



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

(21) BR 112020004429-6 A2



(22) Data do Depósito: 05/09/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 20/10/2020

(54) **Título:** USO DE DANTROLENO OU UM SAL FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL DO MESMO PARA OBTENÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) **Int. Cl.:** A61K 31/4178; A61K 31/444; A61K 31/46; A61K 31/5517; A61K 45/06; (...).

(30) **Prioridade Unionista:** 05/09/2017 US 62/554,049; 21/05/2018 US 62/674,406.

(71) **Depositante(es):** EAGLE PHARMACEUTICALS, INC..

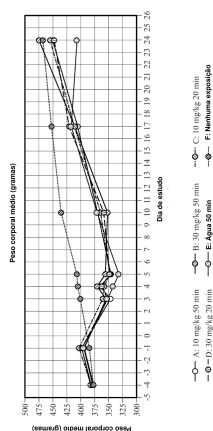
(72) **Inventor(es):** ADRIAN HEPNER.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2018049515 de 05/09/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/050923 de 14/03/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 05/03/2020

(57) **Resumo:** A divulgação refere-se a métodos para tratar indivíduos expostos a agentes neurotóxicos com dantroleno ou com um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.



“USO DE DANTROLENO OU UM SAL FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL DO MESMO PARA OBTENÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA”

Campo técnico

[0001] A divulgação refere-se a métodos para tratar indivíduos expostos a agentes neurotóxicos com dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno), ou com um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

Histórico

[0002] Agentes neurotóxicos, também referidos como agentes nervosos são compostos orgânicos de fósforo que interrompem a transmissão de impulsos nervosos no sistema nervoso bloqueando acetilcolinesterase. Estes agentes, quer em forma gasosa, aerossol ou líquida são extremamente tóxicos e têm um efeito muito rápido. A intoxicação por agentes neurotóxicos produz um grande número de sintomas, incluindo miose unilateral ou bilateral, dor de cabeça, convulsões, perda de consciência, coma e morte. Em particular, a intoxicação por agentes neurotóxicos produz convulsões, que podem evoluir rapidamente para estado epiléptico (SE), o que leva a danos cerebrais relacionados a convulsões. Convulsões induzidas por agentes neurotóxicos geralmente se tornam refratárias à terapia antiepiléptica padrão.

[0003] Os cuidados médicos para tratar o envenenamento por agentes neurotóxicos provavelmente serão adiados além da janela de oportunidade terapêutica para interromper as convulsões induzidas por agentes neurotóxicos e os danos cerebrais relacionados a convulsões continuarão ao longo de uma cascata patológica. Assim, é necessária uma terapia medicamentosa que seja capaz de interromper a cascata patológica para prover neuroproteção durante a fase

refratária das convulsões induzidas por agentes neurotóxicos.

Sumário da invenção

[0004] A divulgação refere-se a métodos par tratar indivíduos expostos a um agente neurotóxico com uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade de dantroleno (ou de um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou de um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo.

Breve descrição das figuras

[0005] A Figura 1 mostra o peso corporal médio do grupo de teste ao longo do tempo.

[0006] A Figura 2A mostra os resultados do teste de preferência com sacarose no dia 14 do estudo.

[0007] A Figura 2B mostra os resultados do teste de preferência com sacarose no dia 15 do estudo.

[0008] A Figura 3 mostra os resultados do teste de nado forçado.

[0009] A Figura 4 mostra os escores médios de necrose do córtex frontoparietal.

[0010] A Figura 5A mostra fotomicrografia do córtex frontoparietal de um animal do Grupo E (controle positivo, água 50 minutos após o início do SE). As setas marcam neurônios desbotados e encolhidos. O escore de necrose é 4.

[0011] A Figura 5B mostra fotomicrografia do córtex frontoparietal de um animal do Grupo D (30 mg/kg de RYANODEX®, 20 minutos após o início do SE). As setas marcam neurônios normais. O escore de necrose é 0.

Descrição detalhada de incorporações ilustrativas

[0012] A presente divulgação pode ser entendida mais prontamente por referência à seguinte descrição detalhada

considerada juntamente com as figuras de acompanhamento e exemplos, que fazem parte desta divulgação. Deve-se entender que esta divulgação não se limita às composições ou métodos específicos descritos e/ou mostrados aqui, e que a terminologia usada neste documento tem o objetivo de descrever incorporações particulares apenas a título de exemplo e não se destina a limitar a divulgação reivindicada. Além disso, conforme usado no relatório descritivo, incluindo as reivindicações anexas, as formas singulares "um", "uma", "o" e "a" incluem o plural e a referência a um valor numérico específico inclui pelo menos esse valor específico, a menos que o contexto mostre claramente o contrário. Todas as faixas numéricas são inclusivas e combináveis.

[0013] O modificador "cerca de" deve ser considerado como divulgando a faixa definida pelos valores absolutos dos dois pontos extremos. Por exemplo, a expressão "de cerca de 2 a cerca de 4" divulga também a faixa "de 2 a 4". Quando usado para modificar um número único, o termo "cerca de" pode referir-se a mais ou menos de 10% do número indicado e inclui o número indicado. Por exemplo, "cerca de 10%" pode indicar uma faixa de 9% a 11%, e "cerca de 1" significa de 0,9 a 1,1.

[0014] Deve-se compreender que determinadas características da divulgação que são, para maior clareza, aqui descritas no contexto de incorporações separadas, também podem ser providas em combinação em uma única incorporação. Por outro lado, várias características da divulgação que são, por uma questão de brevidade, descritas no contexto de uma única incorporação, também podem ser fornecidas separadamente ou em qualquer subcombinação. Além disso, a referência a valores declarados nas faixas inclui todo e qualquer valor dentro

dessa faixa.

[0015] Quando aqui usado, o termo "composição farmacêutica" significará uma composição apropriada para administração em seres humanos e contém excipientes farmacologicamente aceitáveis, por exemplo, estabilizantes, agentes de volume, tampões, transportadores, diluentes, veículos, solubilizantes e ligantes. Quando aqui usada, composição farmacêutica inclui, mas não se limita a uma forma líquida pronta para infusão ou injeção subcutânea e injeção intramuscular.

[0016] "Quantidade terapêuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de um agente farmacêutico ativo aqui descrito que é suficiente para inibir, interromper ou causar uma melhoria em um distúrbio ou condição sendo tratada em um indivíduo em particular ou em uma população de indivíduos. Em determinadas incorporações, num ser humano ou outro mamífero, uma quantidade terapêuticamente eficaz pode ser determinada experimentalmente num laboratório ou ambiente clínico, ou pode ser a quantidade requerida pelas diretrizes governamentais para a doença e o indivíduo em particular a serem tratados.

[0017] Quando aqui usado, "melhorar" refere-se à diminuição da gravidade de um distúrbio ou condição sendo tratada em um indivíduo particular ou população de indivíduos.

[0018] Quando aqui usado, "paciente" ou "indivíduo" pretende significar um mamífero. Assim, os métodos aqui descritos são aplicáveis a indivíduos humanos e não humanos.

[0019] Quando aqui usado, o termo "farmacologicamente aceitável" significa que o que é farmacologicamente aceitável, por exemplo, componentes, incluindo recipientes, de uma composição farmacêutica, não causa perda inaceitável de

atividade farmacológica ou efeitos colaterais adversos inaceitáveis. Exemplos de componentes farmacologicamente aceitáveis são providos na Farmacopeia dos Estados Unidos (USP), no Formulário Nacional (NF), adotado na Convenção Farmacopeia dos Estados Unidos, realizada em Rockville, Maryland em 1990 e emitido em 1996 pelo U.S. Food and Drug Administration (FDA) (ambos são aqui incorporados por referência, incluindo quaisquer desenhos). Outros graus de soluções ou componentes que satisfazem limites e/ou especificações necessárias que estão fora de USP/NF também podem ser usadas.

[0020] Quando aqui usado, o termo "sal farmacologicamente aceitável" significa um sal de um composto da divulgação que é farmacologicamente aceitável e que possui a atividade farmacológica desejada do composto original. Em particular, tais sais não são tóxicos e podem ser sais de adição de ácidos e sais de adições de bases inorgânicos ou orgânicos. Especificamente, tais sais incluem: sais formados quando um próton ácido presente no composto original é substituído por um íon metálico, por exemplo, um íon de metal alcalino, um íon de metal alcalino-terroso ou um íon alumínio; ou coordena com uma base orgânica tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, N-metil-glucamina e similares. Os sais incluem ainda, apenas como exemplo, sódio, potássio, cálcio, magnésio, amônio, tetra-alquil-amônio e similares; e quando o composto contém uma funcionalidade básica, sais de ácidos orgânicos ou inorgânicos não tóxicos, tais como cloretos, brometos, tartaratos, mesilato, acetatos, maleatos, oxalatos e similares.

[0021] Quando aqui usado, "agente neurotóxico" ou "agente

nervoso" refere-se a compostos que afetam a transmissão de impulsos nervosos no sistema nervoso. Os agentes neurotóxicos são compostos orgânicos de fósforo, isto é, eles são da fórmula $(R)_3P(O)$, na qual os grupos R podem ser iguais ou diferentes. Agentes neurotóxicos do tipo "G" incluem metilfosfonofluoridrato de O-pinacolila (soman, GD), N,N-dimetil-fosforamidocianidrato de etila (tabun, GA), metilfosfonofluoridrato de propan-2-ila (sarin, GB), metilfosfonofluoridrato de ciclo-hexila (ciclo-sarin, GF) e 2-(dimetilamino)etila (GV). Agentes neurotóxicos do tipo "V" incluem S-(2-dietil-amino-etil) metil-fosfonotiolato de O-ciclopentila (EA-3148), (S)-(etil {[2-(dietilamino) etil] sulfonilas}(etil)fosfonatos) tais como (S)-(etil {[2-(dietilamino)etil]sulfanil}(etil)fosfinato) (VE), fosforotioato de O,O-dietil S-[2-(dietilamino)etila] (VG), metil-fosfonotioato de S-[2-(dietilamino)etil] O-etila (VM), N,N-dietil-2-(metil-(2-metil propoxi)fosforil) sulfanil-etanamina (VR), e ({2-[bis(propan-2-il)amino]etil}sulfanil)(metil)fosfinato de etila (VX). Os métodos aqui descritos podem ser usados para tratar um indivíduo exposto a um agente neurotóxico. Os métodos aqui descritos também podem ser usados para tratar um indivíduo exposto a dois ou mais agentes neurotóxicos.

[0022] Quando aqui usadas, as frases "resultante de exposição a um agente neurotóxico" e "devido à exposição a um agente neurotóxico" referem-se a efeitos que são uma consequência direta de exposição a agente neurotóxico, bem como a efeitos que são uma consequência secundária de exposição a agente neurotóxico, bem como a efeitos que são uma consequência indireta de exposição a agente neurotóxico.

[0023] Entre outras coisas, a divulgação refere-se a métodos para tratar um indivíduo exposto a um agente neurotóxico com uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade de dantroleno ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo. A divulgação refere-se também a métodos para tratar um indivíduo exposto a um agente neurotóxico com uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade de um metabólito de dantroleno, por exemplo, 5-hidroxi-dantroleno, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo. Por exemplo, em alguns aspectos, os métodos descritos impedem dano neurológico secundário a exposição a agente neurotóxico. Em outros aspectos, os métodos descritos provêm efeitos neuroprotetores após exposição a agente neurotóxico. Em outros aspectos, os métodos descritos melhoram dano a tecido cerebral secundário a exposição a agente neurotóxico. Em outros aspectos, os métodos descritos melhoram dano a tecido cerebral secundário a estado epiléptico a exposição a agente neurotóxico. Em outros aspectos, os métodos descritos impedem necrose neuronal devido à exposição a agente neurotóxico. Em outros aspectos, os métodos descritos tratam sobrecarga de cálcio intracelular devido a exposição a agente neurotóxico. Em outros aspectos, os métodos descritos melhoram a sobrecarga de cálcio intracelular devido a exposição a agente neurotóxico. Em outros aspectos, os métodos descritos impedem a sobrecarga de cálcio intracelular devido a exposição a agente neurotóxico.

[0024] Os indivíduos aqui descritos podem ser expostos a um agente neurotóxico via inalação. Em outros aspectos, indivíduos são expostos a um agente neurotóxico via consumo de um líquido ou alimento que foi contaminado com um agente

neurotóxico. Em outros aspectos, indivíduos são expostos a um agente neurotóxico via administração subcutânea, intravenosa ou intramuscular do agente ao indivíduo.

[0025] Em alguns aspectos, os métodos referem-se a métodos para proteger um indivíduo de necrose neural, após o indivíduo ter sido exposto a um agente neurotóxico. Nestas incorporações, uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade de dantroleno (ou de um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou de um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, é administrada ao indivíduo após ele ter sido exposto a um agente neurotóxico. Quando aqui usado, o termo "proteção" de necrose neural abrange diminuição da gravidade dos efeitos do agente neurotóxico ou melhora do efeito do agente neurotóxico ou diminuição do dano neural resultante da exposição ao agente neurotóxico. Em alguns aspectos, o termo "proteção" de necrose neural abrange a prevenção de necrose neural num indivíduo que foi exposto a um agente neurotóxico. Isto é, sujeitos que são "protegidos" de necrose neural por administração das composições contendo dantroleno descritas (ou composições compreendendo um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) têm melhor desempenho em testes neurocomportamentais, quando se compara com indivíduos expostos a agente neurotóxico aos quais não foram administradas as composições descritas.

