

FACULDADE DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ADILIO DA SILVA DADDA

**AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA PRÉ-CLÍNICA DE CANDIDATOS A FÁRMACOS
ANTITUBERCULOSE**

Porto Alegre
2018

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

ADILIO DA SILVA DADDA

**AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA PRÉ-CLÍNICA DE
CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTITUBERCULOSE**

Porto Alegre
2018

ADILIO DA SILVA DADDA

**AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA PRÉ-CLÍNICA DE
CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTITUBERCULOSE**

Tese apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Doutor pelo Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular da Escola de Ciências da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Basso

Coorientador: Valnês da Silva Rodrigues Junior

Porto Alegre
2018

Ficha Catalográfica

D121a Dadda, Adilio da Silva

Avaliação farmacocinética pré-clínica de candidatos a fármacos antituberculose / Adilio da Silva Dadda . – 2018.

84 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Basso.

Co-orientador: Prof. Dr. Valnês da Silva Rodrigues Junior.

1. Farmacocinética. 2. Tuberculose. 3. IQG-607. 4. Derivados quinolínicos. 5. Atividade antituberculose. I. Basso, Luiz Augusto. II. Junior, Valnês da Silva Rodrigues. III. Título.

ADILIO DA SILVA DADDA

**AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA PRÉ-CLÍNICA DE
CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTITUBERCULOSE**

Tese apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Doutor pelo Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular da Escola de Ciências da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Bibiana Verlindo de Araujo - UFRGS

Prof. Dr. Jeverson Frazzon - UFRGS

Prof. Dr. Maurício Reis Bogo - PUCRS

Porto Alegre
2018

Dedico esse trabalho aos meus pais,
Ivo e Teresinha, pelo apoio e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Diógenes Santiago Santos (in memoriam), pela oportunidade de participar do grupo de pesquisa no Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional/Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (CPBMF/INCT-TB), pela bolsa auxílio que foi essencial para a realização deste doutorado, e por toda a confiança depositada ao longo desses anos nos projetos desenvolvidos. Deixo aqui, portanto, minha enorme gratidão.

Ao meu orientador, Professor Luiz Augusto Basso, por ter me acompanhado desde a época do mestrado, e durante todo o tempo de Doutorado, por ter depositado confiança, pelos ensinamentos, e pelas discussões relacionadas aos resultados obtidos que foram fundamentais em todas as etapas deste trabalho.

Ao Doutor Valnês da Silva Rodrigues Junior, pela confiança e disponibilidade, pela ajuda nos desafios encontrados, pela objetividade na realização dos experimentos, e também pela revisão desta tese e do manuscrito.

À Professora Teresa Dalla Costa pela colaboração nos principais resultados obtidos neste trabalho, que foram essenciais.

Ao Doutor Guilherme Oliveira Petersen pela valiosa ajuda nos enormes desafios encontrados durante a realização deste trabalho.

Ao Doutorando Fernando Carreño pela disponibilidade e enorme ajuda nos experimentos, que foram essenciais.

Aos demais Professores e Pós-doutorandos do CPBMF/INCT-TB pelo apoio e ajuda na resolução de problemas.

Aos colegas e ex-colegas do CPBMF e da QUATRO G que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

À CAPES, ao BNDES, e demais órgãos de fomento, pelo financiamento, fundamental para a realização deste trabalho.

“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor,
a eletricidade e a energia atômica: a vontade.”

Albert Einstein

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa, causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis*, responsável por um número considerável de mortes em todo o mundo. O composto IQG-607 é um análogo da isoniazida (INH) que, de acordo com diversos experimentos realizados pelo grupo de pesquisa envolvido no seu estudo, apresenta atividade anti-TB *in vitro* e *in vivo*. Estudos iniciais do mesmo grupo demonstraram que o composto INCT-TB551 (um derivado quinolínico) também apresenta promissora atividade anti-TB. O objetivo deste estudo foi desenvolver metodologias analíticas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) para a quantificação do composto IQG-607 e do INCT-TB551, em plasma de camundongos, para a realização de estudos de farmacocinética. O método analítico para a determinação do composto IQG-607 em plasma de camundongos apresentou linearidade ($r = 0.9992$) na faixa de 0.5–50 $\mu\text{g/mL}$. Os valores de precisão intra e inter-ensaio ($\text{CV} < 15\%$) e de recuperação (92.07-107.68%) demonstram que o método é preciso e exato para a análise do composto. Além disso, o IQG-607 se mostrou estável no plasma por até 30 dias, quando armazenado no freezer $-80\text{ }^\circ\text{C}$, e estável após o tratamento da amostra do plasma, por até 4 horas (h) na bancada (gelo) e no *autosampler* do equipamento ($6\text{ }^\circ\text{C}$). A aplicabilidade do método analítico para o estudo de farmacocinética foi determinada após a administração i.v. e oral em camundongos (animais em jejum e animais alimentados). As concentrações plasmáticas de IQG-607 foram quantificadas por até 2,5 h após a administração nos animais. Quando administrado pela via i.v. foi observado um tempo de meia vida ($t_{1/2}$) curto (1,14 h), elevado clearance (CL) (3,89 L/h/kg), e um moderado volume de distribuição (V_{dss}) (1,22 L/kg). Resultados similares foram obtidos após a administração oral (250 mg/kg) em camundongos que estavam em jejum ou alimentados. A biodisponibilidade oral (F) foi de aproximadamente 4 %, valor que não foi alterado pela alimentação. A taxa de ligação a proteínas plasmáticas do IQG-607 é de aproximadamente $88 \pm 0.9\%$. Experimentos recentes em camundongos infectados com *M. tuberculosis* demonstraram que o composto INCT-TB551 não apresentou atividade neste modelo *in vivo*, ao contrário dos estudos de atividade *in vitro* realizados anteriormente. Um método analítico para a determinação do composto INCT-TB551 em plasma de camundongos foi desenvolvido para avaliar se o composto estava sendo absorvido após a administração oral. O método analítico apresentou linearidade na faixa de 0.1-10 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.9999$). Após o método ter sido padronizado, o composto foi administrado por via oral em camundongos, e as concentrações plasmáticas foram quantificadas por até 1 h após a administração. O composto INCT-TB551 foi detectado no plasma dos animais, indicando que estava sendo absorvido. Apesar de absorvido quando administrado por via oral, o composto não está apresentando atividade contra *M. tuberculosis* neste modelo animal, o que pode estar relacionado, por exemplo, com a formação de metabólitos inativos e/ou ainda, o nível plasmático atingido pode ser inadequado para que o composto consiga exercer o seu efeito terapêutico, e isto precisa ser melhor investigado. Os protocolos apresentados neste trabalho poderão servir como suporte para estudos de farmacocinética de compostos que se apresentam promissores,

colaborando para o avanço nas etapas necessárias para o desenvolvimento de possíveis fármacos.

Palavras-chave: Farmacocinética, tuberculose, IQG-607, análogo da isoniazida, derivados quinolínicos, INCT-TB551, atividade antituberculose

ABSTRACT

Tuberculosis (TB), caused mainly by *Mycobacterium tuberculosis*, is an infectious disease responsible for a significant number of deaths worldwide. IQG-607 is an analog of isoniazid (INH). According to several experiments carried out by our research group, IQG-607 showed both *in vitro* and *in vivo* anti-TB activity. Initial studies showed that the compound INCT-TB551 (a quinoline derivative) also presents *in vitro* anti-TB activity. The aim of this study was to develop analytical methods by high performance liquid chromatography (HPLC-UV) for quantification of IQG-607 and INCT-TB551 in mice plasma, and therefore to perform pharmacokinetic studies. The analytical method for the determination of IQG-607 in mice plasma showed linearity ($r = 0.9992$) in 0.5–50 $\mu\text{g/mL}$ concentration range. Intra- and inter-day precision was $< 15\%$, and the recovery ranged from 92.07 to 107.68%, showing that the method provides a precise and accurate analysis of the compound. In addition, IQG-607 was stable in plasma for at least 30 days at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, and after plasma processing, for 4 h in the auto-sampler ($6\text{ }^{\circ}\text{C}$) and maintained on ice (recovery $> 85\%$). The applicability of the method for pharmacokinetic studies was determined after intravenous (i.v.) and oral (fasted and fed conditions) administrations to mice. IQG-607 levels in plasma were quantified at time points for up to 2.5 h. A short half-life ($t_{1/2}$) (1.14 h), a high clearance (CL) (3.89 L/h/kg), a moderate volume of distribution at steady state (V_{dss} , 1.22 L/kg), were observed after i.v. (50 mg/kg) administration. Similar results were obtained for oral administration (250 mg/kg) under fasted and fed conditions. The oral bioavailability (F), approximately 4%, was not altered by feeding. Plasma protein binding was $88.87 \pm 0.9\%$. Recently, experiments in mice infected with *M. tuberculosis* have shown that the compound INCT-TB551 has no *in vivo* activity, unlike previous *in vitro* activity studies. An analytical method was developed for the determination of INCT-TB551 in mice plasma to assess compound absorption, if any, after oral administration. The analytical method presented linearity from 0.1–10 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.9999$). After development of the analytical method, the compound was orally administered in mice and the plasma levels were quantified at time points for up to 1 h. The compound INCT-TB551 was detected in the plasma of animals, which indicated that INCT-TB551 was absorbed. Although absorbed when orally administered, the compound is not exhibiting activity against *M. tuberculosis* in this animal model. This finding may be associated with the formation of inactive metabolites and/or the plasma concentration of INCT-TB551 achieved may be inadequate to exert its therapeutic effect. However, these points require further investigations. The protocols described here may serve as support to initiate pharmacokinetic studies of promising compounds, collaborating to advance in earlier stages of drug development.

