

**(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)**

**(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual**  
Secretaria Internacional



**(43) Data de Publicação Internacional**  
**18 de Outubro de 2012 (18.10.2012)** **WIPO | PCT**

**(10) Número de Publicação Internacional**

**WO 2012/139191 A1**

**(51) Classificação Internacional de Patentes :**  
**A61K 31/65** (2006.01)      **A61P 25/04** (2006.01)

**(21) Número do Pedido Internacional :**  
**PCT/BR2012/000112**

**(22) Data do Depósito Internacional :**  
13 de Abril de 2012 (13.04.2012)

**(25) Língua de Depósito Internacional :** Português

**(26) Língua de Publicação :** Português

**(30) Dados Relativos à Prioridade :**  
014110001295  
15 de Abril de 2011 (15.04.2011)      BR

PI 1106121-9  
25 de Novembro de 2011 (25.11.2011)      BR

**(71) Requerente (para todos os Estados designados, exceto US) :** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG [BR/BR]; Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, Sala 2016, CEP: 31270-901, Belo Horizonte - MG (BR).

**(72) Inventores; e**

**(75) Inventores/Requerentes (para US únicamente) :** SILVA BASTOS, Leandro Francisco [BR/US]; 30th St., nº 1300, Smiley Court Apartments, apt. B4-14, East Campus., 80303 - CO (US). GOMES DA SILVA, Jeferson [BR/BR]; Rua José Félix Martins, 1435, Bairro Mantiqueira, 31655-700 - Belo Horizonte - MG (BR). DE MATOS COELHO, Márcio [BR/BR]; Rua Primeiro de Maio, 145, casa 3, Bairro Vila Boa Vista, 30295-060 Belo Horizonte - MG (BR). DE OLIVEIRA BERALDO, Heloisa [BR/BR]; Rua Aratijo Ribeiro, 95, Apto 701, Bairro Vila Paris, 30380-710 Belo Horizonte - MG (BR). DUTRA MORAES, Márcio Flávio; Rua Castelo Serpa, 162, Apto. 101, Bairro Castelo, 31330-170 Belo Horizonte

- MG (BR). DE ASSIS SANTOS, Daniel; Rua Vital Brasil, 397, Apto. 102, Bairro Liberdade, 31270-190 Belo Horizonte - MG (BR). GONÇALVES DOS SANTOS, Simone; Rua Senador Firmino, 87, Bairro Ouro Preto, 31310-0570 Belo Horizonte - MG (BR).

**(74) Mandatário :** DE LUCA GUIMARÃES, Raissa; Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º Andar, Sala 2016, CEP: 31270-901, Belo Horizonte - MG (BR).

**(81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes) :** AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

**(84) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes) :** ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicado:**

— com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))

**WO 2012/139191 A1**

**(54) Title : PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING 11,12-PYRAZOLE MINOCYCLINE AND USE THEREOF FOR RELIEVING PAIN OF NEUROPATHIC ORIGIN**

**(54) Título : COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO 11,12- PIRAZOLMINOCICLINA E USO PARA ALÍVIO DE DOR DE ORIGEM NEUROPÁTICA**

**(57) Abstract :** The present invention describes pharmaceutical compositions containing the compound 11,12-pyrazole minocycline hydrochloride (HPMCCI) - a minocycline (HMCCI) derivative - and pharmaceutically acceptable excipients, and use thereof for relieving neuropathic pain. The composition containing HPMCCI may be used alone or in combination with other drugs for treating patients with neuropathic pain. The HPMCCI compound has no antimicrobial effects, which, in comparison to minocycline, may decrease the side effects, with a greater possibility of the patients adhering to the treatment.

**(57) Resumo :** A presente invenção descreve composições farmacêuticas contendo o composto cloridrato de 1,12-pirazolminociclina (HPMCCI) - um derivado da minociclina (HMCCI) - e excipientes farmacologicamente aceitáveis, e seu uso para alívio de dor neuropática. A composição contendo HPMCCI pode ser utilizada isoladamente ou em associação com outros fármacos para o tratamento de pacientes portadores de dor neuropática. O composto HPMCCI não apresenta efeito antimicrobiano,,o que, em comparação à minociclina, pode reduzir as reações adversas, possibilitando maior adesão dos pacientes ao tratamento.

**COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO 11,12-  
PIRAZOLMINOCICLINA E USO PARA ALÍVIO DE DOR DE ORIGEM  
NEUROPÁTICA**

A presente invenção descreve composições farmacêuticas contendo o composto cloridrato de 11,12-pirazolminociclina (HPMCCI) - um derivado da minociclina (HMCCI) - e excipientes farmaceuticamente aceitáveis, e seu uso para alívio de dor neuropática. A composição contendo HPMCCI pode ser utilizada isoladamente ou em associação com outros fármacos para o tratamento de pacientes portadores de dor neuropática. O composto HPMCCI não apresenta efeito antimicrobiano, o que, em comparação à minociclina, pode reduzir as reações adversas, possibilitando maior adesão dos pacientes ao tratamento.

As tetraciclinas foram descobertas ao final da década de 1940 e constituem uma família de fármacos naturais derivados dos metabólitos de diferentes espécies de *Streptomyces* sp. (clortetraciclina, oxitetraciclina), bem como de fármacos semissintéticos (metaciclina, doxiciclina, HMCCI, limeciclina, rolitetraciclina e tigeciclina). A clortetraciclina e a oxitetraciclina são fármacos obtidos de *Streptomyces aureofaciens* e de *Streptomyces rimosus*, respectivamente. Outras tetraciclinas foram descobertas posteriormente, entre as quais a tetraciclina de *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces rimosus* e *Streptomyces viridofaciens* e a desmetilclortetraciclina de *Streptomyces aureofaciens*. O membro dessa classe farmacológica descoberto mais recentemente foi a tigeciclina, uma tetraciclina de terceira geração derivada do HMCCI que foi aprovada nos Estados Unidos da América (EUA) para tratamento de pacientes com infecções cutâneas e intra-abdominais graves (CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 65, n. 2, p. 232-60, 2001).