[0026] Em algumas incorporações, todo o sistema nervoso central do indivíduo está protegido de necrose neural. Em algumas incorporações, o córtex frontoparietal, o hipocampo e/ou o tálamo estão protegidos de necrose neural. Em outros aspectos, o córtex frontoparietal estará protegido de necrose neural. Em outros aspectos, o hipocampo está protegido de

necrose neural. Em outras incorporações, o tálamo está protegido de necrose neural.

[0027] A presença e extensão de necrose neural podem ser determinadas usando métodos conhecidos na técnica, incluindo testes neurocomportamentais, testes radiológicos e avaliação de patologia.

[0028] A divulgação refere-se também a métodos para proteger um indivíduo de uma diminuição da função do sistema nervoso central resultante de exposição a um agente neurotóxico. Estes métodos compreendem administrar ao indivíduo uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade de dantroleno (ou de um metabólito de dantroleno, tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou de um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo após o indivíduo ter sido exposto a um agente neurotóxico.

[0029] A divulgação refere-se também a métodos para proteger um indivíduo de uma disfunção do sistema nervoso central resultante da exposição a um agente neurotóxico. Estes métodos compreendem administrar ao indivíduo uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade de dantroleno (ou de um metabólito de dantroleno, tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou de um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo após o indivíduo ter sido exposto a um agente neurotóxico.

[0030] A divulgação refere-se também a métodos para tratar mudanças comportamentais num indivíduo resultantes de exposição a um agente neurotóxico. Estes métodos compreendem administrar ao indivíduo uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade de dantroleno (ou de um metabólito de dantroleno, tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou

de um sal farmacologicamente aceitável do mesmo após o indivíduo ter sido exposto a um agente neurotóxico.

[0031] Quando aqui usada, "proteção" de uma diminuição na função do sistema nervoso central abrange diminuição da gravidade dos efeitos do agente neurotóxico sobre o sistema nervoso central ou melhorar os efeitos do agente neurotóxico sobre o sistema nervoso central ou diminuir os efeitos do agente neurotóxico sobre o sistema nervoso central. Isto é, indivíduos que estão "protegidos" de uma diminuição na função do sistema nervoso central por administração das composições descritas têm um desempenho melhor nos testes neurocomportamentais, quando se compara com indivíduos expostos a agente neurotóxico aos quais não foram administradas as composições descritas.

[0032] A divulgação refere-se também a métodos para tratar convulsões induzidas por agente neurotóxico num indivíduo que foi exposto a um agente neurotóxico. Em alguns aspectos, as convulsões tratadas são estado epiléptico (SE). Estes métodos compreendem administrar ao indivíduo uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade de dantroleno (ou de um metabólito de dantroleno, tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou de um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Quando aqui usado, o tratamento de convulsões induzidas por agente neurotóxico resulta numa redução na gravidade ou na duração das convulsões. Em outros aspectos, o tratamento resulta numa redução tanto na gravidade como na duração da convulsão.

[0033] A quantidade de dantroleno, ou de um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, que é terapêuticamente eficaz para tratar o indivíduo de acordo com qualquer um dos

métodos descritos, deve ser determinada por um médico especialista na técnica. A quantidade terapêuticamente eficaz pode ser a quantidade necessária para tratar o indivíduo com uma única dose. Alternativamente, a quantidade terapêuticamente eficaz pode ser a quantidade cumulativa necessária para tratar o indivíduo com mais que uma dose, por exemplo, múltiplas doses, durante um tratamento crônico ou prolongado.

[0034] Naquelas incorporações nas quais o indivíduo é um ser humano, a quantidade terapêuticamente eficaz de dantroleno é de 1 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, administrada em uma ou duas doses. Em outros aspectos, a quantidade terapêuticamente eficaz de dantroleno é de 1 mg/kg a cerca de 20 mg/kg. Em outros aspectos, a quantidade terapêuticamente eficaz de dantroleno é de cerca de 5 mg/kg a cerca de 30 mg/kg. Em outros aspectos, a quantidade terapêuticamente eficaz de dantroleno é de cerca de 10 mg/kg a cerca de 30 mg/kg. Em outros aspectos, a quantidade terapêuticamente eficaz de dantroleno é de cerca de 15 mg/kg a cerca de 30 mg/kg. Em outros aspectos, a quantidade terapêuticamente eficaz de dantroleno é de cerca de 20 mg/kg a cerca de 30 mg/kg. Em outros aspectos, a quantidade terapêuticamente eficaz de dantroleno é de cerca de 5 mg/kg a cerca de 20 mg/kg. Em outros aspectos, a quantidade terapêuticamente eficaz de dantroleno é de cerca de 5 mg/kg a cerca de 15 mg/kg. Em outros aspectos, a quantidade terapêuticamente eficaz de dantroleno é de cerca de 5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg. Em outros aspectos, a quantidade terapêuticamente eficaz de dantroleno é de cerca de 10 mg/kg a cerca de 20 mg/kg. Em outros aspectos, a quantidade terapêuticamente

eficaz de dantroleno é de cerca de 2 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, preferivelmente de cerca de 2 mg/kg a cerca de 6 mg/kg. Em outros aspectos, a quantidade terapeuticamente eficaz de dantroleno é de cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou cerca de 30 mg/kg. Em algumas incorporações, a quantidade terapeuticamente eficaz de dantroleno para tratar um indivíduo humano é maior que 30 mg/kg, por exemplo, de 30 mg/kg a cerca de 100 mg/kg, administrada em uma ou duas doses. Em algumas incorporações, a quantidade terapeuticamente eficaz de dantroleno para tratar um indivíduo humano é de cerca de 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, ou cerca de 100 mg/kg.

[0035] A quantidade de metabólito de dantroleno (tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou de um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, que é terapeuticamente eficaz para tratar o indivíduo de acordo com qualquer um dos métodos descritos, deve ser determinada por um médico especialista na técnica. Naquelas incorporações nas quais o indivíduo é um ser humano, a quantidade terapeuticamente eficaz do metabólito de dantroleno é de 1 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, administrada em uma ou duas doses. Em outros aspectos, a quantidade terapeuticamente eficaz do metabólito de dantroleno é de 1 mg/kg a cerca de 20 mg/kg. Em outros aspectos, a quantidade terapeuticamente eficaz do metabólito de dantroleno é de cerca de 5 mg/kg a cerca de 30 mg/kg. Em outros aspectos, a quantidade terapeuticamente eficaz do metabólito de dantroleno é de cerca de 10 mg/kg a cerca de 30 mg/kg. Em outros aspectos, a quantidade terapeuticamente eficaz do metabólito de dantroleno é de cerca de 15 mg/kg a cerca de 30

mg/kg. Em outros aspectos, a quantidade terapeuticamente eficaz do metabólito de dantroleno é de cerca de 20 mg/kg a cerca de 30 mg/kg. Em outros aspectos, a quantidade terapeuticamente eficaz do metabólito de dantroleno é de cerca de 5 mg/kg a cerca de 20 mg/kg. Em outros aspectos, a quantidade terapeuticamente eficaz do metabólito de dantroleno é de cerca de 5 mg/kg a cerca de 15 mg/kg. Em outros aspectos, a quantidade terapeuticamente eficaz do metabólito de dantroleno é de cerca de 5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg. Em outros aspectos, a quantidade terapeuticamente eficaz do metabólito de dantroleno é de cerca de 10 mg/kg a cerca de 20 mg/kg. Em outros aspectos, a quantidade terapeuticamente eficaz do metabólito de dantroleno é de cerca de 2 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, preferivelmente de cerca de 2 mg/kg a cerca de 6 mg/kg. Em outros aspectos, a quantidade terapeuticamente eficaz do metabólito de dantroleno é de cerca de 15 mg/kg a cerca de 20 mg/kg. Em outros aspectos, a quantidade terapeuticamente eficaz do metabólito de dantroleno é de cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou cerca de 30 mg/kg. Em algumas incorporações, a quantidade terapeuticamente eficaz do metabólito de dantroleno para tratar um indivíduo humano é maior que 30 mg/kg, por exemplo, de 30 mg/kg a cerca de 100 mg/kg, administrada em uma ou duas doses. Em alguns aspectos, a quantidade terapeuticamente eficaz do metabólito de dantroleno para tratar um indivíduo humano é de cerca de 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, ou cerca de 100 mg/kg.

[0036] Em alguns aspectos da divulgação, o momento da

administração da composição farmacêutica compreendendo dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, ao indivíduo, após exposição a um agente neurotóxico, pode afetar a quantidade de proteção de necrose neural conferida ao indivíduo.

[0037] Em alguns aspectos da divulgação, o momento da administração da composição farmacêutica compreendendo dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, ao indivíduo, após exposição a um agente neurotóxico, pode afetar a quantidade de diminuição na função do sistema nervoso central conferida ao indivíduo.

[0038] Em alguns aspectos da divulgação, o momento da administração da composição farmacêutica compreendendo dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, ao indivíduo, após exposição a um agente neurotóxico, pode afetar o tratamento de convulsões induzidas por agente neurotóxico no indivíduo.

[0039] Composições compreendendo dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, podem ser administradas cronicamente ao indivíduo, em duas ou mais doses, isto é, durante o curso de duas ou mais semanas, por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou mais semanas após o indivíduo ter sido exposto ao agente neurotóxico. Composições compreendendo dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, podem ser administradas agudamente ao

indivíduo, em duas ou mais doses, isto é, durante o curso de menos que duas semanas, por exemplo, durante o curso de horas ou dias, por exemplo, durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, ou 24 horas ou durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, ou 13 dias, após o indivíduo ter sido exposto ao agente neurotóxico.

[0040] Em alguns aspectos, em relação ao momento da composição farmacêutica compreendendo dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, a composição farmacêutica compreendendo dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, pelo menos uma dose é administrada ao indivíduo 24 horas ou menos após o indivíduo ter sido exposto ao agente neurotóxico. Em alguns aspectos, a composição farmacêutica compreendendo dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, pelo menos uma dose é administrada ao indivíduo 20 horas ou menos após o indivíduo ter sido exposto ao agente neurotóxico. Em alguns aspectos, a composição farmacêutica compreendendo dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, pelo menos uma dose é administrada ao indivíduo 16 horas ou menos após o indivíduo ter sido exposto ao agente neurotóxico. Em alguns aspectos, a composição farmacêutica compreendendo dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, pelo menos uma dose é administrada ao

indivíduo 12 horas ou menos após o indivíduo ter sido exposto ao agente neurotóxico. Em alguns aspectos, a composição farmacêutica compreendendo dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, pelo menos uma dose é administrada ao indivíduo 8 horas ou menos após o indivíduo ter sido exposto ao agente neurotóxico. Em alguns aspectos, a composição farmacêutica compreendendo dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, pelo menos uma dose é administrada ao indivíduo 4 horas ou menos após o indivíduo ter sido exposto ao agente neurotóxico. Em alguns aspectos, a composição farmacêutica compreendendo dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, pelo menos uma dose é administrada ao indivíduo 2 horas ou menos após o indivíduo ter sido exposto ao agente neurotóxico. Em alguns aspectos, a composição farmacêutica compreendendo dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, pelo menos uma dose é administrada ao indivíduo 1 hora ou menos após o indivíduo ter sido exposto ao agente neurotóxico. Em alguns aspectos, a composição farmacêutica compreendendo dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, pelo menos uma dose é administrada ao indivíduo em cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, ou em cerca de 24 horas após o indivíduo ter sido exposto a um agente neurotóxico.

[0041] Em alguns aspectos, a composição farmacêutica

compreendendo dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, pode liberar a quantidade terapêuticamente eficaz de dantroleno (ou de um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ao indivíduo exposto a agente neurotóxico em uma dose. Em outros aspectos, duas ou mais doses da composição farmacêutica podem ser necessárias para liberar a quantidade terapêuticamente eficaz de dantroleno (ou de um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ao indivíduo exposto a agente neurotóxico. Estas dosagens adicionais podem ser administradas substancialmente simultaneamente com a primeira dose. Nesses aspectos nos quais 3 ou mais doses são administradas, cada dose pode ser separada em tempo da administração de qualquer outra dose.

[0042] Em alguns aspectos da divulgação, a administração de dantroleno (ou de um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ao indivíduo exposto a agente neurotóxico é uma terapia adjunta para exposição a agente neurotóxico. Os indivíduos expostos a um agente neurotóxico também podem receber um ou mais antídotos do agente neurotóxico. Uma classe de antídotos para exposição a agente neurotóxico é a dos reativadores de acetilcolinesterase, por exemplo, cloreto de asoxima (HI-6). Outra classe de antídotos para exposição a agente neurotóxico é a dos antagonistas reversíveis de receptores de acetilcolina, por exemplo, atropina, por exemplo, metil nitrato de atropina. Indivíduos expostos a agentes neurotóxicos também podem receber medicamento anticonvulsivo. Medicamentos anticonvulsivos exemplares incluem aldeídos (por exemplo, paraldeído), álcoois alílicos

aromáticos (por exemplo, estiripentol), benzodiazepinas (por exemplo, clobazam, clonazepam, clorazepato, diazepam, midazolam, lorazepam, nitrazepam, temazepam, nimetazepam), barbituratos (por exemplo, fenobarbital, metil-fenobarbital, barbexaclona), brometos (por exemplo, brometo de potássio), carbamatos (por exemplo, felbamato), carboxamidas (por exemplo, carbamazepina, oxacarbazepina, acetato de eslicarbazepina), ácidos graxos (por exemplo, ácido valpróico, valproato de sódio, divalproex sódico, vigabatrina, progabida, tiagabina), topiramato, análogos de GABA (por exemplo, gabapentina, pregabalina), hidantoínas (por exemplo, etotoína, fenitoína, mefenitoina, fosfenitoina), oxazolidinedionas (por exemplo, parametadiona, trimetadiona, etadiona), propionatos (por exemplo, beclamida), pirimidinadionas (por exemplo, primidona), pirrolidinas (por exemplo, brivaracetam, levitiracetam, seletracetam), succinimidas (por exemplo, etossuximida, fensuximida, messuximida), sulfonamidas (por exemplo, acetazolamida, sultiame, metazolamida, zonisamida), triazinas (por exemplo, lamotrigina), ureias (por exemplo, feneturida, fenacemida), valproilamidas (por exemplo, valpromida, valnoctamida), perampanel, e combinações dos mesmos. Em alguns aspectos, o medicamento anticonvulsivo é uma benzodiazepina, por exemplo, midazolam. Em outros aspectos, o medicamento anticonvulsivo é um barbiturato. Em outros aspectos ainda, o medicamento anticonvulsivo é uma hidantoína. Em alguns aspectos, o medicamento anticonvulsivo é paraldeído. Em outros aspectos, o medicamento anticonvulsivo é um ácido graxo. Em outros aspectos, o medicamento anticonvulsivo é topiramato.