Key-words: Pharmacokinetics, tuberculosis, IQG-607, isoniazid analog, quinoline derivatives, INCT-TB551, anti-tuberculosis activity

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME - Absorção, distribuição, metabolização e excreção

ASC - Área sob a curva

$ASC_{0 \rightarrow t}$ - Área sob a curva do tempo zero até o último tempo em que a concentração do fármaco foi determinada no fluido biológico

$ASC_{0 \rightarrow \infty}$ - Área sob a curva do tempo zero ao infinito

ASC_{ext} - Área sob a curva extrapolada

ASMC - Área sob a curva do primeiro momento

$ASMC_{0 \rightarrow t}$ - Área sob a curva do primeiro momento do tempo zero até o último tempo em que a concentração do fármaco foi determinada no fluido biológico

$ASMC_{0 \rightarrow \infty}$ - Área sob a curva do primeiro momento do tempo zero ao infinito

$ASMC_{ext}$ - Área sob a curva do primeiro momento extrapolada

BRICS - Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul

CEUA - Comitê de Ética para o Uso de Animais

CL - Clearance

CL-EM - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

CLAE/HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*)

C_{max} - Concentração máxima determinada do fármaco no fluido biológico

CN - Grupos cianetos

CPBMF - Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional

DMSO - Dimetil sulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico (*deoxiribonucleic acid*)

DOTS - Tratamento Diretamente Supervisionado de Curta Duração (*Directly Observed Treatment Short course*)

F (%) - Biodisponibilidade

FDA - Órgão Regulatório de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration*)

GSK - Grupo GlaxoSmithKline

HIV - Vírus da imunodeficiência humana (*human immunodeficiency virus*)

IC50 - Concentração inibitória do fármaco que induz 50% de lise ou morte celular

I.V. - Intravenosa

IDH - Índice de desenvolvimento humano

IQG-607 - Pentaciano(isoniazida)ferrato(II)

INCT-TB - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose

INH - Isoniazida

InhA - Gene codificante da enzima enoil-ACP-CoA redutase de *Mycobacterium tuberculosis*

InhA - Enzima 2-*trans*-enoil-ACP(CoA) redutase de *Mycobacterium tuberculosis*

katG - Gene codificante da enzima peroxidase-catalase de *Mycobacterium tuberculosis*

KatG - Enzima peroxidase-catalase de *Mycobacterium tuberculosis*

Ke - Constante de eliminação

MDR-TB - Tuberculose resistente a múltiplos medicamentos (*multidrug resistant tuberculosis*)

CIM - Concentração inibitória mínima

MS - Ministério da Saúde

NAD - Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada

OMS/WHO - Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)

PAMPA - Permeabilidade em membrana artificial paralela

PEG - Polietilenoglicol

QOA - Quinoloxiacetamidas

RIF - Rifampicina

SIDA - Síndrome da imunodeficiência humana

SIPESQ – Sistema de pesquisas da PUCRS

$t_{1/2}$ - Tempo de meia vida

TB – Tuberculose

TDR-TB - Tuberculose totalmente resistente a medicamentos (*totally drug resistant tuberculosis*)

T_{max} - Tempo após a administração em que o fármaco alcançou a sua concentração máxima

TMR - Tempo de residência médio

T_R - tempo de retenção

UFC - Unidades formadoras de colônias

UV/VIS - Ultravioleta/visível

Vdss - Volume de distribuição no *steady-state*

XDR-TB – Tuberculose extensivamente resistente a medicamentos (*extensively drug resistant tuberculosis*)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Taxas de incidência de TB, no ano de 2016.....	17
Figura 2 - Granulomas (A) sólido, (B) necroso e (C) caseoso.....	18
Figura 3 - Prevalência estimada de HIV em casos de TB, em 2016.....	19
Figura 4 - Histórico da descoberta de fármacos e do desenvolvimento de regimes de tratamentos para a TB.....	20
Figura 5 - Estruturas químicas da INH (A) e do IQG-607 (B).....	23
Figura 6 - Mecanismo de ação proposto do IQG-607, mediado por ativação redox..	23
Figura 7 - Imagens representativas de pulmões de camundongos não infectados (A), infectados com <i>M. tuberculosis</i> H37Rv e não tratados (B, C), tratados com INH (D) e tratados com IQG-607 (E, F).....	24
Figura 8 - Estrutura química do núcleo quinolínico.....	27
Figura 9 - Estrutura química da GSK358607A (QOA).....	28
Figura 10 - Estruturas químicas dos compostos (A) INCT-TB469, (B) INCT-TB542, (C) INCT-TB576, (D) INCT-TB551, e (E) INCT-TB596.....	29
Figura 11 - Curva da concentração plasmática do fármaco em função do tempo.....	32
Figura 12 - (A) A concentração plasmática de um fármaco em função do tempo pode ser dividida em uma série de trapezoides. (B) Cálculo da área de um trapezoide.....	33
Figura 13 - Representação esquemática dos perfis farmacocinéticos para fármacos/substâncias administradas por via oral ou intravenosa.....	34
Figura 14 - Representação esquemática da área terminal de uma curva de concentração em função do tempo após a administração intravenosa de um fármaco.....	35
Figura 15 - Cromatogramas referentes às análises do (A) branco e do (B) INCT-TB551 (10 µg/mL) (T_R = aprox. 8 min). (C) Espectro de absorção na região do UV referente ao pico cromatográfico do analito.....	52
Figura 16 - Cromatogramas referentes às análises do (A) plasma branco e do (B) INCT-TB551 em plasma (10 µg/mL) (T_R = 7.95 min).....	53
Figura 17 - Curva de calibração para o método de determinação do composto INCT-TB551 em plasma de camundongos.....	54
Figura 18 - Perfil da concentração plasmática <i>versus</i> tempo após a administração oral do composto INCT-TB551 (50 mg/kg) em camundongos.....	56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. A TUBERCULOSE HUMANA.....	16
1.1.1. Transmissão e infecção.....	17
1.1.2. Tratamento da doença e o aparecimento de cepas de bactérias resistentes a medicamentos.....	19
1.2. O COMPOSTO IQG-607.....	22
1.2.1. Métodos de detecção do composto IQG-607.....	26
1.3. DERIVADOS QUINOLÍNICOS.....	26
1.4. FARMACOCINÉTICA.....	30
1.4.1. Parâmetros farmacocinéticos.....	32
2. JUSTIFICATIVA	39
3. OBJETIVOS	40
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
4. RESULTADOS	41
4.1. CAPÍTULO I - MANUSCRITO PUBLICADO NO PERIÓDICO EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES.....	41
4.2. CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO DO COMPOSTO INCT- TB551 APÓS A ADMINISTRAÇÃO ORAL EM CAMUNDONGOS.....	49
4.2.1. Método de detecção do composto INCT-TB551 por CLAE.....	50
4.2.1.1. Materiais e reagentes.....	50
4.2.1.2. Condições cromatográficas e preparação das amostras.....	50
4.2.1.3. Análise do composto.....	51
4.2.2. Avaliação da absorção do composto INCT-TB551.....	54
4.2.2.1. Animais.....	54
4.2.2.2. Administração do composto e análise no plasma.....	54
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
REFERÊNCIAS	59
ANEXO A: CARTA DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS, REGISTRO CEUA - 14/00427	72

ANEXO B: CARTA DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS, CÓDIGO SIPESQ: 7710.....	74
ANEXO C: CARTA DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS, CÓDIGO SIPESQ: 7500.....	76
ANEXO D: TOXICOLOGICAL PROFILE OF IQG-607 AFTER SINGLE AND REPEATED ORAL ADMINISTRATION IN MINIPIGS: AN ESSENTIAL STEP TOWARDS PHASE I CLINICAL TRIAL.....	78
ANEXO E: THERMODYNAMICS, FUNCTIONAL AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF INOSINE-URIDINE NUCLEOSIDE HYDROLASE FROM <i>LEISHMANIA BRAZILIENSIS</i>	80
ANEXO F: EFFECT OF THE BRADYKININ 1 RECEPTOR ANTAGONIST SSR240612 AFTER ORAL ADMINISTRATION IN <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> -INFECTED MICE.....	82

1. INTRODUÇÃO

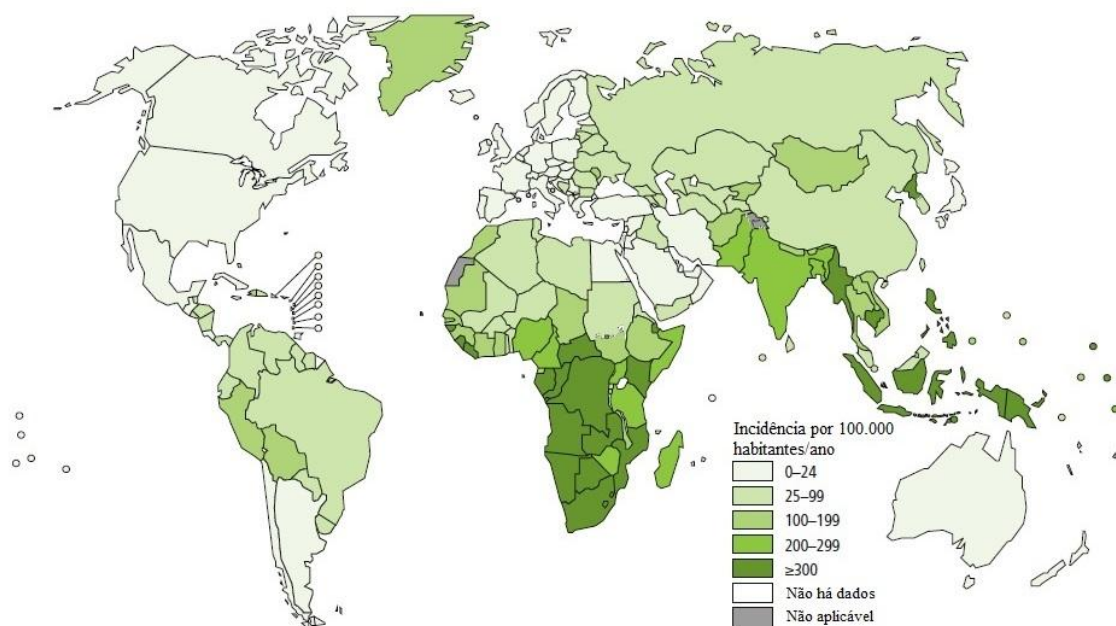
1.1. A TUBERCULOSE HUMANA

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (bacilo de Koch) que afeta tipicamente os pulmões (TB pulmonar), podendo afetar também outros sítios do organismo (TB extrapulmonar) (WHO, 2015). Historicamente, a TB pertence ao grupo das doenças negligenciadas, onde as indústrias farmacêuticas não pretendem investir devido à percepção de baixo potencial comercial (Harper, 2007). Considerada um dos principais problemas de saúde no mundo, a TB é a nona principal causa de mortes, e atinge aproximadamente 10 milhões de pessoas a cada ano. Juntamente com a síndrome da imunodeficiência humana (SIDA), são as duas principais causas de mortes por doenças infecciosas reportadas atualmente (WHO, 2016, WHO 2017).

No ano de 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que cerca de 1,3 milhão de pessoas morreram por conta da TB no mundo (WHO, 2017). A sua ocorrência está relacionada, por exemplo, ao baixo índice de desenvolvimento humano (IDH) caracterizado por condições sociais desfavoráveis, ao baixo índice de escolaridade, e a precárias condições de habitação e saúde (Guimarães, 2015, San Pedro *et al.*, 2013). Tendo isto em vista, o número de casos incidentes de TB em 2016 para cada 100.000 habitantes difere consideravelmente entre os países (WHO, 2017) (**Figura 1**). As menores taxas de incidência ocorrem em países ricos, como os da Europa Ocidental, Canadá, Estados Unidos da América, Austrália, e Nova Zelândia. Os países sul-africanos apresentam as taxas mais elevadas, sendo acima de 300 para cada 100.000 habitantes. Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul (BRICS) representam, a nível mundial, quase 50% dos casos de TB (WHO, 2017). No caso do Brasil, assim como em muitos países do continente americano, há uma incidência entre 25 e 99 casos para cada 100.000 habitantes. Aproximadamente 25 mil novos casos de TB foram notificados nas capitais brasileiras, e Porto Alegre apresenta uma taxa de incidência de 80 para cada 100 mil habitantes (MS, 2017).

