

ANEXO I – PLANO DE TRABALHO

**DETALHAMENTO DAS PROPOSTAS DE DESENVOLVIMENTOS
BIOLÓGICO E TECNOLÓGICO****1. RESUMO DOS DESENVOLVIMENTOS COMPLEMENTARES (TECNOLÓGICO
E BIOLÓGICO)**

A retinopatia diabética é a maior causa de redução e perda visual em pessoas portadoras de diabetes e especialmente na sua idade produtiva. Sua incidência atualmente atinge números epidêmicos e está em ascensão em todos os continentes. Somente no Brasil, dados estimam haver entre 6,5 a 7,0% da população adulta com diabetes e desse universo, em torno de 50% apresentarão alguma forma de retinopatia diabética. Ainda hoje, o tratamento dessas complicação é invasiva e inclui pan-fotocoagulação a laser da retina que destroem áreas de retina saudável ou alternativamente injeções intravítreas de agentes anti-VEGF, porém com efeito terapêutico de curta duração ou ainda, nas formas mais avançadas cirurgia intraocular (vitrectomia). Para desenvolvermos novas modalidades terapêuticas, é necessário o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no aparecimento e progressão dessa doença retiniana.

Neste desenvolvimento, apresentamos uma forma inédita não invasiva (tópico-colírio) para o tratamento farmacológico da retinopatia diabética, desde suas fases iniciais.

2. DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO- Profa Maria Helena Santana

O desenvolvimento tecnológico será complementar ao já desenvolvido, e terá como foco o desenvolvimento do produto, conforme as seguintes etapas:

- Otimização das concentrações EPC/Etanol/Nitróxido ativo
- Estabilidade em embalagem com membrana filtrante, que elimina a necessidade de conservantes químicos.
- Determinação da dose
- Viscosidade, fluidez no gotejamento, perdas
- Escalonamento do processo de produção de lipossomas encapsulando o nitróxido ativo.

O resultado será a definição exata da formulação para a produção em escalas dimensionadas para os estudos biológicos *in vitro* e em animais (pré-clínicos).

2.1. DESCRIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO-MÉTODOS

Os métodos que serão utilizados nos ensaios complementares de otimização das concentrações EPC/Etanol e na caracterização dos lipossomas encapsulando o nitróxido ativo são aqueles descritos na patente (processos n. PCT/BR2016/000061 e BR 10 2015 015356 2.).

Os ensaios de viscosidade e fluidez serão realizados no Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (LDPB) da FEQ/UNICAMP

O escalonamento do processo também será feito no LDPB, de acordo com metodologia padrão de cálculo das similaridades geométrica e dinâmica. As condições obtidas teoricamente serão validadas com preparações experimentais para validação do processo e caracterização do produto obtido em maior escala.

2.3 JUSTIFICATIVA

Estes desenvolvimentos complementares são muito importantes para, garantir que o produto tenha a mesma qualidade desde os ensaios *in vitro* até os ensaios

em animais (pré-clínicos). Esta mesma qualidade deverá ser assegurada para os posteriores ensaios clínicos, mediante os parâmetros de escalonamento do processo definidos nesta etapa complementar.

2.4. DEFINIÇÃO DAS EQUIPES TÉCNICAS:

Pelo lado da **UNICAMP**, será constituído um grupo de trabalho composto pelo técnico biologista Gilson Maia , pela farmacêutica Aline Borelli Alonso, por 1 engenheiro químico a ser contratado, e coordenado pela Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana, LDPB/FEQ/UNICAMP.

2.4 ESCOPO DO PROJETO:

Prover experimentos complementares para otimização da composição EPC/Etanol, estabilidade da preparação lipossomal primária às condições de embalagem com membrana filtrante, formulação final do produto e sua estabilidade durante o período de estudos *in vivo* e em animais (pré-clínicos). Adicionalmente serão determinados os parâmetros de escalonamento de processo, susceptíveis à produção em escala industrial, e que neste projeto serão aplicados na produção da formulação para os ensaios *in vivo* e em animais (pré-clínicos).

2.5 FASES PREVISTAS:

As fases do desenvolvimento tecnológico serão aquelas que foram descritas no item **2.** deste documento.

2.6. CONTRAPARTIDA DA UNICAMP

A contra-partida da **UNICAMP** será na forma de instalações físicas, equipamentos, coordenação técnica do projeto e serviços de pessoal.

3. DESCRIÇÃO DOS DESENVOLVIMENTOS BIOLÓGICOS-MÉTODOS

3.1

i. Estudos pré-clínicos

O objetivo desses estudos pré-clínicos complementares será determinar qual a melhor dose do princípio ativo e a posologia mais cômoda para um possível uso clínico crônico (contínuo) dos pacientes através da utilização de modelos animais experimentais.

Para tal, serão utilizados ratos Wistar experimentalmente diabéticos com injeção endovenosa de estreptozotocina. Após 72 hs, os grupos diabéticos serão randomizados a receber tratamento com colírio contendo a formulação desenvolvida nesta patente com 2 doses (0,5 e 1,0 mM) 1 ou 2 vezes/dia por um período de 6 semanas. Ao final, os animais serão submetidos a estudos de eletrorretinografia para avaliar os possíveis efeitos protetores dos diferentes tratamentos e após, serão sacrificados e os olhos enucleados para estudos morfológicos (imunohistoquímica para marcadores de retinopatia diabética e lesão oxidativa da retina).

ii. Estudos *in vitro*

Paralelamente aos estudos em animais, serão conduzidos experimentos *in vitro* para certificar a eficiência das formulações nanoestruturadas através da barreira epitelial retiniana. Serão realizados ensaios utilizando-se células de retina humana (ARPE-19), que serão tratadas com as nanopartículas contendo 0,5, 1,0 e 3,0 mM do nitróxido ativo desse desenvolvimento por 2 horas. Após, alíquotas do sobrenadante serão coletadas e enviada para quantificação do tempol em espectroscopia para-magnética. Estas quantificações serão

realizadas no Laboratório de Propriedades Ópticas e Magnéticas de Sólidos Instituto de Física, UNICAMP.

3.2. JUSTIFICATIVA

Estes desenvolvimentos complementares são muito importantes para, em ato contínuo, iniciarmos estudos clínicos. Desta forma, teremos, ao final de de 6 meses, a formulação liposomal final nanoestruturada de altíssima pureza em apresentações diferentes, ou seja, em sua baixa e alta doses, para serem testadas em pessoas saudáveis e pacientes diabéticos como exigidos nos estudos clínicos.

3.3. DEFINIÇÃO DAS EQUIPES TÉCNICAS:

Pelo lado da **UNICAMP**, será constituído um grupo de trabalho composto pelos Dr Diego Andreazzi Duarte e Dra Mariana A Rosales no Laboratório de Fisiopatologia Renal/Estudos de Complicações Microvasculares do Diabetes, FCM, UNICAMP chefiado pelo Prof Dr José Butori Lopes de Faria e coordenado pela Profa. Dra. Jacqueline Mendonça Lopes de Faria..

3.3 . ESCOPO DO PROJETO:

Verificar em estudos *in vitro* e pré-clínicos com modelos animais de diabetes, a eficácia da formulação com diferentes doses do princípio ativo e alternativas posológicas de aplicação ocular tópica para o tratamento farmacológico da retinopatia diabética.

3.4 FASES PREVISTAS:

O projeto prevê o desenvolvimento de fases distintas e complementares:

Fase I- Verificação *in vivo* utilizando-se modelos animais de diabetes, a segurança e a eficiência das formulações contendo diferentes concentrações do princípio ativo e sob diferentes posologias de aplicação por um período de 6 semanas.

-parâmetros a serem avaliados: -cortes histológicos da retina dos grupos de animais estudados avaliando marcadores de retinopatia diabética e de estresse oxidativo

-ensaios funcionais da retina através de eletrorretinografia

Fase II – verificação *in vitro* do comportamento da barreira retiniana externa da possível toxicidade e capacidade de permeação dos lipossomas em meio de cultura celular DMEM contendo diferentes concentrações do princípio ativo

-parâmetros a serem avaliados: eficiência da barreira através de espectroscopia ressonância magnética (EPR) e ensaios de morte celular (apoptose)

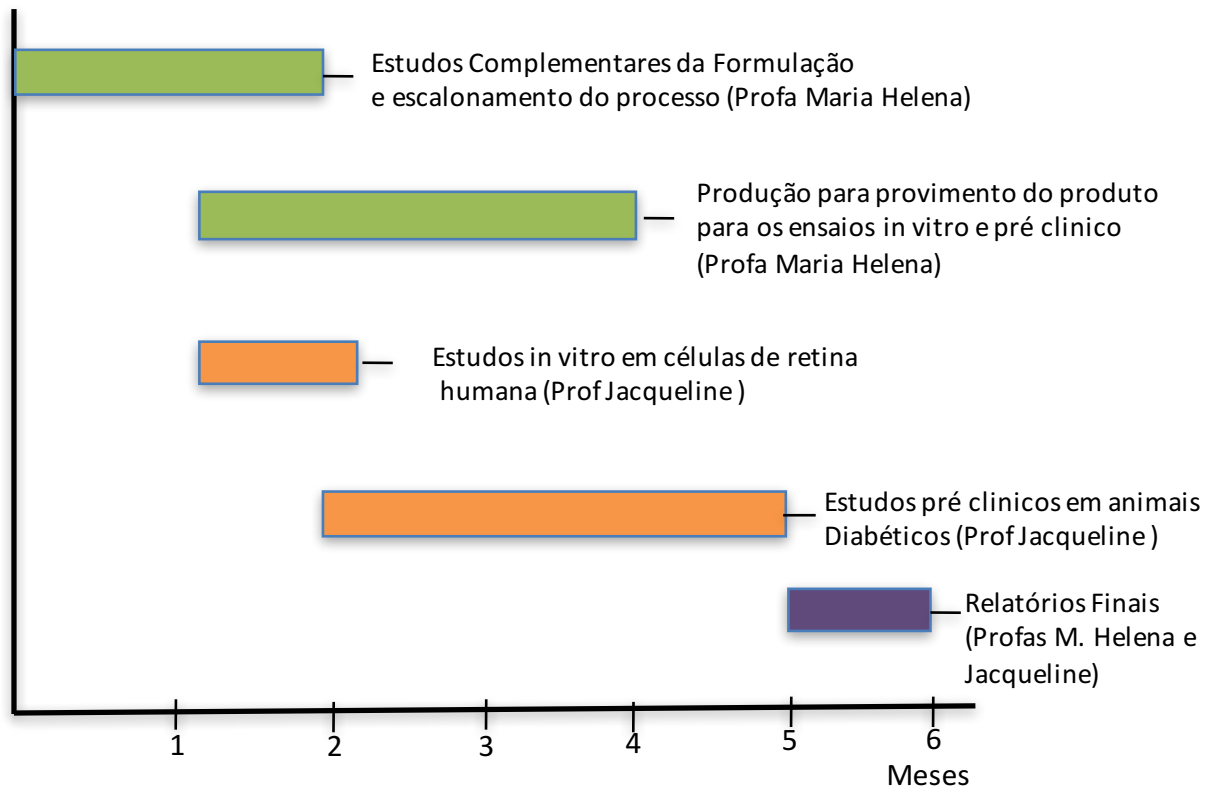
3.5. CONTRAPARTIDA DA UNICAMP

A contra-partida da **UNICAMP** será na forma de instalações físicas, equipamentos, coordenação técnica do projeto e serviços de pessoal.

4. RELATÓRIOS

Ao final, os coordenadores responsáveis emitirão relatórios detalhados das atividades realizadas e dos resultados obtidos, o que permitirá o início imediato dos estudos clínicos fase I.

5. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES:



6. RECURSOS FINANCEIROS DO PROJETO

Os custos financeiros do projeto serão integralmente cobertos pela **Empresa LICENCIANTE**, custos estes, relacionados a remuneração da equipe de trabalho da **UNICAMP**, aquisição de materiais, insumos e reagentes, serviços de terceiros e demais despesas de manutenção de equipamentos do laboratório dedicados ao projeto. Os reagentes necessários ao desenvolvimento do projeto serão comprados diretamente pela empresa ou pela **FUNCAMP** e fornecidos aos pesquisadores;

Para a equipe da Professora Maria Helena:

A Empresa pagará o valor de R\$ **98.000,00** com interveniência da **FUNCAMP**, com pagamentos de parcelas mensais de acordo com o cronograma de Desembolso abaixo, contra apresentação de faturas.

Item	Valores (R\$)
Remuneração dos pesquisadores e apoio técnico	20.000,00
Materiais de consumo para desenvolvimento do projeto , incluindo o lipídio, o nitróxido ativo, soluções tampão, mangueiras para bomba peristáltica, embalagens e vidraria.	15.000,00
Serviços de terceiros (espectroscopia para magnética, e Raios -X de baixo ângulo-SAXS)	15.000,00
Consultoria e coordenação	30.000,00
Taxas Funcamp (22,5%)	18.000,00
Totais estimados	98.000,00

Para a equipe da Professora Jacqueline:

A Empresa pagará o valor de R\$ **159.250,00** interveniência da **FUNCAMP**, com pagamentos de parcelas mensais subseqüentes, de acordo com o cronograma de Desembolso abaixo, com contra apresentação de faturas.

Item	Valores (R\$)
Remuneração dos pesquisadores	40.000,00
Materiais de consumo do laboratório (descartáveis de cultura de células, meio de cultura, tratamento com os lipossomas, hospedagem dos animais, materiais para estudos de retina, aquisição de reagentes, vidrarias, manutenção de equipamentos)	30.000,00
Serviços de terceiros (espectroscopia para magnética, microscopia confocal)	10.000,00
Consultoria	50.000,00
Taxas Funcamp (22,5%)	29.250,00
Totais estimados	159.250,00

7. CRONOGRAMA GERAL DE DESEMBOLSO (PARA OS DESENVOLVIMENTOS TECNOLÓGICOS E BIOLÓGICOS)

Mes	Remuneração dos pesquisadores	Consultoria	Materiais de consumo do laboratório dedicados ao projeto	Serviços de terceiros	Taxas	Total Mensal (R\$)
1	x	MH	x	x	x	50.225,00
2	x	MH e JMLF	x	x	x	71.662,50
3	x	MH e JMLF		x	x	47.162,50
4	x	MH e JMLF		x	x	44.100,00
5	x	JMLF			x	24.500,00
6		MH e JMLF			x	19.600,00

MH: Profa Maria Helena Santana; JMLF: Profa Jacqueline M Lopes de Faria