[0043] Naqueles aspectos onde se administra um antídoto ao indivíduo exposto a agente neurotóxico, o dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) é administrado após a administração do antídoto. Por exemplo, o dantroleno pode ser administrado após a administração do reativador de acetilcolinesterase e/ou após a administração do antagonista reverso de receptores de acetilcolina.

[0044] Naqueles aspectos onde se administra um medicamento anticonvulsivo ao indivíduo exposto a agente neurotóxico, o dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) pode ser administrado simultaneamente com a administração do medicamento anticonvulsivo. O dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) também pode ser administrado substancialmente simultaneamente com a administração do medicamento anticonvulsivo, por exemplo, em cerca de 5 minutos da administração do medicamento anticonvulsivo. Em outras incorporações, o dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) é administrado antes do medicamento anticonvulsivo ser administrado. Em outras incorporações, o dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) é administrado após a administração do medicamento anticonvulsivo.

[0045] A composição farmacêutica compreendendo dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo pode ser administrada via intravenosa. Em outros aspectos a composição farmacêutica compreendendo dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo pode ser

administrada via transdérmica. Em outros aspectos a composição farmacêutica compreendendo dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo pode ser administrada via intramuscular. Em outros aspectos a composição farmacêutica compreendendo dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo pode ser administrada via intraóssea. Em outros aspectos a composição farmacêutica compreendendo dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo pode ser administrada via subcutânea.

[0046] Composições farmacêuticas preferidas para uso nos métodos descritos incluem dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, manitol, um polissorbato (por exemplo, polissorbato 80), uma povidona (por exemplo, povidona K12), um ajustador de pH opcional (por exemplo, NaOH ou HCl), e água.

[0047] Uma composição farmacêutica particularmente preferida compreendendo dantroleno (ou um metabólito de dantroleno tal como 5-hidroxi-dantroleno) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo é RYANODEX® (dantroleno sódico, Eagle Pharmaceuticals, Woodcliff Lake, NJ). RYANODEX® é uma suspensão injetável provida como um pó liofilizado estéril. RYANODEX® é fornecido em pequenos frascos de 20 mL contendo 250 mg de dantroleno sódico, 125 mg de manitol, 25 mg de polissorbato 80, 4 mg de povidona K12 e hidróxido de sódio ou ácido clorídrico suficiente para ajuste de pH.

Quando reconstituído com 5 mL de água estéril para injeção USP, este produz uma suspensão.

[0048] Os exemplos seguintes são fornecidos para ilustrar alguns dos conceitos descritos nesta divulgação. Embora se considere cada exemplo para prover incorporações individuais específicas da divulgação, nenhum dos Exemplos deve ser considerado como limitativo das incorporações mais gerais aqui descritas. Nos exemplos seguintes, foram feitos esforços para garantir exatidão com respeito aos números usados (por exemplo, quantidades, temperatura, etc.), mas alguns erros e desvios experimentais devem ser contabilizados.

Exemplos

Exemplo 1

Visão geral do estudo

[0049] O objetivo do estudo foi determinar se o RYANODEX® possui efeitos neuroprotetores em um modelo de sobrevida GD (soman) estabelecido em ratos. Doses únicas de 10 ou 30 mg/kg de RYANODEX® foram administradas por injeção em bolo IV aos 20 ou 50 minutos após o início das convulsões induzidas por soman. A sobrevivência foi facilitada pelo tratamento com cloreto de asoxima (HI-6) trinta minutos antes da injeção subcutânea (SQ) de soman, metil nitrato de atropina um minuto após o início das convulsões induzidas por soman, e midazolam vinte minutos após o início das convulsões induzidas por soman que atingiram um escore de Racine de pelo menos 3. Os controles incluíram um grupo de ratos não tratados (ingênuos) e outro grupo que receberá água estéril 50 minutos após o início das convulsões induzidas por soman.

[0050] Executou-se uma série de testes neurocomportamentais durante um período de aproximadamente 28 dias após exposição

de GD com dose única. No dia 29, os ratos foram sacrificados sob anestesia via exsanguinação e perfusão intracardíaca. O cérebro de cada rato foi coletado para exame microscópico de neuropatologia e o coração de cada rato foi coletado para possível exame de patologia.

[0051] Os indivíduos experimentais foram ratos machos Sprague-Dawley canulados com veias jugulares com 8 ou mais semanas de idade (Charles River Laboratories) pesando 300-500 g no dia da exposição. O teste de preferência de sacarose e os testes neurocomportamentais de nado forçado foram utilizados para avaliar possíveis déficits em tarefas que envolvem aprendizado e/ou integração sensorial motora.

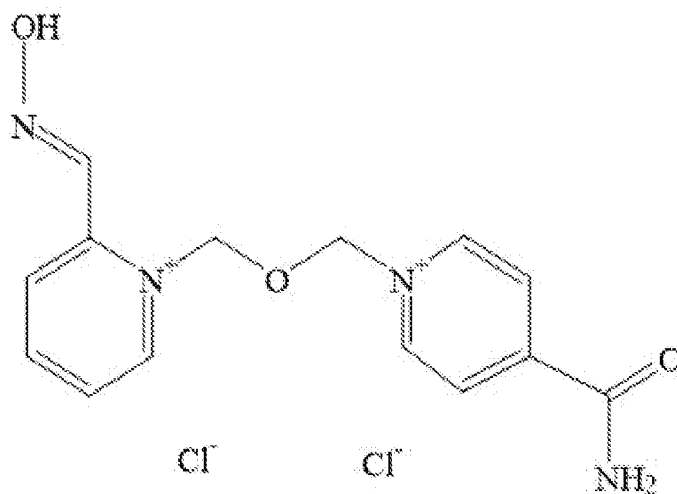
Materiais

[0052] Soman (GD) - diluído com cloreto de sódio a 0,9%. Soman é um agente neurotóxico orgânico de fósforo que desativa acetilcolina esterase (AChE) formando um aduto com a enzima.

- Nome químico: metil fosfonofluoridrato de pinacolila
- Fórmula: $C_7H_{16}FO_2P$
- Peso molecular: 182,17
- MRIGlobal Lote#: GD090415-DOC-1
- Padrão primário ID: 13972-49-3
- Pureza: 100%
- Condições de armazenamento: $<4^{\circ}C$

[0053] HI-6

- Nome químico: metanossulfonato de [(E)-[1-[(4-carbamoilpiridin-1-ilo-1-il)metoxi-metil]piridin-2-ilideno] metil]-oxoazânio (cloreto de asoxima)
- Estrutura:



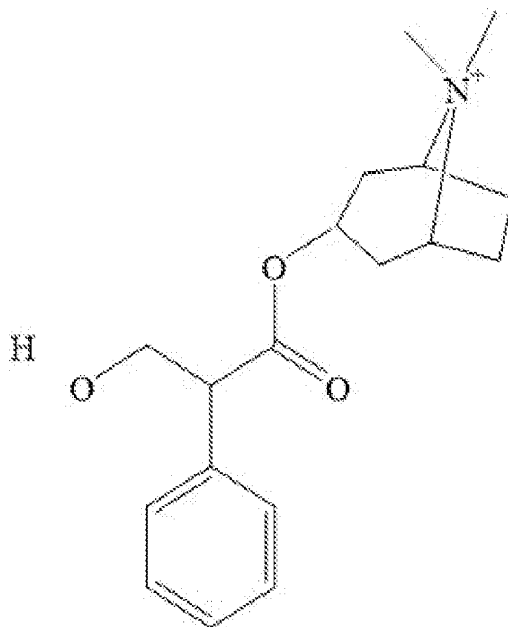
- Fórmula: $C_{14}H_{16}Cl_2N_4O_3$

- Peso molecular: 359,207

[0054] Metil nitrato de atropina

- Nome químico: Nitrato 3-hidroxi-2-fenil-propanoato de (8,8-dimetil-8-azoniabicciclo[3.2.1]octan-3-ila)

- Estrutura:



- Fórmula: $C_{18}H_{26}N_2O_6$

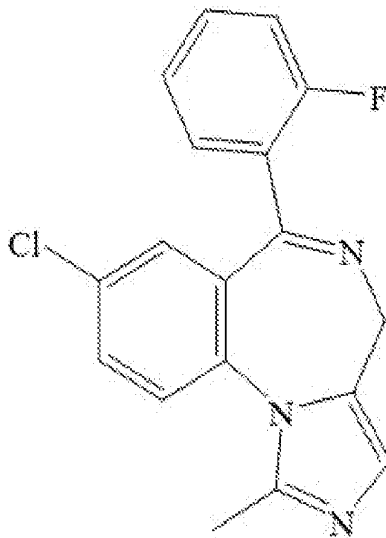
- Peso molecular: 366,414

[0055] Midazolam

- Nome químico: 8-cloro-6-(2-flúor-fenil)-1-metil-4H-

imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepina

• Estrutura:



• Fórmula: $C_{18}H_{13}ClFN_3$

• Peso molecular: 325,771

[0056] RYANODEX® é um fármaco aprovado por FDA para tratamento de hipertermia maligna em conjunto com medidas de suporte apropriadas e para a prevenção da hipertermia maligna em pacientes com alto risco.

Animais

[0057] Para este estudo, foram usados 48 ratos Sprague Dawley (mais 8 extras/substituições para um total de 56; Charles River Laboratories), com idade de 8 ou mais semanas e 300-500 g com cateteres vasculares jugulares implantados pelo fornecedor. Os ratos foram identificados por marcação de cauda ou marca de orelha com uma designação alfanumérica única. (Vide, SOP MRI-1504, "Procedure for Identification of Animals and Cages" ("Procedimento para identificação de animais e gaiolas")).

[0058] Todos os ratos incluídos no estudo estavam com boa saúde, livres de quaisquer sinais de doença clínica e possuíam cateteres patenteados apropriados para dosagem no

início do estudo. Após a entrega, os ratos foram inspecionados quanto a sinais de problemas de saúde e colocados em quarentena nas instalações convencionais de animais da Spencer por não menos que 48 horas. Um veterinário examinou a saúde dos animais e os liberou para o estudo (vide SOP MRI-1501, "Acclimation and/or Quarantine Procedures for Animals" ("Procedimentos de aclimatação e/ou quarentena para animais")). De acordo com SOP MRI-1500, os animais foram pesados dentro de três dias após a entrega. Durante o período do dia seguinte à chegada do animal até o fim do estudo, os ratos foram manuseados pelos funcionários pelo menos duas vezes ao dia para aclimatação e consistência ao longo do estudo.

[0059] Todos os ratos foram alimentados com alimento para roedores certificado pela Lab Diet, identificados como fonte, número de lote e certificado de análise, ad libitum. Não estavam presentes na ração quaisquer contaminantes que pudessem afetar os resultados do estudo, tal como verificado pelo certificado de análise (para cada lote fornecido pelo fornecedor; vide SOP MRI-1510, "Procedure for Feeding Animals" (Procedimento para alimentação de animais)). Garrafas de água (uma garrafa de água/gaiola) foram fornecidas com água de torneira durante todo o estudo, com exceção do período de aclimatação e realização do teste de preferência por sacarose (vide infra), durante o qual os ratos receberam duas garrafas de água contendo água de torneira ou uma garrafa de água contendo água de torneira e uma garrafa de água contendo uma solução de sacarose a 1%.

[0060] Os animais foram alojados em gaiolas de policarbonato Tecniplast com capota metálica (Tecniplast,

Phoenixville, PA) durante todo o período de aclimatação/quarentena e vida útil. Os animais foram alojados individualmente para evitar danos aos cateteres. Os ratos foram alojados em salas com controle ambiental, com pelo menos 10 trocas de ar por hora. As salas foram mantidas a uma temperatura de 20,0°C (68,0°F) a 26,1°C (79,0°F) e umidade relativa de 50% ± 20% com um ciclo de 12 horas claro/escuro por dia. A temperatura ambiente, a umidade e os ciclos de luz (12 h:12 h reverso claro/escuro) foram monitorados pelo sistema de monitoramento Amega View 24 h/dia ou por um higrotermógrafo durante o estudo (vide SOP MRI-1170, "Temperature and Humidity Monitoring in Animals Rooms" ("Monitoramento de temperatura e umidade e salas de animais")).

