



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

(21) PI 0818182-9 A2



(22) Data do Depósito: 01/10/2008

(43) Data da Publicação Nacional: 23/06/2020

(54) Título: COMPOSTOS DIAMINOFENOTIAZINAS, PRODUTO DE FÁRMACO E COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO OS MESMOS, BEM COMO USOS DOS REFERIDOS COMPOSTOS

(51) Int. Cl.: A61K 31/542; A61P 25/28.

(30) Prioridade Unionista: 03/10/2007 US 60/960,544.

(71) Depositante(es): WISTA LABORATORIES LTD..

(72) Inventor(es): CLAUDE MICHEL WISCHIK; DAMON JUDE WISCHIK; JOHN MERVYN DAVID STOREY; CHARLES ROBERT HARRINGTON.

(86) Pedido PCT: PCT GB2008003315 de 01/10/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/044127 de 09/04/2009

(85) Data da Fase Nacional: 06/04/2010

(57) Resumo: COMPOSTOS DIAMINOFENOTIAZINAS, PRODUTO DE FÁRMACO E COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO OS MESMOS, BEM COMO USOS DOS REFERIDOS COMPOSTOS A presente invenção refere-se geralmente aos métodos e materiais para uso no tratamento ou profilaxia de doenças, por exemplo, distúrbios cognitivos, usando diaminofenotiazinas. Em particular, libera para tratamentos tendo propriedades farmacocinéticas otimizadas, e formas de dosagem são pretendidas para melhorar os benefícios de CNS ou cognitivos relacionados das diaminofenotiazinas, por exemplo, em comparação aos efeitos hematológicos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"COMPOSTOS DIAMINOFENOTIAZINAS, PRODUTO DE FÁRMACO E COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO OS MESMOS, BEM COMO USOS DOS REFERIDOS COMPOSTOS"**.

5 Campo Técnico

A presente invenção refere-se geralmente aos métodos e materiais para uso no tratamento ou profilaxia de doenças, por exemplo, distúrbios cognitivos, usando diaminofenotiazinas. Em particular refere-se aos tratamentos tendo propriedades farmacocinéticas otimizadas.

10 Técnica Antecedente

Os compostos de 3,7-diaminofenotiazina (DAPTZ) foram previamente mostrados inibir a agregação de proteína tau e romper a estrutura de PHFs, e reverter a estabilidade proteolítica do núcleo de PHF (veja, WO96/30766, F Hoffman-La Roche). Tais compostos foram descritos para uso no tratamento e profilaxia de várias doenças, incluindo doença AD e dos corpúsculos de Lewy, e incluiu cloreto de metiltionínio ("MTC").

WO96/30766 descreve, no caso de administração oral, uma dosagem diária de cerca de 50 mg a cerca de 700 mg, preferivelmente cerca de 150 mg a cerca de 300 mg, dividida em preferivelmente 1-3 doses de unidade.

20 Outras descrições de fenotiazinas na área de distúrbios neurodegenerativos incluem WO 02/075318, WO 2005/030676.

Descobriu-se na técnica que os compostos de DAPTZ podem ocorrer em uma forma carregada (oxidada) e uma forma não-carregada (reduzida ou "leuko"). Descobriu-se também que a absorção desses é diferenciada. Adicionalmente, descobriu-se que tais compostos puderam em princípio ter efeitos metabólicos hematológicos adversos e outros efeitos colaterais em certas doses.

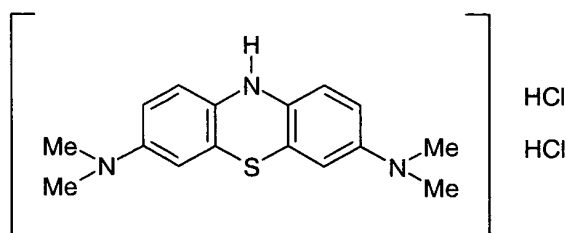
25 WO 02/055720 (The University Court of the University of Aberdeen) descreve o uso de formas reduzidas de diaminofenotiazinas especificamente para o tratamento de uma variedade de doenças de agregação de proteína, embora a descrição seja principalmente com respeito às tauopatias. WO 02/055720 descreve um modelo de farmacocinético preliminar com base nos conjuntos de estudo de dados de excreção urinária em seres

humanos, cães e ratos por DiSanto e Wagner, J Pharm Sci 1972, 61:1086-1090 e 1972, 61:1090-1094 e Moody e outros, Biol Psych 1989, 26: 847-858. Também note que a única forma de azul de metileno que cruza a barreira hematoencefálica após administração iv está na forma reduzida. Com base na atividade *in vitro* para as formas reduzidas de diaminofenotiazinas nelas, uma dosagem diária sugerida foi 3,2-3,5 mg/kg, e dosagens de 20 mg tds, 50 mg tds ou 100 mg tds, combinadas com relação de 2x mg de ácido ascórbico de uma tal maneira para obter mais do que 90% de redução antes da ingestão, foram também descritas.

10 Entretanto, WO 02/055720 não forneceu um modelo que integrasse os dados de nível sanguíneo Tal como aqueles descritos por Peter e outros. (2000) Eur J Clin Pharmacol 56: 247-250 ou forneceu um modelo validado por dados de experiência clínica. Na verdade, como descrito abaixo, os dados de Peter e outros contradisseram os dados anteriores de Di-
15 Santo e Wagner com respeito à meia-vida de eliminação de terminal.

May e outros. (Am J Physiol Cell Physiol, 2004, Vol. 286, pp. C1390-C1398) mostraram que eritrócitos humanos sequencialmente reduzem e absorvem MTC, isto é que MTC propriamente dito não é absorvido pelas células porém de preferência é a forma reduzida de MTC que cruza a membrana celular. Eles também mostraram que a taxa de absorção é dependente de enzima; e que ambos MTC e MTC reduzido estão concentrados nas células (MTC reduzido se re-equilibra uma vez que dentro das células para formar MTC).

No entanto, a otimização de uma dose terapêutica apropriada dos compostos de DAPTZ tal como MTC, e sua formulação, em particular para otimizar a atividade desejada e minimizar os efeitos colaterais adversos são problemas complexos. Uma barreira principal para isto é a falta de um modelo farmacocinético adequado. Desse modo, pode ser observado que a provisão de um tal modelo, e portanto o ensinamento sobre o tratamento de um ou mais destes problemas, forneceriam uma contribuição para a técnica.
30 O pedido depositado, não publicado PCT/GB2007/001103 descreve os compostos incluindo:



Esses compostos podem ser considerados serem uma forma reduzida estabilizada em comparação com, por exemplo, MTC.

PCT/GB2007/001103 descreve unidades de dosagens que compreendem 20 a 300 mg dos compostos de DAPTZ descritos aqui, por exemplo, 30 a 200 mg, por exemplo, 30 mg, 60 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg. Uma dose adequada do composto de DAPTZ é sugerida na faixa de cerca de 100 ng a cerca de 25 mg (mais tipicamente cerca de 1 µg a cerca de 10 mg) por quilograma de peso corporal do paciente por dia, por exemplo, 100 mg, 3 vezes diariamente, 150 mg, duas vezes diariamente, 200 mg, duas vezes diariamente.

Descrição da Invenção

O Cloreto de metiltionínio ("MTC") é o ingrediente ativo de uma preparação terapêutica proprietária (designada "rember[®]") sendo desenvolvida para o tratamento de AD e demências relacionadas. Uma experiência clínica foi conduzida na qual a eficácia terapêutica foi demonstrada durante 50 semanas de tratamento em AD brando e moderado.

Ao utilizar os resultados desta experiência, os presentes inventores desenvolveram um modelo farmacocinético integrado completamente novo aplicável à dosagem oral humana do compostos de DAPTZ incluindo, porém não-limitada a, MTC. O modelo tem implicações principais para definir os parâmetros que determinam a dosagem oral ideal em termos de segurança e eficácia, e envolve novas modalidades de tratamento para o tratamento de distúrbios cognitivos. O novo modelo é mostrado ser preciso pelo fato de que prediz a excreção urinária, e corretamente prediz cinéticos do comportamento de tecido cerebral verificado pelo estudo em porco.

Brevemente, a experiência clínica mostrou que MTC tem duas ações farmacológicas sistêmicas: efeitos cognitivos e efeitos hematológicos,

porém que inesperadamente essas ações são separáveis. Especificamente os efeitos não mostram uma relação de dose-resposta monotônica, ao mesmo tempo em que os efeitos hematológicos mostram. Os inventores propõem que duas espécies distintas são responsáveis pelos dois tipos de atividade farmacológica: MTC absorvido como a forma Leuco-MT descarregada sendo responsável pela atividade cognitiva benéfica, e MTC absorvido como uma espécie dimérica oxidada sendo responsável pela oxidação de hemoglobina. Uma vez que esses efeitos são mecanisticamente distintos, eles podem ser separadamente manipulados tal como para maximizar a bio-disponibilidade das espécies terapeuticamente ativas (cognitivamente eficaz).

Desse modo essas descobertas têm profundas implicações com a dosagem de ambos compostos oxidados e de leuco- DAPTZ, em cada caso tal como para maximizar a atividade terapêutica e, portanto reduzir os efeitos colaterais por otimização do regime de dosagem e formulação relevante para o agente em questão.

Compostos de DAPTZ Oxidados – formas de dissolução rápida

Como pode ser visto a partir da Figura 31A, há uma perda de etapa de eficácia predita quando o percentual observado de dissolução de cápsula em 30 minutos cai para abaixo de 20%. Isto confirma que a dissolução rápida é crítica para atividade terapêutica e pode ser explicada pelo papel crítico do estômago na absorção da porção de Metiltionínio (MT) em sua forma terapeuticamente ativa.

Especificamente, de acordo com a hipótese de dissolução retardada, uma forma muito distinta de MT é responsável pelos efeitos colaterais hematológicos. Esta foi postulada ser um dímero, a formação do qual é favorecida nas condições alcalinas do intestino delgado e intestino inferior. Portanto, os efeitos colaterais hematológicos observados na experiência clínica foram uma consequência específica da formulação de cápsula de gelatina usada no estudo (e em particular sua taxa de dissolução – veja Figura 7) em vez de uma característica inerente da porção de MT propriamente dita, se observado através do estômago.

Portanto, no projeto de uma formulação melhorada de MTC ou outros compostos de DAPTZ, a obtenção da eficácia predita é criticamente determinada pelo requerimento da dissolução do produto medicinal investigacional (isto é comprimido ou cápsula) ser maior do que 50% em 30 minutos em condições padrão.

Desse modo, em um aspecto é descrito um método de tratamento de um distúrbio cognitivo ou de CNS em um paciente, onde o referido distúrbio é um que é susceptível ao tratamento por um composto de DAPTZ, cujo método compreende oralmente administrar ao referido paciente uma unidade de dosagem contendo o referido composto de DAPTZ na forma oxidada como ingrediente ativo,

onde a referida unidade de dosagem libera pelo menos 50% do referido ingrediente ativo dentro de 30 minutos sob condições padrão.

O tratamento do distúrbio cognitivo ou de CNS será tal como para maximizar o benefício cognitivo ou de CNS relativo vs. efeitos hematológicos do composto de DAPTZ (veja, por exemplo, Figura 7).

A dissolução da cápsula é determinada pela quantidade de DAPTZ liberado na fase aquosa do fluido gástrico simulado (SGF) sob condições de dissolução de Farmacopeia US/EU padrão. Isto é descrito no Exemplo 11.

As unidades de dosagem desta forma portanto maximizarão a absorção no estômago, e mais criticamente minimizarão a formação de dímeros o que é favorecido nas condições alcalinas do intestino delgado e intestino inferior.

Preferivelmente maior do que 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 60% ou 50% serão absorvidos pelo estômago em menos do que 30 minutos. As formulações e veículos de liberação adequados para esta dissolução rápida são descritos em maiores detalhes abaixo.

A quantidade de DAPTZ oxidado na forma de dosagem será uma quantidade terapeuticamente eficaz. Entretanto com base na descrição desta, pode ser visto que doses elevadas (onde a dissolução é retardada) levarão a absorção somente limitada da dose nominal no estômago através

do mecanismo de reductase levando a absorção retardada indesejável do intestino delgado em pH mais elevado através da formação de dímeros.

Desse modo preferivelmente a unidade de dosagem compreende menos do que 120 mg, menos do que 100, menos do que 70, mais preferivelmente de 40-70 mg (por exemplo 40, 45, 50, 55, 60, 65, ou 70) e é administrada 3/dias ou 4/dias (veja, por exemplo, Figuras 29 & 30 & 32 & 36).

Compostos de DAPTZ Oxidado – formas de retenção gástrica

Desse modo em um aspecto é descrito um método de tratamento de um distúrbio cognitivo ou de CNS em um paciente, onde o referido distúrbio é um que é susceptível ao tratamento por um composto de DAPTZ, cujo método compreende oralmente administrar ao referido paciente uma unidade de dosagem contendo o referido composto de DAPTZ na forma oxidada como ingrediente ativo, onde a referida unidade de dosagem é gastrorretida.

O tratamento do distúrbio cognitivo ou de CNS será tal como para maximizar o benefício de CNS ou cognitivo relativo vs. efeitos hematológicos do composto de DAPTZ (veja, por exemplo, Figura 7).

Uma forma gastrorretida preferivelmente será mantida no estômago durante pelo menos 30 minutos, mais preferivelmente pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 horas ou mais.

As formulações e veículos de liberação adequados para gastrorretenção são descritos em maiores detalhes abaixo.

A quantidade de DAPTZ oxidado na forma de dosagem gastrorretida será uma quantidade terapeuticamente eficaz. Ao minimizar o trânsito para o intestino delgado (e, portanto a formação de dímeros terapeuticamente inativos) carregamentos mais elevados de DAPTZ oxidado são possíveis. Desse modo preferivelmente a unidade de dosagem compreende pelo menos 50, 60, 70, 80, 90 ou 100 mg, ou mais, por exemplo, 200, 300, 400, 500 mg.

Compostos de DAPTZ Reduzidos

As relações descritas aqui têm implicações com respeito à abor-

dagem convencional para obter o uso de um regime de dosagem mais conveniente, isto é, 2/dias ou 1/dia. Esses regimes de dosagem são, em princípio, mais desejáveis em pacientes com demência, os quais teor esquecimento e, portanto, necessitam de estímulo para tomar a medicação. A abordagem convencional para obter um regime de dosagem mais conveniente é para criar uma formulação de liberação lenta. Entretanto, a presente análise indica que, ao contrário, uma formulação de liberação lenta padrão de uma forma de DAPTZ oxidado de um produto terapêutico essencialmente eliminaria a eficácia, como ilustrado convenientemente pelas propriedades da cápsula de 100 mg em TRx-014-001 nos Exemplos a seguir.

Desse modo, pelas razões descritas acima, não seria possível gerar uma formulação de liberação prolongada de um produto medicinal com base em DAPTZ oxidado. Entretanto, este não seria o caso para produtos de fármaco onde o composto de DAPTZ está na forma reduzida. Isto é por que as formas leuco de tais compostos não podem dimerizar, uma vez que elas não são moléculas "planas", não têm a carga que permite a estabilização da forma dimérica por neutralização de carga.

Desse modo em um aspecto adicional é descrito um método de tratamento de um distúrbio cognitivo ou de CNS em um paciente, onde o referido distúrbio é um que é susceptível ao tratamento por um composto de DAPTZ, cujo método compreende oralmente administrar ao referido paciente uma unidade de dosagem contendo o referido composto de DAPTZ na forma reduzida cristalina estável como ingrediente ativo.

Como descrito abaixo preferivelmente o composto é tal como para tratar o distúrbio cognitivo ou de CNS e para maximizar o benefício de CNS ou cognitivo relativos vs. efeitos hematológicos do composto de DAPTZ.

Em particular, com base no ensinamento desta, a perda devido a não absorção inicial do estômago seria grandemente reduzida uma vez que as formas cristalinas estavelmente reduzidas têm maior solubilidade do que os equivalentes oxidados e não requereriam a atividade da redutase de pigmento de tiazina (May e outros., 2004) que é presumida existir no estômago

e é presumida ser necessária para a absorção (veja, absorção predita na Figura 33).

É, portanto, suposto que a eficácia substancialmente mais elevada e regime de dosagem superior poderiam ser obtidos usando a forma L-MTx da porção de metiltionínio. A quantidade de DAPTZ reduzido na forma de dosagem será uma quantidade terapeuticamente eficaz.

Em particular a formulação de liberação prolongada (por exemplo, 1/dia) do composto de DAPTZ reduzido entre 100-1000 mg, em princípio, não levaria às consequências adversas de absorção retardada (veja, Figura 38). Desse modo, levando em consideração a descrição desta, as dosagens até 1000mg ou mais (por exemplo, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ou 1000 mg) dadas 1/dia ou mais podem ser consideradas.

Preferivelmente esta é uma formulação de liberação lenta ou demorada isto é liberação de menos do que <50% em 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas.

Como pode ser visto a partir das Figuras 34 & 35, é predito que um nível de eficácia de -8,1 ADAS-cog unidades pode ser obtido em um regime de dosagem de 100 mg do DAPTZ reduzido (descrito como "forma L-MTx") administrado duas vezes diariamente. Isto pode ser também obtido dosando-se com 60mg 3 vezes por dia. Os níveis de eficácia ainda mais elevados seriam esperados usando 100 mg ou mais elevado administrados 3 vezes por dia.

Os compostos de DAPTZ reduzidos preferidos da presente invenção podem convenientemente ser descritos como estando em uma "forma reduzida cristalina estabilizada" e são descritos no pedido depositado, não publicado PCT/GB2007/001103. Será apreciado, entretanto, que mesmo esses compostos podem se auto-oxidar de certa forma para produzir as formas oxidadas correspondentes. Desse modo, é provável, se não inevitável, que as composições compreendendo os compostos de DAPTZ de forma reduzida cristalina estabilizada da presente invenção contenham, como uma impureza, pelo menos alguns dos compostos oxidados correspondentes.

Nos aspectos da presente invenção que pertencem a esses

compostos de DAPTZ de forma reduzida cristalina estabilizada, esses compostos de DAPTZ oxidados podem representar não mais do que 50% em peso, por exemplo, não mais do que 40% em peso, por exemplo, não mais do que 30% em peso, preferivelmente, por exemplo, não mais do que 20% em peso, por exemplo, não mais do que 10% em peso, por exemplo, não mais do que 5% em peso, por exemplo, não mais do que 3% em peso, por exemplo, não mais do que 2% em peso, por exemplo, não mais do que 1% em peso do conteúdo de DAPTZ total da forma de dosagem.

Tratamento

10 O termo "tratamento", como usado aqui no contexto de tratar uma condição, pretence geralmente ao tratamento e terapia de um ser humano, nos quais algum efeito terapêutico desejado é obtido, por exemplo, a inibição do progresso da condição, e inclui uma redução na taxa de progresso, uma parada na taxa de progresso, regressão da condição, melhora da
15 condição, e cura da condição.

A presente invenção também inclui medidas profiláticas (isto é, profilaxia, prevenção).

O termo "quantidade terapeuticamente eficaz", como usado aqui, pertence àquela quantidade de um composto ativo, ou um material, composição ou forma de dosagem compreendendo um composto ativo, que é eficaz para produzir algum efeito terapêutico desejado, comensurar com uma
20 relação de risco/benefício razoável, quando administrado de acordo com um regime de tratamento desejado.

Similarmente, o termo "quantidade profilaticamente eficaz", como usado aqui, pertence àquela quantidade de um composto ativo, ou um material, composição ou forma de dosagem compreendendo um composto ativo, que é eficaz para produzir algum efeito profilático desejado, comensurado com uma relação de risco/benefício razoável, quando administrado de acordo com um regime de tratamento desejado.

30 O termo "tratamento" inclui tratamentos e terapias de combinação, nos quais dois ou mais tratamentos ou terapias são combinados, por exemplo, sequencial ou simultaneamente. Os tratamentos de combinação

são descritos em maiores detalhes a seguir.

Distúrbios cognitivos ou de CNS

Os distúrbios cognitivos ou de CNS preferidos são descritos abaixo. Outros distúrbios neurodegenerativos são descritos nos Exemplos a
5 seguir.

O distúrbio cognitivo pode ser uma condição de tauopatia em um paciente (veja, por exemplo, WO96/30766). Como também, doença de Alzheimer (AD), a patogênese de distúrbios neurodegenerativos tais como
10 doença de Pick e Paralisia supranuclear progressiva (PSP) parece se correlacionar com um acúmulo de agregados tau truncados patológicos no giro denteado e células piramidais estreladas do neocortex, respectivamente. Outras demências incluem demência fronto-temporal (FTD); parkinsonismo ligado ao cromossoma 17 (FTDP-17); complexo de desinibição-demência-parkinsonismo-amiotrofia (DDPAC); degeneração pálido-ponto-negro
15 (PPND); Síndrome de Guam-ALS; degeneração pálido-negra-luysian (PNLD); degeneração córtico-basal (CBD) e outros (veja, Wischik e outros. 2000, loc. cit, para descrição detalhada – especialmente Tabela 5.1). Todas essas doenças, que são caracterizadas principalmente ou parcialmente por agregação de tau anormal, são referidas aqui como "tauopatias".

20 Neste e em todos os outros aspectos da invenção referindo-se às tauopatias, preferivelmente a tauopatia é selecionada da lista que consiste nas indicações acima, isto é, AD, doença de Pick, PSP, FTD, FTDP-17, DDPAC, PPND, síndrome de Guam-ALS, PNLD, e CBD.

25 Em uma modalidade preferida a tauopatia é doença de Alzheimer (AD).

Onde a doença é qualquer tauopatia, o método de tratamento da tauopatia pode ser tal que o composto de DAPTZ cause a inibição da agregação da proteína tau associada com o referido estado de doença e também a dissolução dos agregados de tau no cérebro do paciente ou indivíduo.
30 Como descrito nos Exemplos abaixo, os presentes inventores mostraram que a dissolução de tais agregados é o efeito principal na abertura de uma série de reações de depuração (veja, por exemplo, as Figuras 6A e 6B).

Em uma modalidade, o distúrbio cognitivo pode ser o comprometimento cognitivo brando (MCI), por exemplo, MCI amnésico. O pedido provisional US depositado 60/945.006 (aqui especificamente incorporado por referência) descreve o uso dos compostos de DAPTZ para MCI. Ao mesmo tempo em que há ainda uma descrição na literatura como para a natureza do conceito de MCI (veja, Gauthier e outros., Lancet, 2006; 367: 1262-1270; Petersen RC e outros. Neuropathological features of amnesic mild cognitive impairment. Arch Neurol 2006; 63: 665-672). MCI é reconhecido como um alvo de doença válido pelo FDA. Ele é definido por ter um grau menor de prejuízo cognitivo não ainda atendendo aos critérios clínicos para uma diagnose de demência.

Em uma modalidade, o distúrbio de CNS pode ser uma sinucleinopatia tal como doença de Parkinson (PD).

O pedido PCT depositado anterior PCT/GB2007/001105 (aqui especificamente incorporado por referência) descreve o uso dos compostos de DAPTZ para o tratamento de PD e outras sinucleinopatias.

As sinucleinopatias atualmente consistem nos seguintes distúrbios: PD, demência com corpos de Lewy (DLB), atrofia de múltiplos sistemas (MSA), parkinsonismo induzido por fármaco (por exemplo, produzido por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina [MPTP] ou pesticidas tais como rotenona), e insuficiência autônoma pura (PAF).

Grupos de Paciente

Os pacientes adequados para o método podem ser selecionados com base em fatores convencionais.

Desse modo, por exemplo, para AD a seleção inicial de um paciente pode envolver qualquer uma ou mais dentre: avaliação rigorosa pelo médico experiente; exclusão de diagnose de não AD tanto quanto possível por investigações de laboratório suplementar e outras investigações; avaliação objetiva do nível de função cognitiva usando bateria neuropatologicamente validada.

Para MCI, os critérios representativos para MCI sintomático incluem as características: A. O paciente não é nem normal nem demente; B.

Há evidência de deterioração cognitiva mostrada por declínio objetivamente medido com o passar do tempo e/ou relato subjetivo de declínio por ele próprio e/ou informante em conjunto com testes cognitivos objetivos (por exemplo, testes secundários de memória); C. Atividades de vida diária são preservadas e as funções instrumentais complexas são intactas ou minimamente prejudicadas (veja, também Winblad, B. e outros. (2004) Mild cognitive impairment – beyond controversies, towards a consensus: report of the International Working Group on mild Cognitive Impairment. J. Intern. Med. 256: 240-246). O paciente geralmente será aquele diagnosticado com MCI, porém será aquele não diagnosticado com AD (isto é, não mostrará demência). O paciente pode, por exemplo, ter mais de 45, 50, 55 anos de idade. O paciente pode ser aquele atendendo um ou todos os seguintes critérios com respeito a: (i) Estágio de Braak 3 ou menos, 2 ou menos, 1 ou menos; (ii) Escore de MMSE menor ou igual a MMSE 24,25,26,27,28 ou 29, mais preferivelmente menor do que ou igual a MMSE 24,25,26, mais preferivelmente menor do que ou igual a MMSE 24 ou 25.

Diagnose de PD é bem-conhecida por aqueles versados na técnica.

Como notado acima, os métodos da presente invenção são pretendidos tratar um distúrbio cognitivo ou de CNS em um paciente tal como para maximizar o benefício de CNS ou cognitivo relativo vs. efeitos hematológicos do composto de DAPTZ.

Em vários aspectos da invenção, o paciente pode ser aquele o qual se acredita estar em risco acima da média de um distúrbio hematológico, os efeitos do qual podem de outro modo ser exacerbados pelo composto de DAPTZ. Desse modo (sem limitação) o paciente pode ser aquele conhecido ou o qual se acredita sofrer de uma hemoglobinopatia tal como doença falciforme, Talassemia, Metemoglobinemia; uma anemia (por exemplo, uma anemia hemolítica); uma malignidade hematológica (por exemplo, linfoma, mieloma, plasmacitoma ou leucemia); uma coagulopatia tal como hemofilia; e assim por diante. O risco acima da média de tais doenças pode ser avaliado usando os critérios convencionais, por exemplo, sintomático, genético,

idade, estilo de vida, etnia (por exemplo, doença falciforme ocorre mais comumente em pessoas – ou seus descendentes – de partes do mundo tal como África Subsariana). Uma classe particular de paciente em risco de um distúrbio hematológico seria aquele com idade acima de 70 anos, o qual
5 pode ser submetido a condições anêmicas relacionadas com a idade (por exemplo, displasia mieloide).

Dosagem, formulações e veículos de liberação

Na descrição desta, o nível preciso de dosagem selecionado dependerá de uma variedade de fatores incluindo, porém não-limitados à
10 atividade do composto de DAPTZ particular, a duração do tratamento, outros fármacos, compostos, e/ou materiais usados em combinação, a severidade da condição, e as espécies, sexo, idade, peso, condição, saúde geral, história médica anterior do paciente.

O fármaco ou unidades de dosagem (por exemplo, um comprimido ou cápsula farmacêutica) com as propriedades de carregamento, dissolução ou gastrorretenção apropriadas descritas acima podem ser fornecidas por aqueles versados na técnica com base na descrição desta usando tecnologias convencionais, e essas tecnologias convencionais *per se* não formam parte da presente invenção.
15

Por exemplo, as unidades de fármaco de dissolução rápida (para compostos de DAPTZ oxidados ou reduzidos) ou liberação lenta ou demorada, unidades de dissolução (para os compostos de DAPTZ reduzidos) podem ser fornecidas e testadas quanto à ordem de fontes comerciais, por exemplo, Encap Drug Delivery (Unidades 4, 5 & 6, Oakbank Park Way, Livingston, West Lothian, EH53 0TH, Scotland, UK); Eurand (Via Martin Luther King, 13 20060, Pessano con Bornago, Milan) e assim por diante.
20
25

As unidades de fármaco gastrorretidas são também amplamente conhecidas na literatura de patente (por exemplo, US6207197, US5972389) e literatura geral, e foram por muitos anos – veja, por exemplo, Davis, e outros, "Transit of pharmaceutical dosage forms through the small intestine", Gut, 27 (8):886-892 (1986); Fara, "Physiological limitations: gastric emptying and transit of dosage forms" in: Rate Control in Drug Therapy, L.F. Prescott,
30

e outros, Eds., Churchill Livingstone, Nova Iorque (1985); Davis, S.S. (2005) Formulation strategies for absorption windows Drug Discovery Today 10:249-257. Esta última menciona que o processo de trânsito de GI em seres humanos e suas implicações para liberação de fármaco são agora bem-entendidos. As formas de dosagem administrada a um estômago alimentado terão esvaziamento demorado. Um sistema multiparticulado, tal como um contendo microesferas ou péletes, pode se tornar misturado com a comida e, como uma consequência, geralmente esvaziará com a comida durante um período prolongado de tempo. Se as partículas administradas forem grandes, elas não serão capazes de passar pelo piloro contraído com a comida digerida, e terão que esperar até que o estômago fique vazio e no estado em jejum. Em geral, as partículas até 10 mm em tamanho podem ser esperadas esvaziar do estômago alimentado. Exatamente quando as partículas esvaziam também dependerá de sua quantidade e suas posições relativas dentro do estômago. Portanto, uma forma de dosagem maior do que 15-20 mm e administrada com comida é esperada obter gastrorretenção. Uma tal forma de dosagem então terá uma oportunidade de esvaziar após o alimento ter deixado o estômago quando o estado de jejum ocorre.

Um sistema de unidade única (ou um multiparticulado) pode esvaziar rapidamente do estômago em jejum. Exatamente quando ele esvaziará também dependerá do tempo da onda governante em relação à dosagem. O piloro aberto tem um diâmetro de 15 mm em seres humanos. Um objetivo maior do que este tamanho terá dificuldade em passar no intestino delgado no estado de jejum (ou alimentado). Com base neste conhecimento, várias abordagens foram desenvolvidas para gastrorretenção. Essas se incluem em duas classes principais: (i) partículas pequenas que têm propriedades bioadesivas (e também uma propensão a flutuar nos conteúdos do estômago); e (ii) objetos dilatados grandes que serão retidos no estômago por causa de seu tamanho. Esses sistemas de dilatação podem também ter características flutuantes, geralmente fornecidas pela geração de dióxido de carbono.

The drug delivery company Depomed descreveu os comprimidos

gastroretentivos 'que se dilatam no estômago que trata o comprimido como comida não digerida, e não deixa ele passar para dentro do intestino delgado. O comprimido é retido pelo estômago durante várias horas, onde ele pode liberar sua carga útil de fármaco tão rapidamente ou lentamente como desejado'.

(http://www.depomedinc.com/products_pipeline.htm).

Esses sistemas são com base no óxido de polietileno (PEO) em combinação com hidroxipropil metilcelulose (HPMC) para produzir um comprimido de matriz de liberação prolongada que possa dilatar. De acordo com a companhia, as moléculas candidatas incluem metformina, gabapentina ciprofloxacina e furosemida. Recente divulgação da imprensa declara que a Depomed completou experiências clínicas de Fase III com a metformina uma vez ao dia para o tratamento de diabetes Tipo II e com ciprofloxacina uma vez ao dia para o tratamento de infecções do trato urinário, e que novas aplicações de fármaco (NDA) para ambos produtos foram depositadas com o FDA. A companhia está também conduzindo uma experiência de Fase II com o diurético furosemida.

Um resumo recente descreveu um estudo cintilográfico de rotulação dual de comprimidos retentivos gástricos de furosemida de liberação controlada em voluntários saudáveis. O procedimento de rotulação dual permitiu a caracterização separada da erosão e inchaço. Os comprimidos (e um controle de liberação imediata) foram administrados após um café-da-manhã com alto teor de gordura. A permanência gástrica dos comprimidos em dilatação foi suficientemente longa para liberar o fármaco para o trato GI superior. Consequentemente, a concentração plasmática do fármaco foi prolongada e, além disso, as formulações de liberação lenta anteriores diferentes reportadas na literatura, não tiveram nenhuma redução em biodisponibilidade. A partir de um ponto de vista de aceitação pelo paciente, o comprimido gastroretentivo forneceu diurese e natriurese gradual, em vez da diurese breve e intensa de tempo inicial curto experimentada por pacientes que tomam comprimidos de furosemida de liberação imediata convencionais.

Desse modo, as formas de dosagem gastroretidas conhecidas

podem ser aplicáveis à presente invenção, e em particular para uso com as formas de DAPTZ oxidado.

Ao mesmo tempo em que é possível para o composto de diaminofenotiazínio ser usado (por exemplo, administrado) sozinho, é geralmente preferível apresentá-lo como uma composição ou formulação.

Preferivelmente o fármaco ou unidade de dosagem é fornecido como uma composição farmacêutica (por exemplo, formulação, preparação, medicamento) compreendendo o composto de DAPTZ, como descrito aqui, e um veículo, diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

Em uma modalidade, a composição é uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos um composto de diaminofenotiazínio, como descrito aqui, junto com um ou mais outros ingredientes farmacêuticamente aceitáveis bem-conhecidos por aqueles versados na técnica, incluindo, porém não-limitado a veículos, diluentes, excipientes, adjuvantes, cargas, tampões, conservantes, antioxidantes, lubrificantes, estabilizadores, solubilizadores, tensoativos (por exemplo, agentes umectantes), agentes de mascaramento, agentes de coloração, agentes flavorizantes, e agentes adoçantes farmacêuticamente aceitáveis.

Em uma modalidade, a composição também compreende outros agentes ativos, por exemplo, outros agentes terapêuticos ou profiláticos.

Os veículos, diluentes, excipientes, etc. adequados podem ser encontrados em textos farmacêuticos padrão. Veja, por exemplo, Handbook of Pharmaceutical Additives, 2^a Edição (eds. M. Ash e I. Ash), 2001 (Synopsis Information Resources, Inc., Endicott, Nova Iorque, USA), Remington's Pharmaceutical Sciences, 20^a edição, pub. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; e Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2^a edição, 1994.

O termo "farmacêuticamente aceitáveis", como usado aqui, pertence aos compostos, ingredientes, materiais, composições, formas de dosagem, etc., que são, dentro do escopo do diagnóstico médico seguro, adequados para uso em contato com os tecidos do paciente em questão (por exemplo, humano) sem toxicidade excessiva, irritação, resposta alérgica, ou outro problema ou complicação, comensurado com uma relação de ris-

co/benefício razoável. Cada veículo, diluente, excipiente, etc. deve também ser "aceitável" no sentido de ser compatível com os outros ingredientes da formulação.

5 As formulações podem ser preparadas por qualquer método bem-conhecido na técnica de farmácia. Tais métodos incluem a etapa de introduzir em associação o composto ativo com um veículo que constitua um ou mais ingredientes acessórios. Em geral, as formulações são preparadas uniformemente e intimamente introduzindo-se em associação o composto ativo com os veículos (por exemplo, veículos líquidos, veículo sólido fina-
10 mente dividido, etc.), e em seguida moldando o produto, se necessário.

Como notado acima, a formulação pode ser preparada para fornecer liberação rápida ou lenta; liberação imediata, demorada, com o tempo ou prolongada; ou uma combinação dos mesmos.

Terapias de Combinação

15 Os tratamentos e terapias de combinação, nos quais dois ou mais tratamentos ou terapias são combinados, por exemplo, sequencialmente ou simultaneamente, são descritos em maiores detalhes a seguir. Desse modo, será entendido que quaisquer dos usos ou métodos médicos descritos aqui podem ser usados em uma terapia de combinação, por exem-
20 plo, outro tratamento para AD, MCI, ou PD respectivamente. Por exemplo, um tratamento da invenção para AD (por exemplo, empregando um composto da invenção) está em combinação com um inibidor de colinesterase tal como Donepezil (Aricept[®]), Rivastigmine (Exelon[®]) ou Galantamine (Reminyl[®]).

25 Em uma modalidade, um tratamento da invenção (por exemplo, empregando um composto da invenção) está em combinação com um antagonista de receptor de NMDA tal como Memantina (Ebixa[®], Namenda[®]).

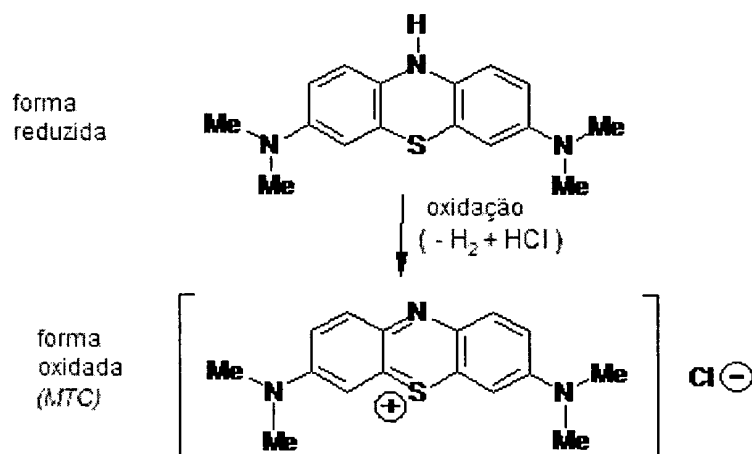
30 Em uma modalidade, um tratamento da invenção (por exemplo, empregando um composto da invenção) está em combinação com um antagonista de receptor muscarínico.

Em uma modalidade, um tratamento da invenção (por exemplo, empregando um composto da invenção) está em combinação com um inibi-

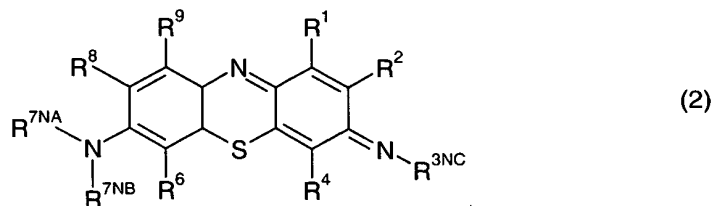
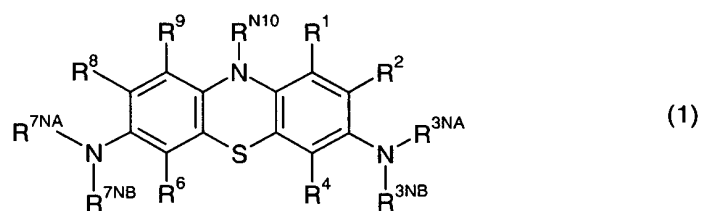
dor de proteína precursora amiloide a beta-amiloide (por exemplo, um inibidor de processamento de proteína precursora amiloide que leva à geração realçada de beta-amiloide).

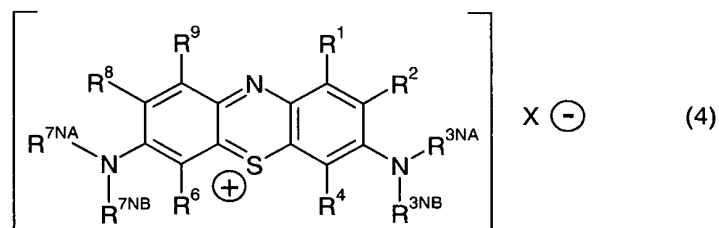
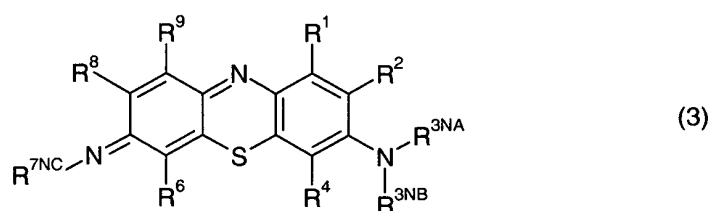
Exemplo dos Compostos de DAPTZ

- 5 A relação entre compostos de DAPTZ oxidados e reduzidos pode ser convenientemente ilustrada usando MTC, um sal de fenotiazín-5-io. Isto pode convenientemente ser considerado ser uma "forma oxidada" quando considerado com respeito ao composto de 10H-fenotiazina correspondente, N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diamina, que pode convenientemente ser considerado ser uma "forma reduzida":



- Este aspecto da invenção pertence a certos compostos de diaminofenotiazina e análogos dos mesmos, tendo uma das seguintes fórmulas, e sais, hidratos, e solvatos dos mesmos farmacologicamente aceitáveis (coletivamente referido aqui como "compostos de diaminofenotiazina" ou "diaminofenotiazina"):





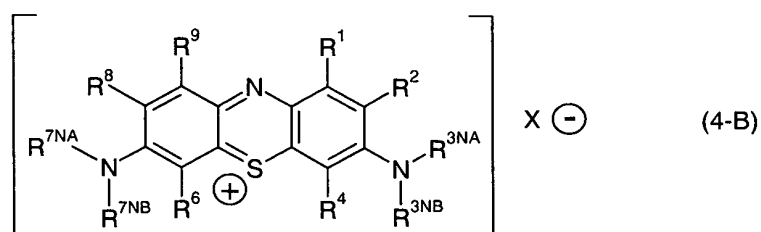
A fórmula (1) descreve compostos em uma forma reduzida, ao passo que cada das fórmulas (2), (3), e (4) descreve os compostos em uma forma oxidada.

