



LAFON PHARMA S.A.

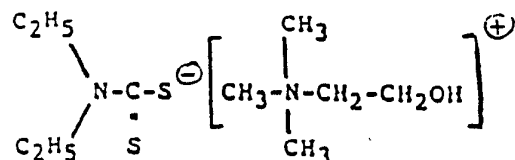
"PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE DIETIL-DITIO-CARBAMATO DE COLINA"

=====

MEMÓRIA DESCRITIVA

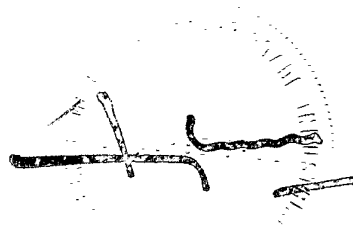
Resumo

O invento diz respeito a um processo de preparação de dietil-ditio-carbamato de colina com a fórmula seguinte:



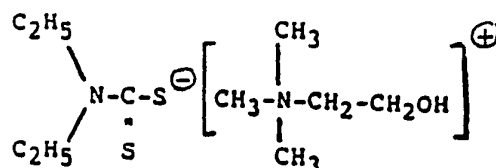
O processo de preparação consiste em se fazer reagir cloreto de colina com dietil-ditio-carbamato de sódio tri-hidratado.

E também objecto do invento um processo para a preparação de medicamentos, que contém o dietil-ditio-carbamato de colina, úteis no tratamento de doenças degenerativas cerebrais.



- 2 -

O invento relaciona-se com um novo composto, o dietil-ditio-carbamato de colina, de fórmula empírica $C_{10} H_{24} N_2 O S_2$, que responde à fórmula estrutural seguinte:



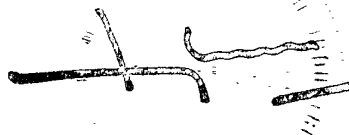
e a um peso molecular de 252,40.

Este novo sal de colina apresenta-se na forma de finos cristais incolores ou ligeiramente amarelados, com um ponto de fusão de 96-97°C, facilmente solúveis em água, em alcoois e glicóis, e muito menos solúveis em solventes orgânicos.

Os cristais de dietil-ditio-carbamato de colina são muito higroscópicos e por isso devem ser conservados num recipiente fechado herméticamente e a baixa temperatura.

A análise centesimal do produto origina os resultados seguintes:

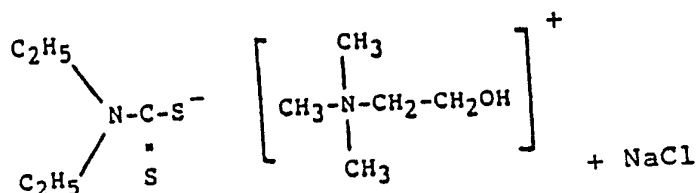
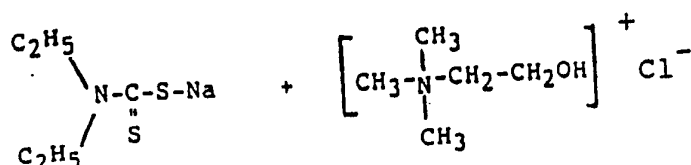
	Calculado	Encontrado	Média
Carbamato	48,85%	48,18-48,47	48,33%
Hidrogénio	9,64%	9,37- 9,54	9,45%
Azoto	11,12%	11,59-11,51	11,55%
Enxofre	25,55%	24,94-24,75	24,85%
Oxigénio	6,35%		



- 3 -

Os espectros de I.V., U.V., R.M.N. e de massa mostram bem as bandas características da molécula do novo produto do invento.