Doses

[0061] HI-6, soman, metil nitrato de atropina e midazolam: Doses únicas de HI-6 (IP, 125 mg/kg), soman (SC, 154 µg/kg, 1,4xLD₅₀), metil nitrato de atropina (IM, 2 mg/kg) e midazolam (IM, 2 mg/kg) foram selecionadas baseada em experiência anterior com o modelo. Esperava-se que esse regime causasse convulsões que atingissem um escore de Racine de pelo menos 3 e um número aceitável de sobreviventes para o estudo de acompanhamento.

[0062] RYANODEX®: Numa avaliação de tolerabilidade de dose única em ratos, foram administradas doses de bolo IV de 12, 40 e 60 mg/kg de RYANODEX® a grupos separados de ratos canulados na veia jugular. Doze mg/kg foram bem tolerados. Uma dose de 40 mg/kg resultou em leve perda de peso corporal dois dias após a administração, e 60 mg/kg resultaram em sacrifício moribundo aproximadamente vinte e quatro horas

após a administração para todos os cinco ratos que receberam a dose. Doses únicas em bolo IV de 10 e 30 mg/kg de RYANODEX® foram selecionadas para este estudo com base na tolerabilidade esperada. Doses de RYANODEX® de 10 e 30 mg/kg em rato são equivalentes a doses humanas de aproximadamente 2 e 6 mg/kg, respectivamente.

Esquema de dosagem

[0063] Um total de 48 mais até 8 ratos Sprague-Dawley machos extras com cateteres jugulares implantados pelo fornecedor foram utilizados em 6 grupos, tal como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Plano para estudo preliminar de eficácia com RYANODEX®

Grupo	Pré-tratamento com HI-6 (IP, 30 min antes de desafio com GD)	Soman "GD" (SQ)	Metil nitrato de atropina (IM, 1 min pós GD)	Midazolam (IM, ~20 minutos após início de atividade convulsiva)	RYANODEX® IV em 20 ou 50 min após início de convulsões
A (n=8)	125 mg/kg	154 µg/kg (1.4 x LD ₅₀)	2.0 mg/kg	2.0 mg/kg	50 min com 10 mg/kg
B (n=8)	125 mg/kg	154 µg/kg (1.4 x LD ₅₀)	2.0 mg/kg	2.0 mg/kg	50 min com 30 mg/kg
C (n=8)	125 mg/kg	154 µg/kg (1.4 x LD ₅₀)	2.0 mg/kg	2.0 mg/kg	20 min com 10 mg/kg
D (n=8)	125 mg/kg	154 µg/kg (1.4 x LD ₅₀)	2.0 mg/kg	2.0 mg/kg	20 min com 30 mg/kg
E (n=8)	125 mg/kg	154 µg/kg (1.4 x LD ₅₀)	2.0 mg/kg	2.0 mg/kg	Controle com água esteril a 50 min
F (N=8)	0 mg/kg	0 µg/kg	0 mg/kg	0 mg/kg	NA

Nota: Para os grupos C e D, RYANODEX® será administrado logo após injeção de midazolam.

[0064] A administração da dose começou com o Grupo D, seguida pelos Grupos B, A, C, E e F, respectivamente.

Preparação de dose

[0065] Preparou-se GD em cloreto de sódio a 0,9% resfriado

em gelo de acordo com SOP MRI-5821 "Preparation of Standards and Samples from Research Development and Testing Evaluation (RDTE) Dilute Solutions" ("Preparação de padrões a amostras a partir de soluções diluídas para desenvolvimento de pesquisa e avaliação de testes (RDTE)").

[0066] Preparou-se RYANODEX® adicionando 5 mL de água estéril para injeção num pequeno frasco do produto liofilizado.

Design experimental

Preparação de animal

[0067] Antes ou no dia de estudo 1 (dia de exposição a GD), ratos foram transferidos para o complexo de laboratório animal diluído.

Dosagem

[0068] No dia de estudo 1, todos os animais dos Grupos A-E receberam o reativador de colinesterase, HI-6 (125 mg/kg) via intraperitoneal (IP) 30 minutos antes do desafio de GD. Todos os ratos dos Grupos A-E foram expostos a GD (154 µg/kg ou ~1,4 x LD₅₀) por uma única injeção subcutânea. Aproximadamente um minuto após injeção de GD para os Grupos A-E, administrou-se metil nitrato de atropina (AMN) via IM (2,0 mg/kg). Aproximadamente 20 minutos após início de atividade convulsiva após exposição a GD tal como definido na Tabela 1 acima, todos os animais dos Grupos A-E, receberam midazolam numa dose intramuscular de 2 mg/kg. O Grupo E não recebeu HI-6, GD, AMN, midazolam e RYANODEX®. O RYANODEX® foi administrado através de uma micro-seringa de Hamilton, e, em seguida, o cateter foi lavado com 0,2 mL de água estéril para injeção, para garantir o fornecimento completo à veia.

[0069] O início da atividade convulsiva foi definido por um

escore de "3" na escala de Racine tal como descrito abaixo:

1= imobilização e olhar fixo

2= balançando a cabeça

3= clônus de membro anterior

4= clônus bilateral de membro anterior

5= clônus bilateral de membro anterior, elevação e perda de equilíbrio.

[0070] Se um rato não atingisse esse escore de "3" após aproximadamente 20 minutos após exposição a GD, ele seria substituído no estudo.

[0071] Tal como mostrado na Tabela 1, os ratos dos Grupos A e C receberam uma dose de 10 mg/kg de RYANODEX® IV e os ratos dos Grupos B e D receberam uma dose de 10 mg/kg de RYANODEX® IV ou em 50 ou em 20 minutos após o início de convulsões (escala de Racine de "3"). Os ratos do Grupo E receberam uma dose de controle (água estéril para injeção) IV num volume comparável ao da dose máxima de RYANODEX® em 50 minutos após o início de convulsões.

[0072] Em aproximadamente 6 horas de desafio pós GD para os Grupos A-E, e a cada AM e PM, os ratos receberam 5 mL de solução de lactato de Ringer SQ pelos primeiros 7 dias após o desafio para ajudar na recuperação. Uma vez os animais estando recuperados do desafio, conforme indicado observando-os comendo e bebendo livremente, movendo-se livremente na gaiola e sem sinais de desidratação (sem dreno de pele nas costas), os fluidos SQ cessaram. Isso foi em parte a critério do veterinário, com base em sua avaliação dos animais. Além disso, após o desafio durante esse mesmo período de tempo (até 7 dias após o desafio), os animais receberam hidrogéis (ClearH₂O) e mingau (ração umedecida na vasilha no chão da

gaiola) para ajuda-los a se recuperar dos efeitos do desafio de GD.

Pesos corporais

[0073] Os pesos corporais foram registrados para cada animal em estudo nas primeiras 72 horas após o recebimento do fornecedor, e novamente dos dias de estudo 1, 3, 5, 10, 17, 24 e 28. Foram coletados pesos corporais mais frequentes se o diretor do estudo discernisse que os animais continuavam a perder peso após o desafio. Se algum animal perdesse mais que 10% do seu peso corporal original, ele era pesado diariamente até que ele ganhasse consistentemente, em vez de perder peso. A Figura 1 mostra os pesos corporais de todos os grupos. Os pesos corporais de todos os grupos expostos a soman tratados com RYANODEX® (Grupos A, B, C, D) recuperaram para os valores de controle negativo (Grupo F) no dia de estudo 25.

Observações clínicas

[0074] Observações gerais de saúde foram realizadas diariamente durante o período de quarentena e aclimatação. Os animais foram tratados duas vezes ao dia durante o período de quarentena e aclimatação e durante toda a vida. No primeiro dia de estudo, os ratos foram observados antes da exposição. Após exposição a GD, os ratos foram monitorados com frequência para avaliar o aparecimento inicial de convulsões. Após dosagem de midazolam, RYANODEX® e/ou água estéril, os animais foram observados no mínimo duas vezes ao dia e pelo menos uma vez no dia da eutanásia. Observações clínicas, incluindo postura curvada, desidratação, pelagem áspera e inapetência foram avaliadas e registradas. O escore de Racine modificado foi registrado em cada ponto de observação, se aplicável. Quaisquer outras observações clínicas anormais

também foram registradas neste momento no caderno de estudo ou forma de captura de dados apropriada conforme SOP MRI-1528 "Procedure for Observations of Animals" ("Procedimento para observações de animais"). A hora da morte foi documentada; quaisquer animais encontrados mortos foram documentados no momento em que foram encontrados.

Disposição animal

[0075] O primeiro dia de estudo foi o dia de exposição a soman e tratamento com RYANODEX®. Todos os ratos que morreram foram encontrados mortos (não sacrificados em uma condição moribunda). O número de ratos especificado no protocolo foi de 8 sobreviventes/grupo, o que não foi alcançado devido à mortalidade associada à alta dose de soman. A sobrevivência global foi de 27 dos 45 ratos (60%) expostos a soman. Vide a Tabela 2.

Tabela 2

Grupo	Regime	Dia e estudo de morte	Mortalidade/total (%)	Nº de ratos que completaram o estudo
A	10 mg/kg de RYANODEX® em 50 min	1 (3 ratos) ^(a) , 2, 15	5/10 (50%)	5
B	30 mg/kg de RYANODEX® em 50 min	1, 2, 3, 8	4/9 (44,4%)	5
C	10 mg/kg de RYANODEX® em 20 min	1, 15	2/8 (25%)	6
D	30 mg/kg de RYANODEX® em 20 min	1, 6, 11	3/9 (33%)	6
E	Água em 50 min	1 ^(b) , 2, 22, 23	4/9 (44,4%)	5
F	Nenhuma exposição/nenhum tratamento	Não aplicável	0/8 (0%)	8

(a) Um rato do Grupo A foi encontrado morto antes de receber midazolam e RYANODEX®.

(b) Um rato do Grupo E foi encontrado morto antes de receber água.

Características do modelo

Sobrevivência:	27 de 45 ratos expostos a soman (60%)
Tempo para início de convulsão após injeção de soman:	6,8 minutos \pm 1,93 Faixa: 4 - 11 minutos
Tempo para escore de Racine máximo ^(a) após injeção de soman:	8,4 minutos \pm 2,99 Faixa: 4 - 17 minutos
Escore de Racine máximo atingido no dia 1:	4,2 minutos \pm 0,59 Faixa: 3 - 5 minutos
Observações clínicas de convulsões durante o 28º dia da fase de vida	Embora os ratos não tenham sido observados continuamente, foram observadas convulsões isoladas da escala de Racine 5 em animais individuais durante toda a fase de vida
Peso corporal durante o 28º dia de fase de vida	Ocorreu 15% de perda de peso corporal para todos os grupos após exposição a soman; recuperação para níveis de controle por dia de estudo 25, EXCETO para animais de controle positivo

Testes neurocomportamentais

[0076] As áreas do cérebro danificadas pela exposição a soman incluíram o hipocampo e os córtices entorrinal, frontal e parietal. Essas áreas contêm estruturas e circuitos neurais para aprendizado, formação de memória, processamento de informações e outros processos cognitivos. Para avaliar os potenciais efeitos neuroprotetores do RYANODEX®, os ratos foram avaliados usando uma série de testes comportamentais estabelecidos que requerem aprendizado, memória, integração

motora sensorial e respostas adaptativas.

[0077] Os testes selecionados foram: (1) Teste de preferência para sacarose e (2) Teste de nado forçado.

Teste de preferência para sacarose

[0078] O teste de preferência para sacarose (SPT) utiliza a inclinação natural de ratos preferir água com açúcar em vez de água normal. É um teste estabelecido para medir o comportamento de busca do prazer (hedonia) ou a falta dele (anedonia) e requer que os animais se adaptem à mudança na colocação a esquerda versus a direita de garrafas contendo água da torneira e água com 1% de sacarose. O SPT ocorreu nos dias de estudo 14 e 15.

[0079] Os ratos foram alojados individualmente com acesso ad libitum a comida e água (uma única garrafa de água em cada gaiola) antes do SPT. Para a porção de aclimatação do SPT, 2 garrafas de água foram introduzidas na gaiola doméstica de cada rato por 5-6 dias. As garrafas de água foram equipadas com tubos de pinça que minimizam o vazamento e foram pesadas aproximadamente a cada 24 horas. Após a fase de aclimatação, uma garrafa de água foi enchida com aproximadamente 200 mL de solução aquosa de sacarose a 1% e a outra garrafa de água com aproximadamente 200 mL de água de torneira. A colocação esquerda/direita das garrafas foi então alterada e a quantidade de fluido restante foi novamente registrada vinte e quatro horas depois. A quantidade (mL) de solução de sacarose consumida foi expressa como uma porcentagem do volume total de líquido consumido (água com sacarose mais água) em cada um dos dois períodos de 24 horas e comparada entre grupos e dias.

[0080] Os resultados de SPT estão mostrados das Figuras 2A

e 2B. No segundo dia do teste (Dia 15), o grupo de controle positivo (água em 50 minutos) não manteve preferência por sacarose, ao contrário dos grupos 3 e 4 que receberam RYANODEX®.

Teste de nado forçado

[0081] O teste de nado forçado (FST) foi desenvolvido no final da década de 1970 por Porsolt como uma maneira rápida de rastrear a eficácia de medicamentos antidepressivos em roedores. A imobilidade aumentada que ocorre no final do FST de 5 minutos em roedores não tratados ("normais") foi interpretada para refletir "desespero comportamental", e sua reversão com fármacos antidepressivos correlacionou-se com a eficácia antidepressiva desses agentes nas pessoas. No entanto, a validade da construção deste teste foi questionada por vários motivos, incluindo: (1) os efeitos agudos dos antidepressivos são testados no FST, enquanto que em pacientes clinicamente deprimidos, os medicamentos requerem 4-6 semanas para melhora clínica; (2) a variável dependente no FST é a resposta aguda do animal ao teste e não é uma característica do animal; e (3) a interpretação do comportamento flutuante como "desespero comportamental" é antropomórfica. Acredita-se agora que a imobilidade progressiva observada em ratos não tratados reflete uma resposta adaptativa ao estresse agudo de ser colocado em um recipiente sem possibilidade de fuga.