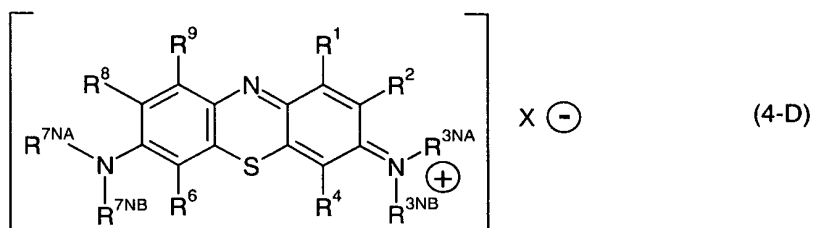
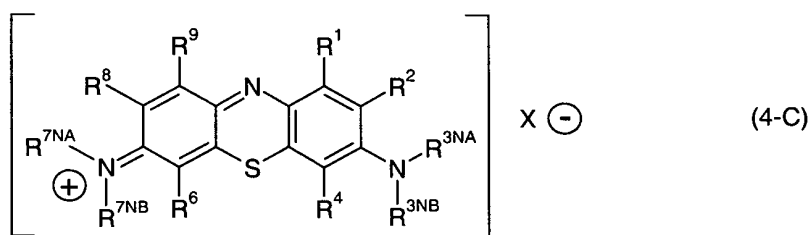
5 Em uma modalidade, os compostos são selecionados dos compostos da fórmula (1), e sais, hidratos, e solvatos farmacologicamente aceitáveis dos mesmos.

Em uma modalidade, os compostos são selecionados de compostos da fórmula (2) ou (3), e sais, hidratos, e solvatos dos mesmos farmacologicamente aceitáveis.

10 Em uma modalidade, os compostos são selecionados de compostos da fórmula (4), e sais, hidratos, e solvatos dos mesmos farmacologicamente aceitáveis.

15 Cada uma dentre as estruturas acima é somente uma de muitas estruturas de ressonância equivalente, e todas das quais são pretendidas serem abrangidas por aquela estrutura representativa. Por exemplo, a estrutura (4) é somente uma de muitas estruturas de ressonância equivalentes, algumas das quais são mostradas abaixo, e todas das quais são pretendidas serem abrangidas pela estrutura (4):





Substituintes de Átomo de Anel de Carbono

Em cada um dentre as fórmulas acima, cada um dentre R^1 , R^2 , R^4 , R^6 , R^8 , e R^9 é independentemente selecionado de:

- H;
- 5 -F; -Cl; -Br; -I;
- OH; -OR;
- SH; -SR;
- NO₂;
- C(=O)R;
- 10 -C(=O)OH; -C(=O)OR;
- C(=O)NH₂; -C(=O)NHR; -C(=O)NR₂; -C(=O)NR^{N1}R^{N2};
- NH₂; -NHR; -NR₂; -NR^{N1}R^{N2};
- NHC(=O)H; -NRC(=O)H; -NHC(=O)R; -NRC(=O)R;
- R;
- 15 em que cada R é independentemente selecionado de:
 - C₁₋₆alquila alifática não-substituída; C₁₋₆alquila alifática substituída;
 - C₂₋₆alquenila alifática não-substituída; C₂₋₆alquenila alifática substituída;
 - C₃₋₆cicloalquila não-substituída; C₃₋₆cicloalquila substituída;
 - C₆₋₁₀carboarila não-substituída; C₆₋₁₀carboarila substituída;
- 20 C₅₋₁₀heteroarila não-substituída; C₅₋₁₀heteroarila substituída;
- C₆₋₁₀carboarila-C₁₋₄alquila não-substituída; C₆₋₁₀carboarila-C₁₋₄alquila substituída;

em que, em cada grupo $-NR^{N1}R^{N2}$, independentemente, R^{N1} e R^{N2} empregados juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles estão ligados formam um anel tendo de 3 a 7 átomos de anel.

Os exemplos de grupos $-NR^{N1}R^{N2}$, em que R^{N1} e R^{N2} empregados juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles estão ligados formam um anel tendo de 3 a 7 átomos de anel, incluem: pirrolidino, piperidino, piperazino, morfolino, pirrolila, e formas substituídas, tais como formas N-substituídas, tal como N-metil piperazino.

Em uma modalidade, cada um dentre R^1 , R^2 , R^4 , R^6 , R^8 , e R^9 é independentemente selecionado de:

- H;
- F; -Cl; -Br; -I;
- OH; -OR;
- C(=O)OH; -C(=O)OR;
- R.

Em uma modalidade, cada um dentre R^1 , R^2 , R^4 , R^6 , R^8 , e R^9 é independentemente selecionado de:

- H;
- R.

Em uma modalidade, cada R é independentemente selecionado de:

- C_{1-6} alquila alifática não-substituída; C_{1-6} alquila alifática substituída;
- C_{2-6} alquenila alifática não-substituída; C_{2-6} alquenila alifática substituída;
- C_{3-6} cicloalquila não-substituída; C_{3-6} cicloalquila substituída.

Em uma modalidade, cada R é independentemente selecionado de:

- C_{1-6} alquila alifática não-substituída; C_{1-6} alquila alifática substituída.

Em uma modalidade, cada R é independentemente selecionado de: -Me, -Et, -nPr, e -iPr.

Em uma modalidade, cada R é independentemente selecionado de: -Me e -Et.

Em uma modalidade, o grupo C_{1-6} alquila é um grupo C_{1-4} alquila.

Em uma modalidade, o grupo C_{2-6} alquenila é um grupo C_{2-4} alquenila.

Em uma modalidade, o grupo C_{3-6} cicloalquila é um grupo C_{3-4} cicloalquila.

5 Os exemplos de grupos C_{1-6} alquila alifática não-substituída incluem: metila, etila, n-propila, iso-propila, n-butila, iso-butila, sec-butila, terc-butila, n-pentila, iso-pentila, tert-pentila, neo-pentila, hexila, iso-hexila, etc.

Os exemplos de grupos C_{2-6} alquenila alifática não-substituída incluem: propen-1-ila, propen-2-ila, buten-1-ila, buten-2-ila, buten-3-ila, etc.

10 Os exemplos de grupos C_{3-6} cicloalquila não-substituída incluem: ciclopropila, ciclopropil-metila, ciclobutila, ciclopentila, ciclo-hexila, etc.

Em uma modalidade, o grupo C_{6-10} carboarila é um grupo C_6 carboarila.

15 Em uma modalidade, o grupo C_{5-10} heteroarila é um grupo C_{5-6} heteroarila.

Em uma modalidade, o grupo C_{6-10} carboarila- C_{1-4} alquila é um grupo C_6 carboarila- C_{1-2} alquila.

Os exemplos de grupos C_{6-10} carboarila não-substituída incluem: fenila, naftila.

20 Os exemplos de grupos C_{5-10} heteroarila não-substituída incluem: pirrolila, tienila, furila, imidazolila, oxazolila, isoxazolila, tiazolila, isotiazolila, pirazolila, piridila, pirazinila, pirimidinila, piridazinila.

Os exemplos de grupos C_{6-10} carboarila- C_{1-4} alquila não-substituída incluem: benzila, feniletila.

25 Em uma modalidade, os substituintes opcionais (por exemplo, em C_{1-6} alquila alifática, C_{1-6} alquenila alifática, C_{3-6} cicloalquila, C_{6-10} carboarila, C_{5-10} heteroarila, C_{6-10} carboarila- C_{1-4} alquila) são independentemente selecionados de:

-F; -Cl; -Br; -I;
30 -OH; -OR';
-SH; -SR';
-NO₂;

- C(=O)R';
 -C(=O)OH; -C(=O)OR';
 -C(=O)NH₂; -C(=O)NHR'; -C(=O)NR'₂; -C(=O)NR'^{N1}R'^{N2};
 -NH₂; -NHR'; -NR'₂; -NR'^{N1}R'^{N2};
 5 -NHC(=O)H; -N'RC(=O)H; -NHC(=O)'R; -N'RC(=O)'R;
 -R';

em que cada R' é independentemente selecionado de:

- C₁₋₆alquila alifática não-substituída; C₁₋₆alquila alifática substituída;
 C₂₋₆alquenila alifática não-substituída; C₂₋₆alquenila alifática substituída;
 10 C₃₋₆cicloalquila não-substituída; C₃₋₆cicloalquila substituída;
 C₆₋₁₀carboarila não-substituída; C₆₋₁₀carboarila substituída;
 C₅₋₁₀heteroarila não-substituída; C₅₋₁₀heteroarila substituída;
 C₆₋₁₀carboarila-C₁₋₄alquila não-substituída; C₆₋₁₀carboarila-C₁₋₄alquila substituída;
 15 em que, em cada grupo -NR'^{N1}R'^{N2}, independentemente, R'^{N1} e R'^{N2} empregados juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles estão ligados formam um anel tendo de 3 a 7 átomos de anel.

- Em uma modalidade, os substituintes opcionais (por exemplo, uma C₁₋₆alquila alifática, C₁₋₆alquenila alifática, C₃₋₆cicloalquila, C₆₋₁₀carboarila, C₅₋₁₀heteroarila, C₆₋₁₀carboarila-C₁₋₄alquila) são independentemente selecionados de:

- F; -Cl; -Br; -I;
 -OH; -OR;
 -C(=O)OH; -C(=O)OR';
 25 -R'.

Em uma modalidade, os substituintes opcionais (por exemplo, uma C₁₋₆alquila alifática, C₁₋₆alquenila alifática, C₃₋₆cicloalquila, C₆₋₁₀carboarila, C₅₋₁₀heteroarila, C₆₋₁₀carboarila-C₁₋₄alquila) são como definido acima, exceto que cada R' é independentemente selecionado de:

- 30 C₁₋₆alquila alifática não-substituída;
 C₂₋₆alquenila alifática não-substituída;
 C₃₋₆cicloalquila não-substituída;

C₆₋₁₀carboarila não-substituída;

C₅₋₁₀heteroarila não-substituída;

C₆₋₁₀carboarila-C₁₋₄alquila não-substituída.

- 5 Em uma modalidade, os substituintes opcionais (por exemplo, em C₁₋₆alquila alifática, C₁₋₆alquenila alifática, C₃₋₆cicloalquila, C₆₋₁₀carboarila, C₅₋₁₀heteroarila, C₆₋₁₀carboarila-C₁₋₄alquila) são como definidos acima, exceto que cada R' é independentemente selecionado de:

C₁₋₆alquila alifática não-substituída;

C₂₋₆alquenila alifática não-substituída;

- 10 C₃₋₆cicloalquila não-substituída.

Em uma modalidade, os substituintes opcionais (por exemplo, em C₁₋₆alquila alifática, C₁₋₆alquenila alifática, C₃₋₆cicloalquila, C₆₋₁₀carboarila, C₅₋₁₀heteroarila, C₆₋₁₀carboarila-C₁₋₄alquila) são como definidos acima, exceto que cada R' é independentemente selecionado de:

- 15 C₁₋₆alquila alifática não-substituída; C₁₋₆alquila alifática substituída.

Em uma modalidade, os substituintes opcionais (por exemplo, em C₁₋₆alquila alifática, C₁₋₆alquenila alifática, C₃₋₆cicloalquila, C₆₋₁₀carboarila, C₅₋₁₀heteroarila, C₆₋₁₀carboarila-C₁₋₄alquila) são como definidos acima, exceto que cada R' é independentemente selecionado de: -Me, -Et, -nPr, e -iPr.

- 20 Em uma modalidade, os substituintes opcionais (por exemplo, em C₁₋₆alquila alifática, C₁₋₆alquenila alifática, C₃₋₆cicloalquila, C₆₋₁₀carboarila, C₅₋₁₀heteroarila, C₆₋₁₀carboarila-C₁₋₄alquila) são como definidos acima, exceto que cada R' é independentemente selecionado de: -Me e -Et.

- 25 Em uma modalidade, cada um dentre R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸, e R⁹ é independentemente selecionado de: -H, -Me, -Et, -nPr, e -iPr.

Em uma modalidade, cada um dentre R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸, e R⁹ é independentemente selecionado de: -H, -Me, e -Et.

Em uma modalidade, cada um dentre R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸, e R⁹ é independentemente selecionado de: -H e -Me.

- 30 Em uma modalidade, todos exceto quatro dentre R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸, e R⁹ é -H.

Em uma modalidade, todos exceto dois dentre R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸,

e R^9 é -H.

Em uma modalidade, todos exceto um dentre $R^1, R^2, R^4, R^6, R^8,$
e R^9 é -H.

Em uma modalidade, cada dentre $R^1, R^2, R^4, R^6, R^8,$ e R^9 é -H.

5 Grupos Amino

Em cada uma dentre as fórmulas acima, em cada grupo
- $NR^{3NA}R^{3NB}$, se presente, cada um dentre R^{3NA} e R^{3NB} é independentemente
-H ou como definido acima para R; ou R^{3NA} e R^{3NB} empregados juntamente
com o átomo de nitrogênio ao qual eles estão ligados formam um anel tendo
10 de 3 a 7 átomos de anel.

Por exemplo, em uma modalidade, em cada grupo - $NR^{3NA}R^{3NB}$,
se presente, cada um dentre R^{3NA} e R^{3NB} é independentemente como defini-
do acima para R; ou R^{3NA} e R^{3NB} empregados juntamente com o átomo de
nitrogênio ao qual eles estão ligados formam um anel tendo de 3 a 7 átomos
15 de anel.

Por exemplo, em uma modalidade, em cada grupo - $NR^{3NA}R^{3NB}$,
se presente, cada um dentre R^{3NA} e R^{3NB} é independentemente selecionado
de:

-H;

20 C_{1-6} alquila alifática não-substituída; C_{1-6} alquila alifática substituída;
 C_{2-6} alquenila alifática não-substituída; C_{2-6} alquenila alifática substituída;
 C_{3-6} cicloalquila não-substituída; C_{3-6} cicloalquila substituída;
 C_{6-10} carboarila não-substituída; C_{6-10} carboarila substituída;
 C_{5-10} heteroarila não-substituída; C_{5-10} heteroarila substituída;
25 C_{6-10} carboarila- C_{1-4} alquila não-substituída; C_{6-10} carboarila- C_{1-4} alquila substi-
tuída;
ou R^{3NA} e R^{3NB} empregados juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual
eles estão ligados formam um anel tendo de 3 a 7 átomos de anel.

Por exemplo, em uma modalidade, em cada grupo - $NR^{3NA}R^{3NB}$,
30 se presente, cada um dentre R^{3NA} e R^{3NB} é independentemente selecionado
de:

C_{1-6} alquila alifática não-substituída; C_{1-6} alquila alifática substituída;

C₂₋₆alquenila alifática não-substituída; C₂₋₆alquenila alifática substituída;

C₃₋₆cicloalquila não-substituída; C₃₋₆cicloalquila substituída;

C₆₋₁₀carboarila não-substituída; C₆₋₁₀carboarila substituída;

C₅₋₁₀heteroarila não-substituída; C₅₋₁₀heteroarila substituída;

- 5 C₆₋₁₀carboarila-C₁₋₄alquila não-substituída; C₆₋₁₀carboarila-C₁₋₄alquila substituída;

ou R^{3NA} e R^{3NB} empregados juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles estão ligados formam um anel tendo de 3 a 7 átomos de anel.

- 10 Em outro exemplo, em uma modalidade, em cada grupo -NR^{3NA}R^{3NB}, se presente, cada um dentre R^{3NA} e R^{3NB} é independentemente selecionado de:

-H;

C₁₋₆alquila alifática não-substituída; C₁₋₆alquila alifática substituída;

C₂₋₆alquenila alifática não-substituída; C₂₋₆alquenila alifática substituída;

- 15 C₃₋₆cicloalquila não-substituída; C₃₋₆cicloalquila substituída;

ou R^{3NA} e R^{3NB} empregados juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles estão ligados formam um anel tendo de 3 a 7 átomos de anel.

- 20 Em outro exemplo, em uma modalidade, em cada grupo -NR^{3NA}R^{3NB}, se presente, cada um dentre R^{3NA} e R^{3NB} é independentemente selecionado de:

C₁₋₆alquila alifática não-substituída; C₁₋₆alquila alifática substituída;

C₂₋₆alquenila alifática não-substituída; C₂₋₆alquenila alifática substituída;

C₃₋₆cicloalquila não-substituída; C₃₋₆cicloalquila substituída;

- 25 ou R^{3NA} e R^{3NB} empregados juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles estão ligados formam um anel tendo de 3 a 7 átomos de anel.

Em outro exemplo, em uma modalidade, em cada grupo -NR^{3NA}R^{3NB}, se presente, cada um dentre R^{3NA} e R^{3NB} é independentemente selecionado de:

-H;

- 30 C₁₋₆alquila alifática não-substituída;

C₂₋₆alquenila alifática não-substituída;

C₃₋₆cicloalquila não-substituída;

ou R^{3NA} e R^{3NB} empregados juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles estão ligados formam um anel tendo de 3 a 7 átomos de anel.

Em outro exemplo, em uma modalidade, em cada grupo $-NR^{3NA}R^{3NB}$, se presente, cada um dentre R^{3NA} e R^{3NB} é independentemente selecionado de:

C_{1-6} alquila alifática não-substituída;

C_{2-6} alquenila alifática não-substituída;

C_{3-6} cicloalquila não-substituída;

ou R^{3NA} e R^{3NB} empregados juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles estão ligados formam um anel tendo de 3 a 7 átomos de anel.

Em outro exemplo, em uma modalidade, em cada grupo $-NR^{3NA}R^{3NB}$, se presente, cada um dentre R^{3NA} e R^{3NB} é independentemente selecionado de: -H, -Me, -Et, -nPr, e -iPr.

Em outro exemplo, em uma modalidade, em cada grupo $-NR^{3NA}R^{3NB}$, se presente, cada um dentre R^{3NA} e R^{3NB} é independentemente selecionado de: -H, -Me, e -Et (por exemplo, $-NR^{3NA}R^{3NA}$ é $-NH_2$, -NHMe, -NMe₂, -NHEt, -NEt₂, ou -NMeEt).

Em outro exemplo, em uma modalidade, em cada grupo $-NR^{3NA}R^{3NB}$, se presente, cada um dentre R^{3NA} e R^{3NB} é independentemente selecionado de: -H e -Me (por exemplo, $-NR^{3NA}R^{3NA}$ é $-NH_2$, -NHMe, ou -NMe₂).

Em analogia precisa, em cada um dentre as fórmulas acima, em cada grupo $-NR^{7NA}R^{7NB}$, se presente, cada um dentre R^{7NA} e R^{7NB} é independentemente -H ou como definido acima para R; ou R^{7NA} e R^{7NB} empregados juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles estão ligados formam um anel tendo de 3 a 7 átomos de anel.

Por exemplo, em uma modalidade, em cada grupo $-NR^{7NA}R^{7NB}$, se presente, cada um dentre R^{7NA} e R^{7NB} é independentemente como definido acima para R; ou R^{7NA} e R^{7NB} empregados juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles estão ligados formam um anel tendo de 3 a 7 átomos de anel.

Em uma modalidade, $-NR^{3NA}R^{3NB}$ e $-NR^{7NA}R^{7NB}$, se ambos presentes, são iguais.

Em uma modalidade, $-NR^{3NA}R^{3NB}$ e $-NR^{7NA}R^{7NB}$, se ambos presentes, são diferentes.

Em cada uma dentre as fórmulas acima, em cada grupo $=NR^{3NC}$, se presente, R^{3NC} é independentemente -H ou como definido acima para R.

- 5 Por exemplo, em uma modalidade, em cada grupo $=NR^{3NC}$, se presente, R^{3NC} é independentemente como definido acima para R.

Por exemplo, em uma modalidade, em cada grupo $=NR^{3NC}$, se presente, R^{3NC} é independentemente selecionado de:

-H;

- 10 C_{1-6} alquila alifática não-substituída; C_{1-6} alquila alifática substituída;
 C_{2-6} alquenila alifática não-substituída; C_{2-6} alquenila alifática substituída;
 C_{3-6} cicloalquila não-substituída; C_{3-6} cicloalquila substituída;
 C_{6-10} carboarila não-substituída; C_{6-10} carboarila substituída;
 C_{5-10} heteroarila não-substituída; C_{5-10} heteroarila substituída;
- 15 C_{6-10} carboarila- C_{1-4} alquila não-substituída; C_{6-10} carboarila- C_{1-4} alquila substituída.

Por exemplo, em uma modalidade, em cada grupo $=NR^{3NC}$, se presente, R^{3NC} é independentemente selecionado de:

- C_{1-6} alquila alifática não-substituída; C_{1-6} alquila alifática substituída;
- 20 C_{2-6} alquenila alifática não-substituída; C_{2-6} alquenila alifática substituída;
 C_{3-6} cicloalquila não-substituída; C_{3-6} cicloalquila substituída;
 C_{6-10} carboarila não-substituída; C_{6-10} carboarila substituída;
 C_{5-10} heteroarila não-substituída; C_{5-10} heteroarila substituída;
- 25 C_{6-10} carboarila- C_{1-4} alquila não-substituída; C_{6-10} carboarila- C_{1-4} alquila substituída.

Em outro exemplo, em uma modalidade, em cada grupo $=NR^{3NC}$, se presente, R^{3NC} é independentemente selecionado de:

-H;

- C_{1-6} alquila alifática não-substituída; C_{1-6} alquila alifática substituída;
- 30 C_{2-6} alquenila alifática não-substituída; C_{2-6} alquenila alifática substituída;
 C_{3-6} cicloalquila não-substituída; C_{3-6} cicloalquila substituída.

Em outro exemplo, em uma modalidade, em cada grupo $=NR^{3NC}$,

se presente, R^{3NC} é independentemente selecionado de:

C_{1-6} alquila alifática não-substituída; alifática C_{1-6} alquila substituída;

C_{2-6} alquenila alifática não-substituída; C_{2-6} alquenila alifática substituída;

C_{3-6} cicloalquila não-substituída; C_{3-6} cicloalquila substituída.

- 5 Em outro exemplo, em uma modalidade, em cada grupo $=NR^{3NC}$, se presente, R^{3NC} é independentemente selecionado de:

-H;

C_{1-6} alquila alifática não-substituída;

C_{2-6} alquenila alifática não-substituída;

- 10 C_{3-6} cicloalquila não-substituída.

Em outro exemplo, em uma modalidade, em cada grupo $=NR^{3NC}$, se presente, R^{3NC} é independentemente selecionado de:

C_{1-6} alquila alifática não-substituída;

C_{2-6} alquenila alifática não-substituída;

- 15 C_{3-6} cicloalquila não-substituída.

Em outro exemplo, em uma modalidade, em cada grupo $=NR^{3NC}$, se presente, R^{3NC} é independentemente selecionado de: -H, -Me, -Et, -nPr, e -iPr.

- 20 Em outro exemplo, em uma modalidade, em cada grupo $=NR^{3NC}$, se presente, R^{3NC} é independentemente selecionado de: -H, -Me, e -Et (por exemplo, $=NR^{3NC}$ é =NH, =NMe, ou =NEt).

Em outro exemplo, em uma modalidade, em cada grupo $=NR^{3NC}$, se presente, R^{3NC} é independentemente selecionado de: -H e -Me (por exemplo, $=NR^{3NC}$ é =NH ou =NMe).

- 25 Em analogia precisa, em cada uma dentre as fórmulas acima, em cada grupo $=NR^{7NC}$, se presente, R^{7NC} é independentemente como definido acima para R^{3NC} .

Substituinte de Átomo de Anel de Nitrogênio

- 30 Também, em analogia precisa, em cada uma dentre as fórmulas acima, R^{N10} , se presente, é independentemente como definido acima para R^{3NC} (ou R^{7NC}).

Por exemplo, em uma modalidade, R^{N10} , se presente, é inde-

pendentemente selecionado de: -H e C₁₋₆alquila alifática não-substituída.

Por exemplo, em uma modalidade, R^{N10}, se presente, é independentemente selecionado de: -H, -Me, e -Et.

5 Por exemplo, em uma modalidade, R^{N10}, se presente, é independentemente selecionado de: -H e -Me.

Por exemplo, em uma modalidade, R^{N10}, se presente, é independentemente -H.

Contraíón

10 X⁻, se presente, é um ou mais contraíóns aniônicos para obter neutralidade elétrica.

Os exemplos de contraíóns aniônicos adequados são descritos abaixo no título "Sais".

Em uma modalidade, X⁻ é independentemente um ânion de halogênio (isto é, um haleto).

15 Em uma modalidade, X⁻ é independentemente Cl⁻, Br⁻, ou I⁻.

Em uma modalidade, X⁻ é independentemente Cl⁻.

Em uma modalidade, X⁻ é independentemente NO₃⁻.

Isômeros

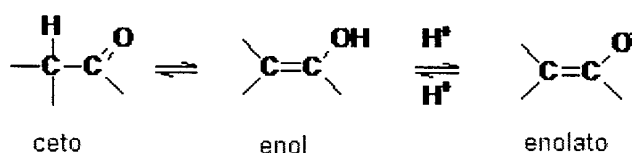
20 Certos compostos podem existir em uma ou mais formas geométricas, ópticas, enantioméricas, diastereoméricas, epiméricas, atrópicas, estereoisoméricas, tautoméricas, conformacionais, ou anoméricas particulares, incluindo, porém não-limitado a, formas cis e trans; formas E e Z; formas c, t, e r; formas endo e exo; formas R, S, e meso-formas; D e L; formas d e l; formas (+) e (-); formas ceto, enol, e enolato; formas syn e anti;

25 formas synclinal e anticlinal; formas α e β; formas axial e equatorial; formas de bote, cadeira, corda, envelope, e meia-cadeira; e combinações dos mesmos, a seguir coletivamente referido como "isômeros" (ou "formas isoméricas").

30 Note que, exceto como descrito abaixo para formas tautoméricas, especificamente excluído do termo "isômeros", como usado aqui, são isômeros estruturais (ou constitucionais) (isto é, isômeros que se diferenciam nas conexões entre os átomos em vez de meramente pela posição de áto-

mos no espaço). Por exemplo, uma referência para um grupo metóxi, $-\text{OCH}_3$, não deve ser considerada como uma referência para seu isômero estrutural, um grupo hidroximetila, $-\text{CH}_2\text{OH}$. Similarmente, uma referência para orto-clorofenila não deve ser considerada como uma referência para seu isômero estrutural, meta-clorofenila. Entretanto, uma referência a uma classe de estruturas pode também incluir formas estruturalmente isoméricas se incluindo nesta classe (por exemplo, C_{1-7} alquila inclui n-propila e iso-propila; butila inclui n-, iso-, sec-, e terc-butila; metoxifenila inclui orto-, meta-, e para-metoxifenila).

10 A exclusão acima não pertence às formas tautoméricas, por exemplo, formas ceto-, enol-, e enolato-, como, por exemplo, nos seguintes pares tautoméricos: ceto/enol (ilustrado abaixo), imina/enamina, álcool de amida/imino, amidina/amidina, nitroso/oxima, tiocetona/enetiol, N-nitroso/hidroxiato, e nitro/aci-nitro.



15 Note que especificamente incluídos no termo "isômero" estão os compostos com uma ou mais substituições isotópicas. Por exemplo, H pode estar em qualquer forma isotópica, incluindo ^1H , ^2H (D), e ^3H (T); C pode estar em qualquer forma isotópica, incluindo ^{11}C , ^{12}C , ^{13}C , e ^{14}C ; O pode estar em qualquer forma isotópica, incluindo ^{16}O e ^{18}O ; e similares.

20 A menos que de outro modo especificado, uma referência a um composto particular inclui todas tais formas isoméricas, incluindo (completamente ou parcialmente) misturas racêmicas e outras misturas dos mesmos. Os métodos para a preparação (por exemplo, síntese assimétrica) e separação (por exemplo, cristalização fracional e meios cromatográficos) de tais formas isoméricas são conhecidos na técnica ou são facilmente obtidos adaptando-se os métodos ensinados aqui, ou métodos conhecidos, de uma maneira conhecida.

25

Sais

Pode ser conveniente ou desejável preparar, purificar, e/ou ma-

nipular um sal correspondente do composto, por exemplo, um sal farmacologicamente aceitável. Os exemplos de sais farmacologicamente aceitáveis são descritos em Berge e outros., 1977, " Pharmaceutically Acceptabel Salt", J. Pharm. Sci., Vol. 66, pp. 1-19.

5 Por exemplo, se o composto é aniônico, ou tem um grupo funcional que pode ser aniônico (por exemplo, -COOH pode ser -COO^-), então um sal pode ser formado com um cátion adequado. Os exemplos de cátions inorgânicos adequados incluem, porém não estão limitados a, íons de metal de álcali tais como Na^+ e K^+ , cátions alcalinoterrosos tais como Ca^{2+} e Mg^{2+} ,
10 e outros cátions tais como Al^{3+} . Os exemplos de cátions orgânicos adequados incluem, porém não estão limitados a, íon de amônio (isto é, NH_4^+) e íons de amônio substituídos (por exemplo, NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+). Os exemplos de alguns íons de amônio substituídos adequados são aqueles derivados de: etilamina, dietilamina, diciclo-hexilamina, trietilamina, butilami-
15 na, etilenodiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, benzilamina, fenilbenzilamina, colina, meglumina, e trometamina, bem como aminoácidos, tais como lisina e arginina. Um exemplo de um íon de amônio quaternário comum é $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$.

Se o composto é catiônico, ou tem um grupo funcional que pode ser catiônico (por exemplo, -NH_2 pode ser -NH_3^+), então um sal pode ser
20 formado com um ânion adequado. Os exemplos de ânions inorgânicos adequados incluem, porém não estão limitados àqueles derivados dos seguintes ácidos inorgânicos: clorídrico, bromídrico, iodídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, nitroso, fosfórico, e fosforoso.

25 Os exemplos de ânions orgânicos adequados incluem, porém não estão limitados àqueles derivados dos seguintes ácidos orgânicos: 2-acetioxibenzoico, acético, ascórbico, aspártico, benzoico, canforsulfônico, cinâmico, cítrico, edético, etanodissulfônico, etanossulfônico, fumárico, glu-
ceptônico, glicônico, glutâmico, glicólico, hidroximaleico, hidroxinaftaleno
30 carboxílico, isetiônico, láctico, lactobiônico, láurico, maleico, málico, metanossulfônico, mícico, oleico, oxálico, palmítico, pamoico, pantotênico, fenilacético, fenilsulfônico, propiônico, pirúvico, salicílico, esteárico, succínico,

sulfanílico, tartárico, toluenossulfônico, e valérico. Os exemplos de anions orgânicos poliméricos adequados incluem, porém não estão limitados àqueles derivados dos seguintes ácidos poliméricos: ácido tânico, carboximetil celulose.

- 5 O composto pode também ser fornecido na forma de um sal misturado (isto é, o composto em combinação com um sal, ou outro sal). Por exemplo, sal misturado de cloreto de zinco de cloreto de metil-tionínio (MTZ) é um sal misturado de cloreto de metil-tionínio (MTC), um sal de cloreto, e outro sal, cloreto de zinco. Tais sais misturados são pretendidos serem
- 10 abrangidos pelo termo "e sais farmacologicamente aceitáveis dos mesmos".

A menos que de outro modo especificado, uma referência a um composto particular também inclui formas de sal dos mesmos.

Hidratos e Solvatos

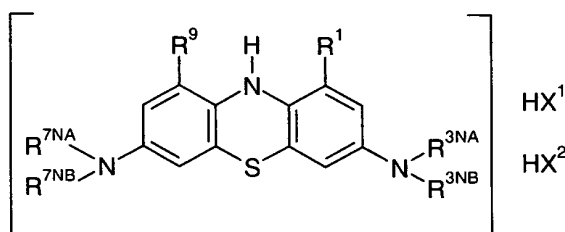
- 15 Pode ser conveniente ou desejável preparar, purificar, e/ou manipular um solvato correspondente do composto ativo. O termo "solvato" é usado aqui no sentido convencional para se referir a um complexo de soluto (por exemplo, composto, sal do composto) e solvente. Se o solvente for água, o solvato pode ser convenientemente referido como um hidrato, por exemplo, um mono-hidrato, um di-hidrato, um tri-hidrato, etc.

- 20 A menos que de outro modo especificado, uma referência a um composto particular também inclui formas de solvato dos mesmos.

Em todas as modalidades, uma diaminofenotiazina oxidada preferida é MTC.

Compostos de DAPTZ reduzidos cristalinos estáveis preferidos

- 25 Os compostos preferidos são descritos no pedido depositado, não publicado anterior PCT/GB2007/001103, e são os compostos de 3,7-diamino-10H-fenotiazina da seguinte fórmula:



em que:

cada de R^1 e R^9 é independentemente selecionado de: -H, C_{1-4} alquila, C_{2-4} alquenila, e C_{1-4} alquila halogenada;

cada de R^{3NA} e R^{3NB} é independentemente selecionado de: -H, C_{1-4} alquila,

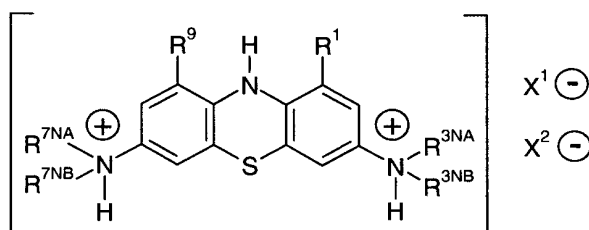
5 C_{2-4} alquenila, e C_{1-4} alquila halogenada;

cada de R^{7NA} e R^{7NB} é independentemente selecionado de: -H, C_{1-4} alquila, C_{2-4} alquenila, e C_{1-4} alquila halogenada;

cada de HX^1 e HX^2 é independentemente um ácido prótico;

e sais, solvatos, e hidratos dos mesmos farmacologicamente aceitáveis.

10 Sem desejar ficar preso a qualquer teoria particular, os inventores acreditam que é possível, se não provável, que os compostos existam na seguinte forma:



Embora os compostos de DAPTZ sejam propriamente sais, eles podem também ser fornecidos na forma de um sal misturado (isto é, o DAPTZ em combinação com outro sal). Tais sais misturados são pretendidos serem abrangidos pelo termo "e sais dos mesmos farmacologicamente aceitáveis". A menos que de outro modo especificado, uma referência a um composto particular também inclui os sais dos mesmos.

Os compostos de DAPTZ podem também ser fornecidos na forma de um solvato ou hidrato. O termo "solvato" é usado aqui no sentido convencional para se referir a um complexo de soluto (por exemplo, composto, sal do composto) e solvente. Se o solvente for água, o solvato pode ser convenientemente referido como um hidrato, por exemplo, um mono-hidrato, um di-hidrato, um tri-hidrato, etc. A menos que de outro modo especificado, uma referência a um composto particular também inclui as formas de solvato dos mesmos.

Em uma modalidade, os grupos C_{1-4} alquila são selecionados de:

grupos C_{1-4} alquila linear, tais como -Me, -Et, -nPr, -iPr, e -nBu; grupos C_{3-4} alquila ramificada, tais como -iPr, -iBu, -sBu, e -tBu; e grupos C_{3-4} alquila cíclica, tais como -cPr e -cBu.

5 Em uma modalidade, os grupos C_{2-4} alquenila são selecionados de grupos C_{1-4} alquenila linear, tais como $-\text{CH}=\text{CH}_2$ (vinila) e $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ (alila).

Em uma modalidade, os grupos C_{1-4} alquila halogenada são selecionados de: $-\text{CF}_3$, $-\text{CH}_2\text{CF}_3$, e $-\text{CF}_2\text{CF}_3$.

Os Grupos R^1 e R^9

10 Em uma modalidade, cada dentre R^1 e R^9 é independentemente -H, -Me, -Et, ou $-\text{CF}_3$.

Em uma modalidade, cada dentre R^1 e R^9 é independentemente -H, -Me, ou -Et.

Em uma modalidade, R^1 e R^9 são iguais.

15 Em uma modalidade, R^1 e R^9 são diferentes.

Em uma modalidade, cada dentre R^1 e R^9 é independentemente -H.

Em uma modalidade, cada dentre R^1 e R^9 é independentemente -Me.

20 Em uma modalidade, cada dentre R^1 e R^9 é independentemente -Et.

Os Grupos R^{3NA} e R^{3NB}

Cada dentre R^{3NA} e R^{3NB} é independentemente selecionado de: -H, C_{1-4} alquila, C_{2-4} alquenila, e C_{1-4} alquila halogenada.

25 Em uma modalidade, cada dentre R^{3NA} e R^{3NB} é independentemente selecionado de: C_{1-4} alquila, C_{2-4} alquenila, e C_{1-4} alquila halogenada.

Em uma modalidade, cada dentre R^{3NA} e R^{3NB} é independentemente -Me, -Et, -nPr, -nBu, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$, ou $-\text{CF}_3$.

30 Em uma modalidade, cada dentre R^{3NA} e R^{3NB} é independentemente -Me, -nPr, -nBu, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$, ou $-\text{CF}_3$.

Em uma modalidade, cada dentre R^{3NA} e R^{3NB} é independentemente -Me ou -Et.

Em uma modalidade, R^{3NA} e R^{3NB} são iguais.

Em uma modalidade, R^{3NA} e R^{3NB} são diferentes.

Em uma modalidade, cada dente R^{3NA} e R^{3NB} é independentemente -Me.

- 5 Em uma modalidade, cada dente R^{3NA} e R^{3NB} é independentemente -Et.

Os Grupos R^{7NA} e R^{7NB}

Cada dente R^{7NA} e R^{7NB} é independentemente selecionado de: -H, C_{1-4} alquila, C_{2-4} alquenila, e C_{1-4} alquila halogenada.

- 10 Em uma modalidade, cada dente R^{7NA} e R^{7NB} é independentemente selecionado de: C_{1-4} alquila, C_{2-4} alquenila, e C_{1-4} alquila halogenada.

Em uma modalidade, cada dente R^{7NA} e R^{7NB} é independentemente -Me, -Et, -nPr, -nBu, $-CH_2-CH=CH_2$, ou $-CF_3$.

- 15 Em uma modalidade, cada dente R^{7NA} e R^{7NB} é independentemente -Me, -nPr, -nBu, $-CH_2-CH=CH_2$, ou $-CF_3$.

Em uma modalidade, cada dente R^{7NA} e R^{7NB} é independentemente -Me ou -Et.

Em uma modalidade, R^{7NA} e R^{7NB} são iguais.

Em uma modalidade, R^{7NA} e R^{7NB} são diferentes.

- 20 Em uma modalidade, cada dente R^{7NA} e R^{7NB} é independentemente -Me.

Em uma modalidade, cada dente R^{7NA} e R^{7NB} é independentemente -Et.

Em uma modalidade, R^{3NA} e R^{3NB} e R^{7NA} e R^{7NB} são iguais.

- 25 Em uma modalidade, R^{3NA} e R^{3NB} e R^{7NA} e R^{7NB} são como definidos aqui, com a condição que pelo menos um dente R^{3NA} e R^{3NB} e R^{7NA} e R^{7NB} seja diferente de -Et.

Condições Opcionais

- 30 Em uma modalidade, o composto é como definido aqui, porém com a condição que:

R^{3NA} e R^{3NB} e R^{7NA} e R^{7NB} não sejam cada -Et.

Em uma modalidade, o composto é como definido aqui, porém

com a condição que:

se: cada dentre R^1 e R^9 for -H;

então: R^{3NA} e R^{3NB} e R^{7NA} e R^{7NB} não serão cada -Et.

Os Grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ e $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$

5 Em uma modalidade:

cada dentre R^{3NA} e R^{3NB} é independentemente C_{1-4} alquila, C_{2-4} alquenila, ou C_{1-4} alquila halogenada;

cada dentre R^{7NA} e R^{7NB} é independentemente C_{1-4} alquila, C_{2-4} alquenila, ou C_{1-4} alquila halogenada;

10 opcionalmente com a condição que pelo menos um dentre R^{3NA} e R^{3NB} e R^{7NA} e R^{7NB} seja diferente de -Et.

Em uma modalidade:

cada dentre R^{3NA} e R^{3NB} é independentemente -Me, -Et, -nPr, -nBu, -CH₂-CH=CH₂, ou -CF₃;

15 cada dentre R^{7NA} e R^{7NB} é independentemente -Me, -Et, -nPr, -nBu, -CH₂-CH=CH₂, ou -CF₃;

opcionalmente com a condição que pelo menos um dentre R^{3NA} e R^{3NB} e R^{7NA} e R^{7NB} seja diferente de -Et.

Em uma modalidade:

20 cada dentre R^{3NA} e R^{3NB} é independentemente -Me ou -Et;

cada dentre R^{7NA} e R^{7NB} é independentemente -Me ou -Et;

opcionalmente com a condição que pelo menos um dentre R^{3NA} e R^{3NB} e R^{7NA} e R^{7NB} seja diferente de -Et.