A reacção é a seguinte:

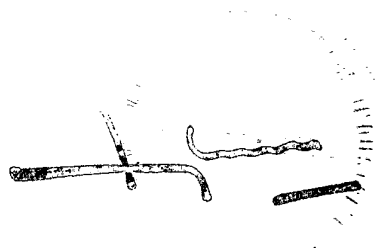


A síntese pode ser realizada pelo modo operativo seguinte:

Em dois erlenmeyers ou dois copos de boca larga de capacidade apropriada, dissolve-se separadamente:

- 56 g (0,40 mole) de cloreto de colina em 100 ml de etanol absoluto aquecidos levemente com a ajuda de uma placa eléctrica ou de um banho maria e agitando a solução de modo a favorecer a dissolução.

- 90 g (0,40 mole) de dietil-ditio-carbamato de sódio de trihidrato em 100 ml de etanol absoluto.



- 4 -

Quando as duas soluções estão limpadas, introduz-se lentamente em fio fino a solução alcoólica de colina na de sal de sódio, esta sob forte agitação e arrefecida exteriormente por um banho de água fria, devido à reacção ser muito exotérmica.

Quando aproximadamente uma terceira parte da solução é adicionada, forma-se um precipitado abundante. Continua-se a adicionar toda a solução mantendo uma agitação muito vigorosa.

A adição da solução alcoólica de colina na do sal de sódio dura cerca de 15 minutos. Continua-se a agitação ainda durante 30 minutos. Em seguida, deixa-se arrefecer durante toda uma noite. O recipiente que contém a massa reaccional permanece fechado.

No dia seguinte, elimina-se o cloreto de sódio por centrifugação e lava-se o filtro duas vezes com 50 ml de etanol absoluto.

Recupera-se cerca de 23 g de cloreto de sódio.

Concentra-se as duas águas-mães alcoólicas (contendo o dietil-ditio-carbamato de colina no etanol) em banho-maria, sob vacuo de trompa-de-água, para apanhar todo o excesso de etanol.

Em seguida, vaza-se rapidamente o resíduo muito viscoso num copo de boca larga ou num almofariz de vidro ou de porcelana. Seca-se num excicador de fósforo como agente excicante.

O produto obtido apresenta-se em bloco que se reduz em finos cristais ou num pó fino micro-crisyalino, que é incolor ou muito ligeiramente amarelado.



- 5 -

O rendimento quantitativo, em dietil-ditio-carbamato de colina, obtido é aproximadamente de 100 g.

O dietil-ditio-carbamato de colina assim obtido deve ser conservado num recipiente fechado hermêticamente, devido à sua higroscopia.

Segundo o presentr invrnito, põe-se em evidência as propriedades terapêuticas do novo sal de colina e faz-se um estudo muito completo da sua toxicidade.

O estudo toxicológico foi efectuado em ratos brancos SWISS.

Com este animal pode-se estudar para a dietil-ditio-carbamato de colina, a toxicidade aguda, a toxicidade crônica, a influência na proliferação, a terarogenése, a fertilidade no tempo e a longevidade, a influência na eficiência da resposta imunitária.

Para todas estas experiências, os animais foram misturados aleatoriamente, separados pelos sexos, divididos em lotes de 30, as fêmeas grávidas foram isoladas em caixas individuais. Estes animais foram alimentados com um alimento completo adequado que eles poderam consumir ad libitum, para evitar toda a carência no curso da experiencia. A sua bebida foi água normal adicionada ou não de produto atestado, o dietil-ditio-carbamato de colina.

O alimento completo utilizado, contém vantajosamente cereais, proteínas vegetais, proteína animais, sais minerais e vitaminas.

A medida da toxicidade aguda do novo composto do invento, administrado por via intraperitoneal e sub-cutânea, mostra que esta toxicidade aguda é muito fraca:

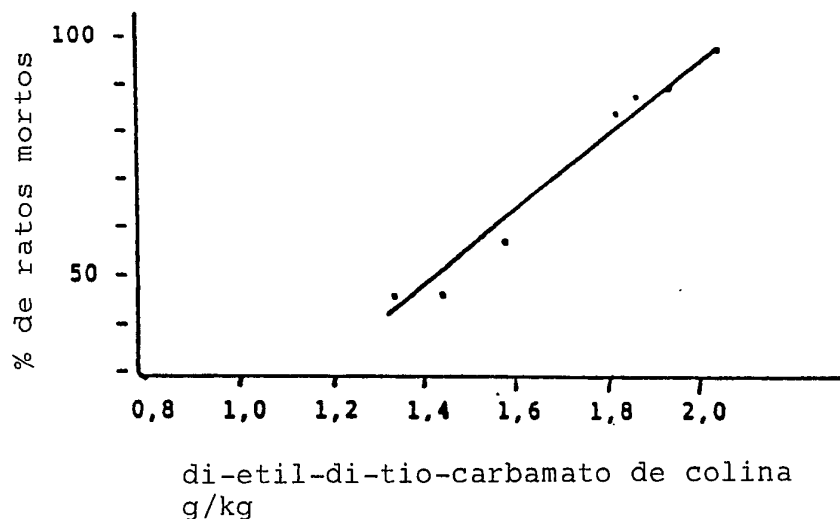
Abaixo de 1 g/kg, não existe mortalidade.

A DL 50 (dose letal em 50%) está compreendida entre 1,4 e 1,7 g/kg.

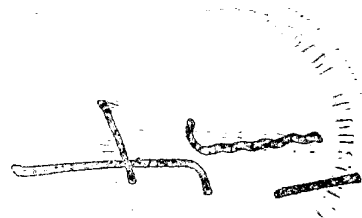
O gráfico seguinte ilustra estes resultados.

TOXIDADE AGUDA EM RATOS EM G/KG

(via intraperitoneal e sub-cutânea)



Para a medição da toxicidade crônica do novo composto do invento, administrou-se por via bocal na água de beber, uma dose de 20 mg/kg por dia do novo composto, a 4 lotes de 30 ratos, durante 100 dias. Nenhum efeito nefasto na saúde dos animais pode ser revelado.



- 7 -

Examinou-se qual o estado do efeito do novo composto do invento sobre a poliferação e a teratogenese dos ratos brancos SWISS. As experiencia foram continuadas ao longo de quatro gerações de animais e mostraram que os lotes que receberam o novo composto do invento tiveram globalmente 15% a mais de descendentes que os lotes testemunha, estes com uma taxa de ratinhos mortos-nascidos inferior a metade.

Os resultados figuram no quadro abaixo:

EXPERIÊNCIAS DE POLIFERAÇÃO E DE TERATOGENÉSE
EFFECTUADAS SOB QUATRO GERAÇÕES DE RATOS BRANCOS
FÊMEA SWISS DE QUATRO MESES

(Lotes T - testemunhas; lotes G - dietil-ditio-carbamato de colina a 1% na água de beber)

Ge- ra- ções	Número de ratos grá- vidos con- trolados em cada geração		Número de ratinhos nascidos vivos		Número de ratinhos nascidos mortos		Número de fetos reabsorvidos	
	T	G	T	G	T	G	T	G
I	30	30	255	249	7	-	15	-
II	30	30	242	316	5	2	9	2
III	30	30	258	324	8	-	8	-
IV	30	30	263	308	3	-	11	-
Total	120	120	1018	1197	23	2	43	4

Do mesmo modo a medida de fertilidade dos ratinhos fêmea em função da sua idade mostrou que a administração do novo composto do invento aumenta substancialmente o período de fertilidade dos ratos fêmea, como indicado no quadro abaixo:



EXPERIENCIAS DE FERTILIDADE EM RATOS FEMEAS

SWISS SEGUNDO A SUA IDADE

Lotes T - testemunhas; Lotes G - dietil-ditio-carbamato de colina a 1%. na água de beber)

	% de ratos fêmeas fértil		número médio de ratinhos por rato fértil	
	T	G	T	G
ratos de 4 meses	97	97	8,5	9,8
ratos de 8 meses	62	92	6,9	8,0
ratos de 15 mese	23	60	5,2	7,5

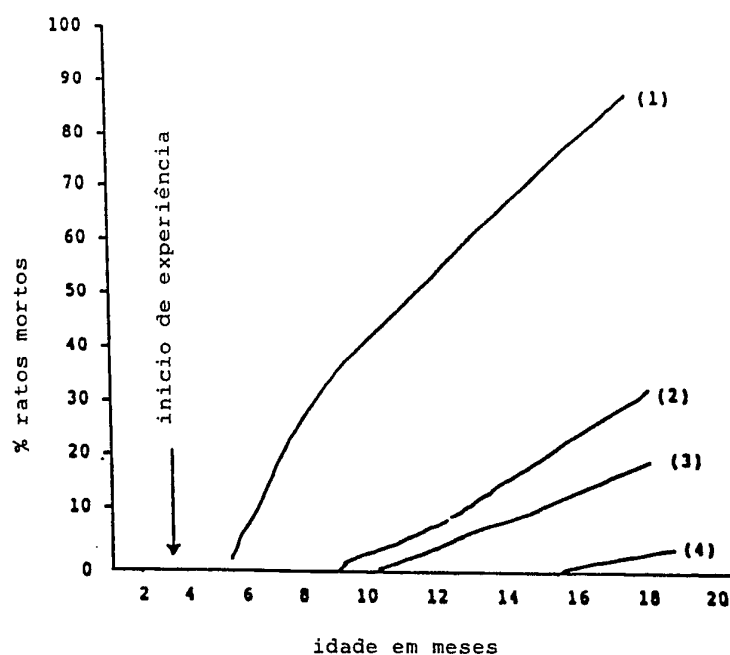
Enfim, no que respeita ao crescimento e à longevidade dos animais, pode-se verificar que o novo composto do invento não tem influência negativa sobre o crescimento, embora se verificasse uma redução de cerca de 25% de água bebida e de cerca de 5% dos alimentos tomados. Ao contrário, constatou-se que a administração do novo composto do invento retardou consideravelmente o envelhecimento. Esta última actividade é particularmente espectacular nos ratos machos e parece ser devido a uma modificação de características e de comportamentos que origina uma diminuição da vulnerabilidade que resulta habitualmente numa

agressividade muito forte. Os machos testemunha lutam muito mais, esgotam-se, ferem-se e matam-se.

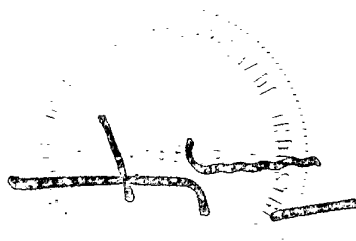
EXPERIÊNCIAS DE LONGEVIDADE
CURVAS DE MORTALIDADE DOS RATOS SWISS MACHOS E FÊMEAS

Impregnados com água normal para as testemunhas e de água normal adicionada de 1% de dietil-ditio-carbamato de colina para os lotes experimentais.

(cada curva é a média de 10 lotes de 30 ratos)



- (1) ratos macho testemunhas
(2) ratos machos receberam o dietil-ditio-carbamato de colina
(3) ratos fêmeas testemunhas
(4) ratos fêmeas receberam o dietil-ditio-carbamato de colina



Igualmente estudou-se a influência do novo composto do invento sobre a eficácia da resposta imunitária nos ratos brancos SWISS.

A protecção dos animais superiores contra as agressões é assegurada pelo sistema imunitário em relação com os antigénos do complexo maior de histocompatibilidade. A eficiência da reacção imunitária depende dos mecanismos e dos equilíbrios conjugados que determinam os principais parâmetros da competência (sensibilidade, precisão, intensidade e duração). Assim, as múltiplas e diversas agressões são habitualmente rapidamente dominadas sem serem cientemente perseguidas pelo hospede agredido. Mas evidentemente, as respostas inapropriadas e errôneas são frequentes, elas são a origem de numerosas doenças inflamatórias difíceis de dominar e que geralmente amplificam-se, com o envelhecimento. Nesse caso uma estratégia higiénica e de intervenções terapêuticas são impostas para corrigir os erros imunitários, dominar a inflamação e para restabelecer a funcionalidade dos tecidos e das regiões lesadas.