[0082] No FST, a atividade de natação e a imobilidade foram medidas em uma câmara cilíndrica (46 cm de altura x 30 cm de diâmetro) cheia de água (30 cm de altura, 25°C). Termômetros foram usados para garantir que a temperatura da água seja constante em 24-26°C para todos os animais. Foram realizadas

duas sessões de natação, uma como "pré-teste" inicial de 15 min, seguida 24 horas depois por um segundo "teste" de 5 min. As sessões de teste foram gravadas em vídeo. O tempo gasto nadando ativamente e o tempo gasto imóvel foram pontuados para cada minuto do FST.

[0083] O FST foi realizado nos dias de estudo 25 e 26. No dia de estudo 25, cada rato foi colocado no cilindro de plexiglas cheio de água por 15 minutos. No dia de estudo 26, cada rato foi colocado de volta no cilindro de plexiglas cheio de água para o teste de 5 minutos. O tempo gasto em movimento e imóvel foi pontuado para cada rato durante cada minuto do teste. Os resultados do FST estão mostrados na Figura 3. Os grupos tratados com RYANODEX® apresentaram tendência semelhante ao grupo de controle negativo (sem tratamento), ou seja, aumento progressivo do tempo gasto imóvel durante os 5 minutos de duração do teste.

Ordem dos testes neurocomportamentais

[0084] A ordem dos testes neurocomportamentais passou do menos estressante para o mais estressante. Não foram realizados dois testes no mesmo dia. Todos os testes ocorreram pela manhã. Os testes foram executados da seguinte forma (após o dia de estudo 1 como dia de desafio:

- No dia de estudo 8, teste de preferência por sacarose (com duração de até 8 dias
- No dia de estudo 25, teste de nado forçado (dura 2 dias).

[0085] A ordem dos animais testados foi aleatória e as identidades dos grupos dos ratos submetidos a ambos os testes foram mascaradas, de modo que os técnicos que executaram esses testes eram cegos para o grupo de tratamento. A pontuação dos resultados dos testes foi realizada usando as

fitas de vídeo.

Eutanásia e processamento e coleta de tecidos

[0086] Para cada grupo no dia de estudo 29, todos os ratos sobreviventes foram anestesiados através de uma injeção IP de doses-alvo ≤ 200 mg/kg de cetamina e ≤ 20 mg/kg de xilazina. Os ratos foram perfundidos transcárdialmente com solução salina heparinizada seguida de paraformaldeído a 0,4% (o protocolo de perfusão segue Rao et al. (2006)). O coração de cada rato foi coletado e armazenado em fixador para possível avaliação.

[0087] Após a coleta de tecidos, as carcaças dos animais foram descartadas de acordo com SOP MRI-1526 "Disposal of Animal Carcasses and Medical Waste in Spencer Animal Care Facility" ("Descarte de carcaças de animais e resíduos médicos no Centro de Cuidados com Animais Spencer").

[0088] Os cérebros permaneceram em fixador de paraformaldeído de um dia para outro a 4°C por pelo menos 4 dias e depois enviados em seus frascos individuais contendo fixador em compressas de gelo de um dia para outro para HSRL, Inc., para avaliação. Cada cérebro foi cortado uniformemente em 7 seções, tal como descrito em Rao, et al. (2014) e em Bolon, et al. (2013) para obter a apresentação anatômica máxima de todo o cérebro, incluindo áreas conhecidas por serem afetadas por soman e outros agentes neurotóxicos orgânicos de fósforo (por exemplo, córtex piriforme, córtex entorrinal, hipocampo, amígdala, tálamo, cerebelo). As seções foram processadas rotineiramente, seccionadas a 5 microns, embebidas em parafina e coradas com hematoxilina e eosina. O pessoal estava encoberto para dosar grupos e tratamento.

Neuropatologia

[0089] As 7 seções do cérebro de cada rato foram avaliadas microscopicamente usando um sistema de pontuação semiquantitativo de 6 pontos. As lesões microscópicas foram classificadas em uma escala de 6 pontos:

0= normal

1= 1-5 células afetadas por campo microscópico de 40X

2= 6-20 células afetadas por campo microscópico de 40X

3= 21-50 células afetadas por campo microscópico de 40X

4= 50%-80% de células afetadas por campo microscópico de 40X

5= >80% de células afetadas por campo microscópico de 40X.

[0090] A Tabela 3 estabeleceu os dados de patologia dos córtices frontoparietais, mostrando a proporção de animais por escore de necrose por grupo.

Tabela 3

Pontuação de necrose						
	0	1	2	3	4	5
Grupo de estudo	Normal	1-5% de necrose	6-20% de necrose	21-50% de necrose	51-80% de necrose	>80% de necrose
A: 10 mg/kg de RYANODEX® 50 min	20	40	20	20	0	0
B: 30 mg/kg de RYANODEX® 50 min	0	60	40	0	0	0
C: 10 mg/kg de RYANODEX® 20 min	34	50	0	17	0	0
D: 30 mg/kg de RYANODEX® 20 min	50	34	17	0	0	0
E: Água 50 min	20	0	0	60	20	0
F: Nenhum desafio	100	0	0	0	0	0

[0091] A Figura 4 mostra escores médios de necroses do córtex frontoparietal.

[0092] As Figuras 5A e 5B mostram fotomicrografias. A Figura 5A mostra uma fotomicrografia de um animal do Grupo E, controle positivo, água 50 minutos após início de SE. As

setas marcam neurônios desbotados e encolhidos. Este animal recebeu uma pontuação de necrose de 4. A Figura 5B mostra uma fotomicrografia de um animal do Grupo D, 30 mg/kg de RYANODEX® 20 minutos após o início de SE. As setas marcam neurônios normais. Este animal recebeu uma pontuação de necrose de 0.

[0093] A Tabela 4 mostra as descobertas da patologia microscópica. Os animais do Grupo F (não tratados) não apresentaram descobertas significativas. O Grupo E tinha descobertas esperadas. A abrangência de necrose reduzida para o córtex frontoparietal em ratos tratados com RYANODEX®, em comparação com o controle positivo (Grupo E) foi consistente com os relatos da literatura.

Tabela 4

Local do cérebro	Escore médio de patologia para necrose				
	A 10 mg/kg em 50 min	B 30 mg/kg em 50 min	C 10 mg/kg em 20 min	D 30 mg/kg em 20 min	E Água em 50 min
Hipocampo, CA3	1,4 (0,89)	1,0 (0,71)	0,8 (0,75)	1,8 (1,72)	0,8 (0,45)
Hipocampo, CA2	4,8 (0,45)	4,2 (1,79)	3,5 (1,97)	4,7 (0,82)	5,0 (0,00)
Hipocampo, CA1	4,4 (1,34)	4,8 (0,45)	3,7 (2,16)	4,7 (0,82)	5,0 (0,00)
Córtex entorrinal	4,0 (1,73)	3,6 (2,19)	4,0 (1,10)	3,2 (2,48)	3,6 (1,14)
Córtex frontoparietal	1,4 (1,14)	1,4 (0,55)	1,0 (1,10)	0,7 (0,82)	2,6 (1,52)
Córtex piriforme	0,4 (0,89)	0,8 (1,30)	0,8 (0,98)	0,3 (0,82)	0,4 (0,89)
Tálamo	3,4 (1,69)	3,0 (0,00)	2,3 (1,03)	3,7 (0,52)	4,2 (0,04)

Conclusões

[0094] No geral, animais tratados com RYANODEX® tiveram melhor desempenho em testes neurocomportamentais comparados com animais não tratados. Os animais tratados com RYANODEX® mostraram menor nível de necrose celular no córtex cerebral,

comparados com animais não tratados. Os animais tratados com RYANODEX® mostraram um efeito de tratamento dependente da dose e do tempo, impactando a morte celular. Esses testes neurocomportamentais e descobertas patológicas são consistentes e parecem estar diretamente correlacionados. O RYANODEX® foi bem tolerado em todos os grupos e nenhum novo sinal de segurança foi observado.

Exemplo 2

Visão geral do estudo

[0095] O objetivo do estudo foi determinar se o RYANODEX® possui efeitos neuroprotetores em um modelo de sobrevivência GD (soman) estabelecido em ratos. Doses únicas de 10 ou 30 mg/kg de RYANODEX® foram administradas por injeção em bolo IV aos 20 ou 60 minutos após o início das convulsões induzidas por soman. A sobrevivência foi facilitada pelo tratamento com cloreto de asoxima (HI-6) trinta minutos após a injeção subcutânea (SQ) de soman, metil nitrato de atropina um minuto após injeção de soman SQ, e sulfato de atropina, cloreto de praloxima (2-PAM-Cl) e midazolam vinte minutos após o início das convulsões induzidas por soman que atingiram um escore de Racine de pelo menos 3. Os controles incluíram dois grupos separados: um grupo de ratos não tratados (ingênuos) (controle negativo) e outro grupo que receberá água estéril ou água estéril mais veículo de manitol, 60 minutos após o início das convulsões induzidas por soman.

[0096] No dia 2, todos os ratos todos os ratos serão sacrificados sob anestesia via exsanguinação e perfusão intracardíaca. O cérebro será coletado de cada rato para exame neuropatológico microscópico, e o coração será coletado de cada rato para possível exame patológico.

[0097] Os indivíduos experimentais serão ratos machos Sprague-Dawley canulados com veias jugulares com 8 ou mais semanas de idade (Charles River Laboratories) pesando 300-500 g no dia da exposição.

Materiais

[0098] Soman (GD) - diluído com cloreto de sódio a 0,9%. Soman é um agente neurotóxico orgânico de fósforo que desativa acetilcolina esterase (AChE) formando um aduto com a enzima.

- Nome químico: metil fosfonofluoridrato de pinacolila
- Fórmula: $C_7H_{16}FO_2P$
- Peso molecular: 182,17
- MRIGlobal Lote#: GD090415-DOC-1
- Padrão primário ID: 13972-49-3
- Pureza: 100%
- Condições de armazenamento: $<4^{\circ}C$

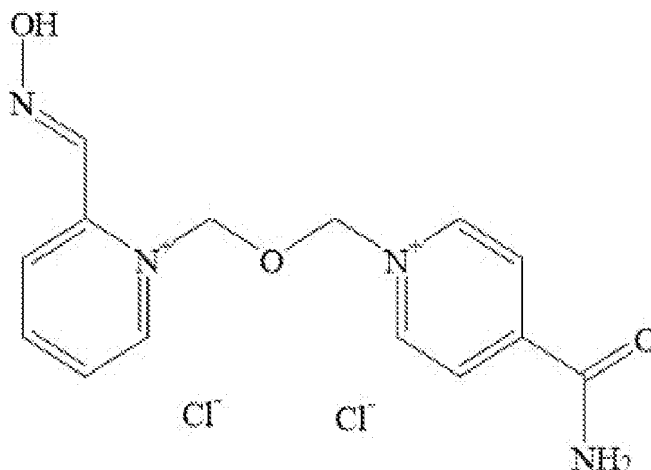
[0099] Os tratamentos para promover a sobrevivência neste modelo serão: (1) cloreto de asoxima (HI-6); (2) metil nitrato de estropina; (3) sulfato de estropina; (4) cloreto de praldoxima; (5) midazolam. HI-6 é um reativador de AChE que pode deslocar organofosfatos como somam da acetilcolinesterase (AChE) e, assim, reativar a enzima. O sulfato de atropina é um antagonista competitivo e reversível de ação central dos receptores muscarínicos de acetilcolina; o metil nitrato de atropina é um antagonista competitivo e reversível de ação periférica dos receptores muscarínicos de acetilcolina; ambos são usados clinicamente para combater a síndrome colinérgica induzida por soman e outros agentes neurotóxicos de organofosfatos. Midazolam é uma benzodiazepina para tratamento de convulsões. Estes agentes

são selecionados porque oximas, atropina e benzodiazepinas representam o tratamento clínico aceito para agente neurotóxico agudo/toxicidade a organofosfatos. Um regime de três fármacos consistindo de praldoxima (um reativador de AChE), atropina e diazepam (uma benzodiazepina) é uma contramedida atualmente aprovada pela FDA para militares.