Outros fatores também estão relacionados com a ocorrência da TB, como a migração de estrangeiros que residem em países com altos índices de TB, e a reativação de infecções latentes destes indivíduos, sendo, portanto, um problema global (Brennan, 1997).

Figura 1. Taxas de incidência de TB, no ano de 2016.



Fonte: Extraído de WHO, (2017).

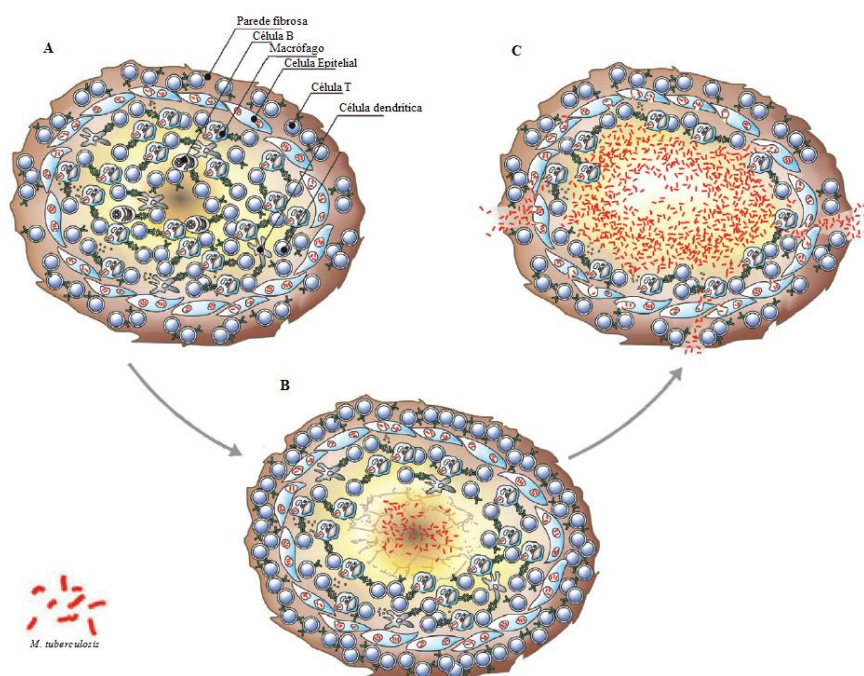
1.1.1. Transmissão e infecção

M. tuberculosis é transmitido através de aerossóis expelidos por indivíduos que possuem a TB na forma ativa, que quando inalados por outros indivíduos, e ao atingirem os pulmões, são fagocitados por macrófagos alveolares ou por células dendríticas (Young *et al.*, 2008). Para se tornar infectado, basta a inalação de gotículas de aerossóis contendo um pequeno número de micobactérias (Kaufmann, 2001). A resposta imune do indivíduo, bem como, as características da bactéria no que diz respeito à virulência, determina se a doença estará na forma ativa ou latente (Young *et al.*, 2008).

Quando o sistema imune está funcionando corretamente, a infecção é contida nos pulmões, ocorrendo a formação de granulomas, onde macrófagos ativos e outras células limitam os danos no órgão e restringem a disseminação da micobactéria (Gengenbacher *et al.*, 2012, Smith, 2003, Saunders *et al.*, 1999) (**Figura 2 A**). Assim é definida a TB latente, onde ocorre a presença de resposta imune contra o *M. tuberculosis* sem evidência clínica de TB ativa (Getahun *et al.*, 2015, Dye *et al.*, 1999). No entanto, indivíduos com TB latente apresentam risco de desenvolver a TB ativa, e

consequentemente, de se tornarem transmissores da doença, pois apesar de o granuloma controlar o patógeno, ele não chega a eliminar a doença (Getahun *et al.*, 2015). Assim, a probabilidade de desenvolver a doença é maior em pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), devido à deficiência imune do paciente (WHO, 2017).

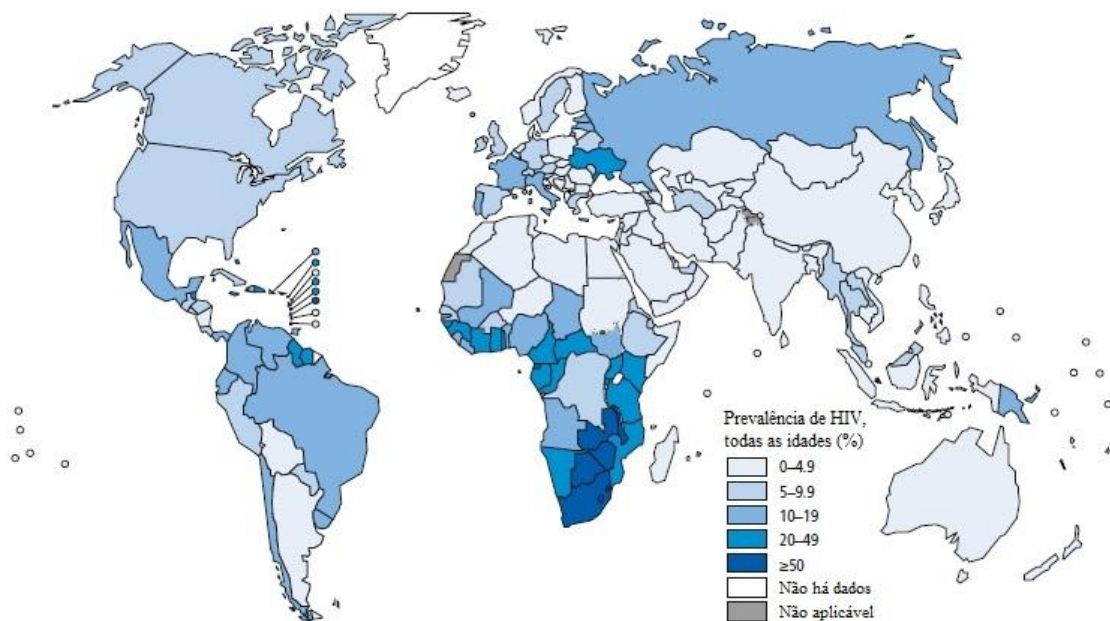
Figura 2. Granulomas (A) sólido, (B) necroso e (C) caseoso. A maturação dos granulomas ocorre em diferentes velocidades, e normalmente culmina na coexistência de todas as formas de lesão durante a TB ativa. O granuloma caseoso perde a solidez devido a deterioração do seu centro e acúmulo de detritos da célula hospedeira. O *M. tuberculosis* cresce para números elevados, e é liberado pelas vias aéreas através de aerossóis.



Fonte: Adaptado de Gengenbacher *et al.*, (2012).

Segundo a OMS, em 2016 foi estimado que, a nível mundial, 10% dos novos casos de TB eram HIV positivos, e destes, a maior parte se concentra na África (WHO, 2017). A proporção de casos de TB coinfectados com HIV também é maior na região africana, excedendo 50% em alguns países sul-africanos (**Figura 3**). No caso do Brasil, chega a 19% os casos de coinfeção TB/HIV (**Figura 3**). Além do HIV, outros fatores exógenos podem comprometer o sistema imune do paciente (fumo, álcool e poluição), aumentando assim, o risco de progressão da doença (Narasimhan *et al.*, 2013).

Figura 3. Prevalência estimada de HIV em casos de TB, em 2016.



Fonte: Extraído de WHO, (2017).

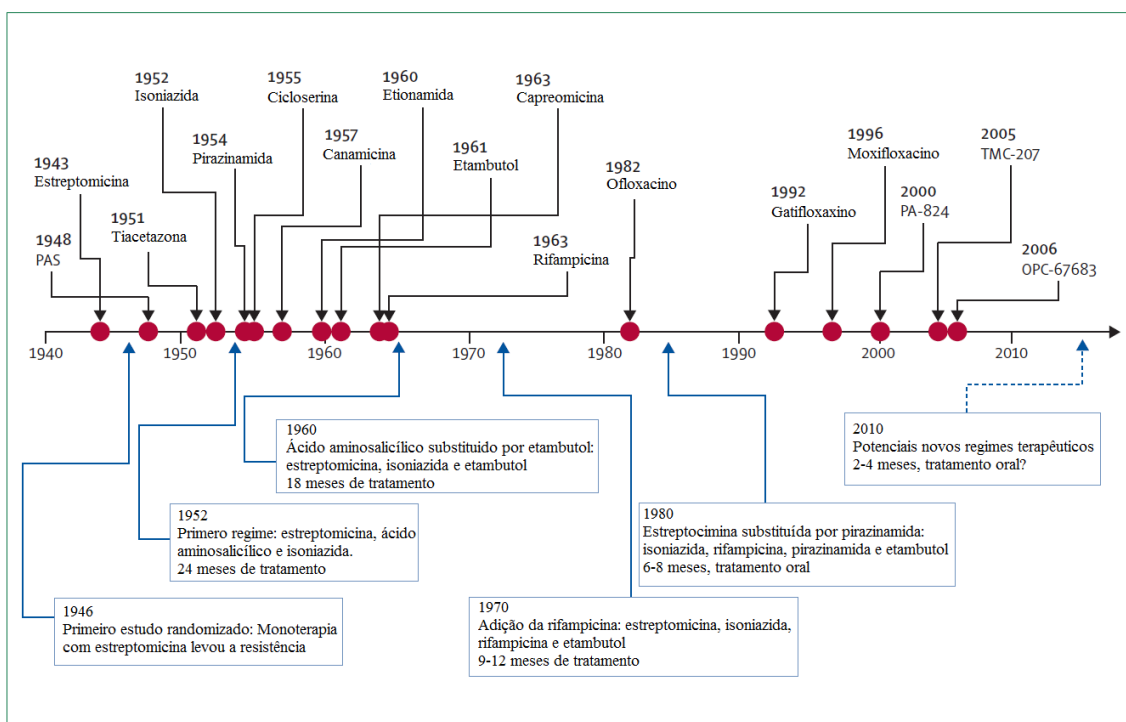
Em relação à TB ativa, há a formação de granulomas necróticos (estágios iniciais da TB ativa) e caseosos (estágios mais avançados da TB) que perdem a sua solidez, e ocorre o aumento no número de micobactérias (Gengenbacher *et al.*, 2012) (**Figura 2 B e C**). Com isso, *M. tuberculosis* tem acesso aos capilares sanguíneos e ao espaço alveolar, abrindo caminho para a disseminação e transmissão (Gengenbacher *et al.*, 2012). O indivíduo apresenta sintomas típicos, como a tosse persistente (podendo ser acompanhada de escarro sanguinolento), febre, sudorese noturna, e emagrecimento (Ryu, 2015, WHO, 2014). O diagnóstico da doença geralmente pode ser feito através da radiografia do tórax, detecção no escarro, teste cutâneo da tuberculina, bem como, por testes de diagnósticos moleculares (Ryu, 2015, Esmail *et al.*, 2014).