Em uma modalidade, os grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ e $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$

25 são iguais.

Em uma modalidade, os grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ e $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ são diferentes.

Em uma modalidade, cada dos grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ e $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ é independentemente selecionado de: -NMe₂, -NEt₂, -N(nPr)₂,
30 -N(Bu)₂, -NMeEt, -NMe(nPr), e -N(CH₂CH=CH₂)₂.

Em uma modalidade, os grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ e $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ são iguais, e são independentemente selecionados de: -NMe₂, -NEt₂,

$-N(nPr)_2$, $-N(Bu)_2$, $-NMeEt$, $-NMe(nPr)$, e $-N(CH_2CH=CH_2)_2$.

Em uma modalidade, os grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ e $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ são iguais, e são independentemente selecionados de: $-NMe_2$ e $-NEt_2$.

Em uma modalidade, cada dos grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ e $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ é: $-NMe_2^+$.

Em uma modalidade, pelo menos um dos grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ e $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ é diferente de $-NEt_2$.

Em uma modalidade, cada dos grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ e $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ é diferente de $-NEt_2$.

Por exemplo, em uma modalidade, os grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ e $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ são iguais, e são selecionados de: $-NMe_2$, $-N(nPr)_2$, $-N(Bu)_2$, $-NMeEt$, $-NMe(nPr)$, e $-N(CH_2CH=CH_2)_2$.

Os Grupos HX^1 e HX^2

Cada dentre HX^1 e HX^2 é independentemente um ácido prótico.

Os exemplos de ácidos próticos incluem, por exemplo, ácidos inorgânicos, tais como ácidos de hidroaleto (por exemplo, HCl , HBr , HI), ácido nítrico (HNO_3), ácido sulfúrico (H_2SO_4), e ácidos orgânicos, tais como ácido carbônico (H_2CO_3) e ácido acético (CH_3COOH).

Em uma modalidade, cada dentre HX^1 e HX^2 é independentemente um ácido monoprótico.

Em uma modalidade, cada dentre HX^1 e HX^2 é independentemente um ácido de hidroaleto (isto é, um ácido hidroálico)

Em uma modalidade, cada dentre HX^1 e HX^2 é independentemente selecionado de HCl , HBr , e HI .

Em uma modalidade, HX^1 e HX^2 são iguais.

Em uma modalidade, HX^1 e HX^2 são diferentes.

Em uma modalidade, HX^1 e HX^2 são iguais, e são independentemente selecionados de HCl , HBr , e HI . Neste caso, o composto (um composto de diamino-fenotiazina) pode convenientemente ser referido como um sal de "diamino-fenotiazina bis(haleto de hidrogênio)".

Em uma modalidade, HX^1 e HX^2 são cada HCl . Neste caso, o composto pode convenientemente ser referido como um "sal de diamino-

fenotiazina bis(cloreto de hidrogênio)".

Em uma modalidade, HX^1 e HX^2 são cada HBr. Neste caso, o composto pode convenientemente ser referido como um "sal de diamino-fenotiazina bis(brometo de hidrogênio)".

- 5 Em uma modalidade, HX^1 e HX^2 são cada HI. Neste caso, o composto pode convenientemente ser referido como um "sal de diamino-fenotiazina bis(iodeto de hidrogênio)".

Algumas Combinações Preferidas

Em uma modalidade:

- 10 cada dentre R^1 e R^9 é independentemente -H, -Me, ou -Et; e cada dos grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ e $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ é independentemente -NMe₂ ou -NEt₂.

Em uma modalidade:

- 15 cada dentre R^1 e R^9 é independentemente -H, -Me, ou -Et; e cada dos grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ e $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ é independentemente -NMe₂.

Em uma modalidade:

- 20 cada dentre R^1 e R^9 é independentemente -H; e cada dos grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ e $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ é independentemente -NMe₂ ou -NEt₂.

Em uma modalidade:

- 25 cada dentre R^1 e R^9 é independentemente -H; e cada dos grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ e $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ é independentemente -NMe₂.

Em uma modalidade:

- 30 cada dentre R^1 e R^9 é independentemente -H, -Me, ou -Et; e cada dos grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ e $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ é independentemente -NMe₂ ou -NEt₂; e

cada dentre HX^1 e HX^2 é independentemente selecionado de

- HCl, HBr, e HI.

Em uma modalidade:

cada dentre R^1 e R^9 é independentemente -H, -Me, ou -Et; e

cada dos grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ e $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ é independentemente $-NMe_2$; e

cada dentre HX^1 e HX^2 é independentemente selecionado de HCl, HBr, e HI.

5 Em uma modalidade:

cada dentre R^1 e R^9 é independentemente $-H$; e

cada dos grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ e $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ é independentemente $-NMe_2$ ou $-NEt_2$; e

10 cada dentre HX^1 e HX^2 é independentemente selecionado de HCl, HBr, e HI.

Em uma modalidade:

cada dentre R^1 e R^9 é independentemente $-H$; e

cada dos grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ e $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ é independentemente $-NMe_2$; e

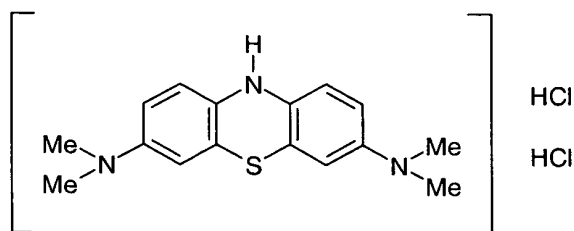
15 cada dentre HX^1 e HX^2 é independentemente selecionado de HCl, HBr, e HI.

Em uma modalidade:

cada dentre R^1 e R^9 é independentemente $-H$; e

20 cada dos grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ e $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ é independentemente $-NMe_2$; e

cada dentre HX^1 e HX^2 é HCl.

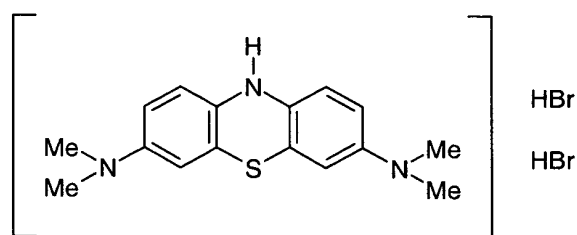


Em uma modalidade:

cada dentre R^1 e R^9 é independentemente $-H$; e

25 cada dos grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ e $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ é independentemente $-NMe_2$; e

cada dentre HX^1 e HX^2 é HBr.

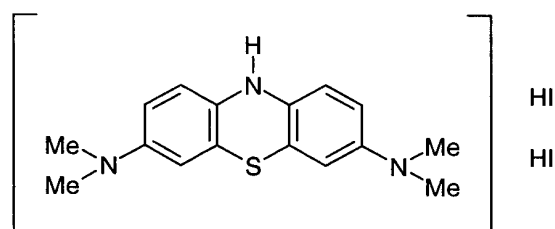


Em uma modalidade:

cada dentre R¹ e R⁹ é independentemente -H; e

cada dos grupos -N(R^{3NA})(R^{3NB}) e -N(R^{7NA})(R^{7NB}) é independentemente -NMe₂; e

5 cada dentre HX¹ e HX² é HI.



Variação Isotópica

Em uma modalidade, um ou mais dos átomos de carbono do composto é ¹¹C, ¹³C, ou ¹⁴C.

10 Em uma modalidade, um ou mais dos átomos de carbono do composto é ¹¹C.

Em uma modalidade, um ou mais dos átomos de carbono do composto é ¹³C.

Em uma modalidade, um ou mais dos átomos de carbono do composto é ¹⁴C.

15 Em uma modalidade, um ou mais dos átomos de nitrogênio do composto é ¹⁵N.

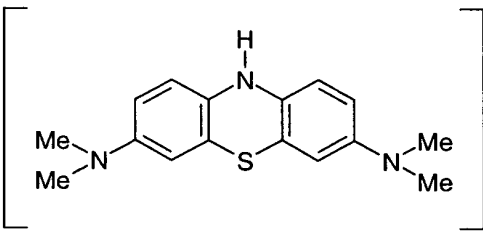
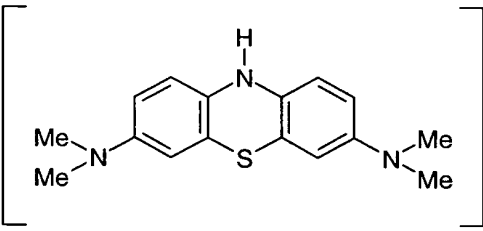
Em uma modalidade, um ou mais ou todos dos átomos de carbono de um ou mais ou todos dos grupos R^{3NA}, R^{3NB}, R^{7NA}, R^{7NB}, R¹, R⁹, e R¹⁰ é ¹¹C. (Ou ¹³C.) (Ou ¹⁴C.)

20 Em uma modalidade, um ou mais ou todos dos átomos de carbono de um ou mais ou todos dos grupos R^{3NA}, R^{3NB}, R^{7NA}, e R^{7NB} é ¹¹C. (Ou ¹³C.) (Ou ¹⁴C.)

Em uma modalidade, os grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ e $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ são iguais, e são: $-N(^{11}\text{CH}_3)_2$. (Ou $-N(^{13}\text{CH}_3)_2$.) (Ou $-N(^{14}\text{CH}_3)_2$.)

Em uma modalidade, o composto é selecionado dos seguintes compostos, e sais, solvatos, e hidratos dos mesmos farmacologicamente aceitáveis.

5

1	 <p>HCl HCl</p>
2	 <p>HBr HBr</p>

Outros Aspectos da Invenção

Onde qualquer método de tratamento é descrito aqui, também descritos são:

- 10 Um composto de DAPTZ para uso naquele método e uso do composto de DAPTZ na preparação de um medicamento para o referido tratamento. As modalidades, preferências, e individualizações correspondentes, descritas aqui aplicam *mutatis mutandis* a esses aspectos.

Desse modo a invenção fornece entre outras coisas:

- 15 Um composto de DAPTZ para uso em um método de tratamento de um distúrbio cognitivo ou de CNS em um paciente, onde o referido distúrbio é um que é susceptível ao tratamento pelo referido composto de DAPTZ, cujo método compreende oralmente administrar ao referido paciente uma unidade de dosagem contendo o referido composto de DAPTZ na forma oxidada como ingrediente ativo, em que a referida unidade de dosagem libera pelo menos 50% do referido ingrediente ativo em 30 minutos sob condições padrão.
- 20

Um composto de DAPTZ para uso em um método de tratamento

de um distúrbio cognitivo ou de CNS em um paciente, onde o referido distúrbio é um que é susceptível ao tratamento pelo referido composto de DAPTZ, cujo método compreende oralmente administrar ao referido paciente uma unidade de dosagem contendo o referido composto de DAPTZ na forma oxidada como ingrediente ativo, em que a referida unidade de dosagem é

5 gastrorretida.

Um composto de DAPTZ para uso em um método de tratamento de um distúrbio cognitivo ou de CNS em um paciente, onde o referido distúrbio é um que é susceptível ao tratamento pelo referido composto de

10 DAPTZ, cujo método compreende oralmente administrar ao referido paciente uma unidade de dosagem contendo o referido composto de DAPTZ na forma reduzida cristalina estável como ingrediente ativo,

Uso de um composto de DAPTZ na preparação de uma unidade de dosagem de medicamento para uso em um método de tratamento de um

15 distúrbio cognitivo ou de CNS em um paciente, onde o referido distúrbio é um que é susceptível ao tratamento pelo referido composto de DAPTZ, cujo método compreende oralmente administrar ao referido paciente uma referida unidade de dosagem contendo o referido composto de DAPTZ na forma oxidada como ingrediente ativo, em que a referida unidade de dosagem libera pelo me-

20 nos 50% do referido ingrediente ativo em 30 minutos sob condições padrão.

Uso de um composto de DAPTZ na preparação de uma unidade de dosagem de medicamento para uso em um método de tratamento de um distúrbio cognitivo ou de CNS em um paciente, onde o referido distúrbio é um que é susceptível ao tratamento pelo referido composto de DAPTZ, cujo

25 método compreende oralmente administrar ao referido paciente uma referida unidade de dosagem contendo o referido composto de DAPTZ na forma oxidada como ingrediente ativo, em que a referida unidade de dosagem é gastrorretida.

Uso de um composto de DAPTZ na preparação de uma unidade

30 de dosagem de medicamento para uso em um método de tratamento de um distúrbio cognitivo ou de CNS em um paciente, onde o referido distúrbio é um que é susceptível ao tratamento pelo referido composto de DAPTZ, cujo

método compreende oralmente administrar ao referido paciente uma unidade de dosagem contendo o referido composto de DAPTZ na forma reduzida cristalina estável como ingrediente ativo,

5 Em um aspecto a invenção fornece uma unidade de fármaco para o tratamento de um distúrbio cognitivo ou de CNS em um paciente, onde o referido distúrbio é um que é susceptível ao tratamento por um composto de DAPTZ, cuja unidade de dosagem contém o referido composto de DAPTZ na forma oxidada como ingrediente ativo, e em que a referida unidade de dosagem libera pelo menos 50% do referido ingrediente ativo em
10 30 minutos sob condições padrão. As unidades de dosagem podem compreender, por exemplo, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 100, 120 mg de um composto de DAPTZ como descrito.

Em um aspecto a invenção fornece uma unidade de fármaco para o tratamento de um distúrbio cognitivo ou de CNS em um paciente,
15 onde o referido distúrbio é um que é susceptível ao tratamento pelo composto de DAPTZ, cuja unidade de dosagem contém o referido composto de DAPTZ na forma oxidada como ingrediente ativo, e em que a referida unidade de dosagem é gastrorretida. A unidade de dosagem pode compreender pelo menos 50, 60, 70, 80, 90 ou 100 mg, ou mais, por exemplo, 200, 300,
20 400, 500 mg de um composto de DAPTZ como descrito.

Em um aspecto a invenção fornece uma unidade de fármaco para o tratamento de um distúrbio cognitivo ou de CNS em um paciente, onde o referido distúrbio é um que é susceptível ao tratamento por um composto de DAPTZ, cuja unidade de dosagem contém o referido composto de
25 DAPTZ na forma reduzida cristalina estável como ingrediente ativo, em uma dosagem descrita acima (por exemplo, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, ou 1000 mg), e tendo uma taxa de dissolução descrita acima (por exemplo, <50% em 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, ou 5 horas).

Também fornecido é um produto de fármaco compreendendo a
30 referida unidade acompanhada por um rótulo indicando que o produto de fármaco é para o tratamento da referida doença, o recipiente contendo uma ou mais unidades de dosagem cada compreendendo pelo menos um exci-

piante farmacologicamente aceitável e, como um ingrediente ativo, um composto de diaminofenotiazínio puro isolado como descrito aqui.

Ligantes

5 Adicionalmente o uso como indicador de diagnóstico ou prognóstico, por exemplo, como um ligante para rotulação de agregados de proteína no cérebro é também contemplado. As descobertas aqui em cujo efeito cognitivo (dependente da concentração do cérebro) vs. efeito hematológico negativo (deduzido ser de formação de dímero) têm implicações também para uso como um ligante.

10 Tais compostos de DAPTZ (Ligantes) podem incorporar, serem conjugados para, serem quelados com, ou de outro modo serem associados com, outros grupos químicos, tais como isótopos estáveis e instáveis detectáveis, radioisótopos, átomos de emissão de pósitron, rótulos de ressonância magnética, tinturas, marcadores fluorescentes, grupos antigênicos, 15 porções terapêuticas, ou qualquer outra porção que possa ajudar em uma aplicação prognóstica, diagnóstica, ou terapêutica.

Por exemplo, em uma modalidade, o composto de DAPTZ é como definido aqui, porém com limitação adicional que o composto incorpora, é conjugado para, é quelado com, ou é de outro modo associado com, 20 ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, etc.) rótulos detectáveis, por exemplo, isótopos, radioisótopos, átomos de emissão de pósitron, rótulos de ressonância magnética, tinturas, marcadores fluorescentes, grupos antigênicos, ou porções terapêuticas.

25 Em uma modalidade, o composto de DAPTZ é um ligante bem como um rótulo, por exemplo, um rótulo para proteína tau (ou proteína tau agregada), e incorpora, é conjugado para, é quelado com, ou é de outro modo associado com, um ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, etc.) rótulos detectáveis.

30 Por exemplo, em uma modalidade, o composto de DAPTZ é como definido acima, porém com a limitação adicional que o composto incorpora, é conjugado para, é quelado com, ou é de outro modo associado com, um ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, etc.) rótulos detectáveis.

Os compostos de DAPTZ rotulados (por exemplo, quando ligados à proteína tau ou proteína tau agregada) podem ser visualizados ou detectados por qualquer meio adequado, e a pessoa versada apreciará que qualquer meio de detecção adequado como é conhecido na técnica, possa ser usado.

Por exemplo, o composto de DAPTZ (ligante-rótulo) pode ser adequadamente detectado incorporando-se um átomo de emissão de pósitron (por exemplo, ^{11}C) (por exemplo, como um átomo de carbono de um ou mais substituintes do grupo alquila, por exemplo, substituintes do grupo metila) e detecção do composto usando tomografia de emissão de pósitron (PET) como é conhecido na técnica.

Tais compostos de DAPTZ rotulados ^{11}C podem ser preparados adaptando-se os métodos descritos aqui de modos conhecidos, por exemplo, em analogia aos métodos descritos em WO 02/075318 (veja, Figuras 11a, 11b, 12) e WO 2005/030676.

Desse modo em um aspecto é descrito um método de rotulação de uma proteína de doença agregada associada com um distúrbio neurodegenerativo no cérebro de um paciente, em que a referida proteína de doença agregada é uma que é susceptível à rotulação por um composto de DAPTZ, cujo método compreende oralmente administrar ao referido paciente uma unidade de dosagem contendo o referido composto de DAPTZ na forma oxidada como ingrediente ativo rotulado, em que a referida unidade de dosagem libera pelo menos 50% do referido ingrediente ativo em 30 minutos sob condições padrão.

Em um outro aspecto é descrito um método de rotulação de uma proteína de doença agregada associada com um distúrbio neurodegenerativo no cérebro de um paciente, em que a referida proteína de doença agregada é uma que é susceptível à rotulação por um composto de DAPTZ, cujo método compreende oralmente administrar ao referido paciente uma unidade de dosagem contendo o referido composto de DAPTZ na forma oxidada como ingrediente ativo rotulado, em que a referida unidade de dosagem é gastrorretida.

Em um outro aspecto é descrito um método de rotulação de uma proteína de doença agregada associada com um distúrbio neurodegenerativo no cérebro de um paciente, em que a referida proteína de doença agregada é uma que é susceptível à rotulação por um composto de DAPTZ, cujo método compreende oralmente administrar ao referido paciente uma unidade de dosagem contendo o referido composto de DAPTZ na forma reduzida cristalina estável como ingrediente ativo rotulado.

As proteínas de doença agregadas preferidas, compostos de DAPTZ, e distúrbios neurodegenerativos são descritos em outras partes aqui.

Os métodos podem também compreender a etapa de determinar a presença e/ou quantidade do referido composto ligado à referida proteína agregada. Outro aspecto da presente invenção pretence a um método de diagnose ou prognose do referido distúrbio neurodegenerativo que também compreende a etapa de se correlacionar com o resultado da determinação com o estado de doença do paciente.

Onde qualquer método de rotulação, diagnose ou prognose é descrito aqui, também descritos são:

Um composto de DAPTZ para uso naquele método e uso do composto de DAPTZ na preparação de um indicador de diagnóstico ou prognóstico para o referido método. As modalidades, preferências, e individualizações correspondentes, descritas aqui aplicam *mutatis mutandis* a esses aspectos.

Ao longo deste relatório descritivo, incluindo as reivindicações que seguem, a menos que o contexto requeira de outro modo, a palavra "compreender", e variações tais como "compreende" e "compreendendo", serão entendidas envolver a inclusão de um número inteiro ou etapa declarada ou grupo de números inteiros ou etapas, porém não a exclusão de qualquer outro número inteiro ou etapa ou grupo de números inteiros ou etapas.

Deve ser notado que, como usado no relatório descritivo e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um", "uma", e "o" incluem refe-

rentes plurais a menos que o contexto claramente imponha de outro modo. Desse modo, por exemplo, referência a "um veículo farmacêutico" inclui misturas de dois ou mais tais veículos, e similares.

5 As faixas são geralmente expressas aqui como de "cerca de" um valor particular, e/ou a "cerca de" outro valor particular. Quando uma tal faixa é expressa, outra modalidade inclui daquele valor particular e/ou ao outro valor particular. Similarmente, quando os valores são expressos como aproximações, pelo uso dos antecedentes "cerca de", será entendido que o valor particular forme outra modalidade.

10 Todas as combinações compatíveis das modalidades descritas acima são explicitamente descritas aqui como se cada combinação fosse especificamente e individualmente recitada.

Qualquer subtítulo aqui é incluído para conveniência somente, e não deve ser considerado como limitante da descrição de modo algum.

15 A invenção agora será também descrita com referência às seguintes Figuras e Exemplos não-limitantes. Outras modalidades da invenção ocorrerão para aqueles versados na técnica levando em consideração esses.

20 A descrição de todas as referências citadas aqui, na medida em que pode ser usada por aqueles versados na técnica para realizar a invenção, é desse modo especificamente incorporada aqui por referência cruzada.

Figuras

25 Figura 1. TRx-014-001 & 009 projeto de estudo de experiência clínica. Os números correspondem aos pacientes em cada estágio do estudo. 323 pacientes entraram no estudo base, um paciente foi randomizado, porém não foi dada a medicação. Os pacientes foram tratados com MTC como indicado ou placebo. Após 24 semanas e 50 semanas, os pacientes continuaram em duas extensões (E1 e E2) da experiência e em seguida con-
30 tinuaram na experiência TRx-014-009. Por razões éticas, àqueles em placebo durante as primeiras 24 semanas foram dados 100 mg bd em E1. "tid" significa dosagem em uma frequência de três vezes por dia, e "bd" significa

dosagem em uma frequência de duas vezes por dia.

Figura 2. Resposta de tratamento em CDR moderado em 24 semanas. Para este gráfico, as convenções de rotulação de "plac" referem-se ao placebo, "baixo" refere-se a baixo (100 mg) (veja, rodapé 1, Tabela 1)
5 "30 mg" refere-se a 30 mg dose tid e "60 mg" refere-se a 60 mg dose tid.

Figura 3. Comparação dos efeitos do tratamento de rember[®] como visto por formação de imagem de cérebro funcional usando SPECT. O fluxo sanguíneo cerebral regional diminuído (rCBF) é visto como áreas brancas em todo o cérebro.

10 (1) Análise de SPM mostra as regiões onde a visita 4 teve significativamente menos rCBF do que a visita 1 em pacientes tratados com placebo. O limiar para a diferença $p < 0,005$, corrigida $p < 0,05$ para múltiplas comparações, ambas significância de voxel e cluster. R=direito, L=esquerdo, A=anterior, P=posterior. O par superior em cada painel representa as vistas anterior (esquerda) e posterior (direita) respectivamente.
15

(2) Análise SPM mostra nenhuma região onde a visita 4 teve significativamente menos rCBF do que a visita 1 em pacientes tratados com rember TM em 30 mg ou 60 mg tid. O limiar para diferença $p < 0,005$, corrigido $p < 0,05$ para múltiplas comparações, ambas as significâncias de voxel e cluster.
20

(3) Locais da diferença dependente de tratamento em declínio entre o valor de referência e visita 4 em pacientes de CDR brando tratados com placebo versus aqueles com rember TM em 30/60 mg tid. O limiar para diferença $p < 0,005$, corrigido $p < 0,05$ para múltiplas comparações, ambas as significâncias de voxel e cluster.
25

Figura 4. ITT/OC ADAS-cog alteração do valor de referência valor de referência e curvas ajustadas. Para este gráfico, as convenções de rotulação de "placlo" referem-se aos pacientes que foram originalmente randomizados para placebo e foram em seguida comutados para a dose de
30 100 mg bd após 24 semanas, "baixo" refere-se à dose tid baixa (100 mg), "30 mg" refere-se a 30 mg de dose tid e "60 mg" refere-se a 60 mg de dose tid.

Figura 5. Dissolução de cápsulas no fluido intestinal simulado por dosagem: cápsulas (A) de 30 mg e (B) de 100 mg dissolvidas inicialmente e seguinte 24 meses de armazenamento. A dissolução da cápsula de 100 mg foi mais lenta do que a da cápsula de 30 mg e esta diferença aumentou com tempo depois da fabricação.

Figura 6A. rember[®] inibe o evento de nucleação e agregação de tau autocatalítico.

Figura 6B. rember[®] abre uma nova série de reações de depuração para agregados de tau.

Figura 7. Relação entre o tempo de dissolução e efeitos relativos cognitivos e hematológicos. A % de dissolução é α ajustado com base nos cálculos abaixo:

Um índice de atividade cognitiva (CI) foi primeiro determinado como o tamanho do efeito ADAS-cog normalizado em 50 semanas em cada dose nominal relativa ao tamanho de efeito máximo observado em 50 semanas, usando estimativas de quadrados mínimos lineares de tamanho de efeito. Um índice de atividade hematológica correspondente (HI) foi expresso como a alteração normalizada na contagem de célula vermelha em 24 semanas em cada dose nominal relativo ao tamanho de efeito de célula vermelha máximo observado. Os pontos de tempo de 50 semanas para efeito cognitivo e 24 semanas para efeito hematológico foram escolhidos por que os efeitos correspondentes foram máximos nesses tempos. A atividade cognitiva relativa foi expressa na forma $CI/(CI+HI)$ e a atividade hematológica relativa foi expressa na forma $HI/(CI+HI)$, e ambas essas atividades relativas foram normalizadas quanto às suas doses cruzadas máximas correspondentes. Um cálculo similar foi usado para expressar a porcentagem relativa de MTC disponível na solução antes ou após 30 minutos relativo ao total, com base nos dados de dissolução de cápsulas de 24 meses de idade, quando as diferenças de dissolução entre as resistências da cápsula foram máximas. As relações explicitamente calculadas podem ser expressas como segue:

$$\frac{\alpha CI}{\alpha CI + (1 - \alpha) HI} \cong \frac{D_{30}}{D_{total}} \dots\dots\dots(1)$$

$$\frac{(1-\alpha)HI}{[\alpha CI + (1-\alpha)HI]} \cong \frac{(1-D_{30})}{D_{total}} \dots\dots\dots(2)$$

onde α é um parâmetro de graduação para relacionar unidades de CI com unidades de HI (constatado ser 0,645 em estimação de quadrados mínimos), D_{30} é a porcentagem de MTC total disponível de cápsulas de 24 meses em 30 minutos, e D_{total} é a dose nominal total que é eventualmente dissolvida.

5 Figura 8. Relação de dose-resposta envolvida em 50 semanas. O tamanho dos efeitos calculados usando estimativas de quadrados mínimos lineares em 50 semanas. A dose terapêutica eficaz disponível da cápsula de 100 mg foi equivalente a uma dose de aproximadamente 25 mg, indicando que as cápsulas não permitem a liberação e absorção proporcio-
10 nal da dose nominal em uma forma terapêuticamente activa.

 Figura 9. Diferenças nos parâmetros principais de célula vermelha em ratos entre MTC e L-MTx administrados oralmente durante 14 dias nas doses diárias indicadas. As diferenças são mostradas em termos de alteração observada com L-MTx com respeito ao MTC. Por exemplo, em uma
15 dose de 150 mg/kg de L-MTx, a contagem de célula vermelha é aumentada em $>1 \times 10^6/\mu\text{l}$ e a concentração de hemoglobina de célula média é aumentada em 3 pg/dL. A análise estatística dos dados é mostrada na Tabela 4. Abreviações e unidades: RBC: contagem de célula vermelha, $10^6/\mu\text{L}$; HB: hemoglobina, g/dL; MCV: volume de célula médio, fL; MCHC: concentração
20 de hemoglobina de célula média, g/dL; RETI: contagem de reticulócito, % de célula vermelhas.

 Figura 10. Taxas de excreção urinária média para MTC oxidado (Ox-MT) de 7 pacientes humanos adultos seguinte 10 mg de dose oral (média, SE). (de DiSanto e Wagner, 1972b).

25 Figura 11. Taxa de excreção urinária média para leuco-MT (L-MT) de 7 pacientes humanos adultos seguinte 10 mg de dose oral (média, SE). (de DiSanto e Wagner, 1972b).

 Figura 12. Taxa de excreção urinária para Ox-MTC seguinte uma dose oral de 10 mg.

30 Figura 13. Taxa de excreção urinária para L-MT seguinte uma dose oral de 10 mg.

Figura 14. Concentração de Ox-MT no sangue total após administração intravenosa de 100 mg de MTC (de Peter e outros., 2000).

Figura 15. Concentração de Ox-MT no sangue total após administração oral de 100 mg de MTC com (círculos abertos) ou sem (círculos fechados) 800 mg de Mesna (média, SE) (de Peter e outros., 2000).

Figura 16. Estimativa de biodisponibilidade evidente com base na excreção de MT total (isto é Ox-MT + L-MT) em infinidade-T seguindo a dosagem oral, onde a curva foi ajustada pela equação empírica:

$$\underline{Recuperação\ Urinária = 88,9 - (88,9 \times Dose)/(69,7 + Dose)}$$

Note o valor menor do que o valor esperado (marcado "P") para o resultado de dose de 100 mg reportado por Peter e outros. (corrigido para a excreção de 48 horas esperada).

Figura 17. Taxa de excreção urinária de MTC total ($\mu\text{mol/h}$) durante os intervalos de tempo indicados após administração i.v. (barras pretas) e oral (barras cinzas) de MTC. Média, SE, n = 7 (de Peter e outros., 2000).

Figura 18. Primeiro estágio do modelo: ajuste dos dados de concentração sanguínea seguindo a dose intravenosa única de 100 mg de MTC e dados de excreção urinária representados em escala, seguindo a dose oral única de 10 mg de MTC.

Figura 19. Ajuste entre os dados de concentração de sangue observados seguindo a dosagem intravenosa de Peter e outros. (Tabela 7) e predição do modelo descrito na Figura 18.

Figura 20. Ajuste entre a excreção urinária observada representada em escala de Ox-MT seguindo uma dose oral única de 10 mg de MTC de DiSanto e Wagner (Tabela 5) e predição do modelo (mostrado na Figura 18) após dose intravenosa única de MTC (100 mg).

Figura 21. Ajuste entre excreção urinária observada representada em escala de L-MT seguindo a dose oral única de 10 mg de MTC de DiSanto e Wagner (Tabela 5) e predição do modelo (mostrado na Figura 18) após dose intravenosa única de MTC (100 mg).

Figura 22. Segundo estágio do modelo: ajuste dos dados de

concentração de sangue seguindo uma dose oral única de 100 mg de MTC e dados de excreção urinária representada em escala seguindo uma dose oral única de 10 mg de MTC.

5 Figura 23. Ajuste entre os dados observados de concentração de sangue seguindo dosagem oral de Peter e outros. (Tabela 7) e predição do modelo descrito na Figura 22.

10 Figura 24. Ajuste entre a excreção urinária observada representada em escala de Ox-MT seguindo a dose oral única de 10 mg de MTC de DiSanto e Wagner (Tabela 5) e predição do modelo (mostrado na Figura 22) após dose oral única de MTC (100 mg).

 Figura 25. Ajuste entre excreção urinária observada representada em escala de L-MT seguindo a dose oral única de 10 mg de MTC de DiSanto e Wagner (Tabela 5) e predição do modelo (mostrado na Figura 22) após dose oral única de MTC (100 mg).

15 Figura 26. Comparação de taxa de excreção urinária média de MT total como reportado por Peter e outros, e aquelas preditas pelo modelo oral mostrado na Figura 22 para os mesmos intervalos. Comparação de excreção total durante 24 horas é mostrada.

20 Figura 27. Esta reproduz a 16, porém inclui a predição do modelo ("M") para excreção de MTC. O valor do modelo é mais perto do que o predito de outros estudos do que a estimativa reportada por Peter e outros. ("P").

25 Figura 28. Produções do modelo oral para C2 (sangue), C4 e C3 são mostradas novamente representadas em escala para o seu máximo correspondente. Esses são comparados com um modelo triexponencial aplicado para o nível medido de MT no cérebro do porco seguinte uma dose oral única.

30 Figura 29. Relação entre eficácia clínica observada de rember[®] e nível de estado estável médio predito de MT em C3 durante o regime de dosagem de 3/dia. Também mostrados são os níveis de estado estável preditos de MT em C3 durante regimes de dosagem de 2/dia e 1/dia.

 Figura 30. Relação entre eficácia clínica observada de rember[™] e nível de estado estável médio predito de MT em C2 durante o regime de

dosagem de 3/dia. Também mostrados são os níveis de estado estável preditos de MT em C2 durante regimes de dosagem de 2/dia e 1/dia.

5 Figura 31A. Diferença entre tamanho de efeito observado e tamanho de efeito predito como uma função do percentual de dissolução de cápsula em 30 minutos. A dissolução da cápsula é determinada pela quantidade de MTC liberado na fase aquosa em condições padrão de dissolução da Farmacopeia US/EU.

10 Figura 31B. Relação entre nível de estado estável esperado de MT no compartimento central (C2, isto é sangue) e perda observada de células vermelhas em 24 expressa (expressa como a alteração fracional relativa à faixa normal).

 Figura 32. Relação entre dose real ("dose") e dose efetiva ("dose eff") com base nos dados de excreção urinária.

15 Figura 33. Comparação de fração predita absorvida pelo MTC e L-MTx assumindo que a administração da forma de L-MTx elimina a não absorção do estômago (isto é, C1 na Figura 22).

20 Figura 34. Relação entre eficácia clínica esperada de uma forma com base em L-MTx da porção de metiltionínio e nível de estado estável médio predito de MT em C3 para uma faixa de regimes de dosagem de 1/dia a 3/dia.

 Figura 35. Relação entre eficácia clínica esperada de uma forma com base em L-MTx da porção de metiltionínio e nível de estado estável médio predito de MT em C2 (sangue) para uma faixa de regimes de dosagem de 1/dia a 3/dia.

25 Figura 36. Relação de dose-resposta observada para efeito de MTC na formulação de cápsula usada na experiência TRx-014-001 em perda de células vermelhas e para relação com base em MTC e de dose-resposta esperada para uma forma com base em L-MTx de um produto medicinal de metiltionínio administrado nas doses indicadas em uma frequência
30 de 3/dia.

 Figura 37. Vários modelos quantitativos para a progressão e tratamento de doença de Alzheimer como descrito no Exemplo 12.

Figura 38. Relação entre eficácia clínica esperada de uma preparação com base em L-MTx para a formulação de liberação lenta de 1/dia.

Figura 39. O efeito diferencial de inibidores de diferentes sítios da série de reações de agregação de tau. O esquema no lado esquerdo mostra o sítio de inibição da entrada de tau na série de reações de agregação de tau (consumo) e o sítio de depuração realçada de agregados de tau daquela série de reações. O efeito de alterações em ambos desses dois sítios em níveis de PHF em neurônios é mostrado no painel direito. A inibição do consumo diminui o nível de PHFs inicialmente, antes da taxa de formação continuar no mesmo nível como antes. A depuração realçada de tau agregado, entretanto, resulta em uma diminuição estável no nível de tau agregado.

Figura 40. Agregação de tau e sua depuração em doença de Alzheimer. Os oligômeros de tau podem montar em PHFs filamentosos e/ou entrar na série de reações de depuração endossômica-lisossômica.

15 Exemplos

Exemplo 1- Experiência clínica de Fase 2 TRx-014-001

Sumário

Um estudo de descoberta de faixa de dose explorador de Fase 2 de 50 semanas para o tratamento de demência branda e moderada do tipo de Alzheimer foi conduzido empregando um produto medicinal investigacional (IMP) do qual MTC foi o ingrediente farmacêutico ativo (API). O estudo foi um estudo randomizado, duplo cego, controlado por placebo cujo objetivo principal foi investigar os efeitos de MTC em três doses (30, 60 e 100 mg, cada três vezes por dia) comparado com o placebo em capacidade cognitiva (quando medido pela escala de ADAS-cog: Escala de Avaliação da Doença de Alzheimer – subescala cognitiva). 322 Pacientes foram randomizados, dos quais 245 (74%) completaram as primeiras 24 semanas de tratamento. Desses, 227 (93%) escolheram continuar o tratamento durante um adicional de 6 meses, dos quais 177 (78%) completaram 50 semanas de tratamento em 2 de julho de 2007. A análise final compreende análise da população de ITT/OC (Intenção de tratar/Caso Observado) de 245 pacientes que completaram 24 semanas de tratamento, e 177 pacientes que completa-

ram 50 semanas de tratamento em 2 de julho de 2007. O projeto do estudo é resumido na Figura 1. Por razões de interesse ético, os pacientes que foram originalmente randomizados para placebo durante a primeira fase de 6 meses foram comutados para a dose de 100 mg durante a segunda fase de extensão de 6 meses do estudo ("E1").

Análises de 24 semanas

O primeiro resultado pré-especificado primário foi uma análise de ITT/OC de alteração de ADAS-cog de valor de referência em 24 semanas usando uma análise de abordagem de covariância que incluiu uma avaliação da interação entre o efeito do tratamento com rember[®] e severidade de valor de referência como definido por CDR (escala de Variação de Demência Clínica). Esta análise demonstrou um efeito positivo de rember[®] em 60mg de tid que obteve significância estatística em ambas as populações de ITT/OC e ITT/LOCF (Intenção para tratar/Última Observação Realizada Dianteira). A severidade de CDR em valor de referência foi constatada ser um cofator altamente significativo, e quando incluída no modelo mostrou que o efeito de rember[®] foi significativo em 24 semanas somente em pacientes que eram CDR moderado em valor de referência. A necessidade de declive em pacientes de CDR brando em placebo preveniu a análise de eficácia neste grupo durante as primeiras 24 semanas. Entretanto, a eficácia de rember[®] foi confirmada neste grupo por análise de varredura de cérebro funcional em 24 semanas, e por ADAS-cog em 50 semanas.

Tabela 1. Tamanho de efeito de ADAS-cog em 24 semanas em CDR moderado (em unidades de ADAS-cog)

Dose ⁽¹⁾	Estimativa	95% de CI	p-valor ⁽²⁾
<i>baixa</i> (100 mg)	-0,42	-4,24, 3,40	0,826
30 mg	-4,02	-7,30, -0,74	0,0172
60 mg	-5,41	-9,31,-1,52	0,0073

1. A dose de 100 mg é referida como a dose "baixa (100 mg)" para indicar que em sua formulação presente, a eficácia terapêutica da cápsula de 100 mg não correspondeu à dose nominal.

2. O p-valor é de um teste de se o valor é significativamente diferente do placebo.

Na análise do subgrupo da população de ITT/OC que era CDR moderado em valor de referência (Figura 2), o tamanho de efeito de rember[®] na dose tid de 60 mg foi de -5,4 unidades de ADAS-cog e 3,4 unidades de MMSE (Exame de Estado Mini-Mental) (dados de MMSE não mostrados).

5 Ao passo que os pacientes tratados com placebo caíram em 5,1 unidades de ADAS-cog, não houve nenhuma evidência de declive em pacientes tratados com rember[®] em 30 mg ou 60 mg de tid durante 24 semanas. As variáveis de resultado não cognitivo (medindo o transtorno psiquiátrico e habilidades das atividades da vida diária) também confirmaram as propriedades de esta-

10 bilização da doença e tamanho de eficácia de rember[®] no grupo moderado. Os pacientes recebendo rember[®] na dose tid de 60 mg, mostraram um tamanho de efeito de 1,4 – 1,9 unidades na escala de CGIC (Impressão Global Clínica de Alteração) em 24 semanas relativo ao placebo, registrados pelos assessores clínicos cegos para os outros resultados medidos. A relação de

15 odds de não declínio em CGIC para pacientes tomando rember[®] na dose de 60mg foi 9 vezes melhor do que o placebo. O parâmetro de CDR soma de caixas, outra medição clínica global, mostrou benefício de -1,7 unidades. Finalmente, rember[®] na dose de 60mg mostrou benefício significativo nas

20 medições de ADFACS (Escala de Avaliação Funcional de Doença de Alzheimer) das atividades de vida diária, com um tamanho de efeito de 3,1 a 6,1 unidades durante 24 semanas. Em todas as análises psicométricas em 24

semanas, a cápsula de 100 mg mostrou eficácia mínima, de acordo com um defeito de formulação das cápsulas nesta intensidade de dosagem descrita também abaixo.

5 A dose de 100 mg é referida como a dose "baixa (100 mg)" para indicar que em sua formulação presente, a eficácia terapêutica da cápsula e 100 mg não correspondeu à dose nominal. Isto é descrito em maiores detalhes nos Exemplos abaixo.

Análise de varredura de Cérebro Funcional

10 Prevenção de declive durante 24 semanas foi independentemente confirmada pela análise de alterações de varredura de cérebro funcionais em 135 pacientes que passaram por duas varreduras de SPECT 6 meses sem considerar a média (Figura 3). Ao passo que os pacientes recebendo placebo mostravam o padrão esperado de deterioração nas regiões frontal e temporo-parietal do cérebro, os pacientes recebendo rember[®] em 15 30mg ou 60mg mostraram nenhuma evidência de deterioração em qualquer região do cérebro. Quando o subgrupo que era CDR brando no valor de referência foi examinado separadamente, houve também evidência de declive proeminente durante 6 meses em pacientes recebendo placebo, quantificando para perda de 8% de volume neuronal funcionamento. O efeito do tratamento visto na população total foi também visto no subgrupo de CDR brando, demonstrando a eficácia de rember[®] em AD de CDR brando. O fato que 20 houve evidência objetiva da deterioração funcional progressiva no subgrupo brando sem corresponder evidência de declive em quaisquer das escalas psicométricas durante 6 meses confirma a influência de mistura poderosa de reserva cognitiva em AD brando. Em geral, a despeito deste efeito, os déficits funcionais de valor de referência mostrados por varredura de SPECT foram altamente correlacionados com o escore de ADAS-cog de valor de 25 referência, e o benefício de tratamento com rember[®] mostrado na escala de ADAS-cog de outro modo correlacionado com o benefício funcional demonstrado pela varredura SPECT. A ação de rember[®] vista por varredura de 30 cérebro funcional fortemente sugere que a capacidade de rember[®] reverter a patologia de agregação de Tau, que é conhecida ocorrer nas mesmas re-

giões do cérebro com aquelas que mostram defeitos de varredura de cérebro funcional, é responsável por sua capacidade de prevenir o declive na função de cérebro cortical nas mesmas regiões. Determinadas as sensibilidades maiores de SPECT em detecção de ambos decline e efeitos do tratamento, e sua capacidade de predizer a resposta do tratamento (veja análise de 50 semanas abaixo), é concluído que SPECT pode ser usado como um substituto ou marcador próxi para experiências clínicas futuras objetivando para demonstrar a modificação de doença.

Análises de 50 semanas

10 O estudo de 50 semanas se prolongou e confirmou a descoberta de estudo de 24 semanas, e demonstrou benefícios significantes em ambos pacientes de CDR brando e CDR moderado nas populações de ITT/OC e ITT/LOCF totais (Figura 4; Tabelas 2 e 3). Os pacientes originalmente randomizados para placebo foram comutados para a dose baixa(100 mg) bd
15 após 24 semanas. Isto é referido como uma subdivisão de tratamento de "placebo baixo". Por causa da eficácia mínima da dose baixa (100 mg) em quaisquer das escalas psicométricas durante as primeiras 24 semanas de tratamento, a subdivisão de tratamento de baixo placebo convenientemente serviu como a subdivisão de comparador de Dose Menos Exposta para o
20 estudo de 50 semanas.

O declive médio observado durante o estudo de 50 semanas em pacientes tratados com placebo foi 7,8 unidades de ADAS-cog (Figura 4). Para pacientes tratados com rember[®] em uma dose de 60mg tid, o declive visto durante as 50 semanas não foi significativamente diferente de zero na
25 escala de ADAS-cog ou na escala de MMSE para os pacientes. Na escala de ADAS-cog, cerca de 60% dos pacientes melhoraram ou permaneceram iguais nas 50 semanas. Na escala de MMSE, 62% melhoraram ou permaneceram iguais nas 50 semanas. Os excedentes de um paciente não declinando em qualquer escala foram cerca de 3 a 4 vezes melhor na dose de 60 mg
30 do que em placebo baixo. Os tamanhos de efeitos correspondentes foram - 6,8 unidades de ADAS-cog e 3,2 unidades de MMSE na experiência de 50 semanas. Além do efeito na progressão da doença, houve uma melhora sin-

tomática inicial em 15 semanas de 1,6 unidade de ADAS-cog e 0,8 unidade de MMSE na dose de 60mg, comparável com aquela observada com os inibidores de AChE.

Tabela 2. Tamanho de efeitos inferidos de análises de efeitos misturados em 50 semanas (em unidades de ADAS-cog)

Dose	Estimativa	95% de CI	<i>p</i> -valor ⁽¹⁾
Baixo(100 mg)	-4,04	-7,21, -0,87	0,0124
30mg	-3,87	-6,90, -0,84	0,0126
60mg	-6,78	-9,74, -3,82	<0,0001

1. O *p*-valor é de um teste de se o valor é significativamente diferente do placebo.

Tabela 3. Tamanho dos efeitos inferidos de análise de quadrados mínimos em 50 semanas (em unidades de ADAS-cog)

Dose	Estimativa	95% de CI	<i>p</i> -valor ⁽¹⁾
baixo(100 mg)	-3,59	-5,81, -1,37	0,0015
30mg	-4,37	-6,83, -1,92	0,0005
60mg	-6,50	-8,89, -4,14	<0,0001

1. O *p*-valor é de um teste de se o valor é significativamente diferente do placebo.

5 Não houve nenhuma deterioração nas escalas não cognitivas em pacientes de CDR brando na subdivisão de placebo baixo durante 50 semanas. Os resultados não cognitivos em 50 semanas em pacientes de CDR moderado confirmaram as descobertas das análises de 24 semanas. O NPI (Inventor Neuropsiquiátrico) demonstrou benefícios para o tratamento com rember[®] durante as 50 semanas. Ao passo que pacientes na subdivisão de placebo baixo
10 declinaram em 9,6 unidades na escala de distúrbio do paciente e 4,9 unidades na escala de curador de angústia, nenhum tal declive foi visto em pacientes continuamente tratados com rember[®] durante 50 semanas, com tamanho de efeitos melhores correspondentes de -9,2 unidades e -4,6 unidades.

A subdivisão de baixo placebo comparado com a subdivisão baixa(100mg) forneceu uma aproximação próxima de um planejamento inicial tardio para confirmar que rember[®] está modificando a doença em um sentido regulador formal. Os pacientes que começaram mais tarde em uma dose de eficácia terapêutica evidente mínima como julgado por ADAS-cog durante as 24 semanas iniciais 24 permaneceram significativamente diferentes em 50 semanas relativo aos pacientes que estavam recebendo a dose baixa(100 mg) continuamente. Além disso, os pacientes tratados continuamente na dose baixa(100 mg) mostraram retardamento na taxa de progressão de doença. Embora haja uma diferença no regime de dosagem de cápsula entre as duas subdivisões (tid vs. bd), os efeitos colaterais hematológicos, que mostraram um perfil de dose-resposta claro, foram indistinguíveis com respeito aos dois regimes de dosagem, suportando a equivalência aproximada de exposição biológica, e portanto suportando a interface que rember[®] está modificando a doença. Isto é também confirmado pela capacidade de rember[®] interromper a progressão da doença durante 50 semanas na dose de 60mg, e reduziu a taxa de progressão da doença nas doses de 30mg e baixa (100 mg) em 50 semanas.

Sumário de Segurança Clínica de rember[®]

O perfil de evento adverso total foi substancialmente melhor na experiência de rember[®] do que para os inibidores de AChE (Acetilcolina Esterase) em dose de tratamento ideal reportada em Cochrane Review (Birks, 2006). Não há nenhuma diferença significativa nos excedentes de pacientes tomando rember[®] na remoção de 30mg ou 60 mg tid, experimentando qualquer evento adverso ou remoção devido a um evento adverso, comparado com os inibidores de AChE. A diarreia foi o evento adverso mais frequente reportado pelos pacientes tratados com rember[®], particularmente a dose *baixa(100mg)*, mais provavelmente devido ao trânsito de rember[®] não absorvido pelo intestino distal, causando a repopulação de flora intestinal devido a uma atividade antibiótica branda de MTC que foi bem documentado na literatura (Kristiansen e Amaral, 1997; Gunics e outros., 2000). Embora os pacientes recebendo rember[®] tenham tido vantagens mais elevadas

de desenvolvimento de diarreia do que o reportado para inibidores de AChE, os pacientes tomando rember[®] reportaram significativamente menos náuseas, vômito, anorexia e dor abdominal, enxaqueca, fadiga e agitação. A experiência de alguns dos centros de exame indicou que a diarreia pode ser controlada com preparações probióticas adequadas (por exemplo, preparação de lactobacilo seca).

Nenhuma alteração de significância clínica foi vista em qualquer dos parâmetros químicos clínicos rotineiros. As pequenas reduções em contagens de célula vermelha, hemoglobina, metemoglobina e contagens de hematócitos foram vistas em pacientes tratados com rember[®], e essas alterações estavam relacionadas com a dose. As alterações foram insignificantes para a dose de 30 mg, porém se tornou estatisticamente significativa para as doses de 60 mg e *baixa(100 mg)* tid. No caso de parâmetro de célula vermelha, elas apareceram durante as 24 semanas, porém resolveram em 50 semanas, exceto para evidência que a dose de 60mg tid aumentou os níveis de metemoglobina em 24 semanas e estabilizou, por conseguinte. Nesta dose, nível médio de metemoglobina aumentou do valor médio normal de 0,4% para 0,8% de hemoglobina, porém ainda abaixo do limite superior do normal (1%). No caso de células brancas, novamente as alterações foram insignificantes para a dose de 30mg tid, porém para os valores de dose de 60mg diminuíram e em seguida estabilizaram em níveis não significativamente diferentes da dose de 30mg em 50 semanas. É concluído que a oxidação de hemoglobina por uma forma oxidada da porção de metiltionínio é o mecanismo mais provavelmente responsável pelas alterações nos parâmetros de célula vermelha.

No período de estudo, nenhuma dessas alterações foi clinicamente significativa, e todas permaneceram bem dentro da faixa normal. Portanto, é concluído que as alterações não causam preocupação suficiente em termo de relação de risco/benefício para impactar no outro desenvolvimento clínico das intensidades de dosagem de 30 mg e 60 mg. A presente formulação da dose *baixa(100 mg)* não é adequada para outro desenvolvimento clínico por causa de um perfil de eficácia/efeito colateral mais fraco descrito abaixo.

Exemplo 2 – Formulação e Intensidade do Produto Medicinal Investigacional (IMP)

A formulação de rember[®] usada em TRx-014-001 consistiu em cápsulas de gelatina azul/azul de Tamanho 1 contendo uma carga semissólida compreendida de MTC, Gelucire 44/14 e Aerosil 200. Três intensidades de cápsula, diferindo somente em peso de carga, foram fabricados com 30, 60 e 100 mg de intensidades-alvo de MTC, respectivamente. Um placebo de combinação contendo somente Gelucire 44/14 foi fornecido. As cápsulas de gelatina dura e a gelatina usada para bandagem de cápsula cumpriram com as normas atuais com respeito a Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis.

A uniformidade das cápsulas foi testada quanto a Aparência, Uniformidade de peso de carga, Ensaio (modificado de USP 27), pureza cromatográfica (TLC como especificado por USP 27) e Dissolução usando o método de pá giratória da Farmacopeia Europeia e Farmacopeia dos Estados Unidos. Seis lotes de fabricação foram produzidos, e foram testados quanto à uniformidade e estabilidade.

Através desses estudos de dissolução, descobriu-se que a dissolução da cápsula de 100 mg em todas as condições *in vitro* foi mais lenta do que a cápsula de 30 mg e que esta diferença aumentou com o passar do tempo desde a fabricação (Figura 5). A cápsula de 60mg teve um perfil de dissolução intermediário relativo aos dados mostrados de 30mg e 100mg na Figura 5. Outros estudos mostraram que a reticulação acelerada das cápsulas de gelatina na presença de MTC em pesos de carga elevados (isto é, particularmente cápsulas de 100 mg) diminuiu a probabilidade de cápsulas quebradas iniciais, embora a dissolução subsequente das cápsulas quebradas fosse rápido. O MTC liberado das cápsulas foi constatado reter o nível esperado de bioatividade no ensaio de agregação de Tau *in vitro* (WO96/030766).

Este atraso na dissolução da cápsula de 100 mg é provável ter alterado o sítio primário de absorção do estômago pelo intestino delgado, levando ambos à absorção reduzida (levando a diarreia) e absorção da mai-

oria da dose biodisponível como uma espécie dimérica terapeuticamente inativa. A relação de dose-resposta envolvida descrita também abaixo indica que na presente formulação, a dose cognitivamente ativa equivalente disponível das cápsulas de 100 mg foi ~25 mg, quando comparado com as atividades cognitivas das doses de 30mg e 60mg.

A presente formulação limita a extensão a qual as doses mais elevadas de rember[®] podem ser exploradas clinicamente em estudos clínicos futuros. Como descrito também abaixo, não há nenhuma base teórica para um patamar de eficácia na dose de 60mg. É concluído que o patamar evidente em 60 mg tid reflete uma combinação de limitações em solubilidade, dissolução e absorção de rember[®] em dose mais elevada.

Exemplo 3 – Modelo de eficácia matemático

Um modelo matemático cinético foi desenvolvido para testar para ganho de um melhor entendimento do processo de Agregação de Tau e sua relação quantitativa com a deterioração cognitiva. A estrutura do modelo é ilustrada abaixo na Figura 6, mostrando as constantes de taxa relevante.

Uma ampla abordagem de fornecimento de dados experimentais foi usada para derivar estimativas das constantes de taxa principal no modelo acima. Esses incluem entre outras coisas: estudos clínico-patológicos quantitativos ligante à agregação de Tau e escore de MMSE em homens, estimação da taxa de progressão de estágios de Braak com o passar do tempo (Braak e Braak, 1991), relação de dose-resposta de fármaco em modelos de célula e no ensaio de ligação de Tau *in vitro*, relação dose-resposta de fármaco na redução de patologia de Tau em animais transgênicos, e um modelo farmacocinético de ligação de dose aos níveis cerebrais estimados de rember[®] em animais e em homens descritos também abaixo.

Os dados de experiência clínica foram usados para validar este modelo de eficácia que pode sucessivamente explicar as relações entre a agregação de Tau, demência clínica e perfil de eficácia clínica de rember[®]. Especificamente, nenhuma outra suposição envolvendo o acúmulo de proteína β -amiloide ou outros fatores neurotransmissores desconhecidos são formalmente requeridos. É surpreendente, dada a complexidade da patofi-

siologia de AD geralmente assumida no campo, que um conjunto extremamente econômico de suposições e constantes de taxa, possa fornecer a base total para um conjunto de relações formalmente definíveis ligando a taxa de progressão de demência clínica, os dinâmicos de cascata de agregação de Tau ilustrada acima e a eficácia de intervenção terapêutica de inibidor de agregação de Tau.

Há importantes inferências a serem tiradas do modelo na explicação do mecanismo de *rember*[®] de ação. Ao mesmo tempo em que parece *a priori*, e é geralmente considerado no campo, que a inibição da taxa de agregação de Tau através da redução na taxa de k_3 (isto é inibição sobre a produção lateral), seria importante explicar a eficácia, isto não é mostrado pelo modelo matemático. O modelo pode ser usado para mostrar que o impacto de um fármaco teórico que age somente no lado de influxo da cascata de agregação (por exemplo, estratégias para reduzir o alimento a montante dos produtos no estágio de agregado de tau) produziria somente uma redução transitória do tipo de etapa em agregação de Tau que seria compensada com o passar do tempo pela continuidade da agregação. Em outras palavras, o impacto teórico de um tal fármaco seria somente sintomático e não alteraria a taxa de progressão da doença, *mesmo que o mecanismo pareça ser potencialmente de modificação de doença por que alveja a patologia primária*. O modelo mostra que ainda haveria acúmulo progressivo de agregados de tau com o passar do tempo, e na mesma taxa como sem o fármaco. Isto é principalmente por causa da série de reações de depuração para os agregados de tau que permanecem ineficazes em um paciente de AD e deteriora com o passar do tempo em uma taxa que pode ser medida da progressão do estágio de Braak com o passar do tempo. No caso de estratégias anti-Tau potenciais, isto se aplica particularmente às abordagens que podem ser com base na inibição de fosforilação de Tau, mesmo se a fosforilação de Tau for considerado ser de taxa crítica para a agregação de Tau, que foi contestado pelos inventores (por exemplo, Wischik e outros, 1997). Isto também se aplica aos argumentos com base na taxa na qual a proteína β -amiloide pode, de alguma maneira ainda não conhecida, ativar a agregação

de Tau, como declarado pelas versões atuais recentes da teoria de A β de patogênese de AD (por exemplo, Selkoe, 2004).

A ação terapêutica mais importante de rember[®] consiste em sua capacidade de realçar a depuração de agregados de tau dissolvendo-se os agregados e liberando-se o agregado de tau previamente na forma de um monômero que pode ser processado através de uma série de reações de depuração muito mais eficiente, isto é, a série de reações proteassômicas. Em termos do modelo, a ação principal de rember[®] é realçar ou abrir a constante de taxa de k4b na Figura 6B. De fato, isto abre uma nova série de reações de depuração previamente indisponível para os agregados de tau. Esta nova série de reações de depuração, a série de reações de depuração proteassômicas, é descrita pela constante de taxa k4b na Figura 6B.

O efeito potente de depuração realçada no modelo cinético é devido ao efeito autocatalítico dos agregados, pelo fato de que a taxa de agregação é diretamente proporcional à concentração de agregado. Este é o mecanismo primário responsável pela alteração predita a longo prazo na taxa de progressão de doença, que foi mostrada na experiência clínica TRx-014-001. O modelo aumenta a possibilidade que rember[®], se dado muito antes da progressão de doença (isto é, em ou mesmo antes de MCI clínico), pode também modificar a deterioração estrutural série de reações de depuração do neurônio e fornece outro argumento para rember[®] como uma terapia preventiva primária.

Outra característica do modelo cinético é que ele prediria um efeito sintomático devido à dissolução inicial da carga de agregado de Tau existente. Esta explosão inicial de depuração de agregados existentes é predita pelo modelo a contribuir com uma melhora sintomática precoce. Isto também foi mostrado na experiência clínica de Fase 2 de rember[®].

A ação de modificação de doença tardia de rember[®] depende da extensão a qual a taxa de progresso de produção de oligômeros de Tau, e degradação de progresso da série de reações de depuração de ELM/proteassômica com o passar do tempo (que é o determinante final da taxa inerente de progressão através dos estágios de Braak com o passar do

tempo), pode ser neutralizado por depuração realçada devido à solvatação/solubilização de oligômeros Tau. Uma vez que esses fatores são diretamente proporcionais à concentração de agregado, pequenas alterações no perfil farmacocinético do fármaco podem ter um grande impacto na taxa de progressão de doença. Essas características do modelo foram novamente mostradas pela experiência clínica de Fase 2, e enfatiza a necessidade de maximizar a biodisponibilidade das espécies terapeuticamente ativas que são absorvidas. Em particular, não há nenhum mecanismo inerente no modelo em sua presente forma que prediga um patamar de dose-resposta.

10 Exemplo 4 - Relação entre Atividade Cognitiva e Hematológica

Há defeitos na formulação da cápsula de 100 mg, resumidos acima levando ao retardamento crescente na dissolução com o passar do tempo desde a fabricação. Outros estudos *in vitro* têm mostrado que isto é provavelmente devido à reticulação acelerada das cápsulas de gelatina na presença de MTC em pesos de carga elevados (isto é, cápsulas de 100 mg).

Os estudos publicados *in vitro* sugeriram que a absorção de MTC é um processo complexo que depende em parte da atividade de uma atividade de corante de tiazina reductase de superfície de célula intrínseca (Merker e outros., 1998; Merker e outros., 2002; May e outros., 2004). Um modelo farmacocinético ("PK") (descrito também abaixo) foi desenvolvido com base nos estudos publicados em seres humanos (DiSanto e Wagner, 1972a,b,c; Peter e outros., 2000) que sugere que a meia-vida de desaparecimento de MTC do compartimento de absorção primário seja 30 minutos, de acordo com o estômago sendo o lado de absorção primária para MTC oralmente ingerido.

MTC é altamente ionizado quando está na forma oxidada em pH 7 em um ambiente de não-redução. Como tal, tem fraca solubilidade de lipídeo. Entretanto, a redução para a forma reduzida ("L-MT") por adição de dois elétrons leva a uma espécie não carregada que é facilmente absorvida. Os estudos *in vitro* sugerem que esta etapa de redução possa somente ocorrer fisiologicamente em pH baixo. Esta propriedade explicaria o porquê do estômago ser o sítio de absorção mais provável. Os estudos de PK em roe-

dores, porcos, e primatas, indica que a forma predominante da porção de metiltionínio encontrada nos tecidos é a forma de L-MT incolor, e que após administração oral, somente uma pequena proporção contribui com a forma oxidada que pode ser facilmente medida no sangue. É, portanto provável que somente a forma de L-MT possa cruzar a barreira hematoencefálica, onde um novo estado estável é estabelecido entre as formas oxidadas e reduzidas nos neurônios. Após administração intravenosa, níveis substancialmente mais elevados da forma oxidada podem ser detectados no sangue do que após a administração oral da mesma dose (Peter e outros, 2000). Outros estudos de PK em porco mostraram que isto é devido a uma diferença no nível da forma de L-TM circulante após administração oral, e não como sugerido por Peter e outros., devido à fraca biodisponibilidade através da via oral. Isto sugere que MTC sofra redução durante a absorção oral e distribuição de tecido subsequente.

Em circunstâncias onde a dissolução foi retardada, como para a cápsula de 100 mg usada na experiência de rember[®], é provável que a absorção somente limitada da dose nominal possa ter ocorrido através do mecanismo de reductase que foi descrito. Isto levaria à absorção retardada do intestino delgado em pH mais elevado. Com base em estudos *in vitro* é deduzido que essas circunstâncias favoreceriam a formação de um dímero de monômeros de MTC oxidados que, o que é bem descrito na literatura (Rabinowitch e Epstein, 1941; Lewis e outros., 1943; Spencer e Sutter, 1979). Devido a um empilhamento antiparalelo, o dímero não tem nenhuma carga líquida. Portanto, a dissolução retardada seria esperada levar à absorção retardada de MTC no estado oxidado no pH mais elevado do intestino delgado. A partir de estudos *in vitro*, o dímero não seria esperado ter atividade terapêutica, porém teria efeitos hematológicos devido a sua capacidade de oxidar a hemoglobina.

Esta hipótese de dissolução retardada é de acordo com os dados derivados da experiência de rember[®]. Na essência, a experiência mostrou que MTC tem duas ações farmacológicas sistêmicas: efeitos cognitivos e efeitos hematológicos. Os efeitos cognitivos não mostram uma relação de

dose-resposta monotônica, ao passo que os efeitos hematológicos mostram (Figura 8). Isto sugere que duas espécies diferentes sejam responsáveis pelos dois tipos de atividade farmacológica: MTC absorvido como a forma de L-MT não carregada sendo responsável pela atividade cognitiva benéfica, e
5 MTC absorvido como uma espécie dimérica oxidada sendo responsável pela oxidação de hemoglobina. Se este for o caso, seria esperado que uma relação pudesse ser derivada do tempo de dissolução de ligação com as duas atividades farmacológicas distintas em diferentes resistências de cápsula. Este foi de fato constatado ser o caso, como mostrado na Figura 8.

10 Uma correlação muito elevada ($r = 0,996$) foi constatada entre a dissolução normalizada expressa como porcentagem dissolvida antes ou após 30 minutos, e os índices de atividade cognitiva ou hematológica normalizados relativos. Para a dissolução relativa, a porcentagem da dissolução total que ocorreu *in vitro* antes ou após 30 minutos, foi calculada. A divisão
15 correspondente de atividade farmacológica total foi derivada como mostrado na Figura 7.

Estaria em mente que a atividade cognitiva relativa em cada dose nominal é expressa como a proporção de atividade farmacológica total (isto é, cognitiva e hematológica) em cada dose nominal. Portanto, embora a
20 dose de 30 mg tenha um efeito cognitivo absoluto menor do que a dose de 60mg, ela tem um índice de atividade cognitiva relativa mais elevado relativo à atividade farmacológica total, por que tem menos atividade hematológica do que a dose de 60mg.

Inversamente, a falta de relação de dose-resposta monotônica
25 observada na análise de eficácia de ADAS-cog em 50 semanas indica que a dose eficaz terapêutica disponível da cápsula de 100 mg foi como indicado na Figura 8, isto é, aproximadamente 25 mg, ou um quarto da dose nominal, similar à dose de 30mg na atividade em 50 semanas. É por esta razão que nas análises apresentadas acima, a dose de 100mg foi indicada como "*baixa(100mg)*" para significar que a formulação dessas cápsulas não permite
30 liberação e absorção proporcional da dose nominal esperada em sua forma terapêuticamente ativa. Pareceria que um determinante principal de atvida-

de terapêutica no cérebro é dependente da absorção na forma de L-MT, que pode ser mediado através da capacidade desta forma cruzar a barreira hematoencefálica.

Essas análises fortemente sugerem que é possível dissociar os efeitos cognitivos benéficos da porção de metiltionínio de MTC de seus efeitos hematológicos indesejáveis otimizando-se a formulação. Como descrito em um pedido de patente não publicado depositado anteriormente (PCT/GB2007/001103, os conteúdos do qual estão aqui especificamente incorporados por referência), uma nova forma de sal reduzido estabelecida (designada "L-MTx") teria o benefício de ultrapassar a atividade de reductase que é necessária para a absorção da porção de metiltionínio de MTC. O L-MTx estável foi constatado ter solubilidade mais elevada do que MTC, e sob a dissolução permanece substancialmente no estado reduzido incolor durante mais do que 1 hora, permitindo a absorção direta como as espécies de metiltionínio reduzidas. Um outro benefício do L-MTx estabilizado pode ser que mesma eficácia mais elevada pode ser obtida por que as doses mais elevadas da forma terapêuticamente ativa podem ser absorvidas sem limitação pela capacidade da atividade de corante de tiazina reductase gástrico por um lado, e efeitos colaterais hematológicos e diarreia por outro lado. Esses são descritos também abaixo.

Como predito a partir da análise presente, a forma de sal de L-MT foi constatada ter significativamente menos toxicidade hematológica do que MTC. A Figura 9 mostra as diferenças entre MTC e L-MTx através de uma faixa de doses orais em termos de parâmetros principais de célula vermelha em ratos dosados diariamente durante 14 dias. Como pode ser visto, os animais dosados com L-MTx tiveram contagens maiores de células vermelhas ("RBC"), níveis mais elevados de hemoglobina ("HB") e concentração de hemoglobina de célula vermelha mais elevada ("MCHC"). O volume de célula vermelha médio foi menor ("MCV"), indicando que células vermelhas mais maduras foram liberadas da medula óssea, e a reticulocitose induzida pelos efeitos hemolíticos de MTC foi reduzida ("RETI").

Tabela 4. Análise estatística de diferenças em parâmetros principais de célula vermelha em ratos entre as doses de MTC e L-MTx.

Dose (mg / kg)	Diferença com respeito ao MTC	<i>p</i> -valor
Hemoglobina (g/dL)		
0 ⁽¹⁾	-0,39	0,427
15 ⁽²⁾	0,80	0,106
45 ⁽²⁾	1,43	0,00465
150 ⁽²⁾	3,03	<0,0001
Concentração média de hemoglobina de célula (g/dL)		
0 ⁽¹⁾	0,26	0,780
15 ⁽²⁾	0,80	0,392
45 ⁽²⁾	1,93	0,0414
150 ⁽²⁾	6,05	<0,0001
Volume médio de célula (fL)		
0 ⁽¹⁾	0,08	0,961
15 ⁽²⁾	-1,18	0,475
45 ⁽²⁾	-7,07	<0,0001
150 ⁽²⁾	-9,14	<0,0001
Contagem de célula vermelha (10⁶/mL)		
0 ⁽¹⁾	-0,27	0,171
15 ⁽²⁾	0,41	0,041
45 ⁽²⁾	1,17	<0,0001
150 ⁽²⁾	1,06	<0,0001
Reticulócitos (% de células vermelhas)		
0 ⁽¹⁾	-0,08	0,973
15 ⁽²⁾	-0,54	0,816
45 ⁽²⁾	-6,53	0,0063
150 ⁽²⁾	-7,59	0,0022
<p>1. O <i>p</i>-valor é de um teste de se o valor da dose de veículo único é significativamente diferente de zero.</p> <p>2. O <i>p</i>-valor é de um teste se o valor é significativamente diferente da dose de veículo único.</p>		

Exemplo 5 – Estudos Disponíveis

Como pode ser visto a partir da seguinte descrição, a otimização de uma dose terapêutica apropriada de MTC e sua formulação, são complexas. Uma barreira principal para isto é a falta de um modelo farmacocinético adequado. Embora tenham existido tentativas de gerar um modelo de PK, esses são contraditórios e não levam em conta todos os níveis disponíveis. Portanto, uma abordagem completamente nova de desenvolvimento de um modelo de PK foi requerida. Antes de apresentar isto, os dados e modelos disponíveis são resumidos.

Existem 3 estudos publicados de MTC em seres humanos. Esses são primeiro resumidos, e em seguida descritos juntos. Há outro estudo publicado em seres humanos (Rengelshausen e outros., (2004) Pharmacokinetic interaction of chloroquin and methylene blue combination against malaria. Eur. J. Clin. Pharmacol. 60: 709-715) que não é usado também no presente documento, uma vez que sua metodologia e descobertas são similares àquelas Peter e outros. (2000) descritas abaixo.

1) Estudo 1 da técnica anterior

Os primeiros estudos de referência sistemática foram realizados por DiSanto e Wagner (1972) e reportados em uma série de três documentos, dois dos quais estão resumidos abaixo.

1a) DiSanto AR e Wagner JG (1972a) Pharmacokinetics of highly ionized drugs I: whole sangue, urine and tissue assays. J Pharmaceut Sc 61: 598-601

O documento relata um método para análise de MTC em sangue total, urina e tecidos. Na essência, o método consiste em preparar a matriz aquosa com uma concentração de sal elevada (> 2M), extraindo MTC em dicloroetano, e medindo a absorção do extrato de dicloroetano total em 660 nm. Uma forma leuco estabilizado de MTC ("leuco-MTC") foi encontrada na urina, porém não identificada quimicamente. Isto pode ser analisado primeiro convertendo-se para "livre de MTC" adicionando-se HCl a 5 N e aquecendo-se em um banho de água em ebulição durante 2 minutos antes da extração em dicloroetano. A diferença entre o MTC recuperado da urina seguindo o tratamento com ácido e MTC recuperado sem tratamento com ácido ("livre

de MTC") foi reportado como "leuco-MTC".

1b) DiSanto AR e Wagner JG (1972b) Pharmacokinetics of highly ionized drugs II: absorption, metabolism and excretion in man and dog after oral administration. J Pharmaceut Sc 61: 1086-1090.

5 Neste estudo, 7 voluntários machos adultos com idade entre 21 e 40 anos e pesando entre 54,5 e 95,3 kg ingeriram 10 mg de MTC USP. A urina foi coletada nos intervalos tabulados abaixo. As taxas de excreção urinária média para MT oxidado ("Ox-MT", também referido como "livre de MB") e leuco-MT ("L-MT") com erros padrão correspondentes são mostradas na Tabela 5, e nas Figuras 10 e 11.

10 Tabela 5. Taxas de excreção e erro padrão ("se") para MTC oxidado ("Ox-MT") e MTC reduzido ("L-MT") de DiSanto e Wagner (1972).

Tempo (hr)	Tempo médio(hr)	Ox-MT (µg/hr)	se-Ox	L-MT (µg/hr)	se-L
0,5	0,25	2,31	1,06	14,01	6,98
1	0,75	20,59	5,05	385,06	97,98
2	1,5	38,66	7,50	659,14	104,79
3	2,5	50,56	14,50	474,29	96,93
4	3,5	40,66	8,76	384,43	49,37
6	5	53,01	12,37	290,50	49,26
9	7,5	42,86	17,55	120,29	29,91
24	16,5	37,99	6,43	78,72	13,77
33	28,5	24,34	7,53	41,87	9,91
48	40,5	11,02	2,43	26,77	5,18
57	52,5	5,00	1,16	14,11	5,49
72	64,5	4,98	1,31	7,88	2,29
81	76,5	2,53	0,69	6,39	2,05
96	88,5	1,74	0,48	3,09	1,53
105	100,5	1,23	0,43	3,02	1,60
120	112,5	0,88	0,28	1,91	0,83

Tabela 6. Dados de excreção urinária para Ox-MTC e L-MT

Parâmetro	Livre	Leuco
Kel	0,2263	0,2430
K12	0,7506	0,2962
K21	0,2381	0,1040
Ka	0,1626	0,9654
Tlag (hr)	0,2078	0,2381
VcF (L)	29,7918	8,2607
Correlação (média, obs vs pred)	0,9878	0,9920
Parâmetros Secundários Não-Compartmentais		
F	0,1483	0,4982
Vc (L)	4,4188	4,1152
Cl (L/hr)	6,7420	2,0074
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}$)	1483,24	4981,55
Excreção urinária (% de total)	22,94%	77,06%
MRT (hr)	24,5000	16,8774
T $\frac{1}{2}$ (distribuição, hr)	0,5930	1,1530
T $\frac{1}{2}$ (eliminação, hr)	15,0364	16,4953

As seguintes abreviações padrão são usadas na tabela: Kel (constante de taxa de eliminação de terminal), K12 (constante de taxa para transferência de compartimento putativo 1 para compartimento 2), K21 (constante de taxa para transferência compartimento putativo 2 para compartimento 1), Ka (constante de taxa de absorção, Tlag (tempo de atraso de absorção antes do fármaco é evidente no compartimento central (isto é, sangue)). VcF (Vc x F), F (biodisponibilidade calculada), Vc (volume teórico de distribuição de fármaco no compartimento central), AUC (área sob a curva, uma medição do fármaco total no sangue), MRT (tempo de permanência médio, tempo para 63,2% da dose administrada a ser eliminada), T $\frac{1}{2}$ (meia-vida).

A partir dos dados de excreção urinária, Ox-MT e L-MT diferem com respeito à fase de distribuição e biodisponibilidade evidente. Entretanto, a meia-vida de eliminação de terminal (~16 horas) e volume central evidente corrigido (4 L) são comparáveis (Tabela 6). A recuperação urinária total é 6,465 mg (isto é 65% de dose), da qual 23% são excretados como Ox-MT e 77% são excretados como L-MT.

2) Estudo 2 da Técnica Anterior

Isto é descrito por Peter C, Hongwan D, Kupfer A, Lauterberg BH (2000) Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue. Eur J Clin Pharmacol 56: 247-250.

Neste estudo 7 voluntários humanos (4 machos, 3 fêmeas) com idade de 19 – 53 foram dados 100 mg de MTC (313 μ M) em 3 ocasiões, pelo menos uma semana separadamente como uma injeção IV única (20 mg/ml em 0,9% de NaCl durante 30 s) ou duas cápsulas de 50 mg em gelatina, ou duas cápsulas de 50 mg em gelatina junto com 800 mg de Mesna (mercaptoetanossulfonato de sódio). O efeito farmacocinético de co-administração de Mesna foi incluído por causa do uso clínico de MTC em regimes de quimioterapia de câncer com base em ifosfamida para que Mesna seja coadministrado para prevenir a urotoxicidade.

A metodologia analítica para sangue diferenciada daquela usada por DiSanto e Wagner nos seguintes aspectos:

- Inclusão de um padrão interno
- Uso de hexanossulfonato de sódio como um par de íon para realçar a extração em dicloroetano
- Separação cromatográfica usando uma coluna de Nucleosil 100-5 CN com uma fase móvel isocrática, com efluxo monitorado em 660 nm.

Peter e outros, também mediram a excreção urinária de Ox-MT e L-MTC para 24 horas, porém reportaram somente meios de excreção total em intervalos terminando em 2, 4, 6, 10, 14, 24 hr pós-dose. O método analítico na urina foi referido ser essencialmente idêntico àquele de DiSanto e Wagner.

Os resultados não são tabulados pelos autores, porém são mostrados graficamente como reproduzido nas Figuras 14 e 15.

Os dados foram lidos desses gráficos e são tabulados abaixo.

Tabela 7. Concentração de Ox-MT no sangue total após administração IV de 5 100 mg de MTC.

Tempo (hr)	Sangue Ox-MT ($\mu\text{mol/L}$)
0,09	6,06
0,15	3,32
0,24	1,73
0,33	1,65
0,5	0,78
0,65	0,61
0,83	0,39
1,01	0,41
1,99	0,26
4	0,18

Tabela 8. Concentração de Ox-MT no sangue total após administração oral de 100 mg de MTC (média com e sem Mesna).

Tempo (hr)	Sangue Ox-MT ($\mu\text{mol/L}$)
0	0
0,09	0,00064
0,15	0,0011
0,24	0,0064
0,33	0,017
0,5	0,041
0,83	0,055
1,01	0,064
1,99	0,069
4	0,038

Peter e outros reportaram os seguintes parâmetros farmacocinéticos (Tabela 9).

Tabela 9. Parâmetros farmacocinéticos reportados por Peter e outros. (2000) para MTC administrado por vias intravenosas e orais.

Parâmetro	IV	Oral
AUC ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$)	0,134	0,011
Cl (L/hr) ¹	3	
% de dose excretada na urina em 24 hr	28,6	18,6
<i>Eliminação Estimada T_{1/2}:</i>		
Sangue (1 – 4 hr, hr)	5,25	
Urina (4 – 24 hr, hr)		6,6

1. Cl: depuração, o volume de sangue depurado de fármaco no tempo de unidade.

- 5 Peter e outros, também mencionam que a fração de MT total excretada na urina na forma de L-MB foi aproximadamente 1/3 do total, e isto não difere entre dosagem oral e IV.

3) Estudo 3 da Técnica Anterior

- 10 Isto é descrito em Moody JP, Allan SM, Smith AHW, Naylor GJ (1989) Methylene blue excretion in depression. Biol Psychiat 26: 847-858.

- 15 Este é um estudo limitado de excreção urinária de 24-hr durante um período de experiência de 3 semanas em pacientes deprimidos tomando 15 mg/dia (5 mg t.i.d.) ou 300 mg/dia (100 mg t.i.d.). As coleções de urina de vinte e quatro horas foram obtidas em 7 pacientes no final de 7, 14 ou 21 dias de tratamento. O método analítico foi referido ser aquele de DiSanto e Wagner. Os resultados são resumidos abaixo na Tabela 10.

Tabela 10. Sumário dos dados em excreção urinária de MTC em seres humanos do estudo por Moody e outros. (1989).

Estudo de Dose Repetida (15 mg/24hr)		Ox-MT (mg)	L-MT (mg)	
	Dias			
	7	6,1	7,2	
	14	5,3	8	
	21	6,1	6,4	
24 hr excreção urinária (mg)		5,8	7,2	
% de excreção urinária total		44,8%	55,3%	
F (biodisponibilidade evidente)		0,39	0,48	
Estudo de Dose Repetida (300 mg/24hr)				
	Dias			
	7	43,9	75,6	
	14	41,1	71,6	
	21	45,2	60,4	
24 hr excreção urinária (mg)		43,4	69,2	
% de excreção urinária total		38,6%	61,5%	
F (biodisponibilidade evidente)		0,14	0,23	
Estudo de Dose Única		Ox-MT	L-MT	Total-MT
		(mg)	(mg)	(mg)
	Dose (mg)			
	25	14,9	2,8	17,7
	50	28,1	2,7	30,8
	100	33,5	6	39,5
% de excreção urinária total				
	25	84,2%	15,8%	
	50	91,2%	8,8%	
	100	84,8%	15,2%	
F(biodisponibilidade evidente)				
	25	0,60	0,11	0,71
	50	0,56	0,054	0,62
	100	0,34	0,060	0,40

Os dados de dose única deste estudo foram combinados com aqueles dos estudos de DiSanto & Wagner e Peter e outros, para fornecer uma estimativa de biodisponibilidade oral evidente com base na excreção urinária em 48 hr de total-MT.

5 Descrição dos resultados principais

Existem vários respeitos nos quais os modelos desenvolvidos na base dos dados tabulados acima são inconsistentes. O mais importante é que a meia-vida de eliminação de terminal deduzida por Peter e outros. (5,5 – 6,3 hr) de análise de dados de concentração sanguínea é de acordo com a
10 meia-vida de eliminação de terminal deduzida por DiSanto e Wagner (15 – 16,5 hr) de dados de excreção urinária. É também de acordo com descoloração longa de urina observada seguindo a administração IV intraoperativo de MTC para localizar as glândulas paratiroide para cirurgia (Kuriloff e Sanborn, 2004). O problema surge por que Peter e outros. (2000) basearam
15 suas estimativas em dados sanguíneos obtidos de 4 hr, ou 12 hr no caso de Rengelshausen e outros. (2004) que seguiu a mesma abordagem farmacocinética. Essas análises deixam de levar em conta a fase de eliminação de terminal, por causa das dificuldades técnicas encontradas na estimação de níveis de Ox-MT no sangue, mesmo usando LC-MS (Cromatografia Líquida
20 – Espectroscopia de Massa) após os vasos sanguíneos caírem para abaixo dos limites de detecção. A fase de eliminação de terminal pode ser melhor analisada usando os dados de excreção urinária. Embora se saiba que a taxa de excreção urinária pode fornecer um modo válido de estimar a constante de taxa de eliminação em sistemas simples (por exemplo, Gibaldi e
25 Perrier (1982) *Pharmacokinetics*), o problema com os dados de MTC disponíveis é que é complexo, e não há nenhum modo óbvio de ligar os dados de sangue e dados de excreção urinária em um modelo integrado coerente único capaz de ser responsável pelos casos de dosagem IV e oral. Fornecer uma solução para este problema é crucial para o desenvolvimento de um
30 modelo previsível adequado que possa ser usado para otimizar a dosagem de MTC ou outras formas de MT para o tratamento de AD e em outros contextos terapêuticos. A solução para este problema é descrita abaixo.

Exemplo 6 – Desenvolvimento de Modelo Farmacocinético Integrado

i) Biodisponibilidade Oral

Os dados de Peter e outros, fornecem uma indicação útil de vasos sanguíneos seguindo administração oral vs IV. A comparação dos valores de AUC durante o período de tempo de 4 horas indica que os níveis sanguíneos seguindo a administração oral são 8,2% daqueles vistos após administração IV. Entretanto, esta estimativa não pode ser usada para determinar biodisponibilidade oral. É de acordo com Peter e outros, os dados de recuperação de urina em 24 horas, onde a recuperação urinária seguindo a dosagem oral foi constatada para 65% daquela obtida após dosagem IV (veja, Tabela 5). Esta figura é comparável com os dados de excreção urinária obtidos dos estudos de DiSanto e Wagner e the Moody e outros,.

Os dados desses estudos são combinados na Figura 16 para fornecer uma estimativa total de biodisponibilidade oral. É sugerida uma figura entre 40% - 80% dependendo da dose acima da faixa de 10 – 100 mg. É também evidente a partir da Figura 16 que há redução dependente da dose em biodisponibilidade como determinado pela recuperação urinária seguindo a dosagem oral.

Há, portanto, uma discrepância entre a estimativa de biodisponibilidade oral determinada de medição direta no sangue e aquela determinada da excreção urinária. Isto indica que os níveis de sangue baixos vistos no sangue seguindo a dosagem oral não podem ser explicados simplesmente por uma limitação na absorção como sugerido por Peter e outros. (2000). Os níveis de sangue baixos vistos após administração oral são mais prováveis de refletir uma diferença no volume evidente de distribuição para MTC administrado oralmente e pela via IV. A captação de tecido precoce rápida foi confirmada por DiSanto e Wagner que reportaram que 29,8% da dose intravenosa de MTC pode ser recuperada no coração, pulmão, fígado e rim em 2 minutos seguindo a administração no rato. Este desenho de uma fase de distribuição rápida precoce seguido após 10 hrs por uma fase de eliminação lenta é também de acordo com os dados de excreção urinária mostrados nas Figuras 12 e 13. Portanto, os dados sanguíneos coletados durante um

curso de tempo de 4 horas como fornecido por Peter e outros, não são suficientes para derivar uma estimativa válida de redistribuição de MT entre compartimentos de absorção, central e periféricos.

5 ii) Modelo construído combinando-se os dados sanguíneos de Peter e outros, (Tabelas 7&8) e dados de excreção urinária de DiSanto e Wagner (Tabela 5)

Uma abordagem para derivar um modelo farmacocinético dos estudos disponíveis é para usar equações diferenciais lineares para determinar diretamente um sistema de compartimentos que podem ser adaptados
10 aos conjuntos de dados disponíveis. Os dados usados são os conjuntos de dados de excreção urinária de DiSanto e Wagner para 7 pacientes listados na Tabela 5, levando em conta a excreção diferencial de Ox-MT e L-MT. Isto é combinado com os dados de nível sanguíneo de Peter e outros listados nas Tabelas 7 e 8, também com base em 7 pacientes. É suposto que os da-
15 dos de DiSanto e Wagner possam ser ligados a ambos conjuntos de dados de concentração sanguínea IV e oral após representação em escala apropriada na base que os perfis de excreção urinária como determinado por Peter e outros, foram similares às duas vias de administração (Figura 17).

Entretanto, o conjunto de dados de excreção urinária de DiSanto
20 e Wagner é usado para ajuste em preferência para os dados de Peter e outros, por que o último não explicitamente leva em consideração a excreção diferencial de Ox-MT e L-MT, e por que os intervalos de amostra são grosseiros com relação àqueles disponíveis do conjunto de dados de DiSanto e Wagner.

25 A modelagem foi feita em dois estágios:

No primeiro estágio os dados de concentração sanguínea de Peter e outros para 4 horas seguindo uma dose IV única de 100 mg de MTC foram combinados com o conjunto de dados de excreção urinária de DiSanto e Wagner para 120 horas para dose de MTC oral única de 10 mg. O Segun-
30 do estágio foi para ver se o sistema de compartimento igual ou similar pode ser usado para ajustar os dados de concentração sanguínea de Peter e outros seguinte à dose oral única de 100 mg de MTC, combinado com o conjun-

to de dados de excreção urinária de DiSanto e Wagner para 120 horas para dose de MTC oral única de 10 mg. Em ambos os casos, os parâmetros de representação em escala para permitir as diferenças de 10 vezes em dose foram estimados pelos modelos correspondentes.

5 A Figura 18 mostra a melhor distribuição de compartimentos e constantes de taxa correspondentes que podem ser ajustadas aos três conjuntos de dados (dados de concentração sanguínea de dosagem IV de Peter e outros [Tabela 7], dados de Ox-MT urinário de DiSanto e Wagner [Tabela 5] e dados de L-MT urinários [Tabela 5]). O compartimento central é C2. Os
10 parâmetros de representação em escala para permitir que exista uma diferença de 10 vezes nas doses usadas nos conjuntos de dados de sangue e urina foram explicitamente estimados pelo modelo para Ox-MT urinário (S-Ox) e L-MT (S-L) urinário e são mostrados na Tabela 11. A solução para o modelo requer dois compartimentos periféricos, mostrados como C3 e C4 na Figura
15 18, e outro compartimento de excreção (C5). Existem duas produções de C5, uma que representa a excreção urinária observada representada em escala de L-MT (designado K50 na Tabela 11), e uma segunda produção que representa uma perda não medida (designado K500 na Tabela 11), que é presumida representar o metabolismo hepático secundário de MT que é excretado
20 através da bile como um metabólito não medido. A produção de C3 (designado K30 na Tabela 11) representa a quantidade medida como Ox-MT urinário. As porcentagens mostradas representam divisões de excreção total predita em 120 horas, estimadas dos valores de AUC correspondentes.

Os parâmetros estimados pelo modelo são listados abaixo na
25 Tabela 11.

Tabela 11. Parâmetros modelo estimados para uma dose intravenosa única de 100mg de MTC. As constantes de taxa são como indicado na Figura 18. K50 é a constante de taxa de excreção urinária de C5, e K500 é a constante de taxa de excreção hepática presumida de C5. V2 é o volume evidente de
30 distribuição de MT em C2 calculado pelo modelo. S-Ox e S-L são os parâmetros de representação em escala calculados pelo modelo por serem responsáveis pelo fato que os dados urinários vieram de um experimento no

qual MTC foi administrado como uma dose oral de 10mg, e os dados sanguíneos vieram de um experimento no qual MTC foi administrado como uma dose IV única de 100mg.

Parâmetro	Estimativa
K23	1,60
K24	3,94
K30	0,0093
K32	0,088
K42	0,87
K45	0,28
K50	0,78
K500	0,081
S-Ox	10,6
S-L	6,3
V2	66,03
Correlações (observado vs predito):	
Sangue	0,98
Ox-MT urinário	0,96
L-MT Urinário	0,98

No segundo estágio, o mesmo modelo básico foi ajustado aos dados de concentração sanguínea de Peter e outros seguindo uma dose oral única de 100 mg de MTC (Tabela 8), e dados de excreção urinária representados em escala de DiSanto e Wagner (Tabela 5) seguindo a dose oral única de 10 mg de MTC.

Figura 22 mostra a melhor distribuição de compartimentos e constantes de taxa correspondentes que pode ser ajustada aos três grupos de dados (dados de concentração sanguínea de dosagem oral de Peter e outros [Tabela 7], dados de Ox-MT urinário de DiSanto e Wagner [Tabela 5] e dados de L-MT urinário [Tabela 5]). O modelo oral considera dois outros compartimentos antes do compartimento central (C2). Esses são C1 (o compartimento de absorção primária, considerado corresponder ao estômago), e

um segundo compartimento pré-central (C6, presumido representar um compartimento hepático de metabolismo de primeira passagem). Há uma perda de C1 (designado K100 na Tabela 12) que é presumível para representar MTC não absorvido, e também a perda de C6 (designado K600 na Tabela 12) que é presumido representar a perda devido ao metabolismo de primeira passagem. Os parâmetros de representação em escala para permitir o fato que exista uma diferença de 10 vezes nas doses usadas nos conjuntos de dados de urina e sanguíneo, foram explicitamente estimados pelo modelo para Ox-MT urinário (S-Ox) e L-MT urinário (S-L) e são mostrados na Tabela 12. No que diz respeito ao modelo IV, a solução para o modelo requer dois compartimentos periféricos, mostrados como C3 e C4 na Figura 22, e outro compartimento de excreção (C5). Existem duas produções de C5, uma que representa a excreção urinária observada representada em escala de L-MT (designado K50 na Tabela 12), e uma segunda produção que representa uma perda não medida (designado K500 na Tabela 12), que é suposta representar metabolismo hepático secundário de MT que é excretado através da bile como um metabólito não medido. A produção de C3 (designado K30 na Tabela 12) representa a quantidade medida como Ox-MT urinário. As porcentagens mostradas representam divisões de produção total predita da excreção do sistema em 120 horas, estimado dos valores de AUC correspondentes.

Os parâmetros estimados pelo modelo são listados abaixo na Tabela 12.

Tabela 12. Parâmetros de modelo estimados para dose oral única de 100mg de MTC.

Parâmetro	Estimativa
K100	0,44
K16	1,68
K23	1,39
K24	0,67
K30	0,016
K32	0,091
K42	0,00095
K45	2,059
K50	1,45
K500	0,61
K600	0,20
K62	0,35
S-Ox	12,3
S-L	19,6
Vc2 (L)	319,9
Correlações (observado vs predito):	
Ox-MT Sanguíneo	0,99
Ox-MT urinário	0,98
L-MT urinário	0,99

Os fatores de representação em escala para Ox-MT e L-MT urinários de DiSanto e Wagner (dose de 10 mg, oral) para ajuste com os dados de Peter e outros (dose de 100 mg, oral) são explicitamente estimados para a versão oral do modelo como S-Ox e S-L respectivamente. Outra modificação requerida para obter um ajuste para os dados orais foi a introdução de um atraso de tempo para os dados de excreção urinária de DiSanto e Wagner. Este atraso foi estimado como uma função não-linear variando

de 0,2 a uma hora para tempos de excreção mais cedo do que uma hora, e um atraso de tempo constante de uma hora, por conseguinte.

Como pode ser visto nas Tabelas 11 e 12, houve correlações muito elevadas (todas maiores do que 0,96) entre as produções de modelo e os conjuntos de dados de consumo, como pode também ser facilmente visto a partir das Figuras 19-21 e 23-25. O modelo, portanto, fornece um ajuste preciso para os dados experimentais.

iii) Comparações de produções de modelo com outras fontes de dados

Como uma verificação do modelo oral, suas produções foram comparadas com outros conjuntos de dados disponíveis.

As produções do modelo oral (Figura 22) foram primeiro comparadas com a taxa de excreção urinária reportada por Peter e outros, (2000) e mostradas acima na Figura 18. Esta comparação é mostrada abaixo na Figura 26. Houve boa concordância total, com a exceção do intervalo de coleta de 2 a 4 horas, quando o nível reportado por Peter e outros, foi metade daquele predito pelo modelo. Ao excluir este valor, a correlação entre os dois foi 0,86. A excreção total de 24 horas predita pelo modelo e aquela reportada por Peter e outros, é também comparada na Figura 26. O modelo prediz que a excreção urinária total foi 23% da dose, ao passo que a estimativa de Peter e outros, foi 18,6%.

Como uma verificação adicional no modelo, a excreção urinária de 48 horas predita total foi comparada com os dados mostrados acima na Figura 16, que compila os dados de excreção urinária de DiSanto e Wagner e Moody e outros. Isto é mostrado novamente na Figura 27, com a produção modelo indicada por "M", e os dados de Peter e outros, indicados por "P".

Finalmente, uma comparação foi feita entre as previsões do compartimento e os resultados de um estudo oral no qual os porcos foram administrados com uma dose de 20mg/kg, e níveis cerebrais de MT foram determinados. Os porcos foram dados uma administração oral única de MTC em um nível de dose-alvo de 20 mg/kg de peso corporal. Sangue (0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 e 48 h) e urina (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, e 24 h) foram coletados em pontos de tempo regulares até 48 horas. Dois animais foram sacrificados em cada das 1, 8, 24 e

48 h após a dose e amostras cerebrais retidas. A avaliação farmacocinética da base livre de MTC foi realizada em amostras de sangue total e tecido cerebral. Duas bateladas de amostra de tecido cerebral foram extraídas para cada animal e analisadas essencialmente como descrito por Peter e outros (2000).

5 O tecido cerebral (500 mg) foi vortexado e em seguida extraído com dicloroetano (5 ml) e a fase orgânica tomada para secagem em nitrogênio. O extrato foi absorvido com metanol e separado por HPLC de fase reversa com detecção ultravioleta. O método foi validado, usando padrão internos, em uma faixa de 10 a 2000 ng de MTC por grama de tecido. A exatidão de interocasião
10 média para MTC foi 107%, 95% e 105% em 20, 100 e 1600 ng/g, respectivamente e o coeficiente de variação em cada nível, não foi mais do que 20%.

A meia-vida de eliminação de terminal no porco foi constatada ser 23,5 horas tanto para o sangue quanto para o cérebro, de acordo com as descobertas de excreção urinária de DiSanto e Wagner indicando que a fase
15 de eliminação de terminal é muito mais longa do que o estimado ou por Peter e outros. (2000) ou Rengelshausen e outros. (2004).

Para usar os dados do porco para determinar que compartimento de modelo humano prediz os níveis cerebrais, o tempo-base para os dados do porco foi novamente representado por escala para corresponder à
20 meia-vida humana (15,7 hr).

Os resultados são mostrados na Figura 28. Todos os compartimentos foram novamente representados por escala quanto ao seu máximo respectivo. Pode ser visto a partir da Figura 28 que o compartimento central (C2, sangue) e C4 seguem um ao outro muito proximamente, indicando que
25 MT é livremente permutável entre C2 e C4.

Por outro lado, a eliminação de MT do cérebro do porco pode ser vista para confrontar a eliminação predita de C3, e não de C4. Portanto, dos dois compartimentos internos do modelo (C4 e C3), pode ser visto que C3 fornece uma predição de níveis cerebrais esperados.

30 iii) Interpretação do modelo farmacocinético integrado para MTC

As características farmacocinéticas principais dos modelos IV e oral são agora comparadas.

a) Modelo humano IV

As características cinéticas principais do modelo humano intravenoso são resumidas na Tabela 13. Os dados foram normalizados para o caso de uma dose de 100 mg única (313 μM).

- 5 Tabela 13. Sumário das características cinéticas principais do modelo PK intravenoso humano.

Modelo intravenoso									
		A-T $\frac{1}{2}$ ¹	D-T $\frac{1}{2}$ ¹	E-T $\frac{1}{2}$ ¹	AUC ²	AUC-out ³	%AUC-out ³	Tmax ⁴	MRT ⁵
Compartimentos centrais									
	C2	0,1	1,4	17,9	286				16,3
	C4	0,1	1,4	17,9	984			0,5	17,1
compartimento de profundidade									
	C3	1,3	1,4	17,9	4645			4,0	26,6
compartimento de Excreção									
	C5	0,6	1,6	17,9	320			2,0	18,2
Produções pós-centrais									
	C500					2377	8,2%		
	Ur-Ox-MT					3707	12,8%		
	Ur-L-MT					22836	79,0%		
	Produções Totais					28920			

1. Para cada dos compartimentos, as meias-vidas para uma fase de absorção (A-T $\frac{1}{2}$), uma fase de distribuição (D-T $\frac{1}{2}$) e uma fase de eliminação (E-T $\frac{1}{2}$) foram calculadas em hr, usando uma aproximação triexponencial para os dados da produção de modelo.
2. O AUC $_{\infty}$ ($\mu\text{mol-hr/l}$) foi calculado para MT em cada dos compartimentos "internos".
3. O AUC $_{\infty}$ ($\mu\text{mol-hr/l}$) foi calculado para MT em cada dos compartimentos pós-centrais, e esses foram mostrados em porcentagem.
4. O Tmax é o tempo calculado (hr) após a dose na qual o nível de MT em cada compartimento interno é máximo.
5. MRT é o tempo de permanência médio em cada compartimento, calculado como o tempo requerido para 63,2% da dose administrada a ser eliminada.

Compartimentos centrais. Como pode ser visto a partir da Tabela 13, e também da Figura 28, as propriedades cinéticas de MT nos compar-

timentos C2 e C4 são essencialmente idênticas, suportando o conceito que a forma de MT em C4 está em equilíbrio de permuta pronto entre a forma medida como o nível de sangue de Ox-MT no sangue em C2. Como o compartimento C4 é o determinante principal de excreção urinária da forma de L-MT medida na urina, é concluído que a forma C4 de MT representa o lado de L-MT do equilíbrio de L-MT – Ox-MT que existe no corpo. Após administração IV, a quantidade de MT em C4 alcança seu nível máximo em 30 minutos, e é, por conseguinte eliminada na taxa de eliminação de terminal comum.

Compartimento de Profundidade. Em contraste, pode ser visto que C3 no caso IV tem propriedades dinâmicas diferentes. Ele leva 4 horas após administração para o nível máximo de C3 ser alcançado, e o tempo de permanência médio em C3 é substancialmente mais longo do que em C2 ou C4. Levando em consideração os dados do cérebro do porco, é inferido que o compartimento C3 represente a mistura de MT que é cineticamente capturada dentro das células como descrito por May e outros. (2004).

De acordo com May e outros. (2004), MT precisa estar na forma de L-MT para cruzar a membrana celular. Dentro da célula, há um novo equilíbrio de L-MT – Ox-MT que é determinado por uma combinação do ambiente de redução predominante no meio intracelular, e o pH prevalecente dentro da célula (~ pH 7). Os experimentos *in vitro* (não mostrados) indicaram que é muito difícil manter MT no estado reduzido em pH 7 usando agentes de redução fisiologicamente aceitáveis em concentrações fisiologicamente aceitáveis. Isto é, em pH 7, MT tenderia a existir predominantemente no estado Ox-MT e não para as condições de redução predominantemente que são mantidas na célula. Entretanto, na forma Ox-MT, MT não pode difundir da célula. Isto cria condições para um novo equilíbrio por meio do qual MT é capturado nas células, levando ao acúmulo de MT intracelular contra um gradiente de concentração, que pode ser demonstrado em cultura de tecido (não mostrado). Isto explica a observação farmacocinética de outro modo paradóxica que MT é igualmente rapidamente distribuído para os tecidos seguindo a administração IV (como reportado por DiSanto e Wagner), porém, no entanto eliminado muito mais lentamente. Desse modo, DiSanto e

Wagner constataram que em 2 minutos de uma dose IV administrada em ratos, aproximadamente 25% podem ser recuperados dos órgãos principais.

De acordo com o modelo humano IV, o nível de MT que é medido na urina como a forma Ox-MT é estritamente relacionado cineticamente com as espécies que são capturadas em um ambiente intracelular, incluindo o cérebro, como indicado pelos dados de cérebro de porco.

b) Modelo humano oral

As características cinéticas principais do modelo humano oral são resumidas na Tabela 14. Os dados foram normalizados para o caso de uma dose única de 100 mg (313 μ M).

Tabela 14. Sumário das características cinéticas principais do modelo de PK oral humano (para detalhes veja rodapé da Tabela 13).

Modelo Oral								
	A-T $\frac{1}{2}$	D-T $\frac{1}{2}$	E-T $\frac{1}{2}$	AUC	AUC-out	%AUC-out	Tmax	MRT
compartimentos de Consumo								
C1				154				0,5
C6				467			0,9	2,4
Compartimentos Centrais								
C2	0,5	1,3	15,7	184			2,0	15,7
C4	0,5	1,3	15,7	60			2,0	16,0
Compartimento de Profundidade								
C3	1,4	1,3	15,7	2345			5,0	25,0
compartimento de Excreção								
C5	0,7	1,4	15,7	61			2,0	16,5
Produções pré-Centrais								
C100					7329	23,0%		
C600					9869	31,0%		
Produções pré-centrais								
C500					3422	10,7%		
Ur-Ox-MT					3202	10,0%		
Ur-L-MT					8060	25,3%		
Produções Totais								
					31882			

Compartimento de absorção primária. No modelo oral, há 2 compartimentos de consumo (C1 & C6) antes do aparecimento de MT nos compartimentos centrais (C2 & C4). Como descrito acima na seção *Relação entre Atividade Cognitiva e Hematológica*, as propriedades de C1 são cruciais na determinação da biodisponibilidade e forma na qual MT é absorvido. Como mostrado na Tabela 14, o tempo de permanência médio em C1 é 30 minutos. Pode ser calculado que 50% de MT foram absorvidos em 30 minutos, e que 90% de MT foram absorvidos de C1 em uma hora. Isto indica que C1 é o estômago, onde o pH baixo (pH ~ 2) favorece a conversão mediada por enzima de MT para a forma de L-MT que é facilmente absorvida (May e outros., 2004). É importante notar que 23% de MTC administrado escapam da absorção, e são por conseguinte perdidos (mostrado como C100 na Tabela 14). Portanto, a absorção de C1 é também crítica na determinação de quanto de MTC passa pelo trato gastrointestinal para o intestino distal onde a atividade antibiótica branda de MTC causa diarreia por repopulação da flora intestinal. As propriedades de C1 são, portanto cruciais para otimizar a absorção e eficácia de MTC, e minimizar os efeitos colaterais, ambos de MTC não absorvido (diarreia) e de MTC absorvido posteriormente como mostrado na experiência clínica (efeitos hematológicos colaterais).

Compartimentos centrais. Como para o modelo IV, as propriedades cinéticas dos compartimentos C2 e C4 são essencialmente idênticas no modelo oral. A diferença significativa entre os casos IV e oral é que a constante de taxa K24 (3,94) é tanto quanto 4x mais elevada no caso IV do que no caso oral (K24: 0,67). Isto indica que seguindo a administração IV, há um fluxo maior do Ox-MT administrado para a forma L-MT. Em contraste, no caso oral, o volume de MT já foi reduzido para a forma L-MT antes da entrada nos compartimentos centrais.

Uma outra diferença significativa que pode ser vista entre o modelo IV e o modelo oral é que o volume evidente estimado de distribuição de MT é muito maior no caso oral (320 L, Tabela 12) do que no caso IV (66L, Tabela 11). Esta diferença de quase 4 vezes é a explicação principal para a baixa concentração de Ox-MT observada no sangue seguindo administração

oral do que após administração IV. Isto foi explicado erroneamente por Peter e outros, (2000) como uma baixa biodisponibilidade. Embora seja verdade que aproximadamente metade da dose oralmente administrada é perdida por uma combinação de não absorção (a perda de C100 na Tabela 14 e Figura 22), e metabolismo de primeira passagem (a perda de C600 na Tabela 14 e Figura 22), o C2 AUC no caso oral é 64% do C2 AUC no caso IV. Portanto a biodisponibilidade evidente como determinada pelas relações de sangue AUC é muito próxima da biodisponibilidade evidente calculada dos dados de excreção de urina de DiSanto e Wagner, que indica que 65% da dose administrada podem ser recuperados na urina para o caso de dose de 10 mg.

Compartimento de Profundidade. O nível máximo de MT é visto nos compartimentos centrais 2 hr após administração. Em contraste, o nível máximo é alcançado no compartimento de profundidade (C3) somente em 5 horas após a administração. Novamente o tempo de permanência médio de MT em C3 é muito mais longo do que nos compartimentos centrais (25hr vs 16 horas). Portanto, as características de C3 são essencialmente idênticas nos modelos de dosagem IV e oral.

É importante comparar a biodisponibilidade evidente de MT em C3, que é representativo dos níveis cerebrais, entre as vias de dosagem oral e IV. O C3 AUC oral é 50% do C3 AUC IV. Portanto essencialmente a metade da dose oral fica disponível dentro das células comparado com o caso IV.

Exemplo 7 – Implicações de dosagem de modelo farmacocinético integrado

Um modelo farmacocinético integrado é um instrumento crítico requerido para:

- Otimização do regime de dosagem
- Otimização da formulação
- Estabelecimento da relação entre nível sanguíneo e eficácia

O parâmetro de planejamento principal que pode ser derivado do modelo farmacocinético é a predição dos níveis em estado estável obtidos em dosagem repetida. Será evidente que um modelo que assume uma

meia-vida de eliminação de terminal de 5 – 6 horas (Peter e outros., 2000; Rengelshausen e outros., 2004) produzirá estimativas muito diferentes do regime de dosagem ideal daquelas em que a meia-vida de eliminação é 16 hr. Pode ser estimado a partir do modelo integrado que foi desenvolvido que

5 um regime de dosagem de 3/dia terá implicações muito diferentes quanto aos níveis em estado estável preditos assumindo uma meia-vida de eliminação de 6hr vs 16hr. Desse modo, se as estimativas de Peter e outros, fosse verdade, então o fator de acúmulo (R, isto é, a relação de nível em estado estável para o nível de dose única) que seria visto para dosagem a

10 cada 8 horas seria 1,4. Em contraste, se a estimativa de 16hr for verdade, então o valor correspondente de R é 4,8 para dosagem a cada 8 horas. Isto indica que haveria uma diferença de 3,4 vezes no nível de estado estável esperado de MT (no sangue e no cérebro) de acordo com os dois modelos. É, portanto, difícil determinar relação exata entre dose e eficácia ou efeitos

15 colaterais sem um modelo farmacocinético válido.

A variável interveniente principal que liga dose e eficácia é uma estimativa dos níveis de estado estável de MT em compartimentos críticos em variação de frequências de dosagem regulares. O modelo permite essas serem determinadas como o nível de estado estável médio predito em C2 e

20 C3, como mostrado na Tabela 15.

Tabela 15. Níveis de estado estável médios preditos de MT nos compartimentos C2 e C3 como uma função da frequência de dosagem (valores em μmol).

	C2	C3
3/dia	4,8	295,5
2/dia	3,2	197,0
1/dia	1,6	98,5

25 Correlação entre a eficácia clínica observada e predita com base no modelo farmacocinético humano oral integrado

Primeiro foi examinada a relação entre a eficácia clínica observada (tamanho de efeito em unidades ADAS-cog em 50 semanas) e o nível de estado estável predito de MT no compartimento de profundidade (C3) que

é, como descrito acima, correlacionado com os níveis cerebrais medidos no porco. Isto é, a quantidade de MT em C3 e a concentração de MT no cérebro estão relacionadas por uma constante que depende da fração de MT que alcança o cérebro, e a precisão de detecção de MT total no cérebro.

5 Como este fator de representação em escala é no momento desconhecido no caso humano, com o propósito de outra descrição, a quantidade de MT em C3 é tomada como um substituto para o nível cerebral esperado. A relação é mostrada na Figura 29.

10 Como pode ser visto na Figura 29, há uma relação muito íntima entre o nível de estado estável médio predito de MT no cérebro e o tamanho de efeito clínico de rember[®] em TRx-014-001 para as doses de 30mg 3/dia e 60mg 3/dia. A relação não se mantém para a cápsula de 100 mg pelas razões descritas acima na seção *Relação entre Atividade Cognitiva e Hematológica*. Em essência, o atraso na dissolução da formulação da cápsula de 15 100 mg usada em TRx-014-001 não permitiu a absorção proporcional de MTC em sua forma terapeuticamente ativa.

Uma relação idêntica pode ser definida entre o nível sanguíneo de estado estável de MT (isto é, determinado por C2) e tamanho de efeito, como mostrado na Figura 30.

20 Implicações de dosagem e formulação de correlação entre eficácia clínica predita e observada com base no modelo farmacocinético humano oral integrado

A partir da análise antecedente, há a expectativa de uma relação de dose-resposta monotônica clara entre os níveis sanguíneos de MT que 25 podem ser medidos clinicamente e o tamanho de efeito. A partir disto, nomogramas apropriados podem ser calculados os quais levam em consideração a metodologia de medição. Isto é, a eficácia pode estar relacionada com os níveis sanguíneos, e os níveis sanguíneos terapêuticos podem ser especificados usando metodologia analítica apropriada.

30 Outra implicação da relação mostrada na Figura 30 é para calcular a relação entre a dissolução de cápsula observada e o déficit de eficácia, isto é, a diferença no tamanho de efeito entre o tamanho de efeito observado

e tamanho de efeito predito. Isto é mostrado na Figura 31.

Como pode ser visto a partir da Figura 31, há uma perda exagerada de eficácia predita quando o percentual observado de dissolução de cápsula em 30 minutos cai para abaixo de 20%. Isto confirma as conclusões obtidas acima na seção *Relação entre Atividade Cognitiva e Hematológica*, e confirma que a dissolução rápida é crítica para atividade terapêutica. Como descrito também na seção *Interpretação do modelo farmacocinético integrado para MTC*, isto pode ser explicado pelo papel crítico do estômago na absorção da porção de MT em sua forma terapeuticamente ativa.

Portanto, no planejamento de uma formulação melhorada de MTC, a ligação de eficácia predita é criticamente determinada pelo requerimento que a dissolução do produto medicinal investigacional (isto é, comprimido ou cápsula) é maior do que 50% em 30 minutos em condições padrão.

As relações descritas aqui têm implicações quanto às abordagens convencionais para obter um regime de dosagem mais conveniente, isto é 2/dia ou 1/dia. Esses regimes de dosagem seriam muito mais desejáveis em pacientes com demência, os quais são esquecidos e, portanto necessitam de estímulo para tomar a medicação. A abordagem convencional para obter um regime de dosagem mais conveniente é para criar uma formulação de liberação lenta. Entretanto, a presente análise indica que, ao contrário, uma formulação de liberação lenta de carregamento muito elevado de uma forma com base em MTC de um produto terapêutico essencialmente eliminaria a eficácia, como ilustrado convenientemente pelas propriedades da cápsula de 100 mg em TRx-014-001.

Outra inferência que pode ser tirada das Figuras 29 & 30 é que a dose de uma forma com base em MTC de um produto terapêutico necessitaria ser administrada em uma dosagem de unidade de 120 mg ou maior para obter um nível de eficácia comparável com aquele visto na experiência clínica TRx-014-001 com a dose de unidade de 60mg administrada 3 vezes por dia.

Outra inferência que pode ser tirada das Figuras 29 & 30 é que a

dosagem de unidade de 100mg ou mais administrada 3 vezes por dia seria requerida para obter um nível de eficácia mais elevado do que aquele visto na experiência clínica TRx-014-001. Entretanto, como descrito na seção *Sumário da Experiência clínica de Fase 2 TRx-014-001* há uma limitação na

5 quantidade de MTC que pode ser administrado na presente formulação por causa dos efeitos adversos e hematológicos crescentes e diarreia em doses em ou acima de 100mg 3/dia.

Implicações para formulações e regimes de dosagem melhorados

Como pode ser visto a partir da Figura 31A, há a perda exagerada de eficácia predita quando o percentual observado de dissolução de cápsula em 30 minutos cai para abaixo de 20%.

10

Portanto, no planejamento de uma formulação melhorada de MTC, a obtenção da eficácia predita é criticamente determinada pelo requerimento que a dissolução do produto medicinal investigacional (isto é, comprimido ou cápsula) seja maior do que 50% em 30 minutos em condições padrão.

15

As relações descritas aqui têm implicações quanto à abordagem convencional para obter um regime de dosagem mais conveniente, isto é, 2/dia ou 1/dia. Esses regimes de dosagem seriam muito mais desejáveis em

20 pacientes com demência, os quais são esquecidos, e, portanto necessitam de estímulo para tomar a medicação. A abordagem convencional para obter um regime de dosagem mais conveniente é para criar uma formulação de liberação lenta. Entretanto, a presente análise indica que, ao contrário, uma formulação de liberação lenta de uma forma com base em MTC de um

25 produto terapêutico essencialmente eliminaria a eficácia, como ilustrado convenientemente pelas propriedades da cápsula de 100 mg em TRx-014-001.

Outra inferência que pode ser retirada das Figuras 29 & 30 é que a dose de uma forma com base em MTC de um produto terapêutico necessitaria ser administrada em uma dosagem de unidade de 120 mg ou maior

30 para obter um nível de eficácia comparável com aquele visto na experiência clínica TRx-014-001 com a dose de unidade de 60 mg administrada 3 vezes por dia.

Outra inferência que pode ser retirada das Figuras 29 & 30 é que uma dosagem de unidade de 100mg ou mais administrada 3 vezes por dia seria requerida para obter um nível de eficácia mais elevado do que aquele visto na experiência clínica TRx-014-001. Entretanto, como descrito na

5 seção *Sumário da Experiência Clínica de Fase 2TRx-014-001* há uma limitação na quantidade de MTC que pode ser administrado na presente formulação por causa dos efeitos adversos e hematológicos crescentes e diarreia em doses em ou acima de 100 mg 3/dia.

10 Correlação entre os efeitos colaterais hematológicos observados e preditos com base no modelo farmacocinético humano oral integrado

Agora foi considerada a relação entre o nível de estado estável esperado de MT em C2 (sangue) e os efeitos colaterais hematológicos observados no estudo de TRx-014-001. Perda de células vermelhas em 24 semanas é considerada como a variável indicativa mais informativa. A relação é mostrada abaixo na Figura 31B.

15

Como pode ser visto na Figura 31B, o nível de perda de células vermelhas é muito mais elevado do que o nível de estado estável predito de MT no sangue. Isto é fortemente confirmador da hipótese de dissolução retardada descrita na seção *Relação entre Atividade cognitiva e hematológica*.

20 Especificamente, de acordo com a hipótese de dissolução retardada, uma forma muito distinta de MT é responsável pelos efeitos colaterais hematológicos. Isto foi postulado ser um dímero, a formação do qual é favorecida nas condições alcalinas do intestino delgado e intestino inferior. Portanto, os efeitos colaterais hematológicos observados em TRx-014-001 foram uma

25 consequência específica da formulação de cápsula de gelatina usada no estudo, e são improváveis de serem uma característica inerente da porção de MT propriamente dita, se absorvida através do estômago como descrito.

Exemplo 8 - Implicações para composições e regimes de dosagem melhorados

30 Absorção e eficácia

Como pode ser visto a partir da análise anterior, os fatores limitantes no nível de eficácia terapêutica que podem ser obtidos usando um

produto medicinal com base em MTC são uma combinação de limitações em absorção e limitações de efeito adverso. A presente seção descreve como essas limitações podem ser superadas levando em consideração a análise que foi possível pelo desenvolvimento do modelo farmacocinético integrado.

5 Foi primeiro comparada a dose real com a dose eficaz na Figura 32, calculada usando a mesma relação descrita na Figura 16.

Como pode ser visto, o fator de limitação de eficácia é uma combinação da limitação em absorção e metabolismo de primeira passagem descrito acima. Esses combinam limitar severamente o benefício que pode ser teoricamente obtido aumentando-se a dose. Na verdade, o patamar de eficácia evidente sugerido acima na Figura 7 é determinado quase completamente pela limitação na dose eficaz que pode ser liberada usando um produto medicinal com base na presente forma de MTC.

O pedido não publicado depositado anterior
15 PCT/GB2007/001103 descreve certas formas de sal reduzidas estabilizadas da porção de metiltionínio (referida a seguir como "L-MTx"). Nesse aspecto foi usado o modelo farmacocinético integrado, e a relação definida por ele com eficácia terapêutica observada em TRx-014-001 para determinar como esta nova composição de material pode ser usada para otimizar o tratamento de AD com base na porção de metiltionínio.

Foi primeiro considerada a fração predita de L-MTx oralmente administrado que seria esperado ser absorvida. Isto é calculado com base que a perda devido ao metabolismo de primeira passagem (isto é, a perda de C6 designado C600 na Tabela 14 e mostrado na Figura 22) não seria eliminada dosando-se com a forma de L-MTx form. Entretanto, é esperado que a perda devido à não-absorção inicial de C1 (isto é, a perda de C1 designado C100 na Tabela 14 e mostrado na Figura 22) seria eliminada dosando-se com a forma de L-MTx. Isto é por que a forma L-MTx (particularmente o sal de dibromidrato, PCT/GB2007/001103) tem mais do que duas vezes a solubilidade de MTC, e seria esperado desviar o corante de tiazina reductase (May e outros., 2004) que é presumido existir no estômago e é presumido ser necessário para a absorção. Com base nestas suposições, a

fração predita da dose absorvida, calculada a partir dos dados fornecidos pelo modelo é mostrada na Figura 33. Especificamente, as perdas de compartimento pré-central total quantificam para 54% da dose administrada para o caso de 100mg. Desta perda total, 43% são devido à não-absorção de C1. Isto é aplicado através das doses para estimar a biodisponibilidade esperada de L-MTx administrado permitindo a perda devido ao metabolismo de primeira passagem subsequente.

Uma vez que a absorção no compartimento central ocorreu, a eficácia predita pode ser determinada a partir das relações descritas acima ligando o nível de estado estável em C3 ou C2 com tamanho de efeito observado. Esses são mostrados para C3 na Figura 34.

As relações correspondentes entre eficácia clínica esperada de uma forma com base em L-MTx da porção de metiltionínio e nível de estado estável médio predito de MT em C2 (sangue) para uma faixa de regimes de dosagem de 1/dia to 3/dia são mostradas na Figura 35.

Como pode ser visto a partir das Figuras 34 & 35, é predito que um nível de eficácia de -8,1 unidades ADAS-cog pode ser obtido em um regime de dosagem de 100mg da forma de L-MTx administrada duas vezes por dia, que pode também ser obtido dosando-se com 60mg 3 vezes por dia. Níveis de eficácia ainda mais elevados seriam esperados usando 100mg ou mais administrados 3 vezes por dia.

É, portanto inferido que eficácia substancialmente mais elevada e regime de dosagem superior podem ser obtidos usando a forma L-MTx da porção de metiltionínio.

25 Segurança e tolerabilidade da forma L-MTx da porção de metiltionínio

Como descrito acima na seção *Relação entre Atividade cognitiva e hematológica*, uma limitação significativa na extensão a qual as doses mais elevadas de MTC podem ser administradas para obter melhor eficácia é devido às consequências combinadas de efeitos colaterais hematológicos e tolerabilidade deficiente devido à diarreia. Embora seja provável que a forma L-MTx substancialmente reduza a diarreia, não está claro que os efeitos hematológicos esperados seriam.

Como mostrado na Figura 9 e Tabela 4 na seção *Relação entre Atividade cognitiva e hematológica*, é esperado que a forma L-MTx tenha menos efeitos colaterais hematológicos com base nos estudos de rato descritos acima. Além disso, como descrito acima na seção *Correlação entre*
5 *efeitos colaterais hematológicos observados e preditos com base no modelo farmacocinético humano oral integrado*, é improvável que os efeitos hematológicos sejam inerentes à porção de MT propriamente dita, na faixa de dosagem requerida para atividade antidepressão. Em doses orais mais elevadas, mostradas, por exemplo, no estudo de rato acima, é claro que adverso
10 hematológico seria visto, porém é improvável que estas doses sejam alcançadas no uso clínico de formas com base em MTC de um produto medicinal.

Dada a relação de dose-resposta observada do estudo de rato descrito acima na seção *Relação entre Atividade cognitiva e hematológica*, o
15 efeito esperado na contagem de célula vermelha total pode ser calculado, como mostrado na Figura 36. Como pode ser visto, os efeitos colaterais hematológicos esperados quando desenvolvidos por declínio em contagem de célula vermelha, são esperados serem insignificantes.

20 Facilidade de formulação de liberação retardada da forma L-MTx da porção de metiltionínio

Ao passo que, pelas razões descritas acima, não seria fácil gerar a formulação de liberação prolongada de um produto medicinal com base em MTC, este não seria o caso para uma forma com base em L-MTx da porção de metiltionínio. Isto é por que a forma leuco do metiltionínio não
25 pode dimerizar. Isto é por que ela não é uma molécula "plana" (diferente de Ox-MT), e não tem carga que permita a estabilização da forma dimérica por neutralização de carga.

Portanto, é provável que uma formulação de liberação prolongada da forma com base em L-MTx da porção de metiltionínio seja fácil sem
30 encontrar as consequências adversas de absorção retardada. Isto pode ser criado em uma forma de dosagem uma vez ao dia.

Referências para os Exemplos 1-8

- Birks, J. (2006) Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* (1): CD005593.
- DiSanto, A.R., Wagner, J.G. (1972a) Pharmacokinetics of highly ionized drugs. I: Methylene blue - whole blood, urine and tissue assays. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61:598-602.
- 5 DiSanto, A.R., Wagner, J.G. (1972b) Pharmacokinetics of highly ionized drugs. II. Methylene blue - absorption, metabolism, and excretion in man and dog after oral administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61:1086-1090.
- 10 DiSanto, A.R., Wagner, J.G. (1972c) Pharmacokinetics of highly ionized drugs. III. Methylene blue - blood levels in the dog and tissue levels in the rat following intravenous administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61:1090-1094.
- 15 Gunics, G., Motohashi, N., Amaral, L., Farkas, S. & Molnar, J. (2000) Interaction between antibiotics and non-conventional antibiotics on bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* 14:239-42.
- Kristiansen, J.E., Amaral, L. (1997) The potential management of resistant infection with non-antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 20 40:319-327.
- Lewis, G.N., Bigeleisen, J. (1943) Methylene blue and other indicators in general acids. *The acidity function: J. Amer. Chem. Soc.*, 65:1144-1150.
- May, J.M., Qu, Z.C., Cobb, C.E. (2004) Reduction and uptake of methylene blue by human erythrocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 286:C1390-C1398.
- 25 Merker, M.P., Bongard, R.D., Kettenhofen, N.J., Okamoto, Y., Dawson, C.A. (2002) Intracellular redox status affects transplasma membrane electron transport in pulmonary arterial endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 282:L36-L43.
- Merker, M.P., Olson, L.E., Bongard, R.D., Patel, M.K., Linehan, J.H., Dawson, C.A. (1998) Ascorbate-mediated transplasma membrane electron transport in pulmonary arterial endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, 274:L685-L693.
- 30 Peter, C., Hongwan, D., Kupfer, A., Lauterburg, B.H. (2000) Pharmacokinetic

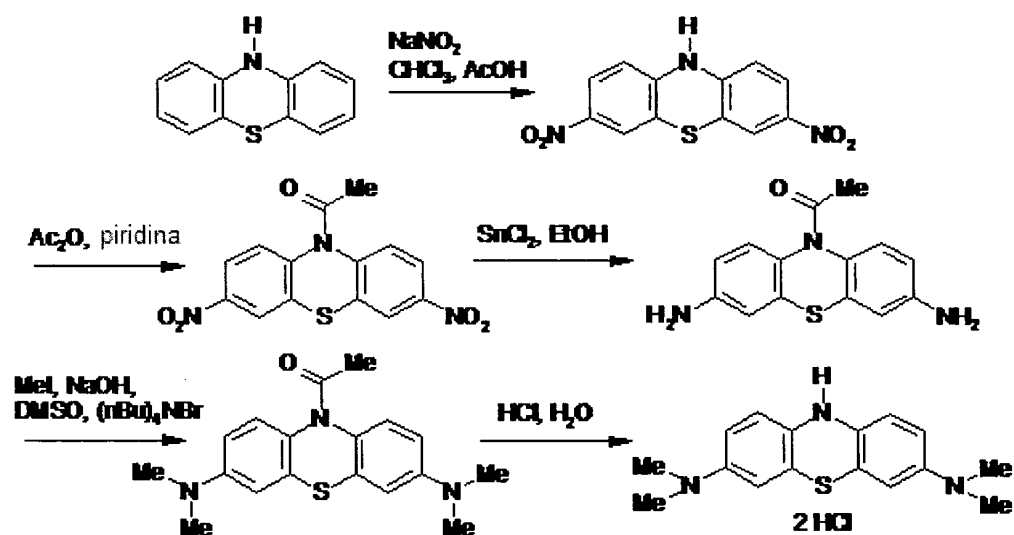
- ics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 56: 247-250.
- Rabinowitch, E., Epstein, L. (1941) Polymerization of dyestuffs in solution. Thionine and methylene blue. *J. Am. Chem. Soc.* 63:69-78.
- 5 Spencer, W., Sutter, J.R. (1979) Kinetic study of the monomer-dimer equilibrium of methylene blue in aqueous suspension. *J. Phys. Chem.*, 83:1573-1576.
- Selkoe, D.J. (2004) Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat. Cell. Biol.*, 6:1054-1061.
- 10 Moody, J.P., Allan, S.M., Smith, A.H., Naylor, G.J. (1989). Methylene blue excretion in depression. *Biol. Psychiatry*; 26:850-852.
- Rengelshausen, J., Burhenne, J., Frohlich, M., Tayrouz, Y., Singh, S.K., Riedel, K.-D., Muller, O., Hoppe-Tichy, T., Haefeli, W.E., Mikus, G. & Walter-Sack, I. (2004) Pharmacokinetic interaction of chloroquine and methylene
- 15 blue combination against malaria. *European Journal of Clinical Pharmacology* 60:709-715.
- Wischik, C.M., Lai, R.Y.K., Harrington, C.R. (1997) Modelling prion-like processing of tau protein in Alzheimer's disease for pharmaceutical development. In *Microtubule-Associated Proteins: Modifications in Disease*. (eds. J. Avila, R. Brandt, & K. S. Kosik) Harwood Academic Publishers, Amsterdam,
- 20 185-241.
- Gibaldi, M. and Perrier, D. (1982) *Pharmacokinetics*. 2ª edição Marcel Dekker Inc., New York.
- Braak, H., Braak, E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related
- 25 changes. *Acta Neuropathologica* 82:239-259.
- Kuriloff, D.B., Sanborn, K.V. (2004) Rapid intraoperative localization of parathyroid glands utilizing methylene blue infusion. *Otolaryngology - Head & Neck Surgery* 131:616-622.
- Exemplo 9 – Síntese química de compostos de DAPTZ de forma reduzida
- 30 cristalina estável

A seguinte descrição geralmente corresponde àquela no pedido não publicado, depositado, anterior PCT/GB2007/001103 (especificamente

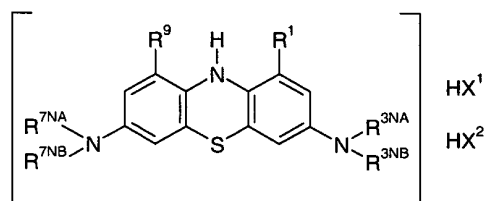
incorporado por referência), porém é incluída aqui para abrangência completa somente.

Por exemplo, uma fenotiazina adequada pode ser convertida para a 3,7-dinitro-fenotiazina correspondente, por exemplo, usando nitreto de sódio com ácido acético e clorofórmio. O grupo de amino de anel pode em seguida ser protegido, por exemplo, como o acetato, por exemplo, usando anidrido acético e piridina. Os grupos nitro podem em seguida ser reduzidos para grupos amino, por exemplo, usando cloreto de estanho (II) com etanol. Os grupos amino podem, em seguida ser substituídos, por exemplo, dissustituídos, por exemplo, metila dissustituída, por exemplo, usando iodeto de metila, hidróxido de sódio, DMSO, e brometo de tetra-n-butilamônio. O grupo amino pode em seguida ser desprotegido, por exemplo, o grupo N-acetila pode ser removido, por exemplo, usando ácido de cloridrato aquoso concentrado. O sal correspondente é em seguida preparado, por exemplo, usando ácido clorídrico aquoso concentrado, por exemplo, ao mesmo tempo em que a desproteção. Um exemplo de tal método é ilustrado no seguinte esquema.

Esquema 1



Desse modo, outro aspecto da invenção pertence a um método de preparação de um composto de 3,7-diamino-10H-fenotiazina da seguinte fórmula, para uso nos métodos de tratamento descritos acima:



em que R^1 , R^9 , R^{3NA} , R^{3NB} , R^{7NA} , R^{7NB} , HX^1 e HX^2 são como definidos aqui (por exemplo, onde HX^1 e HX^2 são cada HCl), compreendendo a etapa de:

(vi) formação de sal (SF).

Em uma modalidade, o método compreende as etapas de:

5 (v) desproteção de amino do anel (DP); e

(vi) formação de sal (SF).

Em uma modalidade, o método compreende as etapas de:

(iv) substituição de amina (AS),

desproteção de amino do anel (DP) opcional (v), e

10 (vi) formação de sal (SF).

Em uma modalidade, o método compreende as etapas de

(iii) redução de nitro (NR),

(iv) substituição de amina (AS),

(v) desproteção de amino do anel (DP), e

15 (vi) formação de sal (SF).

Em uma modalidade, o método compreende as etapas de pro-

teção de amino do anel (AP) opcional (ii),

(iii) redução de nitro (NR),

(iv) substituição de amina (AS),

20 (v) desproteção de amino do anel (DP), e

(vi) formação de sal (SF).

Em uma modalidade, o método compreende as etapas de

(i) nitração (NO),

(ii) proteção de amino do anel (AP),

25 (iii) redução de nitro (NR),

(iv) substituição de amina (AS),

(v) desproteção de amino do anel (DP), e

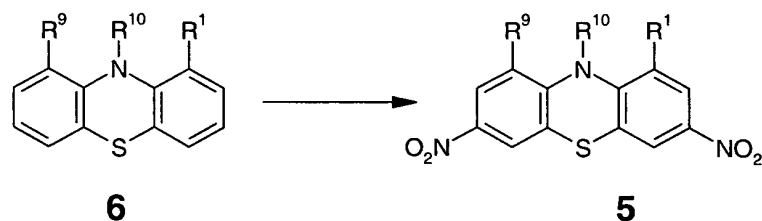
(vi) formação de sal (SF).

Em uma modalidade, as etapas são realizadas na ordem listada (isto é, qualquer etapa na lista é realizada ao mesmo tempo, ou subsequente a, ou precedendo a etapa na lista).

Em uma modalidade, a etapa de (v) desproteção de amino do
5 anel (DP) e a etapa de (vi) formação de sal (SF) são realizadas simultaneamente (isto é, como uma etapa).

Em uma modalidade, a etapa de nitração (NO) é:

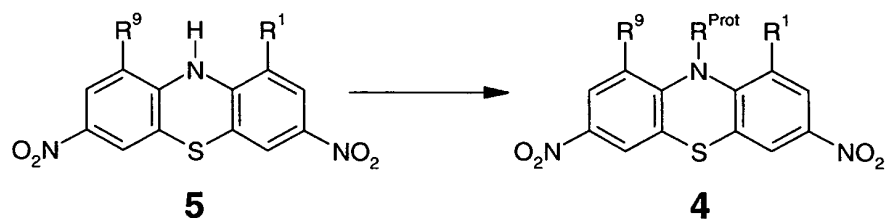
(i) nitração (NO), em que uma 10H-fenotiazina é convertida para uma 3,7-dinitro-10H-fenotiazina, por exemplo:



10 Em uma modalidade, a nitração é realizada usando um nitrato, por exemplo, nitrato de sódio, por exemplo, nitrato de sódio com ácido acético e clorofórmio. Em uma modalidade, R^{10} é -H.

Em uma modalidade, a etapa de proteção de amino do anel (AP) é:

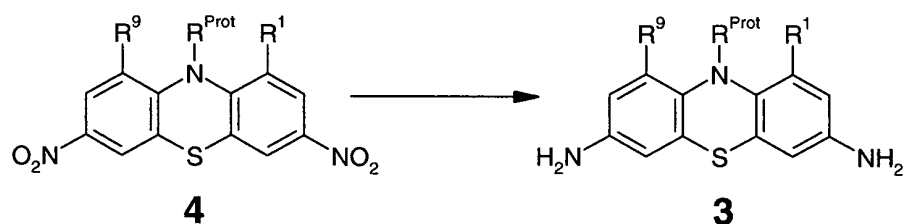
15 (ii) proteção de amino do anel (AP), em que o grupo amino do anel (-NH-) de uma 3,7-dinitro-10H-fenotiazina é convertido para um grupo amino do anel protegido (-NR^{prot}), por exemplo:



Em uma modalidade, a proteção de amino do anel é obtida como um acetato, por exemplo, usando anidrido acético, por exemplo, usando anidrido acético e piridina.

20 Em uma modalidade, a etapa de redução de nitro (NR) é:

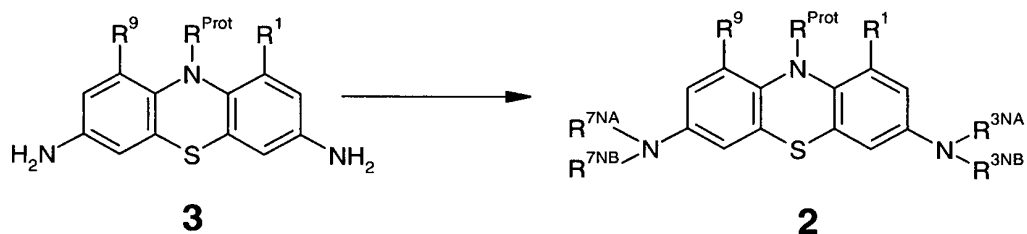
(iii) redução de nitro (NR), em que cada dos grupos nitro (-NO₂) de um 3,7-dinitro-10H-fenotiazina protegida é convertido para um grupo amino (-NH₂), por exemplo:



Em uma modalidade, a redução de nitro pode ser realizada usando, por exemplo, cloreto de estanho (II), por exemplo, cloreto de estanho (II) com etanol.

Em uma modalidade, a etapa de substituição de amina (AS) é:

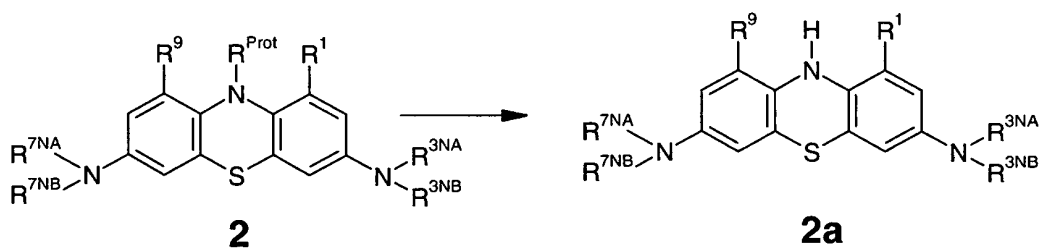
- 5 (iv) substituição de amina (AS), em que cada dos grupos amina (-NH₂) de uma 3,7-diamino-10H-fenotiazina protegida é convertido para grupo amina dissustituído, por exemplo:



- 10 Em uma modalidade, a substituição de amina é realizada usando um haleto de alquila, por exemplo, um iodeto de alquila, por exemplo, iodeto de metila, por exemplo, iodeto de metila com hidróxido de sódio, DMSO, e brometo de tetra-n-butilamônio.

Em uma modalidade, a etapa de desproteção de amina do anel (DP) é:

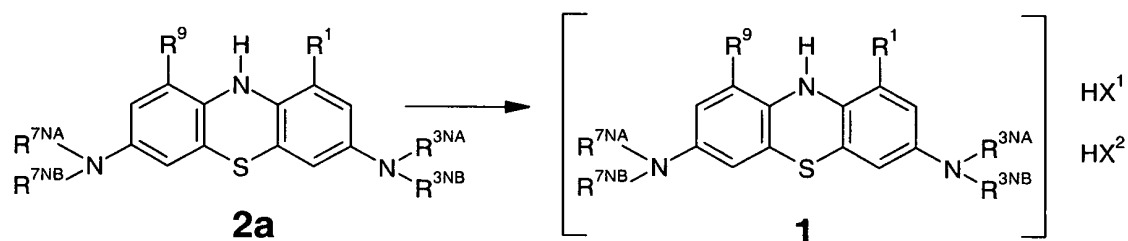
- 15 (v) desproteção de amina do anel (DP), em que o grupo de desproteção, R^{Prot}, é removido, por exemplo:



Em uma modalidade, a desproteção de amina do anel pode ser realizada usando ácido, por exemplo, ácido clorídrico, por exemplo, ácido clorídrico aquoso concentrado.

Em uma modalidade, a etapa é:

(vi) formação de sal (SF), em que o sal correspondente é formado, por exemplo:

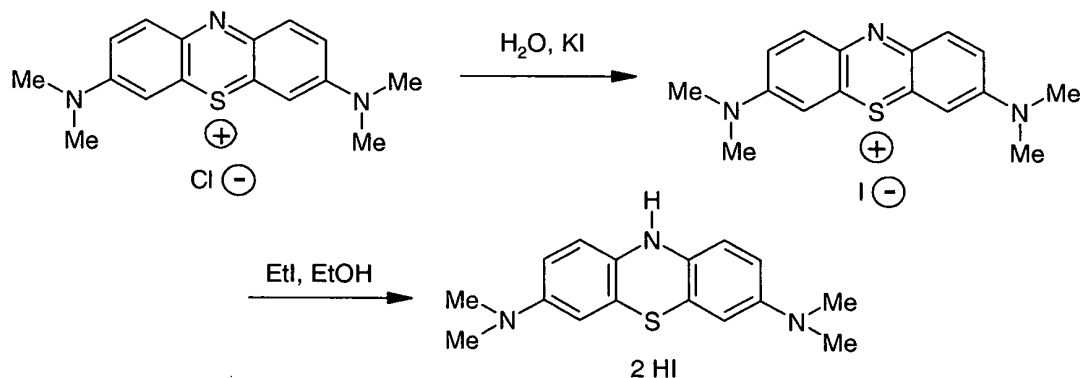


Em uma modalidade, a formação de sal pode ser realizada usando ácido, por exemplo, ácido clorídrico, por exemplo, ácido clorídrico aquoso concentrado.

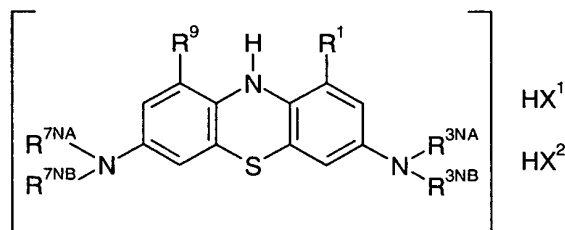
Em uma modalidade, as etapas de desproteção de amino do anel e formação de sal são realizadas simultaneamente (isto é, como uma etapa), por exemplo, composto (1) é formado do composto (2) em uma etapa.

Em outra abordagem, um cloreto de tionínio adequado (por exemplo, cloreto de metiltionínio, MTC) é convertido para o haleto correspondente, por exemplo, por reação com iodeto de potássio, por exemplo, iodeto de potássio aquoso. O iodeto de tionínio resultante é em seguida reduzido, por exemplo, com iodeto de etila e etanol, e o sal formado correspondente. Um método similar é descrito em Drew, H.D.K, e Head, F.S.H., "Derivatives of Methylene-blue," Journal of the Chemical Society, 1933, pp. 248-253. Um exemplo de tal método é ilustrado no seguinte esquema.

Esquema 2



Desse modo, outro aspecto da invenção pertence a um método de preparação de um composto de DAPTZ da seguinte fórmula, para uso nos métodos de tratamento descritos acima:



em que R^1 , R^9 , R^{3NA} , R^{3NB} , R^{7NA} , R^{7NB} , HX^1 e HX^2 são como definidos aqui
5 (por exemplo, onde HX^1 e HX^2 são cada HI), compreendendo a etapa de:

(ii) redução e formação de sal de iodeto (RISF).

Em uma modalidade, o método compreende as etapas de:

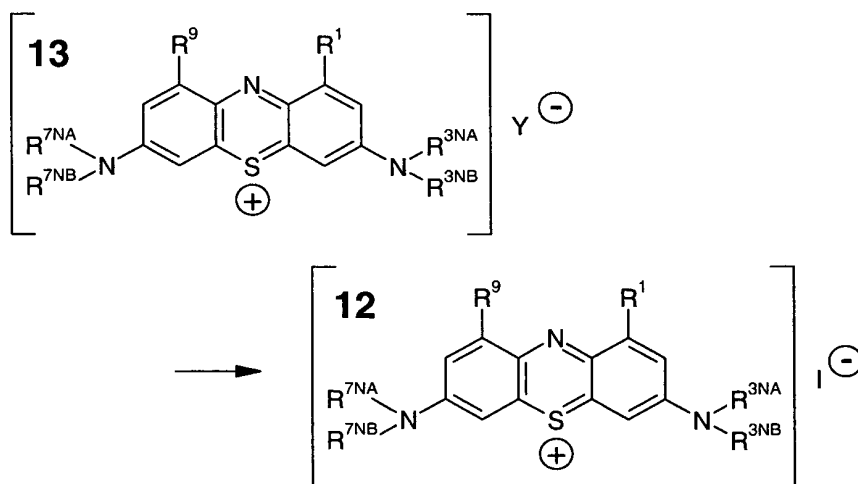
(i) permuta de iodeto (IE); e

(ii) redução e formação de sal de iodeto (RISF).

10 Em uma modalidade, as etapas são realizadas na ordem listada (isto é, qualquer etapa na lista é realizada ao mesmo tempo, ou subsequente à etapa anterior na lista).

Em uma modalidade, a etapa de permuta de iodeto (IE) é:

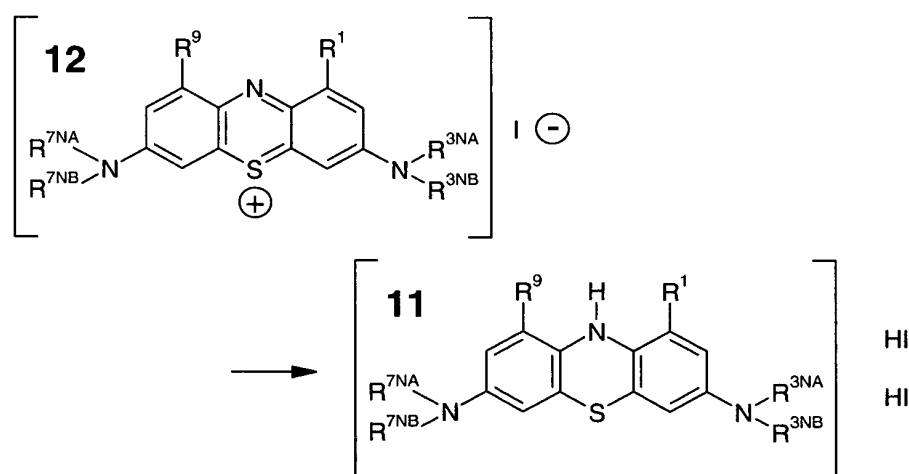
15 (i) permuta de iodeto (IE), em que um sal de 3,7-di(amino dissubstituído)-tionínio é convertido para o iodeto de 3,7-di(amino dissubstituído)-tionínio correspondente, por exemplo, (onde Y^- é um contraíon aniônico, por exemplo, haleto, por exemplo, cloreto ou brometo):



Em uma modalidade, permuta de iodeto (IE) é obtida por reação com iodeto de potássio, por exemplo, iodeto de potássio aquoso.

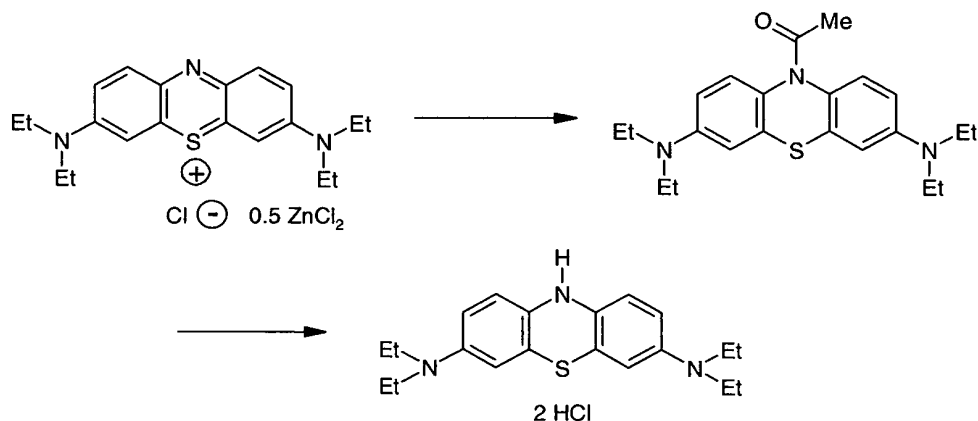
Em uma modalidade, a etapa de redução e formação de sal de iodeto (RISF) é:

- 5 (ii) redução e formação de sal de iodeto (RISF), em que um iodeto de 3,7-di(amino dissustituído)-tionínio é reduzido e convertido para o composto de iodeto de 3,7-diamino-10H-fenotiazina correspondente, por exemplo:

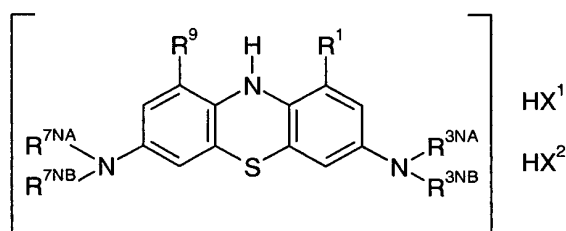


- 10 Em uma modalidade, a redução e formação de sal de iodeto (RISF) são obtidas por reação com iodeto de etila, por exemplo, iodeto de etila e etanol.

- 15 Em outra abordagem, um sal de tionínio apropriado, por exemplo, cloreto de semizincó de tionínio de etila, é simultaneamente reduzido e o grupo de amino do anel protegido, por exemplo, por reação com fenilidrazina, etanol, anidrido acético, e piridina. O sal correspondente pode em seguida ser preparado, por exemplo, usando ácido clorídrico aquoso concentrado, por exemplo, ao mesmo tempo em que a desproteção. Um exemplo de tal método é ilustrado no seguinte esquema.

Esquema 3

Desse modo, outro aspecto da invenção pertence a um método de preparação de um composto de 3,7-diamino-10H-fenotiazina (DAPTZ) da seguinte fórmula:



5 em que R^1 , R^9 , R^{3NA} , R^{3NB} , R^{7NA} , R^{7NB} , HX^1 e HX^2 são como definidos aqui (por exemplo, onde HX^1 e HX^2 são cada HI), compreendendo a etapa de:

(iv) formação de sal (SF).

Em uma modalidade, o método compreende as etapas de

(iii) desproteção de amino do anel (DP), e

10

(iv) formação de sal (SF).

Em uma modalidade, o método compreende as etapas de

(ii) proteção de amino do anel (AP),

(iii) desproteção de amino do anel (DP), e

(iv) formação de sal (SF).

15

Em uma modalidade, o método compreende as etapas de

(i) redução (RED)

(ii) proteção de amino do anel (AP),

(iii) desproteção de amino do anel (DP), e

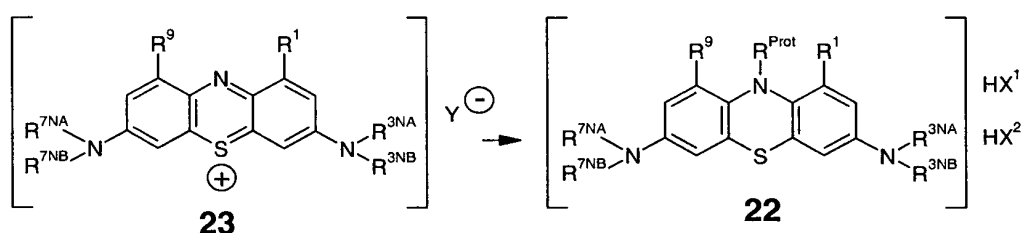
(iv) formação de sal (SF).

Em uma modalidade, as etapas são realizadas na ordem listada (isto é, qualquer etapa na lista é realizada ao mesmo tempo em que, ou subsequente, a etapa anterior na lista).

Em uma modalidade, a etapa de (i) redução (RED) e a etapa de (ii) proteção de amino do anel (AP) são realizadas simultaneamente (isto é, como uma etapa).

Por exemplo, em uma modalidade, a etapa de redução combinada (RED) e etapa de proteção de amino do anel (AP) são:

(i) redução (RED) e proteção de amino do anel (AP), em que um sal de 3,7-di(amino dissustituído)-tionínio é reduzido para produzir a 3,7-di(amino dissustituído)-10H-fenotiazina correspondente, e o grupo de amino do anel (-NH-) da 3,7-di(amino dissustituído)-10H-fenotiazina é convertido para um grupo de amino do anel protegido (-R^{Prot}) para produzir a 3,7-di(amino dissustituído)-10H-fenotiazina protegida correspondente, por exemplo:



Em uma modalidade, Y representa Cl⁻.

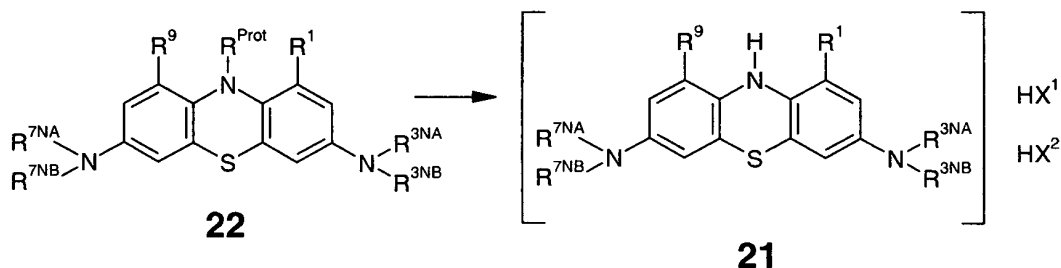
Em uma modalidade, a etapa de redução combinada (RED) e etapa de proteção de amino do anel (AP) são obtidas usando fenilidrazina e anidrido acético, por exemplo, fenilidrazina, etanol, anidrido acético, e piridina.

Em uma modalidade, a etapa de (iii) desproteção de amino do anel (DP) e a etapa de (iv) formação de sal (SF) são realizadas simultaneamente (isto é, como uma etapa).

Por exemplo, em uma modalidade, a etapa de desproteção de amino do anel (DP) combinada e etapa de formação de sal (SF) são:

(ii) desproteção de amino do anel (DP) e formação de sal (SF), em que o grupo de desproteção de uma 3,7-di(amino dissustituído)-10H-

fenotiazina protegida é removido para produzir uma 3,7-di(amino dissubstituído)-10H-fenotiazina, e o sal correspondente é formado, por exemplo:



Em uma modalidade, a etapa de desproteção de amino do anel (DP) combinada e etapa de formação de sal (SF) podem ser realizadas usando ácido, por exemplo, ácido clorídrico, por exemplo, ácido clorídrico aquoso concentrado.

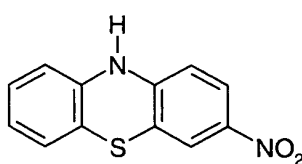
Em uma abordagem similar, um cloreto de tionínio apropriado (por exemplo, cloreto de tionínio de metila, cloreto de tionínio de etila) é primeiro reduzido e acetilado para produzir a 1-(3,7-bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanona correspondente, por exemplo, por reação com hidrazina (NH_2NH_2), hidrazina de metila (MeNHNH_2), ou boroidreto de sódio (NaBH_4); e anidrido acético ($(\text{H}_3\text{CCO})_2\text{O}$); por exemplo, na presença de uma base adequada, por exemplo, piridina ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) ou base de Hunig (diisopropiletilamina, $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}$), por exemplo, em um solvente adequado, por exemplo, etanol ou acetonitrila. O composto reduzido e acetilado é em seguida desprotegido (removendo-se o grupo acetila), por exemplo, por reação com um ácido hálco adequado, por exemplo, ácido clorídrico, em um solvente adequado, por exemplo, etanol, e opcionalmente com a adição de um éter adequado, por exemplo, éter de dietila.

Os exemplos específicos são como seguem:

Síntese Química

Síntese 1

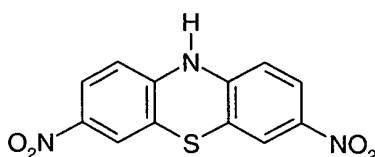
3-Nitro-10H-fenotiazina



Nitreto de sódio (20,00 g, 210 mmols) foi adicionado a uma mistura de 10H-fenotiazina (20,00 g, 50 mmols), clorofórmio (100 cm³), e ácido acético (20 cm³), e a mistura foi agitada durante uma hora em temperatura ambiente. Ácido acético (20 cm³) foi em seguida adicionado e a mistura foi agitada durante um adicional de 18 horas. A suspensão foi filtrada e lavada com ácido acético, etanol, água, e finalmente etanol para produzir um sólido violeta/marrom. O resíduo foi dissolvido em DMF quente e permitido esfriar antes de filtrar o composto di-nitro como um sólido violeta. A concentração da solução de DMF e lavagem do precipitado com água e metanol produziu o composto mono-nitro do título (15g, ~50%) como um sólido marrom; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹: 3328 (NH), 3278 (NH), 3229 (NH), 3119 (CH), 3049 (CH), 1557 (NO₂), 1531 (NO₂); δ_{H} (250 MHz; DMSO): 6,64 (5H, m, ArH), 7,68 (1H, d, *J* 2,5, ArH), 7,79-7,84 (1H, dd, *J* 2,75, 6,5, ArH); δ_{C} (62,9 MHz; DMSO): 113,3 (ArC), 115,3 (ArC), 116,9 (ArC), 121,8 (ArC), 123,6 (ArC), 123,7 (ArC), 124,6 (ArC), 126,4 (ArC), 128,1 (ArC), 138,8 (ArC), 141,0 (ArC), 147,8 (ArC).

Síntese 2

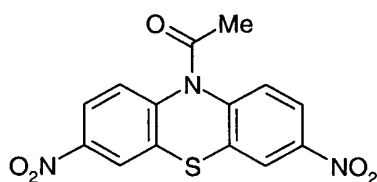
3,11-Dinitro-10H-fenotiazina



O procedimento para a síntese de 3-nitro-10H-fenotiazina foi seguido usando-se 3-nitro-10H-fenotiazina (10,00 g, 41 mmols), clorofórmio (40 cm³), ácido acético (2 x 10 cm³), e nitreto de sódio (11,86 g, 173 mmols). O resíduo obtido foi recristalizado de DMF para produzir o composto di-nitro do título (6,60 g 56%) como resíduo violeta; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹: 3331 (NH), 3294 (NH), 3229 (NH), 3101 (CH), 3067 (CH), 1602 (NO₂), 1558 (NO₂); δ_{H} (250 MHz; DMSO): 6,73-6,76 (2H, d, *J* 9, ArH), 7,78 (2H, s, ArH), 7,89-7,85 (2H, d, *J* 9, ArH).

Síntese 3

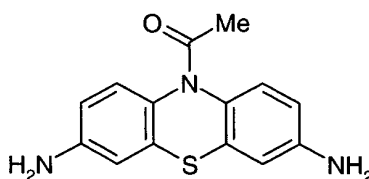
1-(3,7-Dinitro-fenotiazin-10-il)-etanona



Uma solução de 3,11-dinitro-10H-fenotiazina (3,00 g, 10,37 mmols), anidrido acético (15,88 g, 155,50 mmols), e piridina (30 cm³) foi agitada em refluxo durante 18 horas. A solução aquecida foi em seguida cuidadosamente derramada sobre água gelada. Um precipitado se formou e foi filtrado, dissolvido em diclorometano, secado em sulfato de magnésio, filtrado, e concentrado para produzir um sólido marrom/laranja, que foi purificado por cromatografia de coluna (SiO₂, acetato de etila : éter de petróleo, 2:3, carregada como uma solução de diclorometano) para produzir o composto do título (2,46 g, 71%) como um sólido amarelo-claro que pode ser recristalizado de acetona para produzir resíduos amarelo-claros; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹: 3091 (CH), 3063 (CH), 1680 (C=O), 1575 (NO₂), 1510 (NO₂); δ_{H} (250 MHz; CDCl₃): 2,28 (3H, s, CH₃), 7,65-7,69 (2H, d, *J* 9, ArH), 8,22-8,26 (2H, dd, *J* 2,75, 8,75, ArH), 8,33-8,32 (2H, d, *J* 2,5, ArH); δ_{C} (62,9 MHz; CDCl₃): 168,2 (C=O), 146,3 (ArC), 143,3 (ArC), 133,6 (ArC), 127,8 (ArC), 123,4 (ArC), 122,9 (ArC), 23,1 (CH₃); *m/z* (ES) 331,0 (80%, [M]⁺).

Síntese 4

1-(3,7-Diamino-fenotiazin-10-il)-etanona

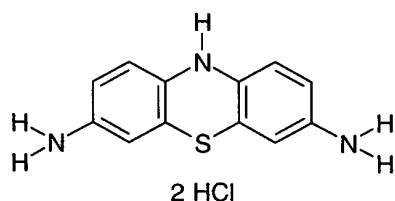


Uma mistura de 1-(3,7-dinitro-fenotiazin-10-il)-etanona (2 g, 6,04 mmols), diidrato de cloreto de estanho (II) (14,17 g, 62,8 mmols), e etanol (50 cm³) foi aquecida para refluxo e agitada nesta temperatura durante 5 horas. A mistura foi em seguida resfriada em temperatura ambiente e derramada em água gelada. O pH foi ajustado para 7 com 5% de hidrogeno car-

bonato de sódio antes do produto ter sido extraído com acetato de etila (3 x 50 cm³). Os extratos foram lavados com salmoura e secados em sulfato de magnésio, filtrados, e concentrados para produzir o composto do título (1,64 g, 100%) como um sólido azul violeta; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹: 3445 (NH), 3424 (NH), 3368 (NH), 3322 (NH), 3203 (NH), 3054 (CH), 2995 (CH), 1706 (C=O), 1650 (NO₂), 1590 (NO₂); δ_{H} (250 MHz; CDCl₃): 2,01 (3H, s, CH₃), 5,09-5,43 (4H, brd s, NH), 6,47-6,51 (2H, dd, *J* 1,5, 8,25, ArH), 6,61 (2H, s, ArH), 7,11-7,15 (2H, d, *J* 8, ArH); δ_{C} (62,9 MHz; CDCl₃): 169,1 (C=O), 147,2 (ArC), 128,1 (ArC), 127,6 (ArC), 127,3 (ArC), 112,3 (ArC), 111,5 (ArC), 22,6 (CH₃); m/z (ES) 293,9 (95%, [M + H, Na]⁺), 272,0 (20%, [M + H]⁺), 227,9 (100%, [M + H, - Ac]⁺).

Síntese 5

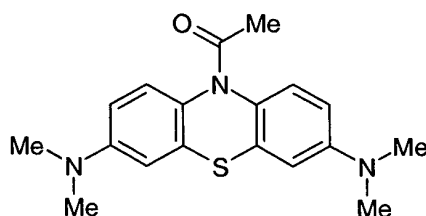
3,7-Diamino-fenotiazina bis(cloreto de hidrogênio) (B4)



1-(3,7-Diamino-fenotiazin-10-il)-etanona (0,25 g, 0,921 mmol) foi dissolvida em ácido clorídrico aquoso (5 N, 10 cm³) e a solução foi aquecida para refluxo e agitada durante 30 minutos. A concentração da mistura de reação produziu o composto do título como um sólido azul-claro. δ_{H} (250 MHz; D₂O): 6,60 (2H, brd d, ArH), 7,07 (4H, brd s, ArH).

Síntese 6

20 1-(3,7-Bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanona

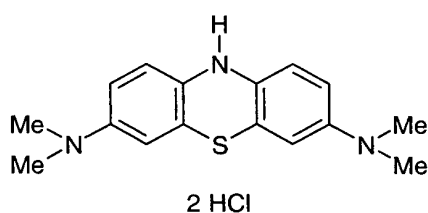


1-(3,7-Diamino-fenotiazin-10-il)-etanona (0,25 g 0,92 mmol) foi dissolvida em DMSO (3 cm³). Tolueno (10 cm³), iodometano (1,96 g, 13,8 mmols), brometo de tetrabutilamônio (50 mg), e finalmente solução de hidróxido de sódio aqu-

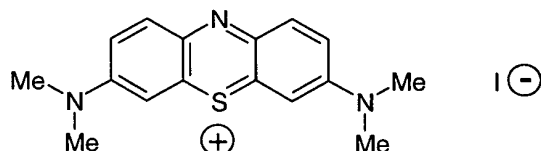
osa (50%, 1,25 cm³) foram adicionados. A mistura foi agitada em temperatura ambiente durante duas horas. O hidróxido de sódio aquoso adicional (50%, 1,25 cm³) e iodometano (1,96 g, 13,8 mmols) foram em seguida adicionados. A mistura foi permitida agitar durante um adicional de 3 horas em
 5 temperatura ambiente antes de uma terceira alíquota de hidróxido de sódio aquoso (50%, 1,25 cm³) e iodometano (1,96 g, 13,8 mmols) foram adicionados e a mistura agitada durante um adicional de 18 horas. A suspensão espessa foi lavada com água (3 x 75 cm³) e o extrato de tolueno coletado. A água foi extraída com diclorometano (3 x 50 cm³) e os extratos combinados
 10 com tolueno, e secados em sulfato de magnésio, filtrados, e concentrados para produzir sólido violeta escuro. O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna (SiO₂, acetato de etila : éter de petróleo, 2:3, carregado como uma solução de diclorometano) para produzir o produto de composto do título (0,12 g, 40%) como um sólido violeta-claro; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹: 2910 (CH), 2876 (CH), 2856 (CH), 2799 (CH), 1659 (C=O), 1596 (NO₂), 1502 (NO₂);
 15 δ_{H} (250 MHz; CDCl₃): 2,16 (3H, s, CH₃), 2,93 (12H, s, NCH₃), 6,59-6,62 (2H, d, *J* 8,5, ArH), 6,69-6,71 (2H, d, *J* 2,75, ArH), 7,08-7,47 (2H, brd s, ArH); δ_{C} (62,9MHz; CDCl₃): 170,3 (C=O), 148,9 (ArC), 127,2 (ArC), 127,1 (ArC), 127,0 (ArC), 110,9 (ArC), 110,7 (ArC), 40,7 (NCH₃), 22,9 (CH₃).

20 Síntese 7

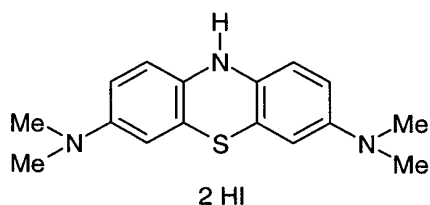
N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diamina bis(cloreto de hidrogênio) (B3)



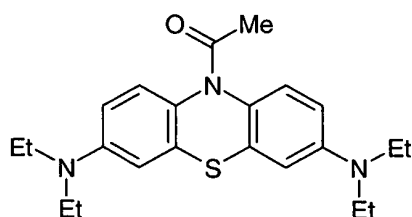
1-(3,7-Bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanona (0,5 g, 1,84 mmol) foi dissolvida em ácido clorídrico aquoso (5 N, 15 cm³), e a solução foi aquecida para temperatura de refluxo e agitada durante 30 minutos. Concen-
 25 tração da mistura de reação produziu o composto do título como um sólido verde/azul; δ_{H} (250MHz; D₂O): 3,18 (12H, s, NCH₃), 6,67 (2H, d, *J* 8,5, ArH), 7,16 (4H, brd s, ArH); δ_{C} (62,9MHz; D₂O): 144,3 (ArC), 138,9 (ArC), 122,4 (ArC), 120,8 (ArC), 120,7 (ArC), 117,6 (ArC), 48,9 (NCH₃).

Síntese 8Iodeto de metiltionínio

A um frasco de fundo redondo foram adicionados cloreto de metiltionínio (MTC, Azul de Metileno) (2 g, 6,25 mmols) e água (50 cm³) e a
 5 mistura agitada durante 10 minutos ou até que o sólido dissolvesse. Iodeto de potássio (1,56 g, 9,4 mmols) foi em seguida adicionado à mistura e uma suspensão verde-escura foi formada. A reação foi aquecida para ebulição e permitida esfriar naturalmente produzindo o composto do título (2,03 g, 79%)
 10 como resíduo verde-claro. Cálculo Analítico para C₁₆H₁₈N₃SI: C, 46,72; H, 4,41; N, 10,22; S, 7,80; I, 30,85, Encontrado: C, 46,30; H, 4,21; N, 10,14; S, 7,86; I, 29,34.

Síntese 9N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diamina bis(iodeto de hidrogênio) (B6)

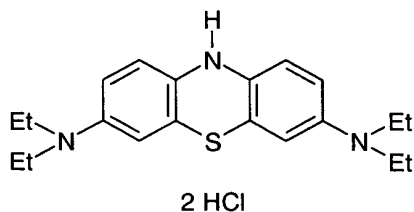
15 A um frasco de fundo redondo foram adicionados iodeto de metiltionínio (2 g, 4,86 mmols), etanol (100 cm³) e iodeto de etila (75,8 g, 486 mmols) e a mistura foi aquecida em refluxo durante 18 horas onde a cor alterou de verde/azul para marrom com um precipitado amarelo. Uma vez que resfriada em temperatura ambiente, a mistura foi filtrada e lavada com di-
 20 etiléter (20 cm³) para produzir o composto do título (1,99 g, 76%) como um sólido verde-claro. δ_H (250 MHz; D₂O): 3,20 (12H, s, NCH₃), 6,76 (2H, d, *J* 8,5, *ArH*), 7,22 (2H, brd s, *ArH*); δ_C (62,9 MHz; D₂O): 145,0 (*ArC*), 139,3 (*ArC*), 122,6 (*ArC*), 121,1 (*ArC*), 120,9 (*ArC*), 117,9 (*ArC*), 48,9 (NCH₃).

Síntese 101-(3,7-Bis-dietilamino-fenotiazin-10-il)-etanona

A um frasco de fundo redondo de 25 cm³ foram adicionados cloreto de zinco de etilitionínio (0,5 g, 1,13 mmol) e etanol (10 cm³). Fenilidrazina (0,134 g, 1,24 mmol) foi em seguida adicionada em gotas em uma atmosfera de nitrogênio. A mistura foi agitada em 25°C durante uma hora e concentrada em vácuo elevado. Piridina (50 cm³) e anidrido acético foram adicionados e a mistura agitada durante 18 horas a 60°C. A solução foi aberta para gelo/água (250 cm³) e os orgânicos foram extraídos em acetato de etila (3 x 50 cm³). Os extratos foram lavados com solução de sulfato de cobre saturado e secados em sulfato de magnésio, filtrados, e concentrados para produzir o produto bruto como um óleo marrom, que foi purificado usando cromatografia de coluna rápida com um eluente de 40% de acetato de etila: 60% de álcool de petróleo 40 a 60°C e sílica 40-63μ 60 Å para produzir o composto do título (0,18 g, 41%) como um sólido vítreo verde. δ_H (250 MHz; CDCl₃): 7,0-7,5 (2H, brds, ArH), 6,64 (2H, s, ArH), 6,52 (2H, d, ArH), 3,35 (8H, q, 7, NCH₂), 2,18 (3H, s, CH₃), 1,16 (12H, t, 7, CH₃); δ_C (62,9 MHz; CDCl₃): 12,5 (CH₃), 22,9 (CH₃), 44,6 (NCH₂), 110,1 (ArC), 127,4 (ArC), 146,5 (ArC), 170,2 (C=O).

Síntese 11

20 N,N,N',N'-tetraetil-10H-fenotiazina-3,7-diamina bis(cloreto de hidrogênio)

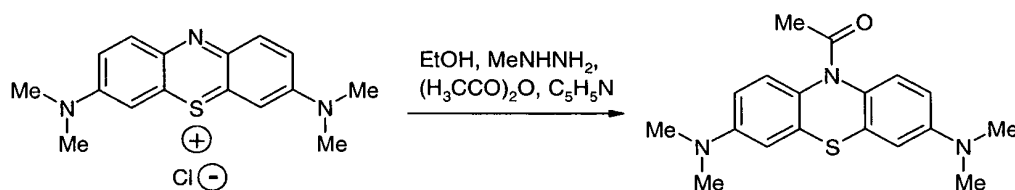


A um frasco de fundo redondo de 25 cm³ foram adicionados 3,7-dietilamino-10-acetil-fenotiazina (0,125 g, 0,33 mmol) e ácido clorídrico aquoso (5 M, 5 cm³). A mistura foi aquecida a 100°C durante duas horas antes

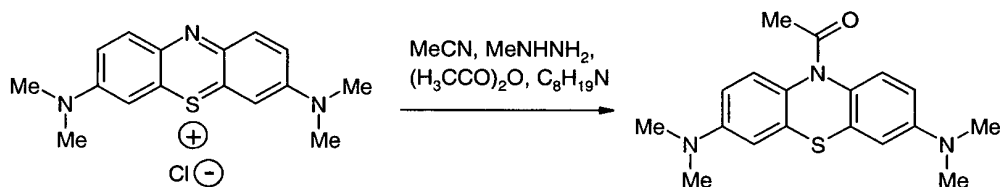
de resfriar em temperatura ambiente e foi concentrada para produzir o composto do título (0,11 g, 81%) como um sólido vítreo verde-amarelo. δ_H (250 MHz; CD_3OD): 7,07 (4H, brd, ArH), 6,65 (2H, brd, ArH), 3,35 (8H, brd, NCH_2), 0,97 (12H, brd, CH_3); δ_C (62,9 MHz; CD_3OD): 10,8 (CH_3), 55,1 (5) (NCH_2), 116,6 (ArC), 120,4 (ArC), 121,5 (ArC), 123,6 (ArC), 132,6 (ArC), 144,5 (ArC).

Síntese 12

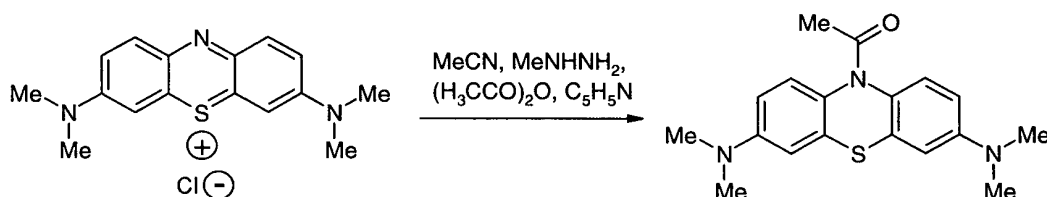
1-(3,7-Bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanona



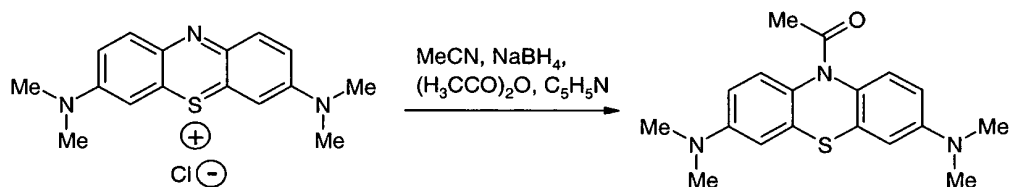
A síntese usando metilidrazina/piridina em dois potes. A um
 10 frasco de fundo redondo de 250 cm³ colocado em uma atmosfera de argônio foram adicionados tri-hidrato cloreto de metiltionínio (26,74 mmols, 10 g), etanol (100 cm³) e metilidrazina (58,83 mmols, 2,71 g). A mistura foi aquecida a 40°C e agitada durante duas horas. A suspensão amarela/verde foi resfriada a 5°C e filtrada em argônio, lavada com etanol (20 cm³) e secada
 15 para produzir o leuco-azul de metileno como um sólido verde-claro. Ao produto leuco foram adicionados anidrido acético (40 cm³) e piridina (10 cm³) e a solução foi aquecida a 100°C durante 18 horas. A mistura resfriada foi em seguida derramada cuidadosamente em água gelada ao mesmo tempo em que agitando para produzir um precipitado, que foi filtrado, lavado com água,
 20 e secado em 60°C durante duas horas para produzir o composto do título (5,82g, 66%) como um sólido marrom-claro. Ponto de fusão 137°C; $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 2910 (CH), 2876 (CH), 2856 (CH), 2799 (CH), 1659 (C=O), 1596 (NO_2), 1502 (NO_2); δ_H (250MHz; $CDCl_3$) 2,16 (3H, s, CH_3), 2,93 (12H, s, NCH_3), 6,59-6,62 (2H, d, J 8,5, ArH), 6,69-6,71 (2H, d, J 2,75, ArH), 7,08-
 25 7,47 (2H, brd s, ArH); δ_C (62,9MHz; $CDCl_3$) 170,3 (C=O), 148,9 (ArC), 127,2 (ArC), 127,1 (ArC), 127,0 (ArC), 110,9 (ArC), 110,7 (ArC), 40,7 (NCH_3), 22,9 (CH_3); m/z (ES) 284,2 (100%, $[M - OAc]^+$), 328,1 (15%, $[M + H]^+$), 350,1 (41%, $[M + Na]^+$).

Síntese 13**1-(3,7-Bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanona**

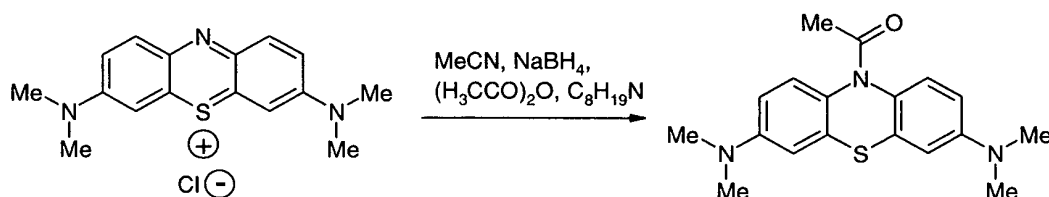
Síntese usando metilidrazina/base de Hunig em um pote. A um vaso de reator de 5000 cm³ em uma atmosfera de nitrogênio foram adicionados tri-hidrato de cloreto de metiltionínio (0,54 mol, 200 g) e acetonitrila (1000 cm³). Metilidrazina (1,07 mol, 49,36 g) foi adicionada em gotas em 1,5 mL por minuto. A temperatura da mistura aumentou para 32°C e foi agitada durante 20 minutos. A suspensão amarela/verde teve anidrido acético (5,35 mols, 541 g) adicionado e em seguida a base de Hunig (diisopropiletilamina) (1,55 mol, 200 g) foi adicionada. A mistura foi aquecida a 90°C durante duas horas. A mistura resfriada foi em seguida derramada cuidadosamente em água gelada (2000 cm³) e em dez porções de 200 cm³ ao mesmo tempo em que agitando para produzir o precipitado. O precipitado foi agitado durante 45 minutos antes de ter sido filtrado, lavado com água (3 x 250 cm³), e secado por ar durante 30 minutos. O material bruto foi cristalizado de etanol quente (2750 cm³) para produzir o composto do título (112,1 g, 64%) como um sólido cinza-claro. Ponto de fusão 137°C; $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 2910 (CH), 2876 (CH), 2856 (CH), 2799 (CH), 1659 (C=O), 1596 (NO₂), 1502 (NO₂); δ_{H} (250MHz; CDCl₃) 2,16 (3H, s, CH₃), 2,93 (12H, s, NCH₃), 6,59-6,62 (2H, d, *J* 8,5, ArH), 6,69-6,71 (2H, d, *J* 2,75, ArH), 7,08-7,47 (2H, brd s, ArH); δ_{C} (62,9MHz; CDCl₃) 170,3 (C=O), 148,9 (ArC), 127,2 (ArC), 127,1 (ArC), 127,0 (ArC), 110,9 (ArC), 110,7 (ArC), 40,7 (NCH₃), 22,9 (CH₃); m/z (ES) 284,2 (100%, [M – OAc]⁺), 328,1 (15%, [M + H]⁺), 350,1 (41%, [M + Na]⁺).

Síntese 14**1-(3,7-Bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanona**

Síntese usando metilidrazina/ piridina em um pote. A um frasco de fundo redondo de 250 cm³ em uma atmosfera de nitrogênio foram adicionados tri-hidrato de cloreto de metiltionínio (26,74 mmols, 10 g) e acetonitrila (50 cm³). Metilidrazina (53,5 mmols, 2,46 g) foi adicionada em quatro porções iguais durante um período de tempo de 30 minutos. A temperatura da mistura foi mantida a 35°C com um banho de água fria e foi agitada durante 30 minutos. A suspensão amarela/verde teve anidrido acético (267 mmols, 27,3 g) e piridina (80,2 mmols, 6,35 g) foram adicionados. A mistura foi aquecida a 90°C durante duas horas. A mistura resfriada foi em seguida derramada cuidadosamente em água gelada (200 cm³) em dez porções iguais ao mesmo tempo em que agitando para produzir um precipitado. O precipitado foi agitado durante 30 minutos antes de ser filtrado, lavado com água (3 x 50 cm³) e secado em ar durante 30 minutos. O material bruto foi cristalizado de etanol quente (120 cm³) para produzir o composto do título (5,97 g, 68%) como um sólido cinza-claro. P.f. 137°C; $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 2910 (CH), 2876 (CH), 2856 (CH), 2799 (CH), 1659 (C=O), 1596 (NO₂), 1502 (NO₂); δ_{H} (250MHz; CDCl₃) 2,16 (3H, s, CH₃), 2,93 (12H, s, NCH₃), 6,59-6,62 (2H, d, *J* 8,5, ArH), 6,69-6,71 (2H, d, *J* 2,75, ArH), 7,08-7,47 (2H, brd s, ArH); δ_{C} (62,9MHz; CDCl₃) 170,3 (C=O), 148,9 (ArC), 127,2 (ArC), 127,1 (ArC), 127,0 (ArC), 110,9 (ArC), 110,7 (ArC), 40,7 (NCH₃), 22,9 (CH₃); m/z (ES) 284,2 (100%, [M – OAc]⁺), 328,1 (15%, [M + H]⁺), 350,1 (41%, [M + Na]⁺).

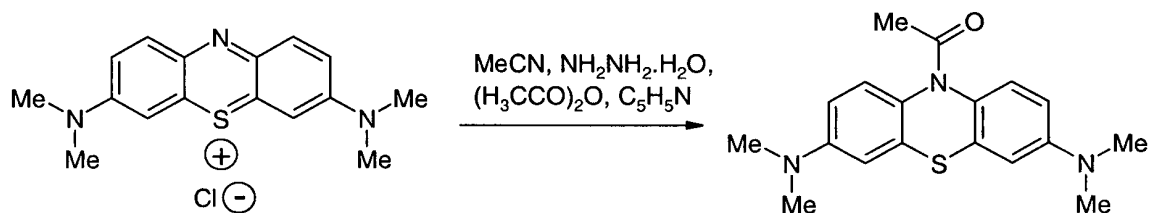
Síntese 15**1-(3,7-Bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanona**

Síntese usando boroidreto de sódio/piridina em um pote. A um frasco de fundo redondo de 500 cm³ em uma atmosfera de nitrogênio foram adicionados tri-hidrato de cloreto de metiltionínio (0,134 mol, 50 g) e acetonitrila (250 cm³). Boroidreto de sódio (0,174 mol, 6,6 g) foi adicionado em quatro porções iguais durante um período de tempo de 30 minutos. A temperatura da mistura foi mantida a 35°C com um banho de água fria e foi agitada durante 30 minutos. A suspensão amarela/verde teve anidrido acético (0,535 mol, 55 g) e piridina (0,174 mol, 13,76 g) adicionados. A mistura foi aquecida a 90°C durante duas horas. A mistura resfriada foi em seguida deramada cuidadosamente em água gelada (250 cm³) em dez porções iguais ao mesmo tempo em que agitando para produzir um precipitado. O precipitado foi agitado durante 30 minutos antes de ser filtrado, lavado com água (3 x 50 cm³), e secado em ar durante 30 minutos. O material bruto foi cristalizado de etanol quente (500 cm³) para produzir o composto do título (26,7 g, 61%) como um sólido cinza-claro. P.f. 137°C; $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 2910 (CH), 2876 (CH), 2856 (CH), 2799 (CH), 1659 (C=O), 1596 (NO₂), 1502 (NO₂); δ_{H} (250MHz; CDCl₃) 2,16 (3H, s, CH₃), 2,93 (12H, s, NCH₃), 6,59-6,62 (2H, d, J 8,5, ArH), 6,69-6,71 (2H, d, J 2,75, ArH), 7,08-7,47 (2H, brd s, ArH); δ_{C} (62,9MHz; CDCl₃) 170,3 (C=O), 148,9 (ArC), 127,2 (ArC), 127,1 (ArC), 127,0 (ArC), 110,9 (ArC), 110,7 (ArC), 40,7 (NCH₃), 22,9 (CH₃); m/z (ES) 284,2 (100%, [M – OAc]⁺), 328,1 (15%, [M + H]⁺), 350,1 (41%, [M + Na]⁺).

Síntese 161-(3,7-Bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanona

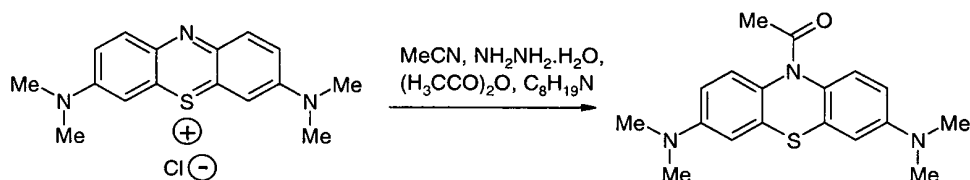
Síntese usando boroidreto de sódio/Base de Hunig em um pote.

A um frasco de fundo redondo de 500 cm³ em uma atmosfera de nitrogênio foram adicionados tri-hidrato de cloreto de metiltionínio (80,2 mmols, 30 g) e acetoneitrila (150 cm³). Boroidreto de sódio (104 mmols, 3,94 g) foi adicionado em quatro porções iguais durante um período de tempo de 30 minutos. A temperatura da mistura foi mantida a 35°C com um banho de água fria e foi agitada durante 30 minutos. A suspensão amarela/verde teve anidrido acético (321 mmols, 32,75 g) e base de Hunig (di-isopropiletilamina) (120 mmols, 15,55 g) adicionados. A mistura foi aquecida a 90°C durante duas horas. A mistura resfriada foi em seguida derramada cuidadosamente em água gelada (200 cm³) em dez porções iguais ao mesmo tempo em que agitando para produzir um precipitado. O precipitado foi agitado durante 30 minutos antes de ser filtrado, lavado com água (3 x 50 cm³), e secado em ar durante 30 minutos. O material bruto foi cristalizado de etanol quente (300 cm³) para produzir o composto do título (13,55g, 52%) como um sólido cinza-claro. P.f. 137°C; $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 2910 (CH), 2876 (CH), 2856 (CH), 2799 (CH), 1659 (C=O), 1596 (NO₂), 1502 (NO₂); δ_{H} (250MHz; CDCl₃) 2,16 (3H, s, CH₃), 2,93 (12H, s, NCH₃), 6,59-6,62 (2H, d, *J* 8,5, ArH), 6,69-6,71 (2H, d, *J* 2,75, ArH), 7,08-7,47 (2H, brd s, ArH); δ_{C} (62,9MHz; CDCl₃) 170,3 (C=O), 148,9 (ArC), 127,2 (ArC), 127,1 (ArC), 127,0 (ArC), 110,9 (ArC), 110,7 (ArC), 40,7 (NCH₃), 22,9 (CH₃); *m/z* (ES) 284,2 (100%, [M – OAc]⁺), 328,1 (15%, [M + H]⁺), 350,1 (41%, [M + Na]⁺).

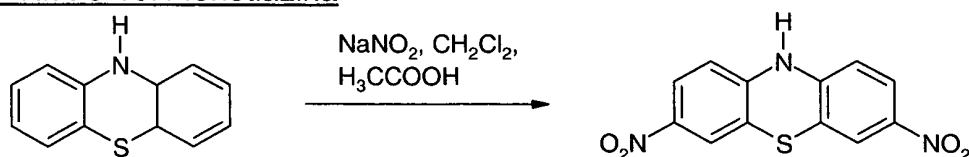
Síntese 171-(3,7-Bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanona

Síntese usando mono-hidrato de hidrazina/piridina em um pote.

A um frasco de fundo redondo de 250 cm³ em uma atmosfera de nitrogênio foram adicionados tri-hidrato de cloreto de metiltionínio (26,74 mmols, 10 g) e acetonitrila (50 cm³). Mono-hidrato de hidrazina (58,8 mmols, 2,95 g) foi adicionado e a mistura foi aquecida para refluxo e agitada durante 10 minutos antes de resfriar a 25°C. A suspensão amarela/verde teve anidrido acético (424 mmols, 43,3 g) e piridina (124 mmols, 9,78 g) adicionados. A mistura foi aquecida a 90°C durante duas horas. A mistura resfriada foi em seguida derramada cuidadosamente em água gelada (100 cm³) em dez porções iguais ao mesmo tempo em que agitando para produzir um precipitado. O precipitado foi agitado durante 30 minutos antes de ser filtrado, lavado com água (3 x 50 cm³), e secado em ar durante 30 minutos. O material bruto foi cristalizado de etanol quente (100 cm³) para produzir o composto do título (4,87 g, 56%) como um sólido cinza-claro. P.f. 137°C; $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 2910 (CH), 2876 (CH), 2856 (CH), 2799 (CH), 1659 (C=O), 1596 (NO₂), 1502 (NO₂); δ_{H} (250MHz; CDCl₃) 2,16 (3H, s, CH₃), 2,93 (12H, s, NCH₃), 6,59-6,62 (2H, d, *J* 8,5, ArH), 6,69-6,71 (2H, d, *J* 2,75, ArH), 7,08-7,47 (2H, brd s, ArH); δ_{C} (62,9MHz; CDCl₃) 170,3 (C=O), 148,9 (ArC), 127,2 (ArC), 127,1 (ArC), 127,0 (ArC), 110,9 (ArC), 110,7 (ArC), 40,7 (NCH₃), 22,9 (CH₃); m/z (ES) 284,2 (100%, [M - OAc]⁺), 328,1 (15%, [M + H]⁺), 350,1 (41%, [M + Na]⁺).

Síntese 18**1-(3,7-Bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanona**

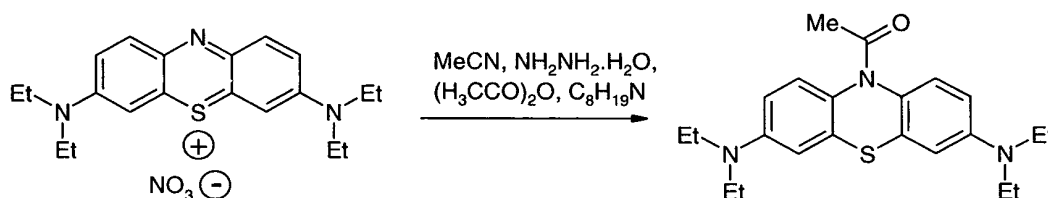
Síntese usando mono-hidrato de hidrazina/base de Hunig em um pote. A um frasco de fundo redondo de 250 cm³ em uma atmosfera de nitrogênio foram adicionados tri-hidrato de cloreto de metiltionínio (80,2 mmols, 30 g) e acetonitrila (150 cm³). Mono-hidrato de hidrazina (176,5 mmols, 8,84 g) foi adicionado e a mistura foi aquecida para refluxo e agitada durante 10 minutos antes de resfriar a 25°C. A suspensão amarela/verde teve anidrido acético (794 mmols, 81,2 g) e base de Hunig (diisopropiletilamina) (232 mmols, 29,97 g) adicionados. A mistura foi aquecida a 90°C durante duas horas. A mistura resfriada foi em seguida derramada cuidadosamente em água gelada (400 cm³) em dez porções iguais ao mesmo tempo em que agitando para produzir um precipitado. O precipitado foi agitado durante 30 minutos antes de ser filtrado, lavado com água (3 x 100 cm³), e secado em ar durante 30 minutos. O material bruto foi cristalizado de etanol quente (400 cm³) para produzir o composto do título (17,15 g, 65%) como um sólido cinza-claro. P.f. 137°C; $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 2910 (CH), 2876 (CH), 2856 (CH), 2799 (CH), 1659 (C=O), 1596 (NO₂), 1502 (NO₂); δ_{H} (250MHz; CDCl₃) 2,16 (3H, s, CH₃), 2,93 (12H, s, NCH₃), 6,59-6,62 (2H, d, *J* 8,5, ArH), 6,69-6,71 (2H, d, *J* 2,75, ArH), 7,08-7,47 (2H, brd s, ArH); δ_{C} (62,9MHz; CDCl₃) 170,3 (C=O), 148,9 (ArC), 127,2 (ArC), 127,1 (ArC), 127,0 (ArC), 110,9 (ArC), 110,7 (ArC), 40,7 (NCH₃), 22,9 (CH₃); m/z (ES) 284,2 (100%, [M – OAc]⁺), 328,1 (15%, [M + H]⁺), 350,1 (41%, [M + Na]⁺).

Síntese 19**3,11-Dinitro-10H-fenotiazina**

10H-Fenotiazina (20,00 g, 100 mmols), diclorometano (100 cm³) e ácido acético (40 cm³) tiveram nitreto de sódio (20,07 g, 300 mmols) adicionado e a mistura foi agitada durante 10 minutos em temperatura ambiente. Ácido acético adicional (40 cm³), diclorometano (100 cm³) e nitreto de sódio (20,07 g, 300 mmols) foram em seguida adicionados. Um outro 120 cm³ de ácido acético foi adicionado para testar e dissolver a mistura de reação espessa. A mistura foi agitada durante 3 horas. A suspensão foi filtrada e lavada com 100 cm³ cada de etanol, água, e finalmente etanol para produzir um sólido violeta/marrom. O resíduo foi agitado em DMF quente e permitido esfriar antes de filtrar o produto de, que foi lavado com etanol (150 cm³) e secado para produzir o composto do título (24,88 g, 86%) como um sólido marrom; $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3331 (NH), 3294 (NH), 3229 (NH), 3101 (CH), 3067 (CH), 1602 (NO₂), 1558 (NO₂); δ_{H} (250MHz; DMSO) 6,73-6,76 (2H, d, *J* 9, ArH), 7,78 (2H, s, ArH), 7,89-7,85 (2H, d, *J* 9, ArH).

15 Síntese 20

1-(3,7-Bis-dietilamino-fenotiazin-10-il)-etanona

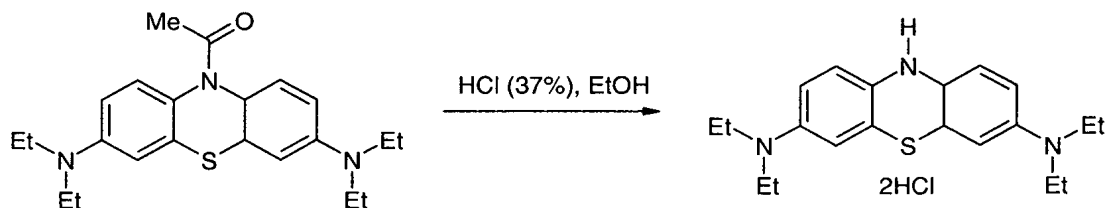


A um frasco de fundo redondo de 250 cm³ em uma atmosfera de nitrogênio foram adicionados mono-hidrato de nitrato de etilitionínio (7,13 mmols, 3 g) e acetonitrila (20 cm³). Mono-hidrato de hidrazina (16,4 mmols, 0,82 g) foi adicionado e a mistura foi aquecida em refluxo e agitada durante 10 minutos antes de resfriar a 25°C. A solução marrom teve anidrido acético (114 mmols, 11,65 g) e base de Hunig (di-isopropiletilamina) (21,4 mmols, 2,77 g) adicionados. A mistura foi aquecida a 90°C durante duas horas. A mistura foi em seguida derramada cuidadosamente em água gelada (40 cm³) em dez porções iguais ao mesmo tempo em que agitando para produzir um precipitado. O precipitado foi agitado durante 30 minutos antes de ser filtrado, lavado com água (3 x 25 cm³) e secado em ar durante 30 minutos. O material bruto foi cristalizado de etanol quente (50 cm³) para

produzir o composto do título (1,73 g, 63%) como um sólido cinza-claro. δ_H (250 MHz; $CDCl_3$) 7,0-7,5 (2H, brds, ArH), 6,64 (2H, s, ArH), 6,52 (2H, d, ArH), 3,35 (8H, q, 7, NCH_2), 2,18 (3H, s, CH_3), 1,16 (12H, t, 7, CH_3); δ_C (62,9 MHz; $CDCl_3$) 12,5 (CH_3), 22,9 (CH_3), 44,6 (NCH_2), 110,1 (ArC), 127,4 (ArC), 146,5 (ArC), 170,2 (C=O).

Síntese 21

N,N,N',N'-tetraetil-10H-fenotiazina-3,7-diamina bis(cloreto de hidrogênio)



A um frasco de fundo redondo foram adicionados 1-(3,7-bis-dietilamino-fenotiazin-10-il)-etanona (0,5 g, 1,30 mmol), etanol (5 cm^3), e ácido clorídrico (37%, 1,3 cm^3) e a solução foi aquecida a 80°C durante uma hora. Uma vez resfriado em temperatura ambiente, a mistura foi concentrada produzindo o composto do título (0,54 g, 100%) como um vidro verde-claro. δ_H (250 MHz; CD_3OD) 7,07 (4H, brd, ArH), 6,65 (2H, brd, ArH), 3,35 (8H, brd, NCH_2), 0,97 (12H, brd, CH_3); δ_C (62,9 MHz; CD_3OD) 10,8 (CH_3), 55,1 (NCH_2), 116,6 (ArC), 120,4 (ArC), 121,5 (ArC), 123,6 (ArC), 132,6 (ArC), 144,5 (ArC).

Síntese 22

N,N,N',N'-Tetraetil-10H-fenotiazina-3,7-diamina bis(brometo de hidrogênio)

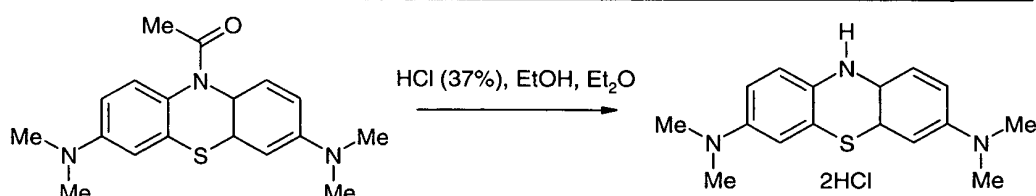


A um frasco de fundo redondo foram adicionados 1-(3,7-bis-dietilamino-fenotiazin-10-il)-etanona (0,5 g, 1,30 mmol), etanol (5 cm^3), e ácido bromídrico (48%, 0,75 cm^3) e a solução foi aquecida a 80°C durante uma hora. Uma vez resfriada em temperatura ambiente, a mistura foi concentrada produzindo o composto do título (0,65g, 100%) como um vidro amarelo-claro. δ_H (250 MHz; D_2O) 7,05 (4H, brd, ArH), 6,79 (2H, brd d, ArH),

3,43 (8H, brd, NCH₂), 1,05 (12H, brd t, CH₃); δ_C (62,9 MHz; D₂O) 12,3 (CH₃), 56,2 (NCH₂), 117,9 (ArC), 121,4 (ArC), 122,4 (ArC), 124,5 (ArC), 133,5 (ArC), 145,1 (ArC).

Síntese 23

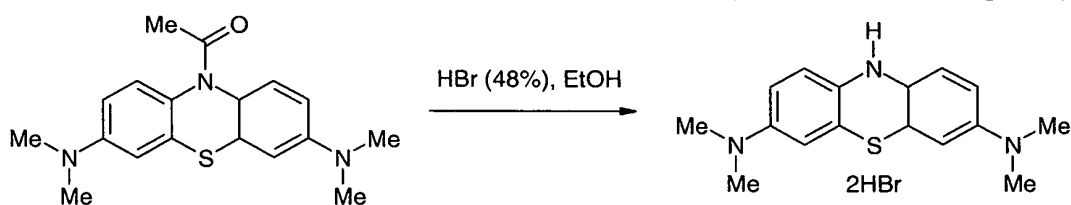
5 N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diamina bis(cloreto de hidrogênio)



A um frasco de fundo redondo foram adicionados 1-(3,7-bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanona (1 g, 3,05 mmols), etanol (10 cm³), e ácido clorídrico (37%, 3 cm³) e a solução foi aquecida a 80°C durante uma hora. Uma vez resfriado em temperatura ambiente, o éter de dietila foi adicionado ao mesmo tempo em que agitando até que uma solução turva constante fosse obtida. Após algum tempo, um precipitado formado, que foi filtrado e lavado com éter de dietila (10 cm³) produzindo o composto do título (0,98 g, 90%) como um sólido verde-claro. P.f. (dec) 230°C; $v_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3500-3229 (NH), 3061 (CH), 3021 (CH), 2948 (CH), 2879 (CH), 2679 (CH), 2601 (CH), 1604 (CH), 1483 (CH), 1318 (CH); δ_H (250MHz; D₂O) 3,18 (12H, s, NCH₃), 6,67 (2H, d, *J* 8,5, ArH), 7,16 (4H, brd s, ArH); δ_C (62,9MHz; D₂O) 144,3 (ArC), 138,9 (ArC), 122,4 (ArC), 120,8 (ArC), 120,7 (ArC), 117,6 (ArC), 48,9 (NCH₃); *m/z* (ES) 286,1 (100%, [M - H, 2Cl]⁺), 285,1 (40%), 284,1 (41%, [M - 3H, 2Cl]⁺).

20 Síntese 24

N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diamina bis(brometo de hidrogênio)

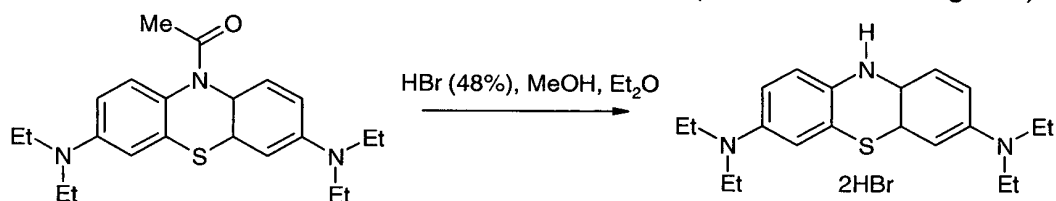


A um frasco de fundo redondo foram adicionados 1-(3,7-bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanona (1 g, 3,05 mmols), etanol (10 cm³), e ácido bromídrico (48%, 4 cm³) e a solução foi aquecida a 80°C durante

uma hora. Uma vez resfriada em temperatura ambiente, um precipitado formou-se, que foi filtrado e lavado com éter de dietila (10 cm³) produzindo o produto (1,22 g, 89%) como um sólido mostarda-claro. P.f. (dec) 230°C; $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3500-3229 (NH), 3061 (CH), 3021 (CH), 2948 (CH), 2879 (CH), 2679 (CH), 2601 (CH), 1604 (CH), 1483 (CH), 1318 (CH); δ_{H} (250MHz; D₂O) 3,18 (12H, s, NCH₃), 6,66 (2H, d, *J* 8,75, ArH), 7,15 (4H, s, ArH); δ_{C} (62,9MHz; D₂O) 144,3 (ArC), 138,9 (ArC), 122,4 (ArC), 120,8 (ArC), 120,7 (ArC), 117,6 (ArC), 48,9 (NCH₃).

Síntese 25

10 N,N,N',N'-tetraetil-10H-fenotiazina-3,7-diamina bis(brometo de hidrogênio)



A um frasco de fundo redondo foram adicionados 1-(3,7-bis-diethylamino-fenotiazin-10-il)-etanona (1,0 g, 2,60 mmols), metanol (10 cm³), e ácido bromídrico (48%, 2,94 cm³) e a solução foi aquecida a 80°C durante uma hora. Uma vez resfriada a 5°C, a mistura teve éter de dietila adicionado, produzindo uma solução turva. A solução foi agitada durante 30 minutos e produziu o composto do título (0,83 g, 63%) como um sólido amarelo-claro. δ_{H} (250 MHz; D₂O) 7,05 (4H, brd, ArH), 6,79 (2H, brd d, ArH), 3,43 (8H, brd, NCH₂), 1,05 (12H, brd t, CH₃); δ_{C} (62,9 MHz; D₂O) 12,3 (CH₃), 56,2 (NCH₂), 117,9 (ArC), 121,4 (ArC), 122,4 (ArC), 124,5 (ArC), 133,5 (ArC), 145,1 (ArC).

20 Exemplo 10 – Outros distúrbios cognitivos ou de CNS

Os métodos de tratamento, profilaxia, diagnose ou prognose da presente invenção, utilizando os compostos de DAPTZ na forma oxidada ou reduzida, podem em qualquer aspecto ser aplicados a qualquer uma ou mais das seguintes doenças.