[0100] HI-6

- Nome químico: metanossulfonato de [(E)-[1-[(4-carbamoilpiridin-1-ilo-1-il)metoxi-metil]piridin-2-ilideno] metil]-oxoazânio (cloreto de asoxima)

- Estrutura:



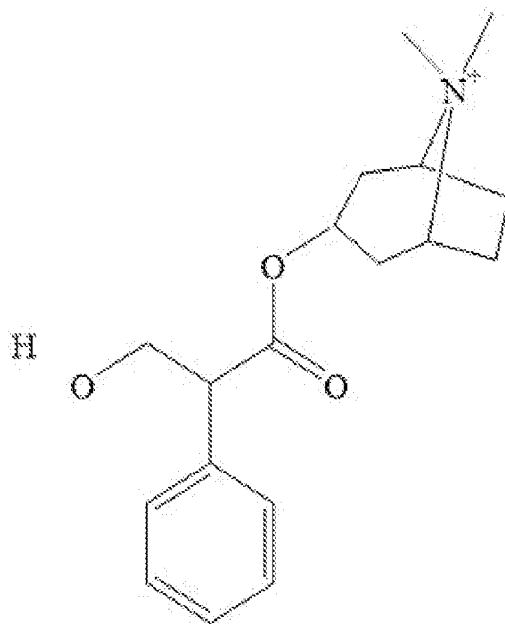
- Fórmula: $C_{14}H_{16}Cl_2N_4O_3$

- Peso molecular: 359,207

[0101] Metil nitrato de atropina

- Nome químico: Nitrato 3-hidroxi-2-fenil-propanoato de (8,8-dimetil-8-azoniabicciclo[3.2.1]octan-3-ila)

- Estrutura:



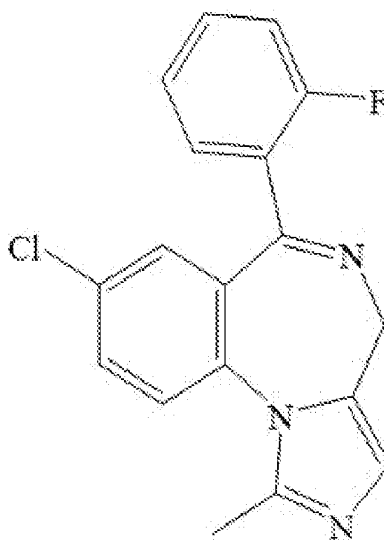
- Fórmula: $C_{18}H_{26}N_2O_6$

- Peso molecular: 366,414

[0102] Midazolam

- Nome químico: 8-cloro-6-(2-flúor-fenil)-1-metil-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepina

- Estrutura:



- Fórmula: $C_{18}H_{13}ClFN_3$

- Peso molecular: 325,771

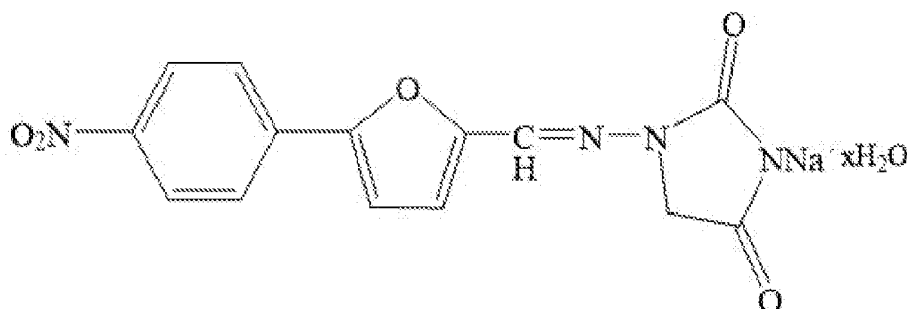
[0103] RYANODEX® (dantroleno sódico) é um fármaco aprovado

por FDA para tratamento de hipertermia maligna em conjunto com medidas de suporte apropriadas e para a prevenção da hipertermia maligna em pacientes com alto risco.

[0104] Dantroleno sódico

Nome químico: hidrato de sal sódico de 1-[[[5-(4-nitrofenil)-2-furanil]metileno]amino]-2,4-imidazolidinadiona

Estrutura:



Peso molecular: 399

[0105] Excipientes:

Manitol (25 mg/mL) polissorbato 80 (5 mg/mL); povidona K12 (0,8 mg/mL)

Solução de manitol a 5%:

Solução de manitol a 5% (em água estéril)

Fórmula: $C_6H_{14}O_6$

Animais

[0106] Para este estudo, foram usados 120 ratos Sprague Dawley machos (mais 20 extras/substituições para um total de 140; Charles River Laboratories), com idade de 8 ou mais semanas e 300-500 g com cateteres vasculares jugulares implantados pelo fornecedor. Os ratos foram identificados por marcação de cauda ou marca de orelha com uma designação alfanumérica única. (Vide, SOP MRI-1504, "Procedure for Identification of Animals and Cages" ("Procedimento para identificação de animais e gaiolas")).

[0107] Todos os ratos incluídos no estudo estavam com boa

saúde, livres de quaisquer sinais de doença clínica e possuíam cateteres patenteados apropriados para dosagem no início do estudo. Após a entrega, os ratos foram inspecionados quanto a sinais de problemas de saúde e colocados em quarentena nas instalações convencionais de animais por não menos que 48 horas. Um veterinário examinou a saúde dos animais e os liberou para o estudo (vide SOP MRI-1501, "Acclimation and/or Quarantine Procedures for Animals" ("Procedimentos de aclimação e/ou quarentena para animais")). Os animais foram pesados dentro de três dias após a entrega. Durante o período do dia seguinte à chegada do animal até o fim do estudo, os ratos foram manuseados pelos funcionários pelo menos duas vezes ao dia para aclimação e consistência ao longo do estudo.

[0108] Todos os ratos foram providos com alimento para roedores certificado pela Lab Diet, identificados como fonte, número de lote e certificado de análise, ad libitum. Não estavam presentes na ração quaisquer contaminantes que pudessem afetar os resultados do estudo, tal como verificado pelo certificado de análise (para cada lote fornecido pelo fornecedor; vide SOP MRI-1510, "Procedure for Feeding Animals" (Procedimento para alimentação de animais)). Garrafas de água (uma garrafa de água/gaiola) foram fornecidas com água de torneira durante todo o estudo.

[0109] Os animais foram alojados em gaiolas de policarbonato Tecniplast com capota metálica (Tecniplast, Phoenixville, PA) durante todo o período de aclimação/quarentena e vida útil. Os animais foram alojados individualmente para evitar danos aos cateteres. Os ratos foram alojados em salas com controle ambiental, com pelo

menos 10 trocas de ar por hora. As salas foram mantidas a uma temperatura de 20,0°C (68,0°F) a 26,1°C (79,0°F) e umidade relativa de 50% ± 20% com um ciclo de 12 horas claro/escuro por dia. A temperatura ambiente, a umidade e os ciclos de luz 12 h:12 h reverso claro/escuro) foram monitorados pelo sistema de monitoramento Amega View 24 h/dia ou por um higrotermógrafo durante o estudo (vide SOP MRI-1170, "Temperature and Humidity Monitoring in Animals Rooms" ("Monitoramento de temperatura e umidade e salas de animais")).

Doses

[0110] HI-6, soman, sulfato de atropina, metil nitrato de atropina, 2-PAM Cl e midazolam: Doses únicas de HI-6 (IP, 125 mg/kg), soman (SC, 154 µg/kg, 1,4xLD₅₀), metil nitrato de atropina (IM, 2 mg/kg), sulfato de atropina (0,45 mg/kg), 2-PAM Cl (25 mg/kg) e midazolam (IM, 2 mg/kg) foram selecionadas baseadas em experiência anterior com o modelo. A inclusão de HI-6, metil nitrato de atropina e midazolam é necessária para garantir sobrevivência adequada. Esperava-se que esse regime causasse convulsões que atingissem um escore de Racine de pelo menos 3 e um número aceitável de sobreviventes para o estudo de acompanhamento.

[0111] RYANODEX®: Numa avaliação de tolerabilidade de dose única em ratos, foram administradas doses de bolo IV de 12, 40 e 60 mg/kg de RYANODEX® a grupos separados de ratos canulados na veia jugular. Doses de RYANODEX® de 10 e 30 mg/kg em ratos são equivalentes a doses em seres humanos de aproximadamente 2 e 6 mg/kg, respectivamente.

Esquema de dosagem

[0112] Um total de 120 mais até 20 ratos Sprague-Dawley

machos extras com cateteres jugulares implantados pelo fornecedor foram utilizados em 6 grupos, tal como mostrado na Tabela abaixo. Os animais foram distribuídos em pelotões de 20. Todas as tarefas de grupo foram aleatoriamente designadas com a estipulação de que cada grupo de dose fosse representado por pelo menos um animal em cada pelotão.

Tabela. Atribuição de tratamento por grupo

Grupo	Pré-tratamento com HI-6 (IP, 30 min antes do desafio de GD)	Soman "GD" (SQ)	Metil nitrato de atropina (IM, 1 min após GD)	Midazolam (IM, ~20 minutos após início de atividade de convulsão)	RYANODEX® IV em 20 ou 60 min após início de convulsões
A (n=20)	125 mg/kg	154 μ g/kg (1,4 x LD ₅₀)	2,0 mg/kg	2,0 mg/kg	60 min com 10 mg/kg
B (n=20)	125 mg/kg	154 μ g/kg (1,4 x LD ₅₀)	2,0 mg/kg	2,0 mg/kg	60 min com 30 mg/kg
C (n=20)	125 mg/kg	154 μ g/kg (1,4 x LD ₅₀)	2,0 mg/kg	2,0 mg/kg	20 min com 10 mg/kg
D (n=20)	125 mg/kg	154 μ g/kg (1,4 x LD ₅₀)	2,0 mg/kg	2,0 mg/kg	20 min com 30 mg/kg
E (n=20)	125 mg/kg	154 μ g/kg (1,4 x LD ₅₀)	2,0 mg/kg	2,0 mg/kg	Água estéril (controle) ou água estéril + manitol (controle) em 50 min
F (N=20)	0 mg/kg	0 μ g/kg	0 mg/kg	0 mg/kg	NA

Nota: para os grupos C e D, administrou-se RYANODEX® logo

após injeção de midazolam.

Preparação de dose

[0113] Preparou-se GD em cloreto de sódio a 0,9% resfriado em gelo de acordo com SOP MRI-5821 "Preparation of Standards and Samples from Research Development and Testing Evaluation (RDTE) Dilute Solutions" ("Preparação de padrões a amostras a partir de soluções diluídas para desenvolvimento de pesquisa e avaliação de testes (RDTE)").

[0114] Preparou-se RYANODEX® adicionando 5 mL de água estéril para injeção num pequeno frasco do produto liofilizado.

[0115] Preparou-se HI-6 numa concentração de 250 mg/mL adicionando salmoura s 0,9% estéril num frasco injetável.

[0116] Preparou-se o metil nitrato de atropina numa concentração de 4 mg/mL adicionando água estéril para injeção (WFI) num frasco injetável.

[0117] Preparou-se sulfato de atropina numa concentração de 8 mg/mL com salmoura estéril.

[0118] Preparou-se 2-PAM Cl numa concentração de 100 mg/mL com salmoura estéril.

[0119] Sulfato de atropina e 2-PAM Cl foram misturados numa razão de 1:1 e administrados IM em 0,5 mL/kg.

[0120] Midazolam foi adquirido de um fornecedor como uma solução de concentração 10 mg/mL e foi administrado como estava.

Design experimental

Preparação de animal

[0121] Antes ou no dia de estudo 1 (dia de exposição a GD), ratos foram transferidos para o local de teste.

Dosagem

[0122] No dia de estudo 1, todos os animais foram pesados para o grama mais próximo e todas as doses de tratamento foram calculadas com base naqueles pesos. Os Grupos A-E receberam o reativador de colinesterase, HI-6 (125 mg/kg) via intraperitoneal (IP) 30 minutos antes do desafio de GD. Todos os ratos dos Grupos A-E foram expostos a GD (154 µg/kg (308 µg/mL) ~1,4 x LD₅₀) por uma única injeção subcutânea. Aproximadamente um minuto após injeção de GD para os Grupos A-E, administrou-se metil nitrato de atropina (AMN) via IM (2,0 mg/kg). Aproximadamente 20 minutos após início de atividade convulsiva após exposição a GD tal como definido na Tabela acima, todos os animais dos Grupos A-E, receberam sulfato de atropina (0,45 mg/kg) misturado com 2-PAM Cl (25 mg/kg) via intramuscular e receberam midazolam numa dose intramuscular de 1,8 mg/kg. O Grupo F não recebeu HI-6, GD, AMN, midazolam e RYANODEX®. O RYANODEX® foi administrado através de uma micro-seringa de Hamilton de 100 µL ou seringa de bloqueio Luer (1 cm³), dependendo do volume de dose a ser administrado e, em seguida, o cateter foi lavado com 0,2 mL de água estéril para injeção, para garantir o fornecimento completo à veia.

[0123] O início da atividade convulsiva foi definido por um escore de "3" na escala de Racine tal como descrito abaixo:

1= imobilização e olhar fixo

2= balanço da cabeça

3= clônus de membro anterior, sacudida rítmica das orelhas acompanhada por piscadas dos olhos e clônus facial

4= clônus bilateral de membro anterior

5= clônus bilateral de membro anterior, elevação e perda de equilíbrio

[0124] Se um rato não atingisse esse escore de "3" após aproximadamente 20 minutos após exposição a GD, ele seria substituído no estudo.

[0125] Tal como mostrado na Tabela acima, os ratos dos Grupos A e C receberam uma dose de 10 mg/kg de RYANODEX® IV e os ratos dos Grupos B e D receberam uma dose de 30 mg/kg de RYANODEX® IV ou em 60 ou em 20 minutos após o início de convulsões (escala de Racine de "3"). Os ratos do Grupo E receberam uma dose de controle (água estéril ou solução de manitol a 5% (a quantidade de manitol entregue por uma dose de 30 mg/kg de RYANODEX®) em água estéril para injeção) IV num volume comparável ao da dose máxima de RYANODEX® em 60 minutos após o início de convulsões.

[0126] Em aproximadamente 6 horas de desafio pós GD para os Grupos A-E, os ratos receberam 5 mL de solução de lactato de Ringer SQ para ajudar na recuperação.

Pesos corporais

[0127] Os pesos corporais foram registrados para cada animal em estudo nas primeiras 72 horas após o recebimento do fornecedor, e novamente nos dias de estudo 1 e 2. Qualquer animal que não ganha peso entre a primeira pesagem no recebimento e a pesagem no dia de estudo 1 será substituído.