1.1.2. Tratamento da doença e o aparecimento de cepas de bactérias resistentes a medicamentos

Diversos compostos com eficiência terapêutica contra a TB foram descobertos na metade do século passado, gerando perspectivas de que erradicariam a doença (Blanchard, 1996). O mesmo ocorreu ao longo das últimas décadas (com pouca frequência), e diferentes regimes terapêuticos foram propostos (Ma *et al.*, 2010). A

Figura 4 representa o histórico de descobertas de fármacos, e alguns dos principais regimes terapêuticos propostos ao longo dos anos. Adicionalmente, como exemplo recente, foi descoberto o composto Q203 que está atualmente em estudos clínicos (Jang *et al.*, 2017, Pethe *et al.*, 2013). No entanto, é possível observar um número limitado de candidatos a fármacos antituberculose que apresentam novo mecanismo de ação ao longo dos últimos anos (Kumar *et al.*, 2018).

Figura 4. Histórico da descoberta de fármacos e do desenvolvimento de regimes de tratamentos para a TB. Compostos que estão em estágios iniciais de desenvolvimento não são mostrados. A seta com linha tracejada representa um futuro regime terapêutico. Os pontos vermelhos representam quando os fármacos foram reportados pela primeira vez.



Fonte: Extraído de Ma *et al.*, (2010).

A OMS, em meados de 1990, implementou um programa denominado Tratamento Diretamente Supervisionado de Curta Duração, do inglês *Directly Observed Treatment Short course* (DOTS). O DOTS é uma estratégia recomendada internacionalmente para o controle da TB, sendo reconhecida como eficaz e custo-efetiva. Dentro desta estratégia, é recomendado o tratamento utilizando fármacos denominados de primeira

linha, que consiste em um regime terapêutico de 6 meses com os fármacos etambutol, isoniazida (INH), pirazinamida, e rifampicina (RIF). Nestes 6 meses, durante 2 meses se utiliza os quatro fármacos acima descritos. Nos 4 meses seguintes, se utiliza somente INH e RIF (WHO, 2014). Segundo a OMS, as taxas de sucesso no tratamento chegam a 85% ou mais, se forem administrados corretamente durante o tempo requerido (WHO, 2016, WHO, 2017). Com isso, a maioria das mortes poderiam ser evitadas com o tratamento adequado. O Brasil, contudo, tem apresentado as piores taxas de sucesso no tratamento nos últimos anos, juntamente com a Rússia (WHO, 2015).

As falhas no sucesso do regime terapêutico estão relacionadas com a duração, complexidade, e efeitos adversos, contribuindo para o aumento de casos de TB resistente a múltiplos medicamentos (MDR-TB), TB extensivamente resistente a medicamentos (XDR-TB), e mais recentemente reportado, TB totalmente resistente a medicamentos (TDR-TB) (Boogaard *et al.*, 2009, Chan *et al.*, 2002). Casos de MDR-TB apresentam resistência a INH e RIF, e para o tratamento dos pacientes, recomenda-se a utilização de fármacos de segunda linha durante cerca de 20 meses (WHO, 2014). Além de ser mais longo que o tratamento de primeira linha, o de segunda linha é mais caro, tóxico para os pacientes, e as taxas de sucesso nos tratamentos são insatisfatórias. Nos casos de XDR-TB, além da resistência apresentada nos casos de MDR-TB, a micobactéria é resistente a pelo menos uma fluoroquinolona, e a um dos fármacos injetáveis de segunda linha (amicacina, canamicina, capreomicina) (WHO, 2017). Indivíduos que possuem TDR-TB não respondem a nenhuma terapia padrão disponível até o momento, permanecendo com a doença mesmo após o tempo preconizado de tratamento com fármacos de segunda linha (Velayati *et al.*, 2009). Os casos de resistência são, portanto, mais difíceis de tratar, e por isso são considerados uma ameaça ao controle e eliminação da TB (D'Ambrosio *et al.*, 2015, Diel *et al.*, 2012, Falzon *et al.*, 2013, Migliori *et al.*, 2012, WHO, 2017).

Em relação aos últimos anos, quanto à incidência dos casos de resistência, mais de 490.000 casos de MDR-TB ocorre todos os anos no mundo. Um total de 111.000 pacientes começaram o tratamento contra a MDR-TB em 2014 (aumento de 14% em relação ao ano 2015). Estima-se que no ano de 2015, aproximadamente, 9,5% dos casos registrados de MDR-TB seriam, na realidade, XDR-TB (WHO, 2016). Em 2016, 600.000 pessoas apresentaram resistência à RIF, havendo também a necessidade de iniciar o tratamento contra a MDR-TB (WHO, 2017).

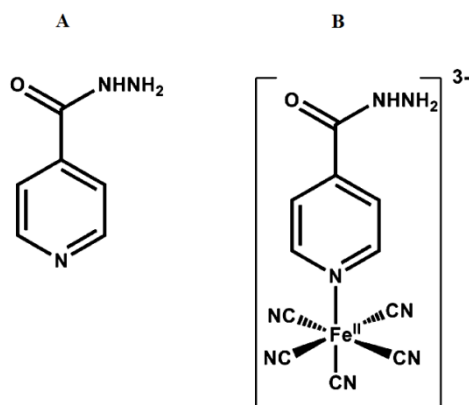
O desenvolvimento de fármacos para o tratamento da TB, principalmente para os casos de infecções geradas por bactérias resistentes, é de grande importância. Estes novos compostos devem atingir os seguintes objetivos: menor duração de tratamento, aumentar a adesão do paciente (permitindo terapia intermitente), apresentar novos mecanismos de ação, e tratamentos curtos para os casos de TB latente (Mattelli *et al.*, 2010). Diversos regimes terapêuticos para o tratamento da TB e da MDR-TB estão sendo testados em ensaios de fase II e fase III e, além disso, novos testes estariam iniciando em 2016, e candidatos a vacinas estão em ensaios clínicos. No final de 2014, 43 países reportaram o uso da bedaquilina (primeiro fármaco aprovado pela *Food and Drug Administration*, FDA, em 40 anos) no tratamento de pacientes com MDR-TB (WHO, 2015, Mahajan, 2013). Juntamente com a bedaquilina, a delamanid está em ensaios de fase III, tendo recebido aprovações aceleradas para o tratamento de MDR-TB, onde 39 países já reportaram o seu uso até o final de 2015 (WHO, 2016). Em 2017, o número de países que utilizaram a bedaquilina para tratar os casos de MDR-TB passou para 89 (WHO, 2017). Além disso, outros candidatos a fármacos de diferentes classes químicas estão sendo estudados (Wallis *et al.*, 2016), e existem 17 compostos em ensaios de fase I, II e III (WHO, 2017).

Portanto, atualmente, esforços estão sendo realizados para introduzir novos fármacos que possam alcançar os objetivos mencionados. Com o mesmo objetivo, foi idealizado e sintetizado o composto pentaciano(isoniazida)ferrato(II), denominado IQG-607.

1.2. O COMPOSTO IQG-607

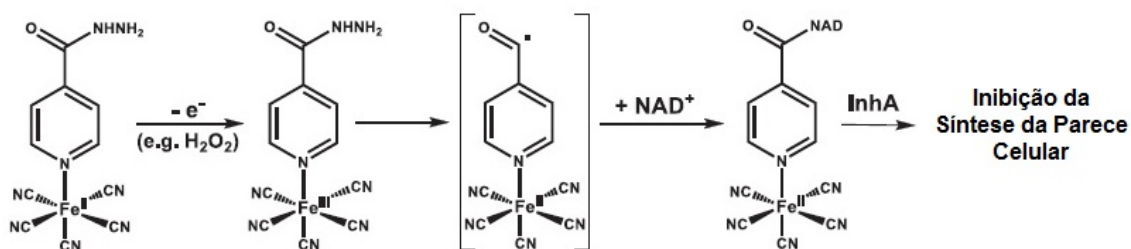
O Composto IQG-607 é um análogo da INH que, no estudo de novos candidatos a fármacos, demonstrou ser um promissor agente anti-TB. A estrutura química do IQG-607 é semelhante à da INH, sendo que, a diferença baseia-se na presença do grupamento cianoferrato ligado ao anel piridínico (**Figura 5**). O composto foi proposto para agir contra os casos de *M. tuberculosis* resistente à INH, mais especificamente, cepas de micobactérias que contém mutações no gene *katG* (Sousa *et al.*, 2012, Rodrigues-Junior *et al.*, 2012, Sousa *et al.*, 2005, Basso *et al.*, 2010).

Figura 5. Estruturas químicas da INH (A) e do IQG-607 (B).



O mecanismo de ação inicialmente proposto do IQG-607 é semelhante ao da INH, interferindo na biossíntese de ácidos micólicos, que são componentes essenciais da parede celular da micobactéria (Banerjee *et al.*, 1994; Rodrigues-Junior, 2014). O alvo para essa inibição é a enzima codificada pelo gene *inhA* de *M. tuberculosis*, denominada 2-*trans*-enoil-ACP(CoA) redutase (InhA) (Vasconcelos *et al.*, 2008, Rodrigues-Junior *et al.*, 2014). Sendo assim, a presença do centro metálico na estrutura química do IQG-607 seria capaz de mimetizar a ativação da INH pela ação da enzima peroxidase-catalase da micobactéria (KatG) *in vitro*, por promover uma reação de transferência de elétrons frente a agentes oxidantes (Sousa *et al.*, 2014, Vasconcelos *et al.*, 2008, Oliveira *et al.*, 2006) (**Figura 6**). Reforçando isso, estudos de cinética enzimática demonstram que o composto não necessita da ativação pela KatG ou qualquer outra enzima para se ligar à enzima InhA (Oliveira *et al.*, 2004). Devido a esta característica, espera-se que o IQG-607 consiga eliminar cepas resistentes de *M. tuberculosis* contendo mutações nos genes *katG* e *inhA*.