O quadro seguinte indica a potência da competência imunitária do dietil-ditio-carbamato de colina.

O quadro mostra realmente, que para obter a mesma protecção imunitária, é necessário 100 mcg de vacina específica nas testemunhas e unicamente 20 mcg para os ratos tratados com o composto do invento.

Influência do dietil-ditio-carbamato de colina em ratos sobre a eficácia da resposta imunitária com a injeção sub-cutânea de um patogene Escherichia coli

(T = lotes testemunha; G = lotes impregnados depois de 21 dias com água de beber contendo 1% o de di-etil-di-tio-carbamato de colina)

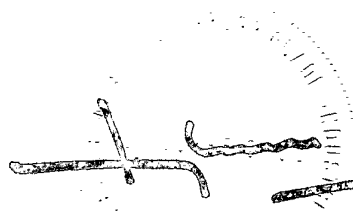
	Dose letal (DL) em %, de inóculo pato- gênico, segundo a dose de vacina injectada	Quantidade de vacina injectada por via sub-cutânea (mcg/rato 'de 25 g), 8 dias depois de ensaio patogénico																
		0		3		10		20		50		70		100		150		
		T	G	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G	
	DL ₀								+					+		+		+
	DL ₃₀							+										
	DL ₅₀												+					
	DL ₇₀								+				+					
	DL ₁₀₀	+	+	+	+	+												

Resulta de todas as experiências relatadas abaixo que a toxicidade do novo composto do invento é praticamente nula. Parece igualmente que a administração deste novo sal de colina aos ratos brancos SWISS origina os efeitos muito favoráveis sobre a proliferação, a longividade, os comportamentos e a eficácia da resposta imunitária.

Os estudos farmacológicos do novo composto do invento mostraram que ele possuía um efeito quelante dos metais pesados e de transição, um efeito imuno-estimulante, um efeito anti-degenerativo e um efeito sobre as transferências nervosas, e por consequência, apresenta uma actividade terapêutica muito interessante no domínio das doenças degenerativas cerebrais, como as demências senis, a doença de Alzheimer e as demências do tipo Alzheimer.

Diz-se que nestas doenças, os neurónios centrais colinérgicos são os primeiros a serem atingidos pela degeneração, que se dá ao nível da síntese do neuro-mediador : o acetyl-colina, ou ao nível da membrana que necessita da colina para a sua biosíntese. Ou do ponto de vista terapêutico, não se pode administrar directamente o acetyl-colina porque não atravessa as membranas, e os resultados obtidos pela administração da colina sozinha na forma de cloreto, são por conseguinte insuficientes.

O novo composto do invento tem sido objectivo de um certo número de experiências conduzidas sob dois modelos animais de degeneração nervosa, provocada seja por uma destruição dos centros coligêrnicos da base, seja pela administração repetida de hidróxido de alumínio. Observou-se nestes dois casos, que as capacidades de aprendizagem dos animais, deteriorados em ligação com a degeneração voltam ao normal pela administração por via oral do dietil-ditio-carbamato de colina, do invento. Depois de



- 14 -

um tratamento de três semanas, observou-se um efeito da dose e as medidas da eficiência da dose revelaram que a DE_{50} estão compreendidas entre 0,10 g e 0,30 g/kg do peso do animal.

O estudo clínico do dietil-ditio-carbamato de colina foi realizado procedendo a experiências em pacientes, que sofrem uma doença degenerativa cerebral, perfeitamente definido segundo os critérios de DSM III do MMS, de um balanço psicométrico aprofundado e de uma radiografia SCANNER.

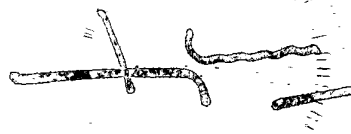
A experiência foi feita duma maneira duplamente cega em meio hospitaleiro com os tratamentos seguintes, de duração de seis a doze semanas:

- placebo
- cloreto de colina
- dietil-ditio-carbamato de colina.

As doses de substância activa utilizadas foram de 125 mg por via oral, três vezes por dia, o que totaliza uma dose diária de 375 mg.

Os resultados mostram que em 70% dos casos tratados pelo produto do invento, observa-se uma supressão ou uma redução significativa dos problemas de comportamento e de humor dos pacientes, estes resultados foram objectivados pelos testes psicométricos.

Nos casos dos pacientes tratados com o placebo ou o cloreto de colina, observa-se unicamente em 30% dos casos melhoramentos ligeiros, pouco claros e menos duráveis que aqueles obtidos nos casos dos pacientes tratados com o novo composto do invento.



- 15 -

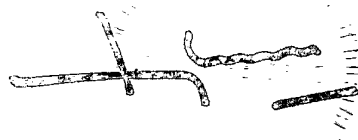
As composições terapêuticas contendo o dietil-ditio-carbamato de colina, como título de princípio activo, podem ser administradas por via oral, rectal, ou injectável dependendo do estado fisiopatológico do tubo digestivo das doenças consideradas.

Nos casos de administração oral, as composições farmacêuticas do invento apresentam-se na forma de géles ou comprimidos nos quais o composto activo está associado a um excipiente conveniente, contendo vantajosamente um gel de sílica para ter em conta do caracter fortemente higroscópico da dietil-ditio-carbamato de colina. Por outro lado para evitar a hidrólise prematura deste último ao nível do estomago, é necessário que o envelope galénico destas preparações, para administração oral, seja de natureza entérica (por exemplo micro-encapsulação).

No caso de administração por via rectal, pode-se preparar a partir do composto do invento supositórios de composição clássica.

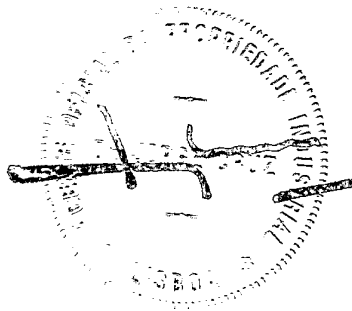
No caso da via injectável, é necessário prever as condições em separado do dietil-ditio-carbamato de colina e da solução fisiológica que deve ser adicionada² no momento da administração.

A posologia retida para as novas composições farmacêuticas situa-se entre uma administração diária de 250 mg a 2,5 g de composto activo, sendo entendido que para a administração oral, os géles ou comprimidos são de preferência dosados em 125 mg de composto activo e podem ser administrados à razão de 2 a 20 géles ou comprimidos por dia, e para a administração rectal os supositórios são dosados em 250 ou 500 mg de composto activo para 3 g.



- 16 -

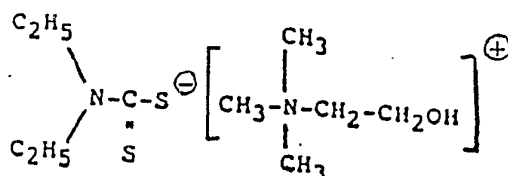
As composições farmacêuticas descritas abaixo são dadas
a título de exemplo ilustrativo e não limitativo do presente
invento.



- 17 -

REIVINDICAÇÕES

12. - Processo para a preparação do dietil-ditio-carbamato de colina de fórmula



caracterizado por se fazer reagir cloreto de colina com dietil-ditio-carbamato de sódio tri-hidratado.

22. - Processo para a preparação de uma composição farmacêutica útil no tratamento de doenças degenerativas cerebrais, caracterizado por se converter o dietil-ditio-carbamato de colina numa forma farmacêuticamente aceitável.

32. - Método para o tratamento de doenças degenerativas cerebrais, caracterizado por se administrar a um paciente, como ingrediente activo, dietil-ditio-carbamato de colina, sendo a gama de dosagem diária de 250 mg a 2,5 g de composto activo.

Lisboa, 16 de Setembro de 1988

J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A, 1.º
1200 LISBOA