Observações clínicas

[0128] Observações gerais de saúde foram realizadas diariamente durante o período de quarentena e aclimatação. Os animais foram tratados duas vezes ao dia durante o período de quarentena e aclimatação e durante toda a vida. No primeiro dia de estudo, os ratos foram observados e pesados antes da exposição. Após exposição a GD, os ratos foram monitorados continuamente para documentar o início de convulsões. Após

dosagem de midazolam, RYANODEX® e/ou solução de controle, os animais foram observados em 1, 2, 4 e 6 horas após o início de convulsão, e pelo menos uma vez no dia da eutanásia. Observações clínicas, incluindo postura curvada, desidratação, pelagem áspera e inapetência foram avaliadas e registradas. O escore de Racine modificado foi registrado em cada ponto de observação, se aplicável. Quaisquer outras observações clínicas anormais também foram registradas neste momento no caderno de estudo ou forma de captura de dados apropriada conforme SOP MRI-1528 "Procedure for Observations of Animals" ("Procedimento para observações de animais"). A hora da morte foi documentada; quaisquer animais encontrados mortos foram documentados no momento em que foram encontrados.

Eutanásia e processamento e coleta de tecidos

[0129] Para cada grupo no dia de estudo 2, todos os ratos sobreviventes foram anestesiados profundamente através de uma injeção IP de >75 mg/kg de solução de pentobarbital. Os ratos foram perfundidos transcardialmente com solução salina heparinizada seguida de paraformaldeído a 0,4% ou formalina tamponada neutra a 10% (o protocolo de perfusão segue Rao et al. (2006)). O coração de cada rato foi coletado e armazenado em fixador para possível avaliação.

[0130] Após a coleta de tecidos, as carcaças dos animais foram descartadas de acordo com, por exemplo, SOP MRI-1526 "Disposal of Animal Carcasses and Medical Waste in Spencer Animal Care Facility" ("Descarte de carcaças de animais e resíduos médicos no Centro de Cuidados com Animais Spencer").

[0131] Os cérebros foram armazenados de um para outro em paraformaldeído a 4°C, no dia seguinte foram drenados e

substituídos com PBS frio e mantidos a 4°C de um dia para outro. No dia seguinte, o PBS foi drenado e substituído por solução de sacarose a 10% e armazenado de um dia para outro a 4°C, e depois transferido para formalina tamponada neutra a 10% de um dia para outro. Alternativamente, o cérebro permaneceu em fixador de formalina a 10% por pelo menos 4 dias em temperatura ambiente e depois enviado. Cada cérebro foi cortado uniformemente em 7 seções, tal como descrito em Rao, et al. (2014) e em Bolon, et al. (2013) para obter a apresentação anatômica máxima de todo o cérebro, incluindo áreas conhecidas por serem afetadas por soman e outros agentes neurotóxicos orgânicos de fósforo (por exemplo, córtex piriforme, córtex entorrinal, hipocampo, amígdala, tálamo, cerebelo). As seções foram processadas rotineiramente, seccionadas a 5 microns, embebidas em parafina e coradas com hematoxilina e eosina. O pessoal estava encoberto para dosar grupos e tratamento.

Neuropatologia

[0132] As 7 seções do cérebro de cada rato foram avaliadas microscopicamente usando um sistema de pontuação semiquantitativo de 6 pontos. As lesões microscópicas foram classificadas em uma escala de 6 pontos.

Testes neurocomportamentais

[0133] Opcionalmente, antes da eutanásia, mas após exposição a GD no dia 1, os ratos foram submetidos a testes neurocomportamentais tais como aqueles descritos no Exemplo 1.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de dantroleno ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo para obtenção de uma composição farmacêutica, caracterizado pelo fato de proteger um indivíduo de necrose neural após ele ter sido exposto a um agente neurotóxico.
2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o córtex frontoparietal, o hipocampo e/ou o tálamo estarem protegidos de necrose neural.
3. Uso de dantroleno ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo para obtenção de uma composição farmacêutica, caracterizado pelo fato de tratar um indivíduo exposto a um agente neurotóxico.
4. Uso de dantroleno ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo para obtenção de uma composição farmacêutica, caracterizado pelo fato de proteger um indivíduo de uma diminuição na função do sistema neurotóxico central resultante de exposição a um agente neurotóxico.
5. Uso de dantroleno ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo para obtenção de uma composição farmacêutica, caracterizado pelo fato de tratar convulsões induzidas por agentes neurotóxicos, em particular estado epiléptico.
6. Uso de dantroleno ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo para obtenção de uma composição farmacêutica, caracterizado pelo fato de proteger um indivíduo de uma disfunção do sistema neurotóxico central resultante da exposição a um agente neurotóxico.
7. Uso de dantroleno ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo para obtenção de uma composição farmacêutica, caracterizado pelo fato de tratar mudanças comportamentais resultantes de exposição a um agente neurotóxico.

8. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizado pelo fato de o agente neurotóxico ser um inibidor de acetilcolinesterase.
9. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, caracterizado pelo fato de o agente neurotóxico ser um fosfato orgânico.
10. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, caracterizado pelo fato de o agente neurotóxico ser metilfosfonofluoridrato de O-pinacolila (soman), N,N-dimetilfosforamidocianidrato de etila (tabun), metilfosfonofluoridrato de propan-2-ila (sarin), metilfosfonofluoridrato de ciclo-hexila (ciclo-sarin) ou 2-(dimetilamino)etila (GV).
11. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, caracterizado pelo fato de o agente neurotóxico ser S-(2-dietilamino-etil)-metil-fosfonotiolato de O-ciclopentila (EA-3148), (S)-(etil {[2-(dietilamino)etil]sulfanil}(etil)fosfinato) (VE), S-[2-(dietilamino)etil] fosforotioato de O,O-dietila (VG), O-etil-metil-fosfonotioato de S-[2-(dietilamino)etila] (VM), N,N-dietil-2-(metil-(2-metil-propoxi)fosforil)sulfanil-etanamina (VR), ou ({2-[bis(propan-2-il)amino]etil}sulfanil)(metil)fosfinato de etila (VX).
12. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 11, caracterizado pelo fato de o indivíduo ser um mamífero.
13. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, caracterizado pelo fato de o indivíduo ser um ser humano.
14. Uso, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de a quantidade terapeuticamente eficaz ser de 1 mg/kg a cerca de 30 mg/kg de dantroleno.
15. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a

14, caracterizado pelo fato de o dantroleno ser administrado ao indivíduo 24 horas ou menos após o indivíduo ter sido exposto ao agente neurotóxico.

16. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 15, caracterizado pelo fato de a composição farmacêutica ser administrada ao indivíduo em uma ou mais doses.

17. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 16, caracterizado pelo fato de compreender ainda administrar ao indivíduo um reativador de acetilcolinesterase, um antagonista reverso de receptores de acetilcolina, um medicamento anticonvulsivo, ou uma combinação dos mesmos.

18. Uso, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de o reativador de acetilcolinesterase ser cloreto de asoxima (HI-6).

19. Uso, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de o antagonista reverso de receptores de acetilcolina ser metil nitrato de atropina.

20. Uso, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de o medicamento anticonvulsivo ser uma benzodiazepina.

21. Uso, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de a benzodiazepina ser midazolam.

22. Uso, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de a composição farmacêutica ser administrada após a administração do reativador de acetilcolinesterase.

23. Uso, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de a composição farmacêutica ser administrada após a administração do reativador de acetilcolinesterase e após a administração do antagonista reverso de receptores de acetilcolina.

24. Uso, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo

fato de a composição farmacêutica ser administrada simultaneamente ou substancialmente simultaneamente com a administração do medicamento anticonvulsivo.

25. Uso, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de a composição farmacêutica ser administrada após a administração do medicamento anticonvulsivo.

26. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 25, caracterizado pelo fato de a composição farmacêutica ser administrada via intravenosa, subcutânea, intramuscular, intraóssea ou transdérmica.

27. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 26, caracterizado pelo fato de a composição farmacêutica compreender dantroleno ou um sal farmacêuticamente do mesmo, manitol, um polissorbato, povidona, um ajustador de pH opcional e água.

28. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 27, caracterizado pelo fato de a administração da composição farmacêutica compreendendo dantroleno ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo resultar em desempenho neurocomportamental melhorado, quando comparado a um indivíduo exposto a um agente neurotóxico ao qual não se administrou a composição farmacêutica compreendendo dantroleno ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo.