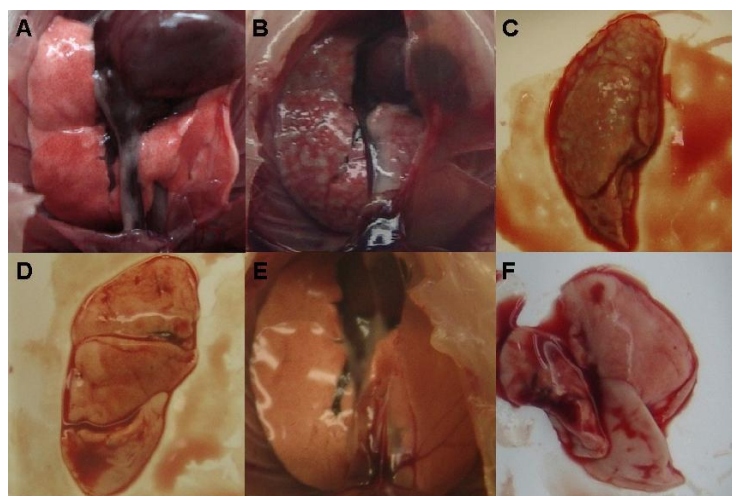
Figura 6. Mecanismo de ação proposto do IQG-607, mediado por ativação redox.



Fonte: Adaptado de Sousa *et al.*, (2014).

A atividade promissora do IQG-607 foi observada em diversos experimentos, que apresentaram resultados satisfatórios contra cepas selvagens e mutantes resistentes à INH contendo mutações no gene *inhA* (Basso et al, 2010). O composto se mostrou eficaz em modelo de macrófagos infectados com *M. tuberculosis*, com um efeito similar ao da INH e RIF (Rodrigues-Junior *et al.*, 2014). A eficácia *in vivo* foi observada em camundongos infectados com *M. tuberculosis* H37Rv, onde após a sua administração por via oral, levou a uma diminuição da carga micobacteriana nos pulmões e baços destes animais. Ainda, o tratamento levou à redução no número de granulomas nos pulmões após a avaliação clínica macroscópica (Rodrigues-Junior *et al.*, 2012) (**Figura 7**). Com esses resultados, podia-se assumir que o IQG-607 estava sendo absorvido quando administrado por via oral, e conseqüentemente, sendo capaz matar o bacilo *M. tuberculosis in vivo*.

Figura 7. Imagens representativas de pulmões de camundongos não infectados (A), infectados com *M. tuberculosis* H37Rv e não tratados (B, C), tratados com INH (D) e tratados com IQG-607 (E, F).



Fonte: Extraído de Rodrigues-Junior *et al.*, (2012).

Recentemente, novos experimentos foram realizados para avaliar a eficácia do IQG-607 contra cepas resistentes, utilizando oito cepas MDR-TB. Estes experimentos demonstraram que as cepas eram resistentes ao IQG-607, o que sugerem uma associação entre mutação no gene *KatG* e o aumentos nos valores de CIM (concentração inibitória mínima) observados (Abadi *et al.*, 2017). Experimentos de

CIM e de infecção de macrófagos com uma cepa laboratorial demonstraram que a mutação no gene *KatG* é suficiente para conferir resistência ao IQG-607, e que o ambiente intracelular dos macrófagos pode não ser suficiente para desencadear o mecanismo de autoativação inicialmente proposto para o composto (Sousa *et al.*, 2014). Somado a isto, o IQG-607 também demonstrou atividade reduzida contra uma cepa de *M. tuberculosis* que superexpressa a proteína mutante S94A InhA (mutação conhecida por ser envolvida na resistência à INH) (Abadi *et al.*, 2017). Tendo isso em vista, o mecanismo de ação do IQG-607 inicialmente proposto (Sousa *et al.*, 2014) precisa ser melhor elucidado, pois esses novos experimentos sugerem que o composto necessita da ativação pela enzima KatG para que consiga exercer a sua ação contra a enzima InhA.

O composto IQG-607 vem demonstrando resultados interessantes quanto a sua segurança, onde evidências experimentais demonstram que o composto não apresenta toxicidade após a administração de doses usuais (25 mg/kg) e acima (500 mg/kg) das administradas de INH em camundongos, enquanto que a INH, na dose de 250 mg/kg levou à morte 80% dos camundongos (Basso *et al.*, 2010). Indícios favoráveis quanto a sua segurança também foram obtidos, quando foi avaliada a sua toxicidade em ratos, no qual se administrou doses repetidas durante 90 dias. Como resultado, não houve evidência de sinais tóxicos graves (Rodrigues-Junior *et al.*, 2017a). Somado a esses dados, um estudo pré-clínico toxicológico em espécie suína (mini pigs) foi realizado, após administração de uma única dose de IQG-607 (220 mg/kg) e doses repetidas durante 90 dias, e não foi observado morte ou morbidade (Rodrigues-Junior *et al.*, 2017b).

O composto pode, ainda, se tornar um medicamento de administração oral, pois resultados favoráveis foram obtidos quanto a sua estabilidade em meio ácido ($\text{pH} \leq 2.0$), mostrando um equilíbrio ácido-base reversível de grupos cianetos (CN) com um pKa de 2.3 (Basso *et al.*, 2010, Oliveira *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos nos estudos realizados até o momento com o IQG-607, além de sua possível produção em grande escala (Basso *et al.*, 2010), indicam ser um bom candidato para ser testado em estudos clínicos e tornar-se, futuramente, um novo agente antimicrobiano no mercado. Diferentes etapas de desenvolvimento ainda devem ser realizadas para que tal objetivo seja alcançado, e dentre elas, a determinação de seus parâmetros farmacocinéticos.

1.2.1. Métodos de detecção do composto IQG-607

A detecção do composto IQG-607 foi realizada utilizando a voltametria (Dadda *et al.*, 2015), técnica bastante explorada na análise de compostos com características semelhantes ao composto (Leandro *et al.*, 2009, Pirzad *et al.*, 1994, Toma *et al.*, 1977). No entanto, esta técnica apresenta limitações quando a tentativa de detecção em fluidos biológicos é realizada.

As dificuldades de detectar complexos de pentacianoferrato por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM) também são reportadas na literatura, onde não é possível detectar a razão massa/carga (m/z) dos íons formados, devido a perdas de cianeto, mudanças no estado de oxidação do ferro, dentre outros (Henderson *et al.*, 2005). Diversas tentativas de analisar o composto por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas pelo grupo de pesquisa envolvido no seu estudo, utilizando diferentes colunas cromatográficas C-18, e de troca iônica. As dificuldades encontradas foram enormes, devido à alta polaridade do composto, o que estaria dificultando a sua retenção nas colunas utilizadas até então.

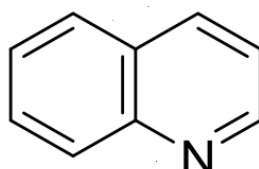
No decorrer dos experimentos, o grupo de pesquisa alcançou êxito ao encontrar a coluna e o método adequados para a detecção e quantificação do IQG-607 por CLAE; cabe ressaltar que, durante 14 anos, pesquisadores brasileiros vêm dedicando-se ao estudo do composto. Até então, nenhum método se mostrou aplicável à detecção de tal molécula, sendo assim, a detecção do composto por CLAE pelo grupo de pesquisa é um achado importante que abre caminho para iniciar os estudos de farmacocinética, avançando nos estudos pré-clínicos.

1.3. DERIVADOS QUINOLÍNICOS

Os derivados quinolínicos têm demonstrado uma interessante atividade contra uma série de doenças, incluindo a TB (Lilienkampf *et al.*, 2009). Esses compostos possuem um anel benzênico e uma piridina germinados (núcleo quinolínico) (**Figura 8**), que está presente, por exemplo, em fármacos de segunda linha contra a TB, como as fluoroquinolonas (gatifloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, e ofloxacino) (Kumar *et al.*, 2014, Aubry *et al.*, 2004). Esses fármacos são também prescritos em combinações com fármacos de primeira linha, e com outros fármacos de segunda linha (Adhvaryu, *et al.*, 2011). Também é pertencente à classe dos compostos quinolínicos, a bedaquilina, recentemente aprovado pela FDA como um novo fármaco para o tratamento da MDR-

TB (Matteelli *et al.*, 2010, Mahajan, 2013). Outros derivados quinolínicos estão sendo estudados por diferentes grupos de pesquisa (Black *et al.*, 2008), pois apresentam-se como um interessante grupo para o desenvolvimento de compostos candidatos a fármacos com ação anti-TB.

Figura 8. Estrutura química do núcleo quinolínico.

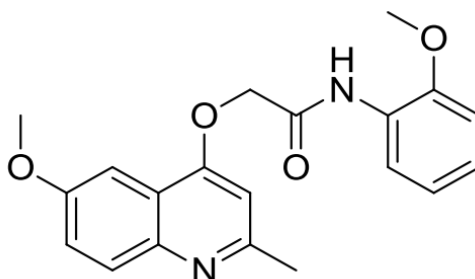


Alguns estudos publicados apontam que o mecanismo de ação dos derivados quinolínicos geralmente está relacionado com a inibição da DNA girase (topoisomerase II) micobacteriana (Collin *et al.*, 2011; Emmerson *et al.*, 2003), uma enzima que regula mudanças topológicas e conformacionais no DNA, essencial em processos celulares como replicação, transcrição, segregação cromossômica, e mitose (Wang, 1996, Watt *et al.*, 1994). Novos compostos que inibem a topoisomerase bacteriana, que não possuem o núcleo quinolínico, estão sendo estudados por grandes empresas (Johnson and Johnson e Pfizer) (Gomez *et al.*, 2007, Miller *et al.*, 2008). No entanto, ainda não se sabe o nível de sucesso clínico que será alcançado, e se será o mesmo apresentado pelas fluorquinolonas (Collin *et al.*, 2011). Ainda, em relação ao mecanismo de ação, outros estudos apontam que um alvo de derivados quinolínicos é o complexo citocromo *bc1* (mais especificamente, a proteína QcrB, uma subunidade essencial do complexo *bc1*), que está envolvido no transporte de elétrons na cadeia respiratória do bacilo (Subtil *et al.*, 2017). O estudo chegou a essa conclusão através da seleção de mutantes espontâneos resistentes a um derivado quinolínico, seguido por sequenciamento completo do genoma, corroborando com o estudo realizado por Phummarin *et al.*, (2016), que identificou o complexo *bc1* como alvo das 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas.

O grupo GlaxoSmithKline (GSK) reportou um grupo de quinoloxiacetamidas (QOA), que possuem um núcleo quinolínico, com CIMs contra *M. tuberculosis* H37Rv menores que 1 μM e baixo índice de citotoxicidade (IC_{50}) em células HepG2 ($\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{M}$). Uma das quinoloxiacetamidas descobertas pelo grupo GSK, a GSK358607A (QOA) (**Figura 9**), apresentou um CIM de 0,7 μM e um bom índice de seletividade (Ballell *et al.*, 2013). Tendo isso em vista, o nosso grupo de pesquisa têm planejado e

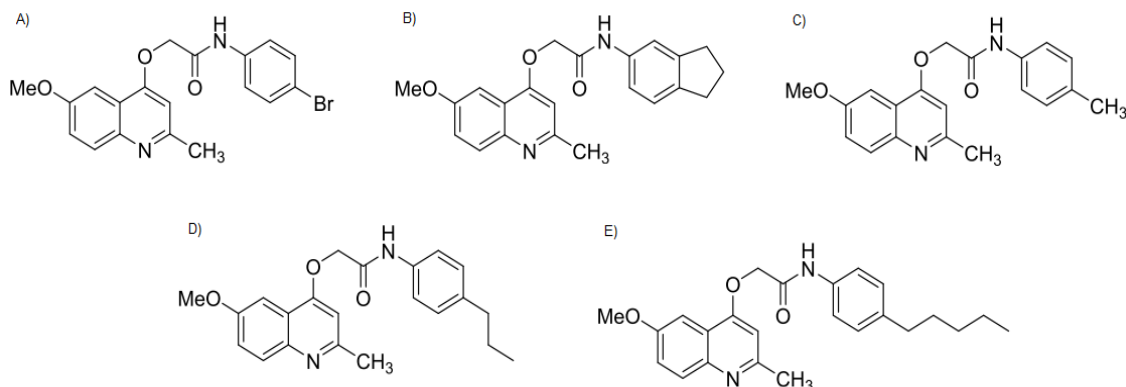
sintetizado estruturas químicas a partir do composto líder GSK358607A, estimulado pelos resultados favoráveis reportados, somado aos resultados apresentados pelos diversos derivados quinolínicos e análogos que já foram sintetizados e avaliados contra *M. tuberculosis* sensível e MDR-TB (Singh *et al.*, 2014, Senthilkumar *et al.*, 2009).

Figura 9. Estrutura química da GSK358607A (QOA).



Alguns dos derivados quinolínicos sintetizados pelo nosso grupo (2-(quinolin-4-iloxi)acetamidas) apresentaram atividade *in vitro* contra cepas de *M. tuberculosis* sensíveis e resistentes, com valores de CIM menores que 0,2 μM . Além disso, esses compostos também não afetaram significativamente a viabilidade celular de células eucarióticas Vero e HepG2 (87-97% e 64-95% de viabilidade, respectivamente), apresentaram resultados favoráveis em ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA) ($1.3\text{-}13.1 \cdot 10^{-6}$ cm/s), estabilidade metabólica *in vitro* (12.7-16.9 mL/min/kg), e redução estatisticamente significante em unidades formadoras de colônias (UFC) comparados com grupos controle (Pissinate *et al.*, 2016; Giacobbo *et al.*, 2017). Os compostos são os seguintes: *N*-(4-bromofenil)-2-((6-metoxi-2-metilquinolina-4-il)oxi)acetamida (INCT-TB469), *N*-(2,3-Dihidro-1H-inden-5-il)-2-((6-metoxi-2-metilquinolina-4-il)oxi)acetamida (INCT-TB542), 2-((6-metoxi-2-metilquinolina-4-il)oxi)-*N*-(*p*-tolil)acetamida (INCT-TB576), 2-((6-Metoxi-2-metilquinolina-4-il)oxi)-*N*-(4-propil fenil)acetamida (INCT-TB551) e 2-((6-Metoxi-2-metilquinolina-4-il)oxi)-*N*-(4-pentilfenil)acetamida (INCT-TB596) (**Figura 10**). Vale ressaltar que os compostos avaliados apresentaram uma atividade maior contra cepas de micobactérias resistentes (PE-003), do que contra cepas sensíveis (H37Rv).

Figura 10. Estruturas químicas dos compostos (A) INCT-TB469, (B) INCT-TB542, (C) INCT-TB576, (D) INCT-TB551, e (E) INCT-TB596.



Portanto, entre os derivados quinolínicos reportados (Pissinate *et al.*, 2016; Giacobbo *et al.*, 2017), o grupo de pesquisa escolheu as moléculas líderes citadas anteriormente (**Figura 10**, baseando-se nos promissores resultados de atividade *in vitro* baixa citotoxicidade em células de mamíferos, e também em ensaios de estabilidade metabólica). Ainda, foram avaliadas as sequências de bactérias resistentes à molécula INCT-TB551, e os resultados apontaram indicativos sobre seu mecanismo de ação (Subtil *et al.*, 2017). De forma importante, foram realizados experimentos que demonstraram que os compostos INCT-TB469, INCT-TB542, INCT-TB576, INCT-TB551, e INCT-TB596 não apresentaram atividade contra *M. tuberculosis* em camundongos infectados (dados não publicados). Diante deste contexto, o grupo de pesquisa quis avaliar se esta classe de moléculas possui potencial para ser absorvida após a administração oral neste modelo *in vivo*, e conseqüentemente, chegando a corrente sanguínea dos animais, uma vez que, compostos precisam primeiro entrar na corrente sanguínea para então serem distribuídos para os seus sítios de ação (Tracy, 2003, Workman *et al.*, 2015). Inicialmente, escolhemos o composto INCT-TB551 para os ensaios de detecção pois os resultados de atividade *in vivo* apontam uma tendência na diminuição das UFC, especialmente nos baços dos animais (dados não publicados). De forma importante, a molécula INCT-TB551 apresentou sinergismo farmacológico *in vitro* com o fármaco rifampicina (Giacobbo *et al.*, 2017), o que sugere esta molécula como importante líder da série.

A avaliação da absorção de novos compostos pela via oral é importante, tendo em vista a facilidade de administração pelos pacientes caso se tornem novos medicamentos (Press *et al.*, 2008). Portanto, foi avaliado neste trabalho a possibilidade de detecção do

composto INCT-TB551 em plasma de camundongos após a administração por via oral, avaliando sua absorção (curva temporal dos níveis plasmáticos), e conseqüentemente, corroborando para investigar se será um candidato para o futuro desenvolvimento de fármacos de administração oral.

1.4. FARMACOCINÉTICA

A farmacocinética é uma ciência que utiliza modelos matemáticos para descrever a cinética, mostrando a evolução temporária do fármaco e/ou seus metabólitos no organismo (Ruiz-Garcia *et al.*, 2007). Mais precisamente, a ciência estuda a evolução temporária da absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME) do fármaco (DiPiro *et al.*, 2010). É um campo de estudo importante para investigar o perfil de disposição do fármaco no organismo, e que pode ser influenciado por condições clínicas (gênero, espécie, idade, doenças) (Fan *et al.*, 2014).

A concentração de um fármaco pode ser determinada no sangue total, plasma, urina, saliva, e/ou outros fluidos biológicos. Mudanças na concentração plasmática de um fármaco refletem em mudanças na sua concentração no sítio de ação, bem como, em outros tecidos. Conseqüentemente, quando a concentração plasmática aumenta, a concentração em diversos tecidos irá aumentar proporcionalmente (DiPiro *et al.*, 2010), se for um processo de difusão.

Na farmacocinética, existem quatro tipos de abordagens principais que descrevem matematicamente a cinética dos fármacos no organismo: compartimental, não compartimental, fisiológica e populacional (Allen Jr., 2013). A farmacocinética compartimental descreve através de modelos matemáticos o movimento do fármaco no organismo considerando os compartimentos (tecidos ou fluidos) que podem receber o fármaco com diferentes velocidades, e que apresentam a mesma afinidade pelo composto. Para utilizar a análise compartimental, é necessário ter um perfil farmacocinético completo de um mesmo/único indivíduo. Na farmacocinética não compartimental, a distribuição do fármaco é descrita utilizando a média de parâmetros de tempo e concentração, tipicamente no plasma, utilizando-se equações matemáticas que fornecem um conhecimento descritivo da substância em estudo sem assumir o número de compartimentos. Desenvolvida com base na teoria dos momentos estatísticos, este é o método de escolha primário no estudo de novos fármacos, sendo, portanto utilizado em estudos iniciais de farmacocinética, e mais comumente utilizado

pela indústria farmacêutica em estudos de fase pré-clínica, podendo ser aplicada a qualquer conjunto de dados farmacocinéticos. Já a abordagem fisiológica, descreve a disposição do fármaco em termos de parâmetros fisiológicos realísticos (fluxo sanguíneo, e coeficiente de partição tecidual, por exemplo). É útil quando se conhece as concentrações do fármaco em diferentes tecidos, levando em consideração a distribuição do fármaco nos tecidos. No caso da farmacocinética populacional, se estuda a variabilidade entre indivíduos (estudo pré-clínico ou clínico) e de que forma essa afeta as concentrações do fármaco na população alvo (Allen Jr., 2013, Milone, 2012, Riviere, 2011, DiPiro *et al.*, 2010, Ruiz-Garcia *et al.*, 2007, Kwon, 2001, Sheiner *et al.*, 1999, Gibaldi *et al.*, 1982).

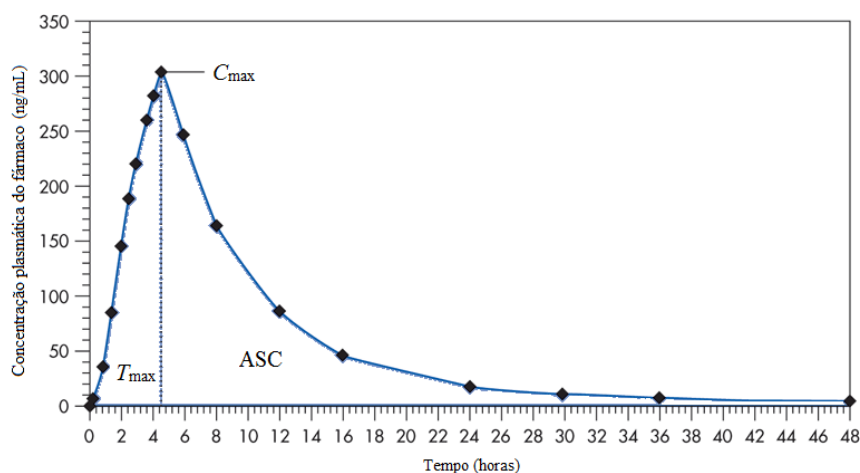
O processo de desenvolvimento de novos fármacos é longo, e durante este período, a aplicação da abordagem farmacocinética é crucial durante os estágios iniciais do desenvolvimento, que são os estudos pré-clínicos, e de fase I e II (Groulx, 2006, Ette *et al.*, 2004). A farmacocinética é abordada na descoberta de novos fármacos, sendo utilizada em todas as etapas da descoberta e desenvolvimento. Se um novo candidato a fármaco parece promissor, o seu perfil farmacocinético será avaliado pré-clinicamente. Conseqüentemente, se o perfil farmacocinético for adequado, o mesmo perfil será avaliado em humanos. Se este mesmo candidato possui um perfil farmacocinético que sugere algum problema no futuro, é preferível que as falhas apareçam nos estágios iniciais do processo de desenvolvimento. Portanto, uma estratégia importante, é avaliar o perfil farmacocinético de novos candidatos a fármacos nos estágios iniciais do desenvolvimento, tendo em vista que uma das razões mais comuns para a não continuidade em estudos clínicos, de acordo com alguns estudos, é o perfil farmacocinético inadequado (Turner, 2007, Walker, 2004). Apesar disso, outros estudos apontam que o perfil farmacocinético pode não ser tão determinante para o sucesso de um candidato a fármaco em estudos clínicos, pois há outros determinantes envolvidos, como por exemplo, a eficácia e a toxicidade (Arrowsmith *et al.*, 2013, Kola *et al.*, 2004).

O principal objetivo da análise farmacocinética é obter uma série de parâmetros que descrevam o comportamento cinético de um fármaco/candidato a fármaco após a sua administração (Ruiz-Garcia *et al.*, 2007). Para a determinação dos parâmetros, o desenvolvimento de um método bioanalítico é necessário para detectar e obter resultados confiáveis na quantificação do composto de interesse, e assim, realizar a correta interpretação dos resultados.

1.4.1. Parâmetros farmacocinéticos

Com base nos parâmetros farmacocinéticos que podem ser calculados, falando especificamente dos que foram utilizados neste trabalho (não compartimentais), a concentração máxima determinada do fármaco no fluido biológico (C_{max}) ao longo do tempo, e o tempo após a administração em que o fármaco alcançou a sua C_{max} (T_{max}) (**Figura 11**) (DiPiro *et al.*, 2010, Dixit, 2007, Shargel *et al.*, 2012), foram obtidos diretamente dos dados experimentais (curva da concentração em função do tempo). Com a curva da concentração em função do tempo obtida, é possível calcular a área sob a curva (ASC) (**Figura 11**).

Figura 11. Curva da concentração plasmática do fármaco em função do tempo.



Fonte: Adaptado de Shargel *et al.*, (2012).

A ASC representa a exposição total do organismo ao fármaco integrada ao longo do tempo, sendo uma medida do grau de absorção do fármaco após a sua administração (**Figura 11**). Este é um parâmetro importante nos estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos, sendo um indicador de biodisponibilidade do fármaco ou metabólitos presentes no organismo, e é requerido para a determinação de outros parâmetros farmacocinéticos (Page *et al.*, 2008, Ratain *et al.*, 2003, Gunaratna, 2001, Bailer, 1988).

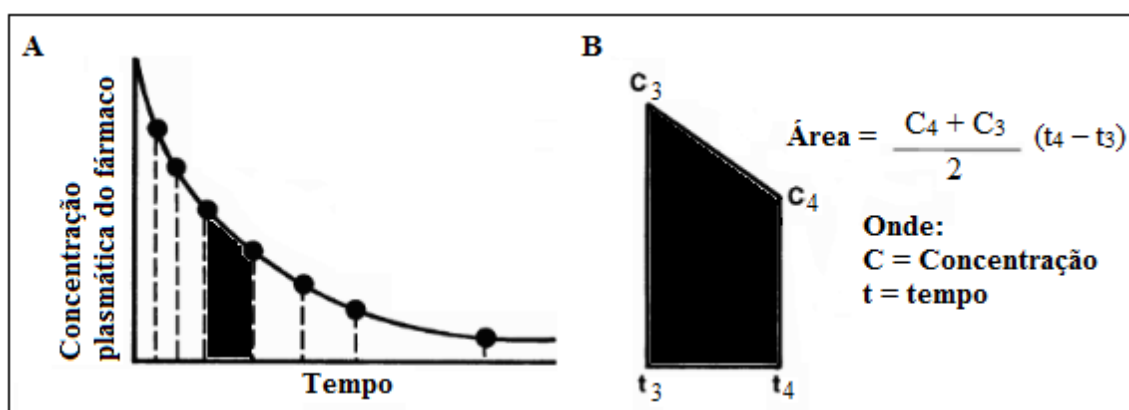
A ASC do tempo zero, até o último tempo em que a concentração do fármaco no fluido biológico foi determinada ($ASC_{0 \rightarrow t}$), pode ser calculada aplicando a “regra trapezoidal” na área gerada, quando se relaciona à concentração em função do tempo. A Figura 12 (DiPiro *et al.*, 2010) mostra um exemplo de administração intravenosa (i.v.),

onde as pequenas áreas (trapezoides) podem ser medidas utilizando a “regra trapezoidal” para estimar a ASC, conforme a equação 1 (Paradkar *et al.*, 2008, Dixit, 2007, Kwon, 2001). Os trapezoides são calculados individualmente, e a equação segue até o último tempo em que amostra foi quantificada no fluido biológico (de acordo com os tempos de coleta do estudo), para depois somá-los, e assim, obter a $ASC_{0 \rightarrow t}$ (equação 1).

$$ASC_{0 \rightarrow t} = \left[\left(\frac{C_1 + C_0}{2} \right) \times (t_1 - t_0) \right] + \left[\left(\frac{C_2 + C_1}{2} \right) \times (t_2 - t_1) \right] + \dots + \left[\left(\frac{C_t + C_{t-1}}{2} \right) \times (t_t - t_{t-1}) \right] \quad (1)$$

onde C é a concentração determinada, t é o tempo após a administração do fármaco em que a amostra foi coletada, e t é o último tempo de coleta.

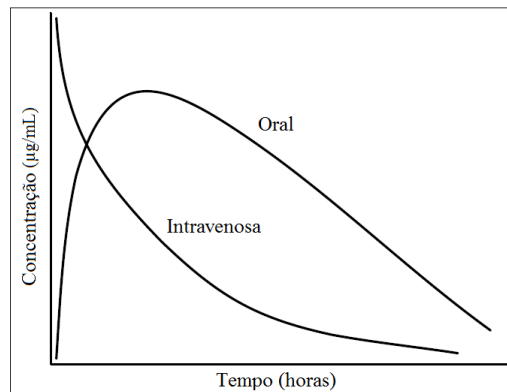
Figura 12. (A) A concentração plasmática de um fármaco em função do tempo pode ser dividida em uma série de trapezoides. (B) Cálculo da área de um trapezoide.



Fonte: Adaptado de DiPiro *et al.*, (2010).

O perfil da concentração plasmática de um fármaco em função do tempo é diferente para doses intravenosas e orais (**Figura 13**) (Gunaratna, 2001). Durante a administração de um fármaco pela via i.v., não há fase de absorção, e 100% do fármaco estará rapidamente biodisponível, sendo, portanto, administrado sempre uma dose menor ou igual do que aquela administrada na via oral (Dixit, 2007). Já na administração pela via oral (via de administração predominante), e por outras vias, a entrada na corrente sanguínea é mais lenta, por ter uma absorção gastrointestinal incompleta ou por sofrer, por exemplo, metabolismo de primeira passagem no fígado (Baca *et al.*, 2011).

Figura 13. Representação esquemática dos perfis farmacocinéticos para fármacos/substâncias administradas por via oral ou intravenosa.



Fonte: Adaptado de Gunaratna, (2011).

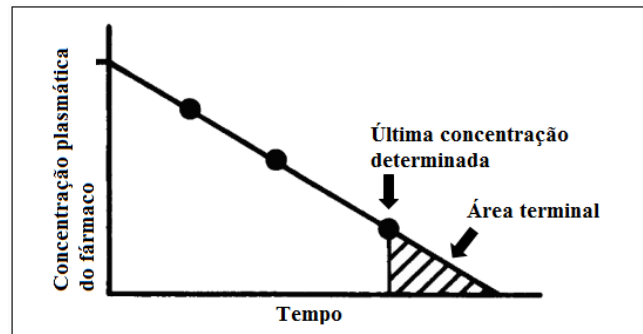
Com o valor de $ASC_{0 \rightarrow t}$ obtido, é possível extrapolar a área a um tempo infinito ($ASC_{0 \rightarrow \infty}$), a partir do último tempo de coleta em que o fármaco foi analisado após a sua administração. Assim, através da equação 2, se obtêm a área sob a curva extrapolada (ASC_{ext}), estimando qual seria o seu valor contando a partir da última concentração determinada do fármaco no estudo (**Figura 14**). Quando somada com a $ASC_{0 \rightarrow t}$, se obtêm a $ASC_{0 \rightarrow \infty}$ (equação 3) (DiPiro *et al.*, 2010).

$$ASC_{ext} = \frac{C_t}{K_e} \quad (2)$$

$$ASC_{0 \rightarrow \infty} = ASC_{0 \rightarrow t} + ASC_{ext} \quad (3)$$

onde C_t refere-se a concentração determinada do fármaco no último tempo de coleta da amostra, e K_e é a constante de eliminação.

Figura 14. Representação esquemática da área terminal de uma curva de concentração em função do tempo após a administração intravenosa de um fármaco.



Fonte: Adaptado de DiPiro *et al.*, (2010).

A K_e , por sua vez, é a fração do fármaco que é removido do organismo por unidade de tempo. Este parâmetro farmacocinético é possível estimar utilizando a equação 4 (DiPiro *et al.*, 2010).

$$-K_e = \frac{\ln \frac{C_2}{C_1}}{t_2 - t_1} \quad (4)$$

onde \ln é o logaritmo natural, C_1 e C_2 são as concentrações da porção terminal do perfil da concentração plasmática *versus* tempo determinadas do fármaco no fluido biológico, e t_1 e t_2 são os tempos que correspondem à porção terminal do mesmo perfil (onde C_1 e C_2 foram determinadas).

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) é o tempo necessário para que a concentração do fármaco no fluido biológico se reduza pela metade. Este parâmetro é, por vezes, relacionado com a sua duração de ação, fornecendo a informação de quando outra dose pode ser administrada. A determinação do $t_{1/2}$ pode ser feita matematicamente quando se conhece a K_e , aplicando a equação 5 (DiPiro *et al.*, 2010, Dixit, 2007, Kwon, 2001).

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{K_e} \quad (5)$$

onde 0.693 é o logaritmo natural de 2 (constante matemática).

O tempo de residência médio (TMR) é o tempo médio em que as moléculas do fármaco permanecem no organismo na sua forma intacta (Mutschler *et al.*, 1995). Pela via oral, o fármaco reside mais tempo no organismo, pois leva em consideração o tempo de absorção antes de atingir a circulação. Não é um parâmetro frequentemente utilizado na prática clínica para o monitoramento de pacientes, mas pode ser utilizado para observar o efeito de uma doença, de um estado fisiológico alterado, ou da interação fármaco-fármaco, na farmacocinética de um fármaco específico. O TMR pode ser calculado através da equação 6 (DiPiro *et al.*, 2010, Paradkar *et al.*, 2008, Kwon, 2001).

$$\text{TMR} = \frac{\text{ASMC}_{0 \rightarrow \infty}}{\text{ASC}_{0 \rightarrow \infty}} \quad (6)$$

onde $\text{ASMC}_{0 \rightarrow \infty}$ é a área sob a curva do primeiro momento do tempo zero ao infinito.