As tetraciclinas inibem a síntese proteica bacteriana ao impedir o acoplamento do aminoacil-RNA transportador ao sítio receptor ribossômico. São fármacos que induzem efeito predominantemente bacteriostático, apresentando atividade contra várias bactérias Gram-positivas e Gram-

negativas e também contra clamídias, micoplasmas, riquétsias e protozoários. Além disso, alguns derivados de tetraciclina são potentes agentes antifúngicos. A doxiciclina foi incluída na lista modelo de medicamentos essenciais proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2010) não somente na classe dos 5 antibacterianos, mas também na classe dos medicamentos usados na profilaxia da malária e no tratamento de pacientes portadores dessa doença parasitária. A doxiciclina e o HMCCI, tetraciclinas de segunda geração, são as mais bem absorvidas (90-100%) após administração oral (LIU, Y. et al. A chemically modified tetracycline (CMT-3) is a new antifungal agent. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 46, n. 5, p. 1447-1454, 2002. PEREZ-TRALLERO, E.; IGLESIAS, L. Tetracyclines, sulfonamides and metronidazole. *Enferm Infect Microbiol Clin*, v. 21, n. 9, p. 520-8, 2003. Organização Mundial da Saúde (OMS), 2010. Listas de Medicamentos Essenciais <<http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/index.html>> 10 15 Acesso em 27/10/2011).

O HMCCI, aprovado para uso desde a década de 1970, é a tetraciclina cujas atividades não antimicrobianas são mais amplamente estudadas. Entre essas atividades podem ser citadas as anti-inflamatórias, neuroprotetoras e antinociceptivas. Estudos publicados na última década têm relatado efeitos em 20 modelos de dor nociceptiva, inflamatória e neuropática (RAGHAVENDRA, V. et al. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 306, n. 2, p. 624-30, 2003. LEDEBOER, A. et al. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain 25 facilitation. *Pain*, v. 115, n. 1-2, p. 71-83, 2005. BASTOS, L. F. S. et al. A novel non-antibacterial, non-chelating hydroxypyrazoline derivative of minocycline inhibits nociception and oedema in mice. *Br J Pharmacol*, v. 155, n. 5, p. 714-21, 2008).

Os efeitos em modelos experimentais de dor têm sido associados com 30 inibição da ativação de células microgliais, sendo que o mecanismo de ativação glial é considerado um alvo potencial para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento de pacientes com doenças neurodegenerativas e

condições dolorosas crônicas (WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nat Rev Drug Discov*, v. 2, n. 12, p. 973-85, 2003. MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*, v. 10, n. 1, p. 23-36, 2009).

5 De fato, estudos clínicos têm sido conduzidos para testar a utilidade do HMCCI no tratamento de pacientes com esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, acidente vascular encefálico, lesão cerebral traumática, Huntington e Parkinson ([www.clinicaltrials.com](http://www.clinicaltrials.com). Acesso em 10/11/2011).

Entretanto, uma limitação à sua possível utilidade no tratamento de 10 pacientes com condições dolorosas crônicas consiste no seu efeito antimicrobiano. Devido a esse efeito, o seu uso prolongado pode gerar candidíase e distúrbios gastrintestinais, o que pode reduzir a adesão dos pacientes ao tratamento (GOULDEN, V. et al. Safety of long-term high-dose minocycline in the treatment of acne. *Br J Dermatol*, v. 134, n. 4, p. 693-5, 15 1996).

Além dessas possíveis reações adversas, existem aquelas resultantes da quelação de cálcio. O HMCCI é contraindicado a gestantes, lactantes e crianças com idade inferior a oito anos por causa da possibilidade de formação de complexo com cálcio, com consequente deposição do composto em ossos. 20 Outra possível consequência da quelação de cálcio é a ocorrência de manchas nos dentes (SANCHEZ, A. R. et al. Tetracycline and other tetracycline-derivative staining of the teeth and oral cavity. *Int J Dermatol*, v. 43, n. 10, p. 709-15, 2004).

Por essas razões, as chamadas tetraciclínas quimicamente modificadas 25 têm sido desenvolvidas. Estudos clínicos têm sido conduzidos para testar a utilidade da inciclinida - uma tetraciclina quimicamente modificada -, no tratamento de pacientes com certos tipos de câncer ([www.clinicaltrials.com](http://www.clinicaltrials.com). Acesso em 13/11/2011). Derivados não antibacterianos do HMCCI também 30 têm sido investigados (LERTVORACHON, J. et al. 1,12-substituted tetracyclines as antioxidant agents. *Bioorg Med Chem*, v. 13, n. 15, p. 4627-37, 2005).

Apesar de existirem várias classes de fármacos úteis no tratamento de pacientes com condições dolorosas, existe uma grande demanda pela busca de fármacos com eficácia ou segurança superiores às dos atualmente disponíveis para uso clínico. Nesse sentido, existe grande interesse pela busca

5 de drogas com atividade analgésica que interfiram na transmissão canabinoidérgica e bloqueadores de canais para sódio resistentes à tetrodotoxina (LA RANA, G. et al. AM404, an anandamide transport inhibitor, reduces plasma extravasation in a model of neuropathic pain in rat: role for cannabinoid receptors. *Neuropharmacology*, v. 54, n. 3, p. 521-9, 2008.

10 SCANIO, M. J. et al. Discovery and biological evaluation of potent, selective, orally bioavailable, pyrazine-based blockers of the Na(v)1.8 sodium channel with efficacy in a model of neuropathic pain. *Bioorg Med Chem*, v. 18, n. 22, p. 7816-25, 2010).

Além da busca por novos fármacos, têm sido demonstrados novos usos

15 para fármacos já disponíveis para uso clínico, tais como os agonistas de  $\alpha_2$ -adrenoceptores, os antagonistas de  $\beta$ -adrenoceptores, os anticonvulsivantes e os antidepressivos, que são atualmente alternativas terapêuticas menos convencionais.

Fármacos como o ácido acetilsalicílico, ibuprofeno e paracetamol estão

20 presentes na lista de medicamentos essenciais proposta pela OMS na classe de medicamentos anti-inflamatórios não esteroides, e morfina e codeína foram incluídos na classe de analgésicos opioides (OMS, 2010). Entretanto, esses fármacos têm utilidade muito limitada no tratamento de pacientes com condições dolorosas associadas com neuropatias, condições que representam

25 um grave problema de saúde pública mundialmente, e têm uma prevalência entre 7 e 8% em países desenvolvidos, onde estudos epidemiológicos já foram conduzidos. Ao invés desses fármacos tradicionais, gabapentina e pregabalina, fármacos anticonvulsivantes, foram aprovados em alguns países para o tratamento de pacientes com dor neuropática (TORRANCE, N. et al.

30 The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey. *J Pain*, v. 7, n. 4, p. 281-9, 2006. BOUHASSIRA, D. et al. Prevalence of chronic pain with neuropathic

characteristics in the general population. *Pain*, v. 136, n. 3, p. 380-7, 2008. DRAY, A. Neuropathic pain: emerging treatments. *Br J Anaesth*, v. 101, n. 1, p. 48-58, 2008. Organização Mundial da Saúde (OMS), 2010. Listas de Medicamentos Essenciais <<http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/index.html>> Acesso em 27/10/2011).

Tetraciclinas quimicamente modificadas despertam grande interesse por apresentarem segurança potencialmente superior àquela de tetraciclinas convencionais. Esses fármacos não causariam candidíase nem distúrbios gastrintestinais, reações adversas associadas com o uso prolongado (duração 10 média de 10,5 meses) do antibiótico HMCCI. Além disso, como substituições na periferia inferior do HMCCI (Figura 1) prejudicam a capacidade de quelação de cálcio(II), outra vantagem potencial das tetraciclinas modificadas em relação ao HMCCI seria a possibilidade reduzida de deposição em ossos e indução de descoloração de dentes (prevalência de 3 a 6%), reações adversas 15 atribuídas à formação de complexo entre HMCCI e ortofosfato de cálcio nesses tecidos (GOULDEN, V. et al. Safety of long-term high-dose minocycline in the treatment of acne. *Br J Dermatol*, v. 134, n. 4, p. 693-5, 1996. SANCHEZ, A. R. et al. Tetracycline and other tetracycline-derivative staining of the teeth and oral cavity. *Int J Dermatol*, v. 43, n. 10, p. 709-15, 2004).

20 O pedido de patente WO9626926 descreve a síntese de derivados 11,12-pirazoltetraciclinas e seu uso como antibióticos, porém não há relatos do uso desses derivados para o tratamento de dor.

Lertvorachon e colaboradores descreveram a síntese de derivados hidroxipirazol da tetraciclina e HMCCI e suas atividades antioxidantes 25 (LERTVORACHON, J. et al. 1,12-substituted tetracyclines as antioxidant agents. *Bioorg Med Chem*, v. 13, n. 15, p. 4627-37, 2005).

Porém, não há relatos no estado da técnica do efeito antinociceptivo induzido pelo HPMCCI em modelos de dor neuropática. O uso de HPMCCI no tratamento de dor neuropática está associado a diversas vantagens, uma vez 30 que os poucos medicamentos disponíveis para o tratamento de pacientes com doenças dessa natureza não são muito efetivos, associado ao fato de que o

HPMCCI é potencialmente mais seguro que o HMCCI, uma vez que é desprovida de atividade antimicrobiana.

### DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

**Figura 1:** Estrutura química do cloridrato de 11,12-pirazolminociclina (HPMCCI).

**Figura 2:** Espectro de massas por ESI no modo negativo do cloridrato de 11,12-pirazolminociclina (HPMCCI).

**Figura 3:** Espectros eletrônicos do cloridrato de minociclina (HMCCI) em tampão TRIS 7,2 após adições sucessivas de CaCl<sub>2</sub> em tampão TRIS 7,2.

**Figura 4:** Espectros eletrônicos do HPMCCI em tampão TRIS 7,2 após adições sucessivas de CaCl<sub>2</sub>.

**Figura 5:** Efeito antinociceptivo induzido pelo HPMCCI, nas doses de 50 e 100 mg/Kg, no modelo de alodínia mecânica desenvolvida 10 dias após a constrição do nervo ciático em ratos. Os valores basais de limiar para retirada de pata foram determinados antes da cirurgia ou tratamento. No décimo dia após a cirurgia, os limiares foram determinados novamente, antes dos tratamentos.

**Figura 6** - Efeito induzido pelo cloridrato de 11,12-pirazolinominociclina (250 mg/kg, *per os*) sobre a alodínia avaliada 10 dias após a constrição de nervo ciático de ratos. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). n=9

### DESCRIÇÃO DETALHADA

A presente invenção compreende composições farmacêuticas contendo o composto cloridrato de 11,12-pirazolminociclina (HPMCCI) - um derivado da minociclina (HMCCI) - e excipientes farmaceuticamente aceitáveis, e seu uso para o alívio de dor neuropática.

Essas composições podem ser apresentadas nas formas: sólida, como comprimidos, drágeas, cápsulas e supositório; líquida, como soluções, suspensões e xaropes; bem como aerossóis, pastas, cremes, ungüentos e

loções para aplicação local ou como dispositivos transdérmicos. Sua administração pode ser realizada pelas vias oral, retal, intravenosa, intratecal, epidural ou tópica.

O HPMCCI pode ser utilizado isoladamente ou em associação com outros fármacos usualmente empregados no tratamento de pacientes portadores de dor neuropática, como os opioides (morfina, codeína, oxicodona, hidrocodona, tramadol), anti-inflamatórios não esteroidais (diclofenaco de sódio ou de potássio, ácido acetilsalicílico, paracetamol, ibuprofeno, cetroprofeno, naproxeno, flurbiprofeno), anticonvulsivantes usados no alívio de dor (carbamazepina, oxcarbazepina, gabapentina, pregabalina), antidepressivos usados no alívio de dor (amitriptilina, nortriptilina, fluoxetina, duloxetina) e medicamentos usados no tratamento de pacientes com artrite reumatoide (etanercepte, infliximabe, adalimumabe, certolizumabe, golimumabe, anakinra, rituximabe, abatacepte, tocilizumabe) e medicamentos usados na profilaxia de enxaqueca (propranolol, atenolol, metoprolol).

A presente invenção apresenta, como vantagem, a ausência de atividade antibacteriana e antifúngica, possivelmente diminuindo os efeitos colaterais em comparação com HMCCI.

A presente invenção pode ser mais bem entendida por meio dos seguintes exemplos, não limitantes, da tecnologia:

#### **Exemplo 1: Preparação de HPMCCI**

A obtenção de HPMCCI (Figura 1) foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa foram adicionados 10 mmol de HMCCI e 15 mmol de hidrazina em 27 mL de uma solução metanol-isopropanol (1:9). A solução foi mantida sob agitação e refluxo por 3 h. O produto obtido foi filtrado e seco sob pressão reduzida. Na segunda etapa, o sólido obtido foi recristalizado em 50 mL de benzeno para remover o isopropanol e favorecer a formação do anel pirazolínico, caso o produto não tivesse sido completamente formado. Opcionalmente, pode-se utilizar o diclorometano em substituição ao benzeno. A solução foi mantida sob agitação e aquecimento por 3 h, com reposição de

benzeno quando necessário. O sólido obtido foi filtrado e seco sob pressão reduzida. O rendimento do produto após a segunda etapa variou entre 65 e 73%.

Com o objetivo de confirmar a formação do produto desejado foram realizados espectros de massas por ionização por *eletrospray* (ESI) dos compostos. Na Tabela 1 estão apresentados os principais picos de *m/z* obtidos para o HMCCI e do seu derivado 11,12-pirazolínico, nos modos positivo e negativo. O espectro de massas por ESI no modo negativo de HPMCCI está apresentado na Figura 2.