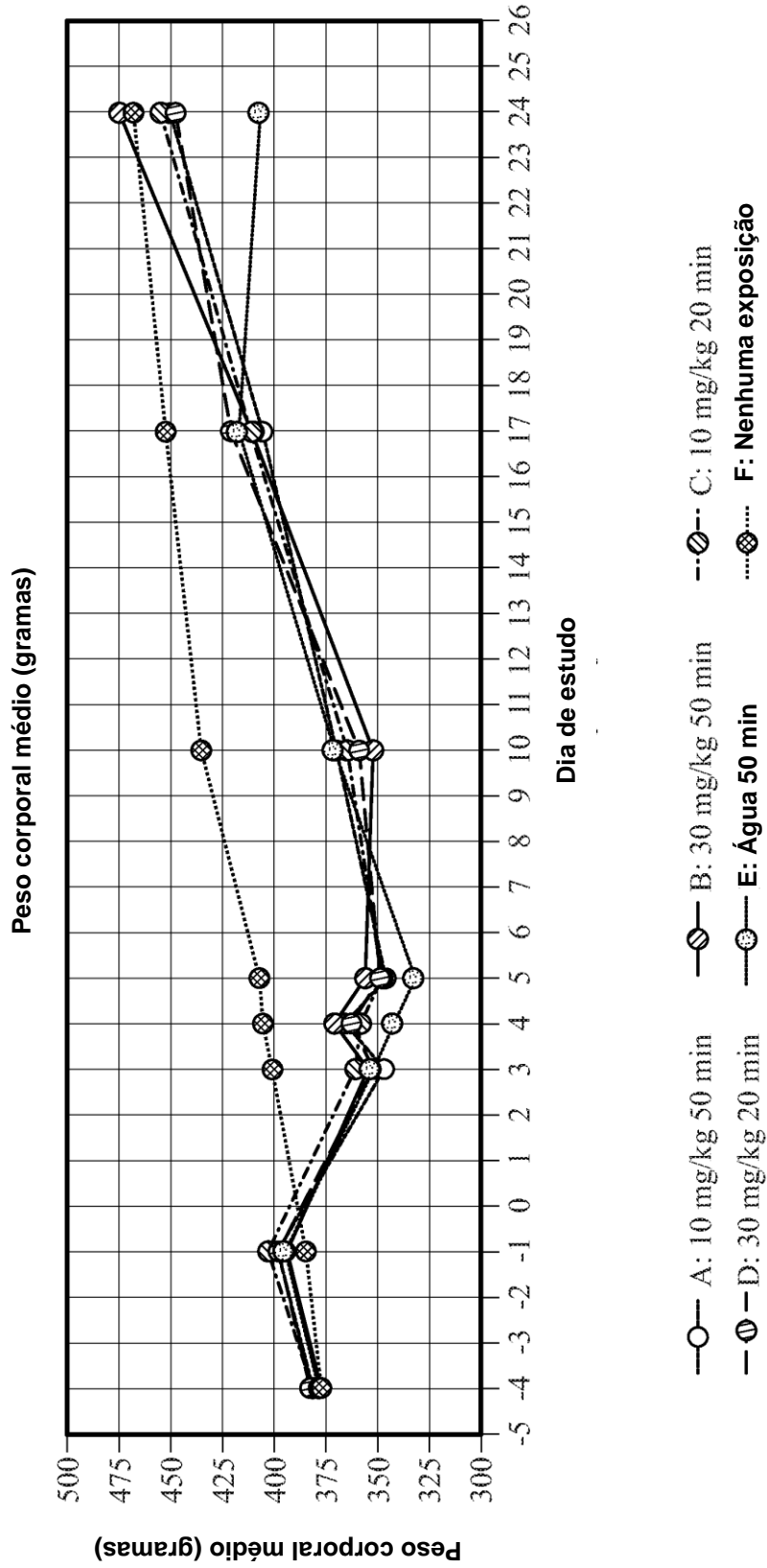


FIG.1

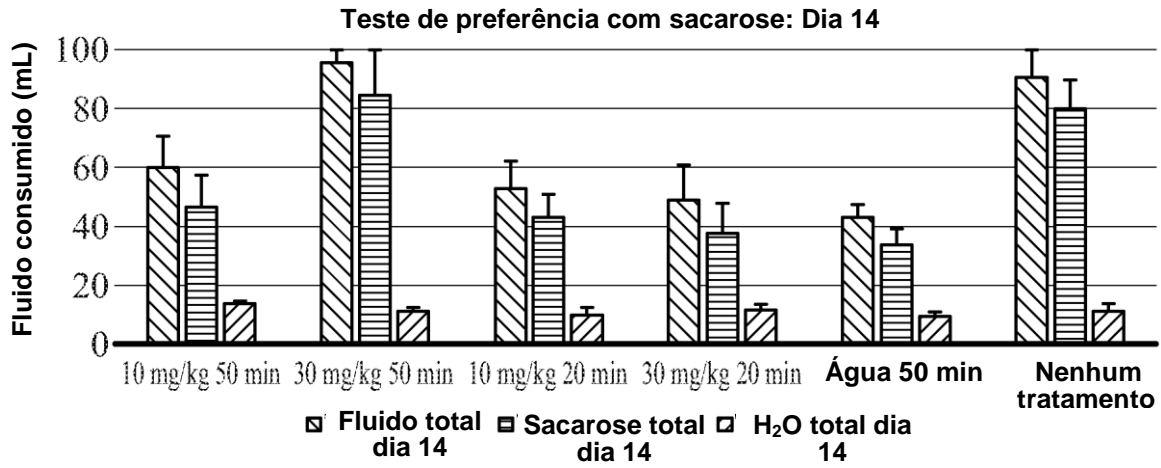


FIG.2A

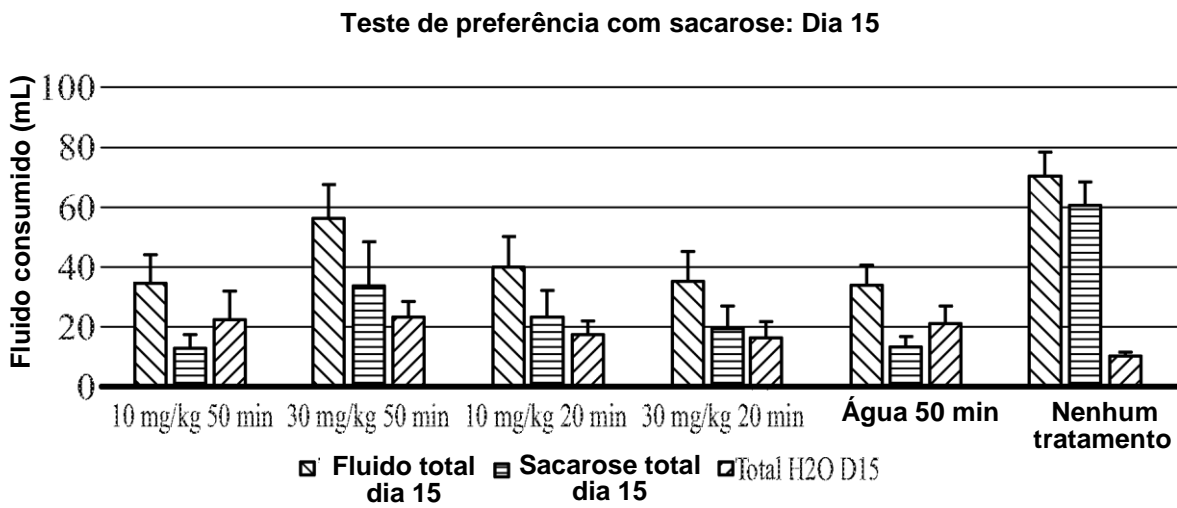


FIG.2B

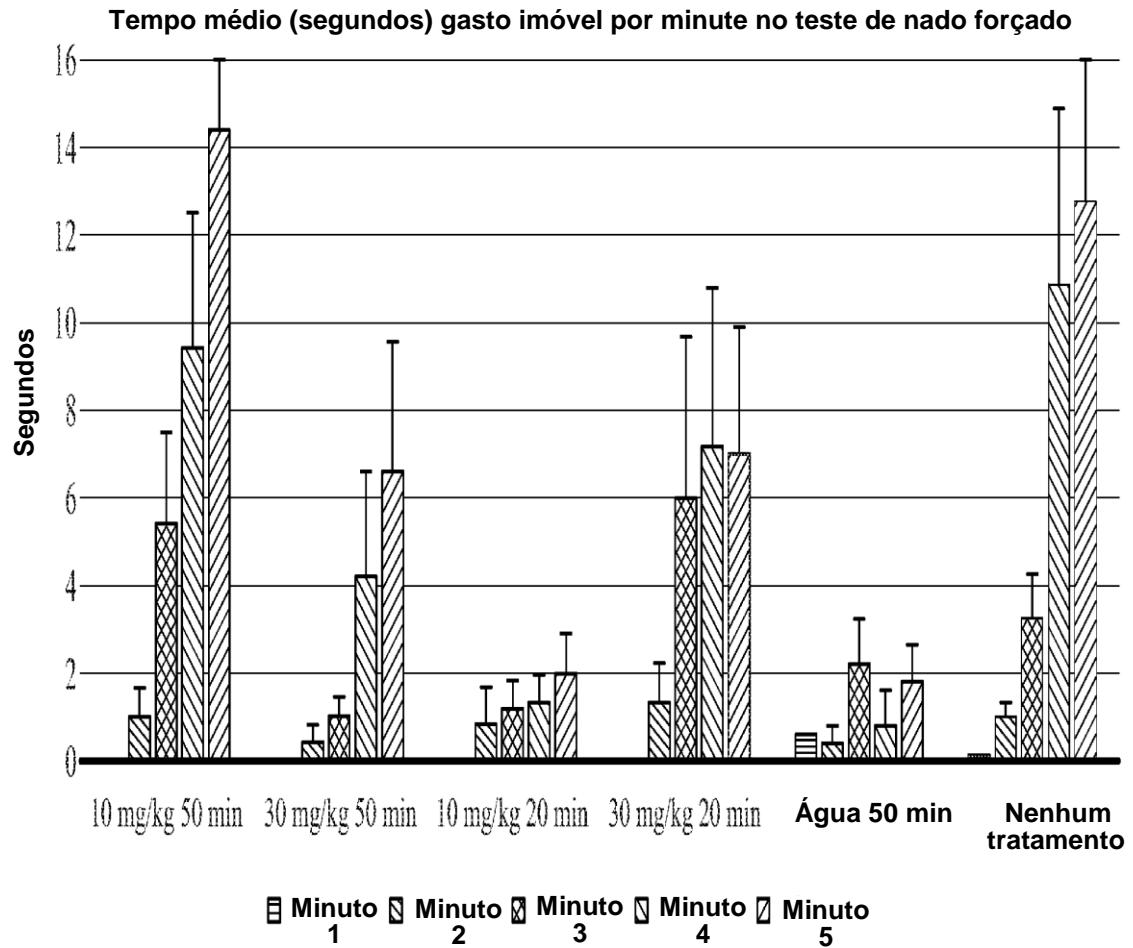
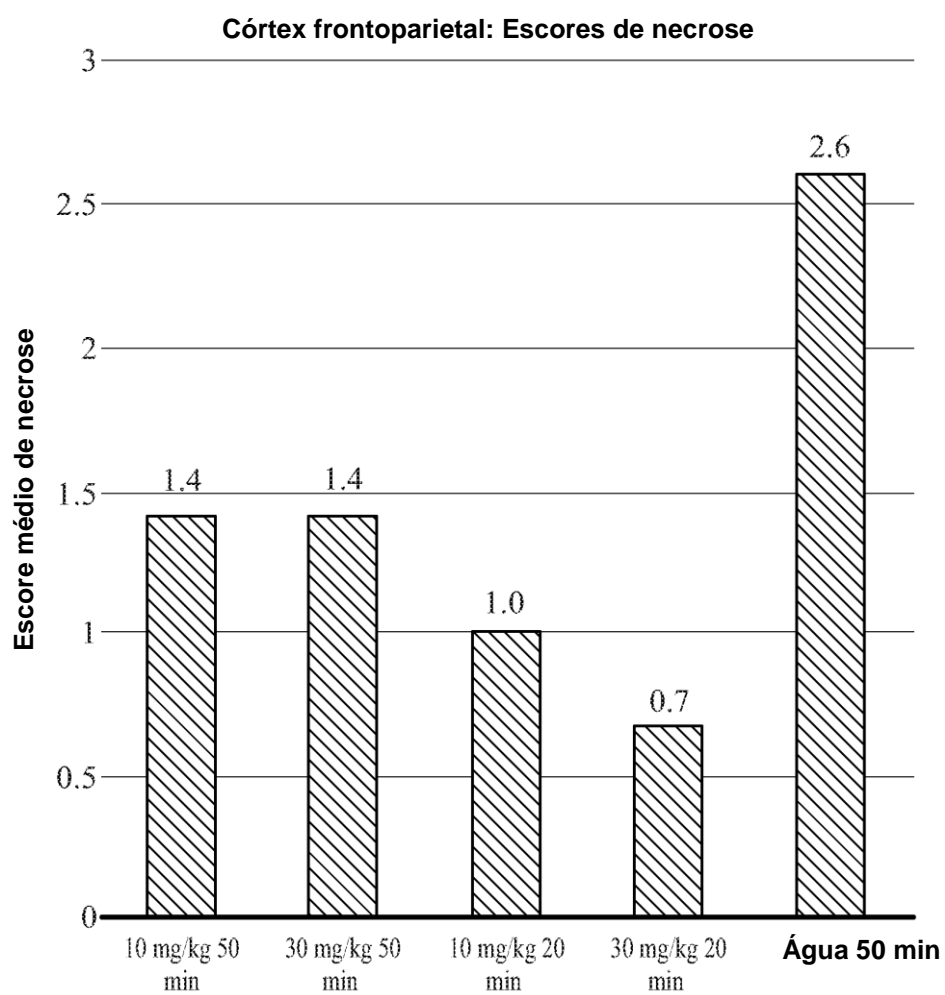


FIG.3

**FIG.4**

5/5

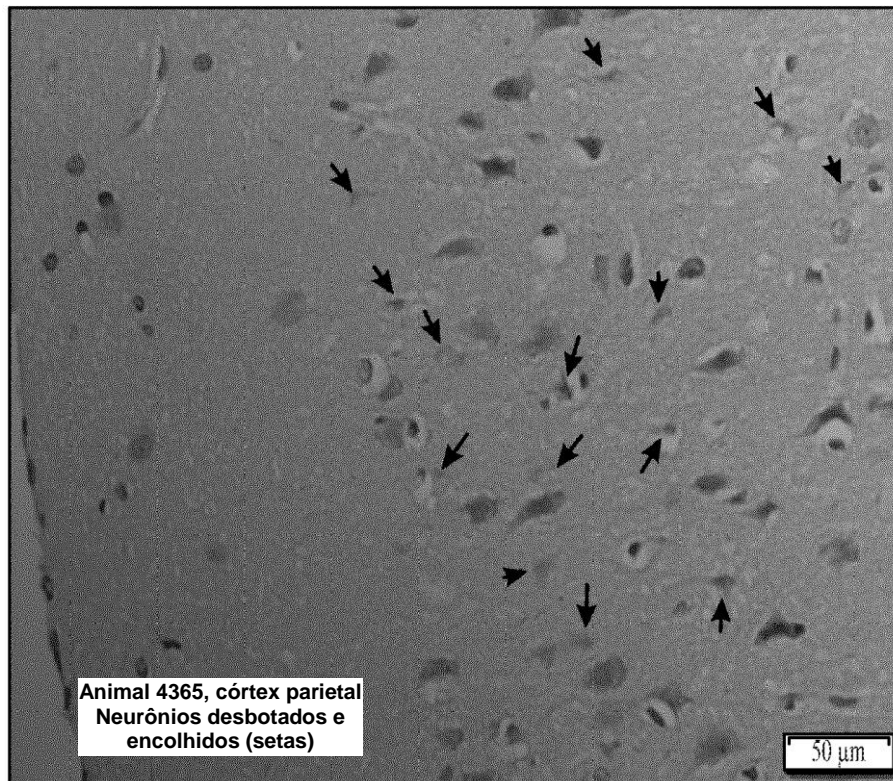


FIG.5A

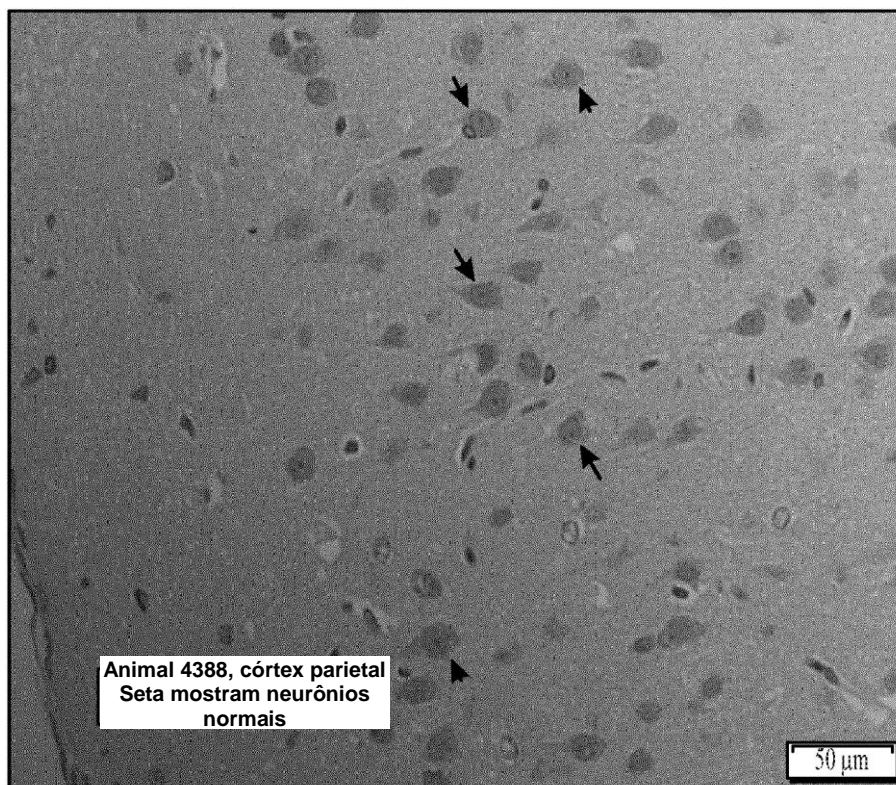


FIG.5B

RESUMO

"USO DE DANTROLENO OU UM SAL FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL DO MESMO PARA OBTENÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA"

A divulgação refere-se a métodos para tratar indivíduos expostos a agentes neurotóxicos com dantroleno ou com um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo.