; t-bu, 70%; I, 50%; OCH_3 , 85% e F, 73%.

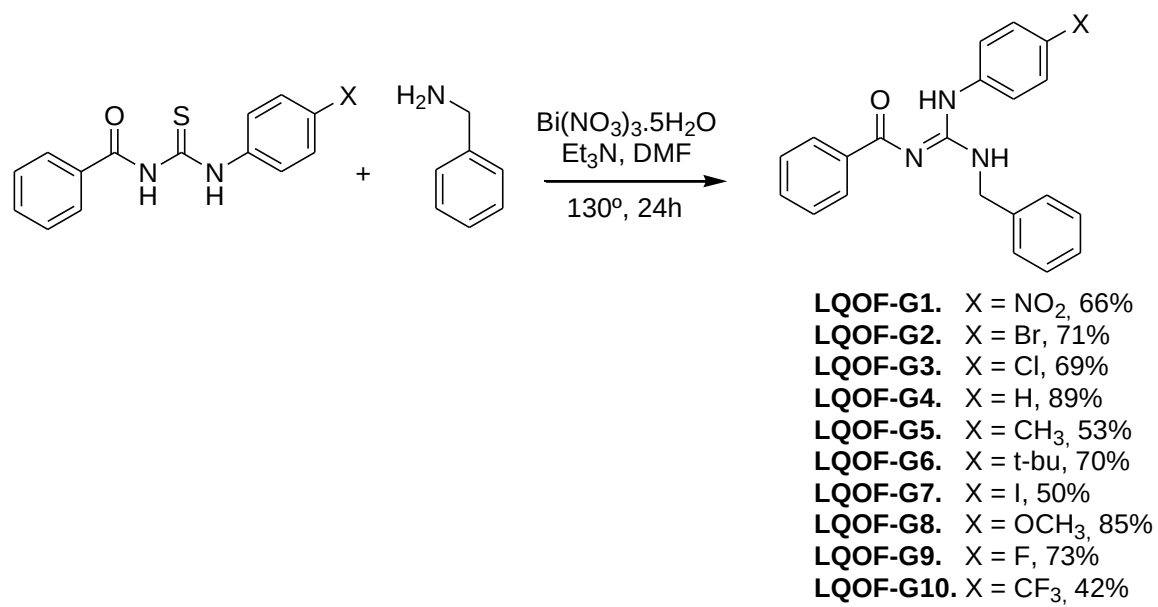


Figura 1

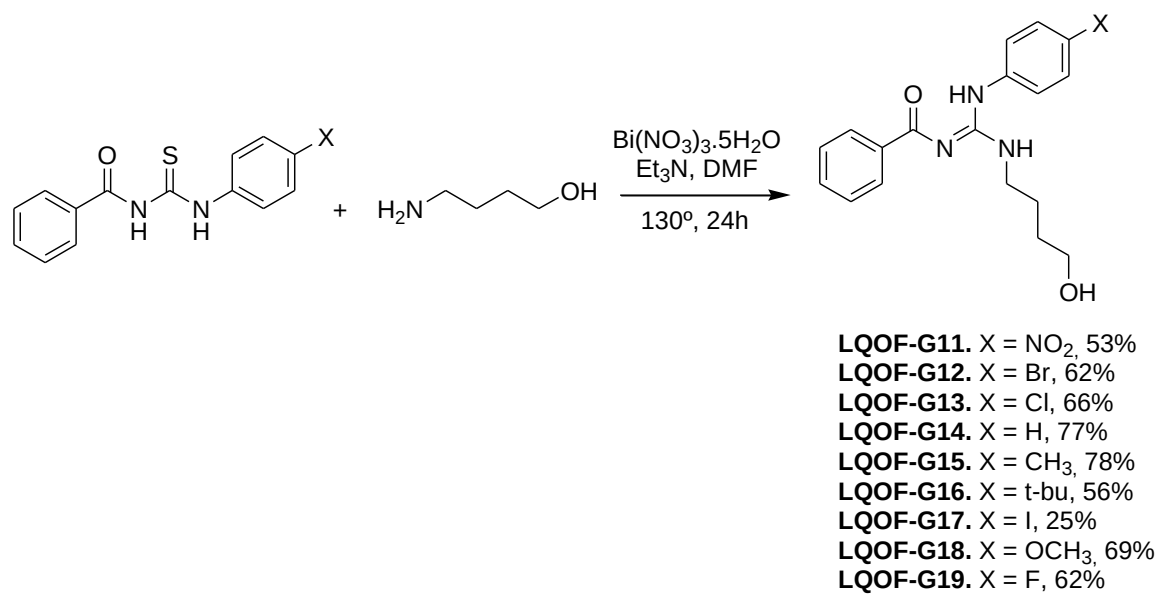


Figura 2

RESUMO

SÍNTESE DE COMPOSTOS GUANIDÍNICOS E COMPOSTOS GUANIDÍNICOS SINTETIZADOS PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE

A presente patente de invenção descreve a síntese de compostos guanidínicos e os respectivos compostos guanidínicos sintetizados para o tratamento de leishmanioses, cujos testes, em formas promastigotas e amastigotas em *L. amazonensis*, resultaram em alta atividade e alto índice de seletividade, solucionando o problema da alta toxicidade e pouca eficácia dos medicamentos atualmente em uso.