**Tabela 1:** Atribuição do principal pico de *m/z* obtidos para cloridrato de minociclina (HMCCI) e cloridrato de 11,12-pirazolminociclina (HPMCCI) por ESI, nos modos positivo e negativo (M = molécula).

<b>HMCCI</b>					
ESI(+)-MS			ESI(-)-MS		
Íon	<i>m/z</i>	Abundância relativa (%)	Íon	<i>m/z</i>	Abundância relativa (%)
$[M-Cl]^+$	458,41	100,00	$[M-Cl-2H]^-$	456,39	100,00
<b>HPMCCI</b>					
ESI(+)-MS			ESI(-)-MS		
Íon	<i>m/z</i>	Abundância relativa (%)	Íon	<i>m/z</i>	Abundância relativa (%)
$[M-Cl]^+$	454,39	100,00	$[M-Cl-2H]^-$	452,55	100,00

**Exemplo 2:** Avaliação da interação dos compostos HMCCI e HPMCCI com cálcio(II)

A capacidade dos compostos HMCCI e HPMCCI de interagirem com cálcio(II) foi avaliada por meio da titulação espectrofotométrica envolvendo 3 mL de uma solução aquosa do composto em pH 7,2 (mantido pela solução tampão TRIS) com microadições de alíquotas de solução de cloreto de cálcio(II). O sistema foi mantido a temperatura de 25 °C. Nas figuras 3 e 4 estão representados os espectros eletrônicos obtidos durante o experimento.

Quando são comparados os espectros de HMCCI com os de HPMCCI pode-se observar que o deslocamento das bandas de absorção dos compostos para maiores energias, pode ser atribuído a formação do anel 11,12-pirazolínico, que ao ser formado leva à perda da transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  atribuída à carbonila conjugada ao anel aromático D. Para HMCCI foi possível observar que ocorreu a interação com os íons cálcio(II), o que já foi descrito na literatura (LERTVORACHON, J. et al. 1,12-substituted tetracyclines as antioxidant agents. *Bioorg Med Chem*, v. 13, n. 15, p. 4627-37, 2005).

#### Exemplo 3: Avaliação da atividade antibacteriana

Os primeiros testes de atividade antibacteriana foram realizados quantitativamente pelo método de macrodiluição em série. Os testes de atividade antibacteriana foram realizados seguindo os padrões do NCCLS (2002, 2003). Cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853) foram inoculadas em caldo Mueller Hinton, sendo ambas incubadas a 37 °C por 18 a 24 h (PERNAK, J. et al. Synthesis and antimicrobial activities of new pyridinium and benzimidazolium chlorides. *Eur J Med Chem*, v. 36, n. 4, p. 313-20, 2001).

A referência para a turbidez do inóculo foi medida pela análise do seu espectro de absorção na região do visível, nos comprimentos de onda 530 nm e 625 nm, devendo fornecer um valor de absorbância entre 0,08 e 0,1, de forma que a concentração do inóculo é de  $10^8$  unidades formadoras de colônia (UFC). Foram retirados 100 µL do inóculo e transferidos para outro tubo contendo 9,9 mL de caldo Mueller Hinton, de modo que a concentração de inóculo neste tubo foi de  $10^6$  UFC. Foram acrescentados 200 µL deste inóculo aos tubos de diluição contendo 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,062 e 0,031 µg/mL das substâncias testadas, de modo que a concentração de inóculo em cada tubo foi de  $10^5$  UFC.

HMCCI foi utilizado como controle positivo nos testes feitos com o objetivo de avaliar a atividade do seu derivado contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Após 20 h de incubação em estufa a 37 °C, foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos compostos.

Os valores para CIM dos compostos estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Valores de CIM encontrados para HMCCI contra *S. aureus* ATCC® 6538 e *P. aeruginosa* ATCC® 9027

Composto	CIM ( $\mu\text{mol/l}$ )	
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
HMCCI	0,108	3,35
HPMCCI	>1082	>1041

Os valores de CIM estão de acordo com a faixa de valores apresentados por esse composto frente a cepas de controle de qualidade. O aumento dos 5 valores de CIM de HPMCCI, quando comparados com aqueles da tetraciclina de partida, podem ser atribuídos à formação do anel pirazólico com a presença dos nitrogênios ligados aos carbonos C11 e C12, que levou à perda da atividade antibacteriana (SAIKALI, Z.; SINGH, G. Doxycycline and other tetracyclines in the treatment of bone metastasis. Anticancer Drugs, v. 14, n. 10, 10, p. 773-8, 2003).

Uma segunda bateria de testes foi realizada, utilizando-se noventa amostras clínicas: 30 de *Staphylococcus aureus*, 30 de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativa e 30 de *Escherichia coli*. As linhagens eram sensíveis a uma ampla faixa de medicamentos antibacterianos, como demonstrado em 15 teste conduzido de acordo com o método proposto pelo Clinical Laboratories Standards Institute (CLSI, 2011).

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) de minociclina e HPMCCI foram avaliadas por meio do método de diluição em ágar (CLSI, 2011). Soluções estoque das drogas foram adicionadas ao ágar Muller-Hinton (BD 20 Difco™, EUA) levando a concentrações finais de 0,125 a 64  $\mu\text{g/mL}$ . Inóculos bacterianos foram preparados por suspensão direta da colônia em salina para obter uma densidade equivalente ao padrão 0,5 McFarland (aproximadamente 1 x 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônia/mL) e então inoculados em ágar Muller-Hinton com as drogas, usando um replicador Steers (Steers, Foltz et al., 25 1959). As linhagens de referência de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923) *Staphylococcus epidermidis* (ATCC® 12228) e *Escherichia coli* (ATCC® 25922)

foram incluídos como controle. A CIM foi considerada a concentração mais baixa suficiente para inibir crescimento bacteriano seguindo normas do instituto CLSI (2011).

Nenhuma das linhagens bacterianas testadas foi sensível a HPMCCI na faixa de concentração usada. Como esperado, todas as linhagens foram sensíveis à minociclina (Tabela 3).