Doenças de agregação de proteína				
Proteína	Doença	Mutações e/ou domínio de agregação	Tamanho de subunidade de Fibrila (kDa)	Referência
<i>Distúrbios Neurodegenerativos</i>				
Proteína do príon	Doenças do príon	<i>Formas herdadas e esporádicas</i>	27	Prusiner (1998)
	(CJD, nvCJD, insônia familiar fatal, síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker, Kuru)	PrP-27-30; muitas mutações.		
		Domínios Fibrilogênicos: 113-120, 178-191, 202-218.		Gasset e outros. (1992)
Proteína tau	Doença de Alzheimer, síndrome de Down, FTDP-17, CBD, parkinsonismo pós-encefáltico, doença de Pick, parkinsonismo com complexo de demência de Guam	<i>Formas herdadas e esporádicas</i>	10-12	Wischik e outros. (1988)
		Tau truncado (domínio de ligação de tubulina) 297-391.		
		Mutações em tau em FTDP-17.		Hutton e outros. (1998)

Doenças de agregação de proteína				
Proteína	Doença	Mutações e/ou domínio de agregação	Tamanho de subunidade de Fibrila (kDa)	Referência
		Muitas mutações em proteínas de presenilina.		Czech e outros. (2000)
β -proteína Amilóide	doença de Alzheimer, síndrome de Down	<i>Formas herdadas e esporádicas</i>	4	Glenner & Wong, (1984)
		β -proteína Amilóide; 1-42(3).		
		11 mutações em APP em famílias raras.		Goate e outros. (1991)
Huntingtin	Doença de Huntington	Terminal de N de proteína com repetições de glutamina expandidas.	40	DiFiglia e outros. (1997)
Ataxinas (1, 2, 3, 7)	Ataxias espinocerebelar (SCA1, 2, 3, 7)	Proteínas com repetições de glutamina expandida.		Paulson e outros. (1999)
Atrofina	Atrofia denta-rubropálido-luisiano (DRPLA)	Proteínas com repetições de glutamina expandidas.		Paulson e outros. (1999)
Receptor de androgênio	Atrofia muscular espinhal e bulbar	Proteínas com repetições glutamina expandidas.		Paulson e outros. (1999)

Doenças de agregação de proteína				
Proteína	Doença	Mutações e/ou domínio de agregação	Tamanho de subunidade de Fibrila (kDa)	Referência
Neuroserpina	Encefalopatia familiar com corpos de inclusão neuronais (FENIB)	Neuroserpina; S49P, S52R.	57	Davis e outros. (1999)
α -Sinucleína	Doença de Parkinson, demência com corpos de Lewy, atrofia de múltiplos sistemas	<i>Formas herdadas e esporádicas</i>	19	Spillantini e outros. (1998)
		A53T, A30P em famílias de PD autossômico-dominante raros.		Polymeropoulos e outros. (1997)
Cistatina C	Angiopatia cerebral hereditário (Icelandic)	Cistatina C menos 10 resíduos; L68Q.	12-13	Abrahamson e outros. (1992)
Superóxido dismutase 1	Esclerose lateral amiotrófica	Mutações SOD1.		Shibata e outros. (1996)

Referências para o Exemplo 10

- Abrahamson, M., Jonsdottir, S., Olafsson, I. & Grubb, A. (1992) Hereditary cystatin C amyloid angiopathy identification of the disease-causing mutation and specific diagnosis by polymerase chain reaction based analysis. *Human Genetics* 89, 377-380.
- 5 Czech, C., Tremp, G. & Pradier, L. (2000) Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms. *Progress in Neurobiology* 60, 363-384.

- Davis, R.L., Shrimpton, A.E., Holohan, P.D., Bradshaw, C., Feiglin, D., Collins, G.H., Sonderegger, P., Kinter, J., Becker, L.M., Lacbawan, F., Krasnewich, D., Muenke, M., Lawrence, D.A., Yerby, M.S., Shaw, C.-M., Gooptu, B., Elliott, P.R., Finch, J.T., Carrell, R.W. & Lomas, D.A. (1999) Familial dementia caused by polymerization of mutant neuroserpin. *Nature* 401, 376-379.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P. & Aronin, N. (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277, 1990-1993.
- Gasset, M., Bladwin, M.A., Lloyd, D.H., abriel, J.-M., Holtzman, D.M., Cohen, F.E., Fletterick, R. & Prusiner, S.B. (1992) Predicted a-helical region of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89, 10940-10944.
- Glenner, G.G. & Wong, C.W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterisation of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120, 885-890.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M.-C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., Mant, R., Newton, P., Rooke, K., Roques, P., Talbot, C., Pericak-Vance, M., Roses, A., Williamson, R., Rossor, M., Owen, M. & Hardy, J. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706.
- Hutton, M., Lendon, C., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R.C., Stevens, M., de Graaf, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joosse, M., Kwon, J.M., Nowotny, P., Che, L.K., Norton, J., Morris, J.C., Reed, L.A., Trojanowski, J.Q., Basun, H., Lannfelt, L., Neystat, M., Fahn, S., Dark, F., Tannenberg, T., Dodd, P.R., Hayward, N., Kwok, J.B.J., Schofield, P.R., Andreadis, A., Snowden, J., Craufurd, D., Neary, D., Owen, F., Oostra, B.A., Hardy, J., Goate, A., van Swieten, J., Mann, D., Lynch, T. & Heutink, P. (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in *tau* with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702-705.

- Paulson, H.L. (1999) Human genetics '99: trinucleotide repeats. *American Journal of Human Genetics* 64, 339-345.
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papaetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I. & Nussbaum, R.L. (1997) Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045-2047.
- Prusiner, S.B., Scott, M.R., DeArmond, S.J. & Cohen, F.E. (1998) Prion protein biology. *Cell* 93, 337-348.
- Shibata, N., Hirano, A., Kobayashi, M., Siddique, T., Deng, H.X., Hung, W.Y., Kato, T. & Asayama, K. (1996) Intense superoxide dismutase-1 immunoreactivity in intracytoplasmic hyaline inclusions of familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior column involvement. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 55, 481-490.
- Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M. & Goedert, M. (1998) α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95, 6469-6473.
- Wischik, C.M., Novak, M., Thøgersen, H.C., Edwards, P.C., Runswick, M.J., Jakes, R., Walker, J.E., Milstein, C., M., R. & Klug, A. (1988) Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 85, 4506-4510.
- 25 Exemplo 11 – Teste de Dissolução Padrão
 Título: Dissolução de Fluido Intestinal Simulado para cápsulas contendo DAPTZ.
 Realizado por: Encap Drug Delivery, Units 4, 5 & 6, Oakbank Park Way, Livingston, West Lothian, EH53 0TH, Scotland, UK.
- 30 1. Propósito

Este método é adequado para uso como um Método de Teste de Dissolução para o propósito de fornecer dados para a determinação de % de

dissolução com o passar do tempo de unidades de dosagem contendo DAPTZ em Fluido Intestinal simulado (SIF), como descrito na USP (<http://www.usp.org>) como meios de dissolução.

O método é exemplificado com 30mg, 60mg e 100mg de cápsulas de MTC formuladas em Gelucire 44/14 e emprega o Aparato2 USP<711>Dissolução, padrão (pá e peso). Onde relevante baixo, o MTC pode ser substituído por um Composto de DAPTZ alternativo no carregamento apropriado e.

2. CONDIÇÕES DO MÉTODO

10 2.1. Reagentes

Água – Grau de laboratório ou equivalente

Ortofosfato de Di-hidrogênio de Potássio – Grau de laboratório ou equivalente

Hidróxido de Sódio – Grau de laboratório ou equivalente

Pancreatina – Grau de USP

15 Ácido clorídrico – Grau de laboratório ou equivalente

2.2. Segurança

Reagentes são irritantes poss. e danosos poss.

2.3. Condições da Dissolução

Aparato de Dissolução

20 Aparato - Aparato2 USP<711>Dissolução (pá e carga)

Amostra - 1 cápsula colocada em uma carga

Taxa de Rotação - 75 rpm

Temperatura - 37°C ± 0,5°C

Meio de Dissolução - 1000ml de Fluido Intestinal Simulado

25 Tempos de Amostra - 15, 30, 45, 60 minutos

Duração do Teste – 60 minutos

Tamanho da Amostra - 5ml (não substituída) (não filtrada)

Condições do Espectrofotômetro UV

Determinação do comprimento de onda - 665nm

30 Referência - Diluição SIF

Comprimento da Trilha - 10mm

Largura da Faixa – 2,0nm

2.4. Preparação do Fluido Intestinal Simulado (SIF)

Para cada litro requerido, dissolver 6,8g de ortofosfato de di-hidrogênio de potássio em 250ml de água, misturar e adicionar 77ml de Hidróxido de Sódio a 0,2N e 500ml de água. Adicionar 10,0g de mistura de pancreatina, USP, e ajustar a solução resultante com Hidróxido de Sódio a 0,2N ou Ácido clorídrico a 0,2N para um pH de $6,8 \pm 0,1$. Diluir com água a 1000ml.

Esta solução deve ser preparada fresca todo dia.

2.5. Soluções padrão (preparo em duplicata)

10 Precisamente pesar aproximadamente 100mg de MTC em um frasco volumétrico de 100ml. Dissolver em 80ml de 50/50 de etanol/água com 15 min de sonicação e em seguida preparar para volume com 50/50 de etanol/água e misturar bem (1000 $\mu\text{g/ml}$). Transferir 5,0ml desta solução para um frasco volumétrico de 100ml e preparar este frasco para volume com SIF e misturar bem (50 $\mu\text{g/ml}$). Transferir 4,0ml desta solução para um frasco volumétrico de 100 ml e preparar este frasco para volume com água e misturar bem. (2,0 $\mu\text{g/ml}$). Esta é a solução padrão.

2.6. Procedimento da Dissolução

20 Adicionar 1000 ml de Fluido Intestinal Simulado a cada dos seis recipientes de dissolução. Inserir as pás na velocidade giratória correta e permitir equilibrar a $37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$. Colocar seis cápsulas individuais em bacias de aço inoxidável e adicionar uma a cada recipiente observando o tempo.

Em cada dos tempos especificados retirar uma amostra de 5 ml.

25 2.7 Preparação de Referência de Base

Transferir 4,0 ml de SIF para um frasco volumétrico de 100ml e preparar para volume com água e misturar bem. Esta solução deve ser usada como a referência de base no Espectrofotômetro UV.

2.8 Preparação da Amostra

Para as cápsulas de 30mg transferir 3,0ml desta solução para um frasco volumétrico de 50ml e preparar para volume com água e misturar bem (1,8µg/ml).

- 5 Para as cápsulas de 60 mg transferir 3,0 ml desta solução para um frasco volumétrico de 100 ml e preparar para volume com água e misturar bem (1,8 µg/ml).

- 10 Para as cápsulas de 100 mg, transferir 1 ml desta solução para um frasco volumétrico de 50 ml e preparar para volume com água e misturar bem (2,0 µg/ml). Essas são as soluções de amostra.

2.9. Procedimento

Determinar as soluções de amostra e padrão em um espectrofotômetro UV que foi ligado e permitido aquecer em temperatura operacional.

2.10 Verificação Padrão

- 15 Verificar os fatores de resposta média de duas soluções padrão. Padrão 2 deve verificar como 98 a 102% do padrão 1.

2.11 Cálculos

Conduzir todos os cálculos para duas casas decimais.

- 20 Determinar a % de liberação de MTC de cada amostra relativo ao padrão de referência usando a equação apropriada:

% de liberação para cápsula de 100 mg = $Asam/Astd \times Wstd/(100 \text{ mg}) \times P \times 100$

% de liberação para cápsula de 60 mg = $Asam/Astd \times Wstd/(60 \text{ mg}) \times 2/3 \times P \times 100$

- 25 % de liberação para cápsula de 30 mg = $Asam/Astd \times Wstd/(30 \text{ mg}) \times 1/3 \times P \times 100$

Asam é a Absorção de MTC para a amostra individual em 665nm

Astd é a Absorção de MTC média dos dois padrão em 665nm

Wstd é o peso médio de padrão de MTC usados (mg)

- 30 *P* é a Pureza de padrão de referência usado, como um decimal (por exemplo, 0,999)

(onde o material de consumo é usado como um padrão de fator de correção de 1 é aplicado para *P*)

Plotar a % de Liberação de MTC contra o tempo de dissolução em um gráfico onde os recipientes individuais são plotados separadamente.

Plotar a % de Liberação de MTC médio, através de todos os seis recipientes, contra o tempo de dissolução em um gráfico.

5 Desse modo geralmente a seguinte equação pode ser usada.

% de liberação para x mg de cápsula = $\frac{Asam}{Astd} \times \frac{Wstd}{(x) \times d \times P} \times 100$

Será apreciado por aqueles versados na técnica que 'd' é a correção, se requerida, para diluição na preparação de amostra como na etapa 2,8 acima.

10 2.12 Teste padrão para Fluido Gástrico Simulado (SGF)

Este teste padrão é realizado como descrito acima, porém usando SGF no lugar de SIF. SGF é preparado de acordo com USP29 como segue:

15 Fluido gástrico, Simulado, TS-Dissolver 2,0 g de cloreto de sódio e 3,2 g de pepsina purificada, que é derivada de mucosa estomacal de porcino, com uma atividade de 800 a 2500 unidades por mg de proteína, em 7,0 mL de ácido clorídrico e água suficiente para preparar 1000 mL. [Atividade de pepsina é descrita nas especificações de Códex de Substâncias Químicas de Comida em Testes e Ensaio Gerais]. Esta solução de teste tem pH de cerca de 1,2.

20 Exemplo 12 – Modelos quantitativos para a progressão e tratamento de doença de Alzheimer

O processo químico subjacente a doença de Alzheimer é a agregação e truncação de proteínas tau. Neste Exemplo, foram usados modelos cinéticos da série de reações de reação de tau para descrever a progressão da doença e o efeito do tratamento, e para comparar a eficácia dos tratamentos que alvejam partes diferentes da série de reações.

25 1. Formulação de um modelo de equilíbrio

30 A Figura 37A mostra a ligação de uma proteína tau a um agregado de proteínas tau truncadas, seguido pela truncação da proteína tau para formar um agregado maior. Na célula esta reação é incrustada em uma série de reações maior, com trilhas para a criação de novas proteínas tau e para a depuração de agregados.

A Figura 37B mostra um modelo natural. Aqui, S significa a quantidade de proteína tau solúvel, e A a quantidade de tau agregado truncado. Para produzir um modelo cinético, é preciso especificar as taxas. Sabe-se que a taxa de agregação de tau aumenta tanto com a disponibilidade de S quanto com a disponibilidade de A [Wischnik, C.M., Edwards, P.C., Lai, R.Y.K., Roth, M. & Harrington, C.R. (1996) Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 93, 11213-11218]. É natural assumir que há um mecanismo de retroalimentação envolvido na criação de S , e desse modo que a taxa de produção de S depende da quantidade de S [Lai, R.Y.K., Gertz, H.-J., Wischnik, D.J., Xuereb, J.H., Mukaetova-Ladinska, E.B., Harrington, C.R., Edwards, P.C., Mena, R., Paykel, E.S., Brayne, C., Huppert, F.A., Roth, M. & Wischnik, C.M. (1995) Examination of phosphorylated tau protein as a PHF-precursor at early stage Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging 16, 433-445.]. Para outra série de reações mostrada, foi preparada a suposição cinética padrão que a taxa de uma reação é proporcional à quantidade do reagente.

Isto forneceu o modelo cinético mostrado na Figura 37C. Por este desenho entende-se, por exemplo, que se $S(t)$ é a quantidade de proteína tau solúvel em tempo t então

$$d/dt S(t) = \lambda(S(t)) - k_{s0} S(t) - k A(t) S(t) \quad [\text{equação 1}]$$

Escalas de tempo de progressão de doença e de cinéticos

Um aspecto crucial deste modelo é a escala de tempo durante a qual a doença de Alzheimer progride, e sua relação com a escala de tempo durante a qual as equações iguais à *equação 1* operam. A posição é que os dinâmicos das equações cinéticas ocorrem durante horas ou dias, e que a progressão da doença é uma devido à alteração lenta de parâmetros do tipo k_{A0} durante a escala de tempo de anos. Uma posição contrária foi adotada em Wischnik e outros. (1995), isto é, que a escala de tempo dos cinéticos é medida em anos, e que a progressão da doença reflete o aumento gradual de $A(t)$ como modelado pelos cinéticos.

Há duas partes principais de evidência para a separação de escalas de tempo. Primeiro, as experiências *in vitro* [WO96/30766], nas quais o tau solúvel é incubado com o tau truncado de fase sólida, mostram que a maioria do tau solúvel se ligou em uma questão de horas. A segunda parte da evidência vem das experiências *in vivo* em camundongos transgênicos que expressam a proteína tau truncada humana [WO 02/059150]. Esses camundongos lentamente desenvolvem patologia de tau de doença de Alzheimer durante períodos de meses, quando medidos tanto por testes cognitivos quanto por exame neuropatológico [Zabke, C., Dietze, S., Stamer, K., Rickard, J.E., Harrington, C.R., Theuring, F., Seng, K.M. & Wischik, C.W. (2008) Early and advanced stages of tau aggregation In transgenic mouse models. International Conference on Alzheimer's Disease, Chicago, 26-31 de julho de 2008, P1-054]. Quando tratada com doses orais diárias de MTC durante um período de 17 dias, a patologia de doença de Alzheimer foi reduzida [Harrington, C., Rickard, J.E., Horsley, D., Harrington, K.A., Hindley, K.P., Riedel, G., Theuring, F., Seng, K.M. & Wischik, C.M. (2008) Methylthioninium chloride (MTC) acts as a tau aggregation inhibitor (TAI) in a cellular model and reverses tau pathology in transgenic mice models of Alzheimer's disease. International Conference on Alzheimer's Disease, Chicago, 26-31 July 2008, O1-06-04]. Portanto, a escala de tempo dos cinéticos é da ordem de dias, ao mesmo tempo em que a escala de tempo da progressão da doença é muito mais longa, medida em meses para esses camundongos.

A técnica matemática deve, portanto ser esta: é suposto que qualquer paciente tenha constantes de taxa que dependem de quanto tempo ele tem a doença, dito $k_{A0}(a)$ etc. onde a é o número de anos desde o início; e é suposto que os níveis resultantes de S e A sejam os valores de equilíbrio do sistema dinâmico. Para ser concreto, foi preciso resolver as equações iguais a esta forma modificada da *equação 1*:

$$\lambda(S) - k_{S0} S - k A S = 0. \quad [\text{equação 2}]$$

É omitido t , uma vez que não há mais interesse nos dinâmicos

do sistema, porém somente no comportamento e equilíbrio. Algumas vezes foi escrito $S(a)$ etc. para enfatizar a dependência dos valores das constantes de taxa.

Responsável pela criação de novos agregados

5 A reação de agregação (Figura 37A) começa com uma molécula agregada e termina com uma molécula agregada, então descreve o *crecimento* de agregados existentes e não a *criação* de novos agregados. Igualmente, no sistema cinético (Figura 37C), se não for dada forma à criação de agregados então a mistura de A de forma constante diminuirá, significando
10 que a solução de equilíbrio é $A=0$.

O modo mais simples de ser responsável pela criação de novos agregados é alterando-se a estequiometria da reação de agregação. Especificamente, foi assumido o esquema mostrado na Figura 37D (embora os valores atuais de n_1 e n_2 sejam desconhecidos).

15 Por exemplo, se $n_1=2,3$ e $n_2=1,87$ então de 230 moléculas tau e 100 moléculas agregadas há 87 novas moléculas produzidas.

Sumário do modelo

Foi proposto o modelo de sistema dinâmico mostrado na Figura 37E.

20 As equações para o estado de equilíbrio deste sistema são:

$$\lambda(S) = k_{S0}S + n_1 k AS \quad [\text{equação 3}]$$

$$n_2 k AS = k AS + k_{A0}(\alpha) A \quad [\text{equação 4}]$$

No restante deste Exemplo foram descritas várias experiências para quantificar as constantes de taxa e desse modo predizer o efeito do tratamento.

2. Quantificação da progressão da doença

25 Lai e outros. (1995) estudam vários pacientes de Alzheimer pós-morte e encontraram uma relação entre A e S :

$$S = f(A) = \alpha/A^\beta - 1 \quad [\text{equação 5}]$$

onde $\alpha=2450$ e $\beta=0,3459$.

Mukaetova-Ladinska e outros. (Mukaetova-Ladinska, E.B., Garcia-Siera, F., Hurt, J., Gertz, H.J., Xuereb, J.H., Hills, R., Brayne, C., Huppert, F.A., Paykel, E.S., McGee, M., Jakes, R., Honer, W.G., Harrington, C.R. & Wischik, C.M. (2000) Staging of cytoskeletal and β -amyloid changes in human isocortex reveals biphasic synaptic protein response during progression of Alzheimer's disease. American Journal of Pathology 157, 623-636) estudaram vários pacientes de Alzheimer pré- e pós-morte, e encontraram uma relação entre os níveis de PHF e o estágio B de Braak do paciente:

$$10 \quad \text{PHF} = g(B) = \text{Exp}(\gamma B/(\delta - B)) - 1 \quad [\text{equação 1}]$$

onde $\gamma=4,8383$ e $\delta=9,8156$.

É razoável assumir que os níveis de PHF são proporcionais aos níveis de agregados de tau:

$$A = \varepsilon \text{ PHF} \quad [\text{equação 2}]$$

embora ε seja desconhecido.

15 Ohm e outros. [Ohm, T.G., Müller, H., Braak, H. & Bohl, J. (1995) Close-meshed prevalence rates of different stages as a tool to uncover the rate of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. Neuroscience 64, 209-217] estudaram a distribuição do estágio de Braak em uma população, e no anexo foi descrito como a partir de seus dados foi obtida uma relação
20 entre o estágio B Braak médio e o tempo a desde o início da demência, em anos:

$$B = h(a) = \text{***} \quad [\text{equação 8}]$$

Usando essas três relações, foram re-escritas as equações de equilíbrio 3-4 para obter:

$$\lambda(S) = k_{S0} S + n_1 k f^{-1}(S) S \quad [\text{equação 9}]$$

$$k_{A0}(a) = (n_2-1) k f(\varepsilon g(h(a))) \quad [\text{equação 10}]$$

3. Quantificação do efeito de um fármaco

WO 02/055720 descreve um modelo de célula para Doença de Alzheimer, e as medições demonstrando o efeito de MTC em níveis de A . As células foram geneticamente modificadas para produzir tau solúvel S em uma taxa constante. Isoladamente, isto não espontaneamente forma agregados, e então as células foram também modificadas para produzir tau truncado T em uma taxa constante. Foi assumido que as células têm um mecanismo normal para destruir T , e que o efeito do fármaco é para abrir uma série de reações pela qual A é dissolvido e transforma-se em T . Para simplicidade, foi assumido que aqui S é somente usado na série de reações de Alzheimer. Portanto, tem-se o modelo cinético mostrado na Figura 37F.

Foi escrito $k_{AT}(d)$ para enfatizar que esta constante de taxa depende do nível de dose d , e foi assumido que $k_{AT}(0)=0$. Foi estritamente escrito $k_{A0}(a_{\text{cell}})$, onde a_{cell} é o tempo em anos desde o início da doença para essas células, embora isto seja eliminado nas equações.

As equações de equilíbrio para este sistema são:

$$\lambda = k A S n_1 \quad [\text{equação 11}]$$

$$\mu + k_{AT}(d) A = T (k_{T0} + k_{TA}) \quad [\text{equação 12}]$$

$$k_{TA} T + n_2 k A S = k A S + A (k_{AT}(d) + k_{A0}) \quad [\text{equação 13}]$$

Usando equações 11 e 12, pode-se eliminar S e T de equação 12 para obter:

$$A = [(n_2-1)/n_1 \lambda + k_{TA}/(k_{T0} + k_{TA}) \mu] / [k_{A0} + k_{AT}(d) k_{T0}/(k_{T0} + k_{TA})]$$

Escrevendo $A(0)$ para o nível de valor de referência de tau agregado, na ausência de qualquer fármaco, então:

$$A(0) = [(n_2-1)/n_1 \lambda + k_{TA}/(k_{T0} + k_{TA}) \mu] / k_{A0}$$

Essas duas equações cancelam convenientemente, e ordenam que:

$$k_{AT}(d)/k_{A0} = (1 + k_{TA}/k_{T0})(A(0)/A(d) - 1)$$

(foi escrito $A(d)$ para enfatizar que o nível observado de agregados A é uma função da dose d).

WO 02/055720 relata que:

$$A(d)/A(0) = g(d) = \zeta d^\theta / (\eta^\theta + d^\theta) + 1 \quad [\text{equação 14}]$$

onde $\zeta = -1,0665$, $\eta = 51,735$ e $\theta = 1,3328$.

5 4. Quantificação do efeito combinado

Será agora questionado: como esperar que o fármaco altere a progressão da doença? O modelo cinético é agora aquele mostrado na Figura 37G, com as equações de equilíbrio:

$$\lambda(S) = k_{S0}S + n_1 k AS \quad [\text{equação 15}]$$

$$k_{AT}(d) A = T (k_{T0} + k_{TA}) \quad [\text{equação 16}]$$

$$k_{TA} T + n_2 k A S = k A S + A (k_{AT}(d) + k_{A0}(a)) \quad [\text{equação 17}]$$

10 Deseja-se resolver essas equações para $A=A(a,d)$. Para fazer isto, é mais conveniente usar a equação 16 para expressar T em termos de A :

$$T = A k_{AT}(d) / (k_{T0} + k_{TA})$$

e em seguida para substituir em 17 para encontrar uma expressão para $S=S(a,d)$

$$15 \quad (n_2 - 1) k S(a,d) = k_{A0}(a) + k_{AT}(d) k_{T0} / (k_{T0} + k_{TA})$$

e finalmente usar as equações 15 e 9 para transformar isto em uma expressão para $A(a,d)$

$$A(a,d) = f^{-1}(S(a,d)) \quad [\text{equação 18}]$$

20 A expressão para $S(a,d)$ pode de forma mais útil ser escrita como uma relação envolvendo $S(a_0,0)$ onde a_0 é o tempo desde o início da doença no qual o tratamento iniciou. Deve-se também substituir nas expressões obtidas para $k_{A0}(a)$ e $k_{AT}(d)$, para dar:

$$S(a,d)/S(a_0,0) = k_{A0}(a)/k_{A0}(a_0) + k_{A0}(a_{\text{cell}})/k_{A0}(a_0) (1/g(d)-1) \quad [\text{equação 19}]$$

A fórmula para $g(d)$ é dada acima na equação 14, a fórmula para f é dada na equação 8, e a fórmula para $k_{A0}(a)$ é dada na equação 9.

Interpretação do resultado.

Se se deixar $d=0$, a equação 19 determina:

$$5 \quad S(a,0)/S(a_0,0) = k_{A0}(a)/k_{A0}(a_0)$$

Como um aumento, a série de reações pela qual os agregados são depurados se degenera, e $k_{A0}(a)$ diminui para 0; desse modo $S(a,0)$ diminui para 0 e, de acordo com equação 18, A aumenta para a infinidade. Tratando-se com um fármaco em alguma dose fixa, foi prevenido S de diminuir abaixo de um certo limiar:

$$S_{\text{limiar}} = k_{A0}(a_{\text{célula}})/k_{A0}(a_0) (1/g(d)-1)$$

que significa que nós prevenimos A de aumentar acima de um certo limiar $f^{-1}(S_{\text{limiar}})$. Em outras palavras, este tratamento não meramente retarda a progressão da doença, ele a detém.

15 5. Um modelo de tratamento alternativo

Foi sugerido que alguém pode tratar a doença de Alzheimer entre outras coisas inibindo-se a reação de ligação de tau-tau (Wischik, C.M., Edwards, P.C., Lai, R.Y.K., Roth, M. & Harrington, C.R. (1996) Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 93, 11213-11218). Qual efeito isto tem na progressão da doença? Considerar o modelo cinético mostrado na Figura 37H onde $k(d)$ é o valor da constante de taxa, após a reação ter sido inibida por seu fármaco putativo na dose d . As equações de equilíbrio são:

$$25 \quad \lambda(S) = k_{S0}S + n_1 k(d) AS$$

$$n_2 k(d) A S = k(d) A S + A k_{A0}(a)$$

Ao resolver isto, e substituir a equação 8, é obtido:

$$S(a,d)/S(a_0,0) = [k_{A0}(a)/k_{A0}(a_0)] / [k(d)/k(0)]$$

$$A(a,d) = f^{-1}(S(a,d)) / [k(d)/k(0)]$$

Pode ser visto que o nível de $S(a,d)$ diminui para 0 quando o tempo a aumenta, para qualquer dose fixa d . Portanto o nível de A aumenta para infinidade. Em outras palavras, um tratamento baseado puramente na inibição da reação de ligação de tau-tau retardaria a progressão da doença, porém não pode detê-la.

6. Resultados numéricos

A Figura 371 ilustra esses resultados numericamente. O plote esquerdo mostra o efeito de um fármaco que cria uma nova série de reações $A \rightarrow T$, como descrito na Seção 3; o plote esquerdo mostra o efeito de um fármaco que inibe a série de reações $S+A \rightarrow A$, como descrito na Seção **Erro! Fonte de referência não encontrada**. Diferente da plotagem do nível de agregados de tau A , foi plotado MMSE, usando a relação entre MMSE e estágio B de Braak derivado dos dados em Ohm e outros. (1995).

$$\text{MMSE} = \sigma(\tau - B) / (\rho - B)$$

onde $\sigma = 56,2204$, $\tau = 6,5969$ e $\rho = 11,599$, junto com as relações nas equações 6 e 7, e ajustando $\epsilon = 1$. foi plotado isto como uma função de vários anos desde o início do tratamento, para um paciente que iniciou o tratamento em $\text{MMSE} = 15$. A linha pontilhada mostra a deterioração de MMSE com nenhum tratamento; as outras linhas mostram o efeito do tratamento em vários níveis de dose. Os níveis de dose que foram ilustrados aqui são (para o plote esquerdo) $d = 25, 50$ e 90 ; e (para o plote direito) $k(d)/k(0) = 45\%, 20\%, 7\%$.

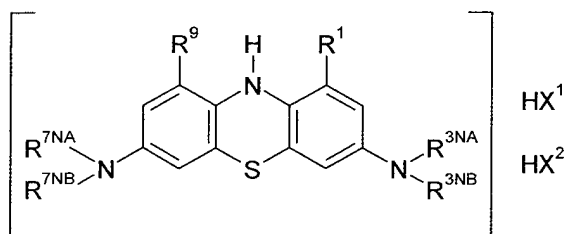
7. Implicações para a depuração de agregados de tau para a progressão de doença.

Essas figuras (Figura 371) ilustram o que já foi explicado algebricamente, isto é, que a inibição de agregação de tau-tau pode somente retardar a progressão da doença, ao passo que ela pode ser detida abrindo-se uma nova série de reações para a dissolução dos agregados. Isto pode ser descrito esquematicamente na Figura 39. A agregação de tau pode ser prevenida afetando-se dois sítios: primeiramente inibindo-se o consumo de tau

no ciclo de agregação e em segundo lugar realçando-se a depuração dos agregados do ciclo de agregação (Figura 39). O nível de tau agregado ou filamentos helicoidais combinados progride estavelmente com o avanço da idade. Se o consumo de tau é prevenido, então o nível de PHFs diminuirá para um certo nível, predito pelo estágio de Braak, tempo após o qual a taxa de progressão continuará como antes. Somente quando a depuração de tau agregado é realçada seus níveis de tau começam a diminuir com o passar do tempo (Figura 39). Em tais circunstâncias, um fármaco tendo tal efeito pode ser referido ser a modificação de doença. Foi descrito por Wischik e outros. (Wischik, C.M., Lai, R.Y.K. & Harrington, C.R. (1997) Modelling prion-like processing of tau protein in Alzheimer's disease for pharmaceutical development. In Microtubule-Associated Proteins: Modifications in Disease. (Eds. J. Avila, R. Brandt, & K. S. Kosik) Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 185-241) que a agregação de tau pode ser semeada por proteínas que surgem da renovação mitocondrial relacionada com a idade (por exemplo, a proteína núcleo 2 do complexo III, porina e ATP sintetase subunidade 9). Esses agregados de tau podem se reunir em PHFs e/ou entrar na série de reações de depuração endossômica-lisossômica, adicionando-se à congestão desta série de reações com o avanço da idade (Figura 40). A depuração realçada de agregados de tau desta série de reações que diminuirá a carga metabólica no neurônio. Este exemplo demonstra como isto pode deter a progressão da doença, em vez de simplesmente retardar sua progressão.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto de DAPTZ na forma reduzida cristalina estável, caracterizado pelo fato de que é selecionado de compostos da seguinte fórmula e sais, solvatos, e hidratos farmacologicamente aceitáveis dos mesmos:



5 em que:
cada dentre R¹ e R⁹ é independentemente selecionado de: -H, C₁₋₄alquila, C₂₋₄alquenila, e C₁₋₄alquila halogenada;

cada dentre R^{3NA} e R^{3NB} é independentemente selecionado de: -H, C₁₋₄alquila, C₂₋₄alquenila, e C₁₋₄alquila halogenada;

10 cada dentre R^{7NA} e R^{7NB} é independentemente selecionado de: -H, C₁₋₄alquila, C₂₋₄alquenila, e C₁₋₄alquila halogenada;

cada dentre HX¹ e HX² é independentemente um ácido prótico.

2. Composto de DAPTZ, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que cada dentre R¹ e R⁹ é independentemente -H.

15 3. Composto de DAPTZ, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que cada dentre R^{3NA} e R^{3NB} e R^{7NA} e R^{7NB} é independentemente -Me, -Et, -nPr, -nBu, -CH₂-CH=CH₂, ou -CF₃.

20 4. Composto de DAPTZ, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que os grupos -N(R^{3NA})(R^{3NB}) e -N(R^{7NA})(R^{7NB}) são iguais, e são selecionados de: -NMe₂ e -NEt₂.

5. Composto de DAPTZ, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que cada dos grupos -N(R^{3NA})(R^{3NB}) e -N(R^{7NA})(R^{7NB}) é: -NMe₂.

25 6. Composto de DAPTZ, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que cada dentre HX¹ e HX² é independentemente um ácido monoprótico.

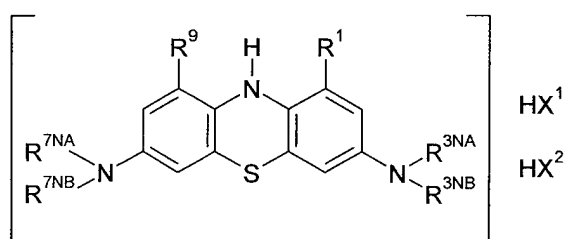
7. Composto de DAPTZ, de acordo com qualquer uma das rei

vindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que cada dentre HX^1 e HX^2 é independentemente um ácido de hidrohaletó.

8. Composto de DAPTZ, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que cada dentre HX^1 e HX^2 é independentemente selecionado de HCl, HBr, e HI.

9. Composto de DAPTZ, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que HX^1 e HX^2 são cada HCl.

10. Composto de DAPTZ na forma reduzida cristalina estável, caracterizado pelo fato de que é selecionado de compostos da seguinte fórmula:



em que:

cada dentre R^1 e R^9 é -H;

cada dentre R^{3NA} e R^{3NB} é -Me;

cada dentre R^{7NA} e R^{7NB} é -Me;

15 cada dentre HX^1 e HX^2 é independentemente um ácido monoprótico.

11. Composto de DAPTZ de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de ser para uso em um método de tratamento ou profilaxia de um distúrbio cognitivo ou de CNS em um paciente, em que o referido distúrbio é um que é susceptível ao tratamento por um composto de 3,7-diaminofenotiazina (DAPTZ),

cujo método compreende oralmente administrar ao referido paciente uma unidade de dosagem contendo o referido composto de DAPTZ como ingrediente ativo.

25 12. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende em forma substancialmente purificada pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98% ou 99%, em peso, de um composto de DAPTZ cristalino

estável, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10.

13. Método de tratamento ou profilaxia de um distúrbio cognitivo ou de CNS em um paciente, caracterizado pelo fato de que o referido distúrbio é um que é susceptível ao tratamento por um composto de 3,7-diaminofenotiazina (DAPTZ),

cujo método compreende oralmente administrar ao referido paciente a unidade de dosagem contendo o referido composto de DAPTZ, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, como ingrediente ativo.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a unidade de dosagem é uma formulação de liberação prolongada do composto de DAPTZ reduzido entre 100-1000 mg.

15. Método, de acordo com a reivindicação 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que a formulação de liberação prolongada libera menos do que <50% em 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, ou 8 horas.

16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 15, caracterizado pelo fato de que a formulação de liberação prolongada compreende não mais do que 5% em peso do composto de DAPTZ oxidado.

17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 16, caracterizado pelo fato de que o distúrbio cognitivo ou de CNS é uma tauopatia.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o tratamento da tauopatia é tal que o composto de DAPTZ cause inibição da agregação da proteína tau associada com o referido estado de doença e também a dissolução de agregados de tau no cérebro do paciente ou indivíduo.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o distúrbio cognitivo ou de CNS é selecionado de Doença de Alzheimer, Doença de Pick, Paralisia supranuclear progressiva (PSP), demência fronto-temporal, parkinsonismo ligado ao cromossoma 17, complexo de desinibição-demência-parkinsonismo-amiotrofia, degeneração páli-

do-ponto-negra, Síndrome de Guam-ALS; degeneração pálido-negra-luysian, degeneração córtico-basal.

20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 19, caracterizado pelo fato de que o distúrbio cognitivo ou de CNS é comprometimento cognitivo brando.

21. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 16, caracterizado pelo fato de que o distúrbio cognitivo ou de CNS é uma sinucleinopatia, que é opcionalmente doença de Parkinson, demência com corpos de Lewy, atrofia de múltiplos sistemas, parkinsonismo induzido por fármaco, ou insuficiência autônoma pura (PAF).

22. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 21, caracterizado pelo fato de que o paciente é um o qual acredita-se estar em risco acima da média de um distúrbio hematológico, os efeitos do qual possa de outro modo ser exacerbado pelo composto de DAPTZ.

23. Método, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o paciente é um conhecido ou que acredita-se estar sofrendo de uma hemoglobinopatia que é opcionalmente doença falciforme, talassemia, metemoglobinemia; uma anemia que é opcionalmente uma anemia hemolítica; uma malignidade hematológica que é opcionalmente linfoma, mieloma, plasmacitoma ou leucemia, uma coagulopatia que é opcionalmente hemofilia.

24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 19, caracterizado pelo fato de que o composto de DAPTZ é fornecido como uma composição farmacêutica compreendendo o composto de DAPTZ e um veículo, diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

25. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a composição farmacêutica é para uma terapia de combinação e compreende além do composto de DAPTZ um outro ingrediente ativo selecionado de: um inibidor de colinesterase; um antagonista de receptor de NMDA; um antagonista de receptor muscarínico; um inibidor de conversão de proteína precursora de amiloide para beta-amiloide.

26. Uso de um composto de DAPTZ, como definido em qualquer

uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma unidade de dosagem de medicamento para uso em um método de tratamento de um distúrbio cognitivo ou de CNS em um paciente..

27. Produto de fármaco, caracterizado pelo fato de que compreende uma unidade de dosagem, em que a unidade de dosagem compreende pelo menos um excipiente farmacologicamente aceitável e, como um ingrediente ativo, um composto de DAPTZ isolado puro, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10,

cuja unidade de dosagem realça o benefício cognitivo ou de CNS relativo vs. efeitos hematológicos do composto de DAPTZ realçando-se a absorção no estômago e a terapia minimizando a formação de dímeros de DAPTZ favorecidos nas condições alcalinas do intestino delgado e intestino inferior.

28. Método de rotular uma proteína de doença agregada associada com um distúrbio neurodegenerativo no cérebro de um paciente, em que a referida proteína de doença agregada é uma que é susceptível à rotulação por um composto de DAPTZ, caracterizado pelo fato de que o referido método compreende oralmente administrar ao referido paciente uma unidade de dosagem contendo o referido composto de DAPTZ, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, como ingrediente ativo rotulado.

29. Método, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o composto de DAPTZ incorpora, é conjugado para, é quelado com, ou é de outro modo associado com, um ou mais rótulos detectáveis opcionalmente selecionados de: isótopos, radioisótopos, átomos de emissão de pósitrons, rótulos de ressonância magnética, tinturas, marcadores fluorescentes, grupos antigênicos, ou porções terapêuticas.

30. Método, de acordo com a reivindicação 28 ou 29, caracterizado pelo fato de que o composto de DAPTZ incorpora um átomo de emissão de pósitron.

31. Composto de DAPTZ, caracterizado pelo fato de ser para uso em um método, como definido em qualquer uma das reivindicações 28 a 30.

32. Uso de um composto de DAPTZ, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma unidade de dosagem para uso em um método, como definido em qualquer uma das reivindicações 28 a 30.

5 33. Produto de fármaco, caracterizado pelo fato de que compreende uma unidade de dosagem, como definida em qualquer uma das reivindicações 28 a 30, em que a unidade de dosagem compreende pelo menos um excipiente farmacologicamente aceitável e, como um ingrediente ativo, um composto de DAPTZ isolado puro.

RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSTOS DIAMINOFENOTIAZINAS, PRODUTO DE FÁRMACO E COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO OS MESMOS, BEM COMO USOS DOS REFERIDOS COMPOSTOS"**.

5 A presente invenção refere-se geralmente aos métodos e materiais para uso no tratamento ou profilaxia de doenças, por exemplo, distúrbios cognitivos, usando diaminofenotiazinas. Em particular, libera para tratamentos tendo propriedades farmacocinéticas otimizadas, e formas de dosagem são pretendidas para melhorar os benefícios de CNS ou cognitivos
10 relacionados das diaminofenotiazinas, por exemplo, em comparação aos efeitos hematológicos.