**Tabela 3:** Concentrações inibitórias mínimas ( $\mu\text{g/mL}$ ) da minociclina e de HPMCCI contra diferentes linhagens bacterianas

<i>Staphylococcus aureus</i> (n=30)		Número de linhagens resistentes*									
Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ )		0,125	0,25	0,25	1	2	4*	8	16	32	64
Compostos	HMCCI	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	HPMCCI	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
<i>Staphylococcus spp.</i>									Número de linhagens resistentes*		
coagulase negativo (n=30)									Número de linhagens resistentes*		
Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ )		0,125	0,25	0,25	1	2	4	8	16	32	64
Compostos	HMCCI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	HPMCCI	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
<i>Escherichia coli</i> (n=30)									Número de linhagens resistentes*		
Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ )		0,125	0,25	0,25	1	2	4	8	16	32	64
Compostos	HMCCI	9	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	HPMCCI	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30

\*As bactérias testadas são consideradas sensíveis ao HMCCI quando apresentam seu crescimento inibido em concentração igual ou inferior a 16  $\mu\text{g/mL}$ , CLSI 2011.

#### **Exemplo 4: Avaliação da atividade antifúngica de HPMCCI**

Onze linhagens de *Candida albicans* foram incluídas neste estudo. Todas as amostras foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose a 4°C. Antes do teste, as amostras foram transferidas para um novo tubo contendo ágar Sabouraud dextrose a 37 °C por 24 h. As suspensões de fungos foram 5 preparadas em solução salina (0,85% de cloreto de sódio, m/v) e a transmitância foi ajustada para 85% a 530 nm em um espectrofotômetro. A suspensão resultante (1 a 5 X 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colônia/mL) foi agitada em um vórtex por 15 s e a densidade celular foi ajustada para 1 a 5 X 10<sup>3</sup> unidades formadoras de colônia/mL em meio RPMI-1640 (Inlab, Brasil).

10 O ensaio de microdiluição foi conduzido usando meio RPMI-1640 esterilizado e tamponado com ácido morfolinopropanossulfônico (0,165 mol/L, Sigma-Aldrich, EUA) como meio para teste. As soluções contendo cada uma das drogas testadas foram dissolvidas em água destilada e esterilizada. Então, foi feita diluição seriada em RPMI-1640, obtendo-se, finalmente, uma faixa de 15 concentração de 128 a 0,25 µg/mL.

20 Aliquotas de cada diluição (100 µL) foram distribuídas em placas para microdiluição com 96 poços com fundo plano, e, então, foram acrescentados 100 µL de suspensão dos inóculos. Controles foram também conduzidos para esterilização e crescimento. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Os testes foram feitas em duplicata para cada uma das diferentes concentrações.

25 Os resultados foram expressos em µg/mL, e a CIM foi definida visualmente como a concentração mais baixa capaz de inibir o crescimento fúngico, quando comparado com o grupo controle. Para fluconazol (controle positivo), a CIM foi aquela capaz de inibir 80% do crescimento fúngico (NCCLS, 2002).

30 Nenhuma das linhagens fúngicas testadas foi sensível à HPMCCI na faixa de concentração usada (até 128 µg/mL). Por outro lado, todas as linhagens foram sensíveis à minociclina em concentração alta (64 a 128 µg/mL) e ao fluconazol em concentração muito baixa ( $\leq$  8 µg/mL), como esperado para um medicamento antifúngico usado como controle positivo (Tabela 4).

**Tabela 4:** Concentrações inibitórias mínimas ( $\mu\text{g/mL}$ ) de HPMCCI, HMCCI e fluconazol contra diferentes linhagens fúngicas

<i>Candida albicans</i>	HPMCCI	HMCCI	fluconazol
ATCC 18804	>128	64	2
038-SBBO	>128	64	1
093-SBBORG	>128	128	2
064-CHBOVD	>128	64	4
030-CHBOVD	>128	64	4
022-CHBOVD	>128	64	8
111-CHBOVD	>128	64	1
073-CHVGVD	>128	64	4
031-CHBOVD	>128	64	4
072-CHBOVD	>128	64	2
024-CHBOVD	>128	64	0,5
MIC 50*	>128	64	2
MIC 90**	>128	64	4

\* CIM que inibiu o crescimento de 50% ou \*\* 90% das linhagens testadas.

5   **Exemplo 5:** Avaliação da alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo ciático em ratos

Os procedimentos cirúrgicos de constrição do nervo são baseados na técnica descrita por Bennett e Xie, 1988 (BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, v. 33, n. 1, p. 87-107, 1988).

Os animais foram anestesiados com isoflurano em oxigênio. Após a anestesia, por meio de uma incisão na região do bíceps femoral previamente tricotomizada e higienizada com iodopolividona 10% m/v, uma porção do nervo ciático foi exposta. Foram feitas quatro ligaduras com fio *catgut* cromado 4.0, com espaço de aproximadamente 1 mm entre elas. A força de constrição foi exercida de forma a não impedir a circulação sanguínea pela vasculatura

superficial epineural. Um grupo controle foi composto por animais submetidos a uma falsa cirurgia, na qual o nervo não foi constringido, apenas visualizado. Os animais falso-operados ou operados foram tratados com o composto ou veículo (solução fisiológica) no décimo dia após a constrição do nervo. A avaliação do 5 efeito induzido pelo composto foi realizada 2, 4 e 6 h após a administração.

A alodínia mecânica foi avaliada por meio do uso de um analgesímetro digital. Esse equipamento permite a determinação do limiar para a retirada da pata e a resposta é expressa em gramas. Uma ponteira de plástico, acoplada a um braço transdutor (faixa: 0,1 a 1000 g, ou aproximadamente 0,1 a 10 N), é 10 aplicada sob o centro da superfície plantar da pata posterior direita dos animais colocados sobre uma grade. Quando a pata é pressionada gradualmente de baixo para cima, ocorre retirada da pata e o resultado então aparece no visor do analgesímetro. O limiar para essa resposta foi determinado cinco vezes, com intervalo de ao menos 20 s entre as determinações, e, então, o valor 15 médio das medidas foi calculado.

Na figura 4 estão apresentadas as curvas de limiar para retirada da pata direita em função do tempo após a administração intraperitoneal (i.p.) do composto HPMCCI ou do seu veículo em ratos submetidos à cirurgia de constrição do nervo ciático ou à falsa cirurgia.

20 Observou-se efeito antinocicepivo induzido pelo HPMCCI (50 e 100 mg/Kg) 10 dias após a constrição do nervo ciático em ratos (n= 6 a 7/grupo). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. Foi feita análise de variância de medidas repetidas de duas vias, sendo tempo e tratamento os efeitos principais. O teste *post hoc* Bonferroni foi usado. \* 25 estatisticamente significativo com relação ao grupo operado e tratado com o veículo ( $p < 0,05$ ).

O composto induziu efeito nesse modelo de dor neuropática, pois o limiar para retirada da pata ao estímulo mecânico foi elevado na segunda hora nos grupos operados tratados com composto (50 e 100 mg/kg) quando 30 comparado com o grupo tratado com o veículo. Por outro lado, o grupo de animais falso-operados tratado com o composto (100 mg/kg) não teve o limiar para retirada de pata alterado em relação ao grupo falso-operado tratado com

o veículo. Isso indica claramente que o composto inibe dor neuropática experimental.

**Exemplo 6:** Efeito antinociceptivo de HPMCCI administrado *per os*.

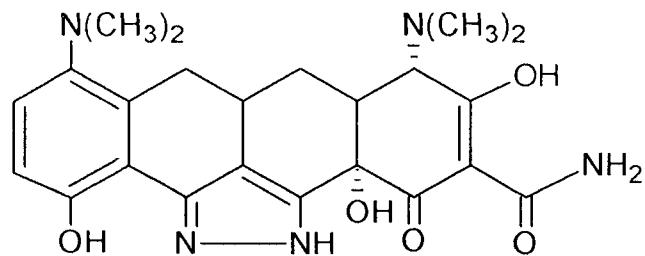
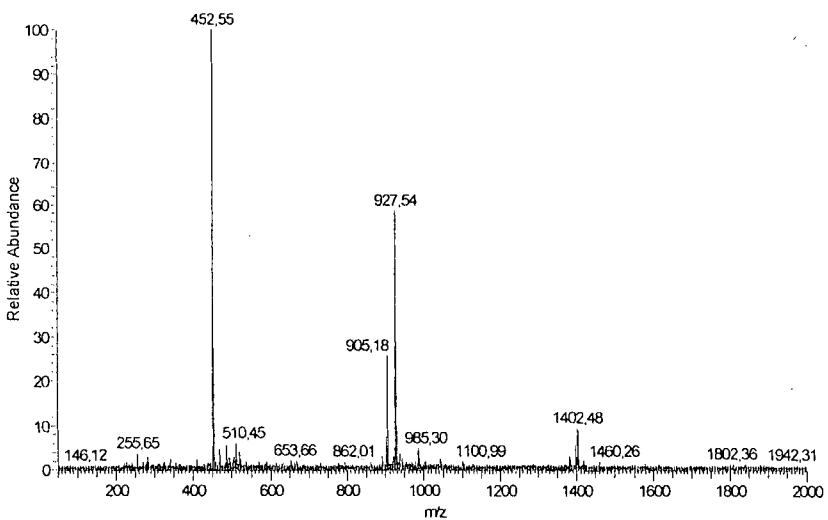
O efeito antinociceptivo de HPMCCI administrado *per os* é de grande 5 importância em um contexto terapêutico, pois a via oral é a mais cômoda para administração de medicamentos.

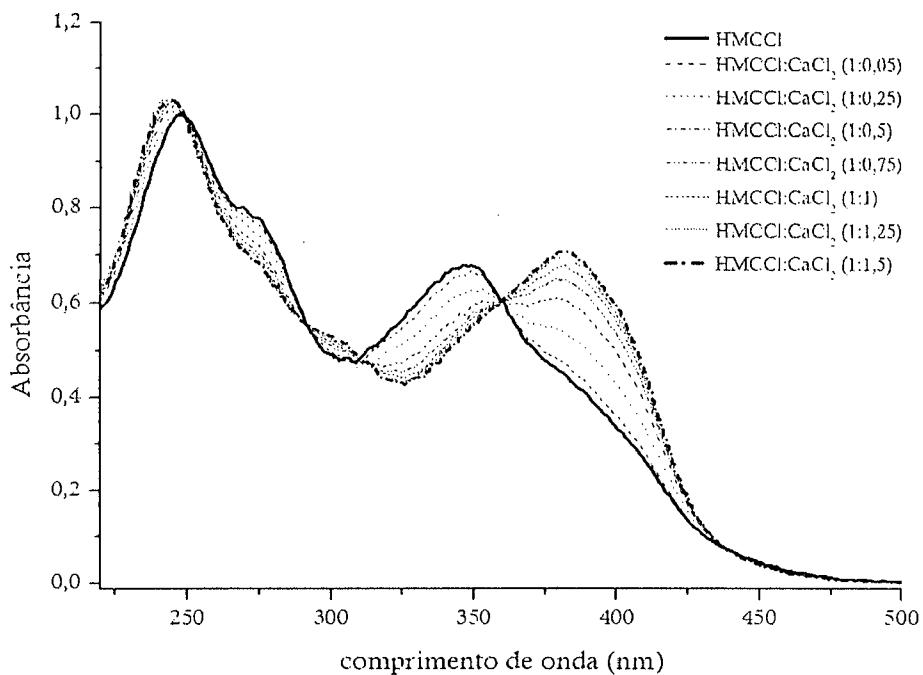
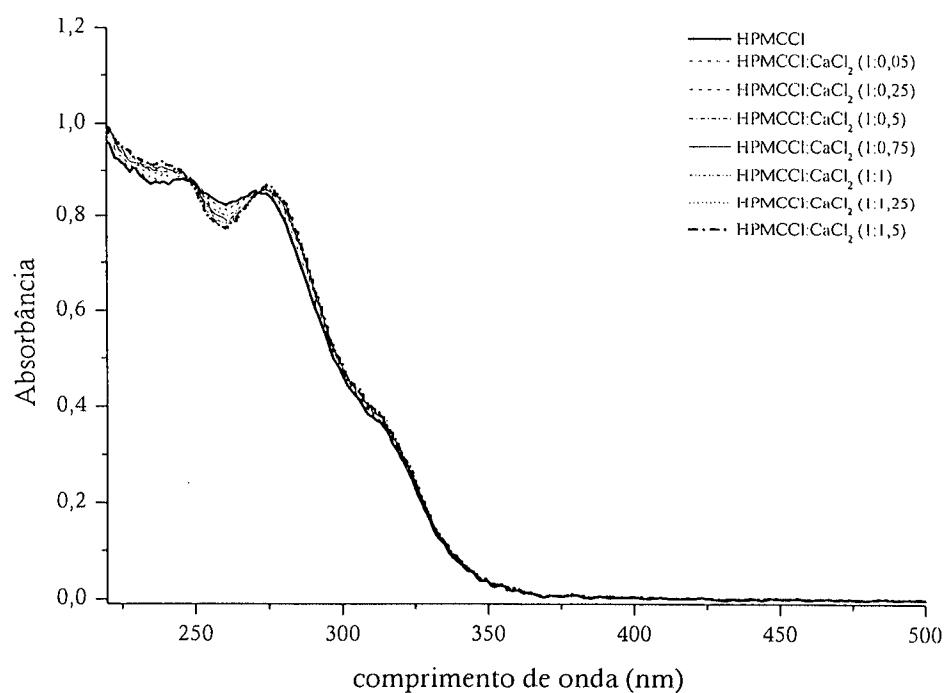
A Figura 6 apresenta dados relativos ao efeito antialodínico de HPMCCI administrado *per os*, o que pode ser atingindo aumentando-se em 5 vezes a dose eficaz administrada por via intraperitoneal (de 50 para 250 mg/kg). A 10 cirurgia foi realizada como previamente descrito no Exemplo 5, e a droga foi administrada através de uma gavagem, em volume de 2 mL/kg, em solução salina contendo 5% de sacarose m/v (Labsynth®, Diadema, Brasil).

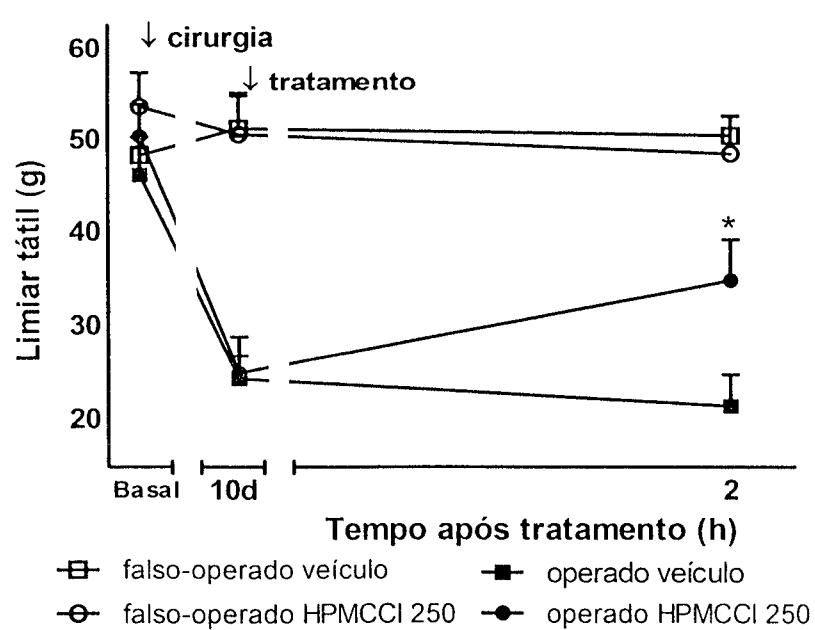
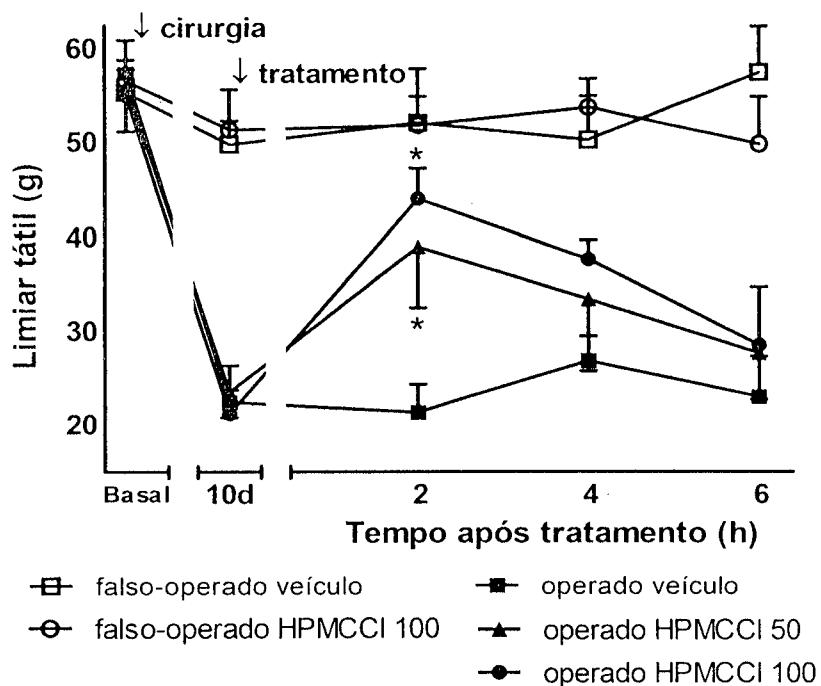
## REIVINDICAÇÕES

1. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA ALÍVIO DE DOR DE ORIGEM NEUROPÁTICA, caracterizadas por conterem o composto cloridrato de 11,12-pirazolminociclina e excipientes farmaceuticamente aceitáveis.
5. 2. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA ALÍVIO DE DOR DE ORIGEM NEUROPÁTICA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas por apresentarem ausência de atividade antibacteriana e antifúngica.
10. 3. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA ALÍVIO DE DOR DE ORIGEM NEUROPÁTICA, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizadas por serem utilizadas individualmente ou em combinação com outros fármacos usualmente empregados no tratamento de pacientes portadores de dor neuropática, como os opioides (morfina, codeína, oxicodona, hidrocodona, tramadol), anti-inflamatórios não esteroidais (diclofenaco de sódio ou de potássio, ácido acetilsalicílico, paracetamol, ibuprofeno, cetroprofeno, naproxeno, flurbiprofeno), anticonvulsivantes usados no alívio de dor (carbamazepina, oxcarbazepina, gabapentina, pregabalina), antidepressivos usados no alívio de dor (amitriptilina, nortriptilina, fluoxetina, duloxetina), medicamentos usados no tratamento de pacientes com artrite reumatoide (etanercepte, infliximabe, adalimumabe, certolizumabe, golimumabe, anakinra, rituximabe, abatacepte, tocilizumabe) e medicamentos usados na profilaxia de enxaqueca (propranolol, atenolol, metoprolol).
15. 4. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA ALÍVIO DE DOR DE ORIGEM NEUROPÁTICA, de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizadas por serem apresentadas nas formas sólida, como comprimidos, drágeas, cápsulas e supositório; líquida, como soluções, suspensões e xaropes; bem como aerossóis, pastas, cremes, ungüentos e loções para aplicação local ou como dispositivos transdérmicos.
20. 5. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA ALÍVIO DE DOR DE ORIGEM NEUROPÁTICA, de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizadas por poderem ser administradas pelas vias oral, retal, intravenosa, intratecal, epidural ou tópica.

6. USO DAS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, de acordo com as reivindicações 1 a 5, caracterizado por ser na preparação de medicamentos para tratamento de pacientes que apresentam dor de origem neuropática.

**FIGURAS****Figura 1****Figura 2**

**Figura 3****Figura 4**



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2012/000112

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**A61K 31/65 (2006.01), A61P 25/04 (2006.01)**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

**A61K, A61P**

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

**SINPI (BANCO DE PATENTE INPI-BR)**

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**EPODOC, DERWENT, CHEMICAL ABSTRACTS, MEDLINE**

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9626926 A1 ( SEGHETTI ENNIO [IT]) 6 Sept 1996 (1996-09-06) page 6 (lines 18-25), page 7 (composed of formula IV) Claims 13 and 14.	1, 2, 4 e 5
X	WO 2006047756 A2 ( PAN JINGWEN [US]) 4 may 2006 (2006-05-04) page 39 (lines 25 and 26), pages 59-62; Claim 269	1, 2, 4 e 5
X	WO 2005082860 A1 ( ROMAN GHEORGHE [CA]) 9 Sept 2005 (2005-09-09) page16 (composed of drawing), page 28 (lines 22-30), page 30 (lines 1-13), Claim 52	1, 2, 4 e 5
Y	Page 46 (lines 1-3), figure 5	6

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

**11 May 2012**

Date of mailing of the international search report

**21 May 2012**Name and mailing address of the ISA/ **BR**

INSTITUTO NACIONAL DA

PROPRIEDADE INDUSTRIAL

Rua Mayrink Veiga nº 9, 18º andar

Facsimile No. cep: 20090-050, Centro - Rio de Janeiro/RJ

Authorized officer

**Fernando Tavares Consoni**

Telephone No.

+55 21 3037-3493/3742

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2012/000112

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Mika, J et al. Minocycline and pentoxifylline attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate the effects of morphine in rat and mouse models of neuropathic pain. <i>European Journal of Pharmacology</i> , 2007, v. 560, p. 142 - 149. <b>See the whole document</b>	3,6
X	Leedeboer, A et al. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. <i>Pain</i> . 2005,v..115, p. 71-83. <b>See the whole document</b>	3,6

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

PCT/BR2012/000112

**RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL**

Depósito internacional Nº

PCT/BR2012/000112

**A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO**

**A61K 31/65 (2006.01), A61P 25/04 (2006.01)**

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

**B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA**

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

**A61K, A61P**

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

**SINPI (BANCO DE PATENTE INPI-BR)**

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

**EPODOC, DERWENT, CHEMICAL ABSTRACTS, MEDLINE**

**C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES**

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
X	WO 9626926 A1 ( SEGHETTI ENNIO [IT]) 06 setembro 1996 (1996-09-06) página 6 (linhas 18-25), página 7 (composto de fórmula IV), Reivindicações 13 e 14.	1, 2, 4 e 5
X	WO 2006047756 A2 ( PAN JINGWEN [US]) 04 maio 2006 (2006-05-04) página 39 (linhas 25 e 26), páginas 59-62; Reivindicação 269.	1, 2, 4 e 5
X	WO 2005082860 A1 ( ROMAN GHEORGHE [CA]) 09 setembro 2005 (2005-09-09) página 16 (composto da figura), página 28 (linhas 22-30), pagina 30 (linhas 1-13), Reivindicação 52	1, 2, 4 e 5
Y	Página 46 (linhas 1 -3), Figura 5-----	6

Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C

Vér o anexo de famílias das patentes

\* Categorias especiais dos documentos citados:

"A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.

"E" pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional

"L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial

"O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.

"P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.

"T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não confita como depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.

"X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.

"Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com um outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.

"&" documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional

**11/05/2012**

Data do envio do relatório de pesquisa internacional

**210512**

Nome e endereço postal da ISA/BR



INSTITUTO NACIONAL DA  
PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
Rua Mayrink Veiga nº 9, 18º andar  
cep: 20090-050, Centro - Rio de Janeiro/RJ  
+55 21 3037-3663

Funcionário autorizado

**Fernando Tavares Consoni**

Nº de telefone: +55 21 3037-3493/3742

## RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional Nº

PCT/BR2012/000112

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
X	Mika, J et al. Minocycline and pentylenetetrazole attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate the effects of morphine in rat and mouse models of neuropathic pain. <i>European Journal of Pharmacology</i> , 2007, v. 560, p. 142 - 149. ver documento inteiro	3,6
X	Ledeboer, A et al. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. <i>Pain</i> . 2005,v.115, p. 71-83. ver documento inteiro	3,6

**RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL**

Informação relativa a membros da família da patentes

Depósito internacional Nº

PCT/BR2012/000112

Documentos de patente citados no relatório de pesquisa	Data de publicação	Membro(s) da família de patentes	Data de publicação
WO 9626926 A1	1996-09-06	AU 4831396 A EP 0812315 A1 IT MI950376 D0 IT 1274653 B JP H11501022 A	1996-09-18 1997-12-17 1995-02-28 1997-07-18 1999-01-26
WO 2006047756 A2	2006-05-04	AU 2005299294 A1 AU 2005299569 A1 CA 2585248 A1 CA 2585418 A1 EP 1805134 A2 EP 1807387 A2 EP 2033950 A1 EP 2269978 A2 EP 2269985 A2 EP 2269991 A2 EP 2284150 A2 EP 2284151 A2 EP 2284152 A2 EP 2284153 A2 EP 2284155 A2 EP 2284156 A2 EP 2284164 A2 EP 2287140 A2 EP 2287148 A2 EP 2287150 A2 EP 2295419 A2 EP 2301912 A2 EP 2301916 A2 EP 2305637 A2 IL 182728 D0 IL 182734 D0 IL 213209 D0 IL 213843 D0 JP 2008518025 A JP 2008518035 A US 2006166944 A1 US 7858601 B2 US 2006166945 A1 US 2011077225 A1 WO 2006047671 A2 WO 2006047756 A3	2006-05-04 2006-05-04 2006-05-04 2006-05-04 2007-07-11 2007-07-18 2009-03-11 2011-01-05 2011-01-05 2011-01-05 2011-02-16 2011-02-16 2011-02-16 2011-02-16 2011-02-16 2011-02-16 2011-02-16 2011-02-16 2011-02-16 2011-02-16 2011-02-16 2011-02-16 2011-02-16 2011-02-16 2011-02-16 2011-03-16 2011-03-30 2011-03-30 2011-04-06 2007-07-24 2007-07-24 2011-07-31 2011-07-31 2008-05-29 2008-05-29 2006-07-27 2010-12-28 2006-07-27 2011-03-31 2006-05-04 2006-07-20
WO 2005082860 A1	2005-09-09	WO 2005082860 A8	2005-12-08