A ASMC não tem significado fisiológico, sendo apenas utilizado para que seja possível calcular o TMR. Portanto, para calcular o TMR, como mostrado anteriormente, é necessário obter a $\text{ASMC}_{0 \rightarrow \infty}$. Antes disso, é necessário obter o valor da área sob a curva do primeiro momento do tempo zero até o último tempo em a concentração do fármaco foi determinada no fluido biológico ($\text{ASMC}_{0 \rightarrow t}$), aplicando-se a regra trapezoidal, assim como o cálculo da $\text{ASC}_{0 \rightarrow t}$ (equação 7). Com o valor da $\text{ASMC}_{0 \rightarrow t}$ obtido, a $\text{ASMC}_{0 \rightarrow \infty}$ é calculada conforme a equação 8. A área sob a curva do primeiro momento extrapolada (ASMC_{ext}) é fornecida através da equação 9 (DiPiro *et al.*, 2010, Kwon, 2001).

$$\text{ASMC}_{0 \rightarrow t} = \left[\left(\frac{C_1 \times t_1 + C_0 \times t_0}{2} \right) \times (t_1 - t_0) \right] + \left[\left(\frac{C_2 \times t_2 + C_1 \times t_1}{2} \right) \times (t_2 - t_1) \right] + \dots + \left[\left(\frac{C_t \times t_t + C_{t-1} \times t_{t-1}}{2} \right) \times (t_t - t_{t-1}) \right] \quad (7)$$

$$\text{ASMC}_{0 \rightarrow \infty} = \text{ASMC}_{0 \rightarrow t} + \text{ASMC}_{\text{ext}} \quad (8)$$

$$\text{ASMC}_{\text{ext}} = \frac{C_t \times t_t}{K_e} + \frac{C_t}{K_e^2} \quad (9)$$

onde C_t refere-se a concentração determinada do fármaco no último tempo de coleta da amostra (t_t).

Para a obtenção de alguns parâmetros farmacocinéticos por abordagem não compartimental, como a biodisponibilidade (F (%)), o volume de distribuição (Vd), e o clearance (CL), a administração do composto em estudo precisa ser feita pela via i.v. Algumas autoridades regulatórias exigem a administração i.v. de candidatos a fármacos para a obtenção desses parâmetros, mesmo que o objetivo não seja desenvolver um medicamento para ser administrado pela via i.v. (Rolan *et al.*, 2009).

A F (%) representa a quantidade total do fármaco que é absorvido e atinge a circulação sistêmica. Para a obtenção deste parâmetro é necessário a administração do composto pela via i.v., obtendo a sua área sob a curva extrapolada a um tempo infinito ($ASC_{0 \rightarrow \infty \text{ i.v.}}$). Logo, se administra o composto por uma via extravascular, como por exemplo, a oral, e se obtém a sua $ASC_{0 \rightarrow \infty \text{ oral}}$. Com as duas ASCs obtidas, se aplica a equação 10, obtendo-se a biodisponibilidade absoluta (F(%)). Compostos administrados pela via i.v. apresentam F (%) de 100%. Compostos administrados por outras vias apresentam uma menor F (%), já que podem sofrer diferentes processos (efeito de primeira passagem intestinal e hepática, taxa de dissolução, e presença de alimentos, por exemplo) até atingirem a circulação sistêmica (Cannon, 2007, Dixit, 2007, Herber, 1996, Kwon, 2001, Shen, 2010).

$$F(\%) = \frac{ASC_{0 \rightarrow \infty \text{ oral}}}{ASC_{0 \rightarrow \infty \text{ i.v.}}} \times \frac{Dose_{i.v.}}{Dose_{oral}} \times 100\% \quad (10)$$

onde $Dose_{i.v.}$ é a dose administrada pela via i.v., e $Dose_{oral}$ é a dose administrada pela via oral.

O volume de distribuição no *steady-state* (V_{dss}) é o volume em que o fármaco se distribui no organismo, indicando o quanto o fármaco está presente no sistema extravascular (tecidos). É o volume de sangue/plasma necessário para conter o fármaco no organismo na mesma concentração identificada no fluido biológico. Para se obter uma estimativa do V_{dss} , se aplica a equação 11 (Dhillon *et al.*, 2006, Dixit, 2007, Kuhlman *et al.*, 1996).

$$V_{dss} = TMR \times CL \quad (11)$$

O CL é definido como o volume de sangue/plasma do qual o fármaco é removido do organismo, por unidade de tempo, informando a eficácia de eliminação do fármaco do organismo. Este parâmetro é independente da via de administração, e é calculado levando em consideração a concentração determinada *versus* tempo após a administração i.v. (equação 12). No caso da administração extravascular (oral, por exemplo), o CL precisa ser normalizado para a biodisponibilidade, de acordo com a equação 13 (Dixit, 2007, Kuhlman *et al.*, 1996, Wilkinson, 2001).

$$CL = \frac{Dose_{i.v.}}{ASC_{0 \rightarrow \infty} \text{ i.v.}} \quad (12)$$

$$CL = \frac{Dose_{oral} \times F}{ASC_{0 \rightarrow \infty} \text{ oral}} \quad (13)$$

Até o presente momento, não havia estudos de farmacocinética do composto IQG-607, e dos novos derivados quinolínicos sintetizados pelo grupo de pesquisa, sendo estes, portanto, os próximos passos realizados pelo nosso grupo.

2. JUSTIFICATIVA

Com o surgimento e disseminação de casos de TB resistentes, devido a regimes terapêuticos inapropriados e a não adesão dos pacientes aos medicamentos correntemente utilizados, se torna imprescindível o desenvolvimento de novos fármacos anti-TB. Neste contexto, os resultados favoráveis obtidos até o presente momento com o IQG-607, somado a sua possível produção em grande escala (Basso *et al.*, 2010), sugerem o composto como sendo um candidato promissor para estudos pré-clínicos e clínicos. Além disso, os resultados anti-TB muito promissores (*in vitro*), bem como, os resultados de toxicidade celular favoráveis também obtidos com o derivado quinolínico INCT-TB551 sintetizado pelo nosso grupo de pesquisa (Giacobbo *et al.*, 2017), sugerem a molécula como um candidato a fármaco promissor. No entanto, recentes experimentos demonstraram que o composto não apresentou atividade contra *M. tuberculosis* em camundongos infectados, tornando-se necessário avaliar se haveria absorção do composto após a administração oral.

Os compostos IQG-607 e INCT-TB551 parecem promissores, e surgem como moléculas líderes para o processo de desenvolvimento de fármacos. Diante deste contexto, o estudo farmacocinético do composto IQG-607 e a avaliação da absorção oral do composto INCT-TB551 foram objetivos a serem alcançados pelo grupo de pesquisa envolvido nos seus estudos, contribuindo assim, para o avançando no estudo desses compostos.

3. OBJETIVOS

Desenvolver metodologias analíticas por CLAE para a quantificação dos compostos IQG-607 e INCT-TB551, a fim de empregar em experimentos de farmacocinética e avaliação da absorção oral, respectivamente.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a Desenvolver metodologia analítica por CLAE para a determinação do composto IQG-607 em plasma de camundongos.

b Realizar controle de estabilidade do composto no plasma de camundongos durante o tempo e temperatura que as amostras serão armazenadas no estudo de farmacocinética.

c Administrar o composto IQG-607 por via endovenosa nos camundongos, e posterior coleta dos plasmas em diferentes tempos, para a determinação das concentrações do composto.

d Administrar por via oral o composto IQG-607 nos camundongos (em jejum e alimentados), e posterior coleta dos plasmas em diferentes tempos, para a determinação das concentrações do composto.

e Determinar os parâmetros farmacocinéticos do composto IQG-607 administrado por via endovenosa e via oral.

f Desenvolver metodologia analítica para detecção do composto INCT-TB551 em plasma de camundongos

g Administrar por via oral o composto INCT-TB551 aos camundongos (em jejum), para posterior coleta dos plasmas em diferentes tempos, avaliando a sua absorção

4. RESULTADOS

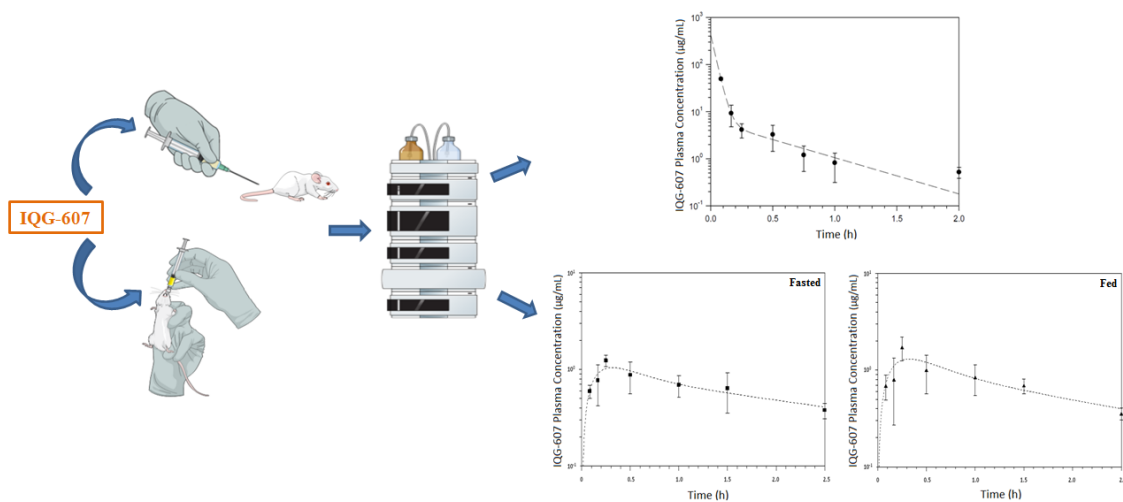
4.1. CAPÍTULO I

MANUSCRITO PUBLICADO NO PERIÓDICO EUROPEAN JOURNAL OF
PHARMACEUTICAL SCIENCES

Preclinical pharmacokinetic profiling of IQG-607, a potential oral metallodrug to treat tuberculosis

Adilio da S. Dadda, Valnês S. Rodrigues-Junior, Fernando Carreño, Guilherme O. Petersen, Antônio F.M. Pinto, Pedro F. Dalberto, Nathalia D.M. Sperotto, Kenia Pissinate, Cristiano V. Bizarro, Pablo Machado, Maria M. Campos, Teresa Dalla Costa, Diógenes S. Santos, Luiz A. Basso

GRAPHICAL ABSTRACT





Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejps

Preclinical pharmacokinetic profiling of IQG-607, a potential oral metallodrug to treat tuberculosis

Adilio da S. Dadda^{a,b,c}, Valnês S. Rodrigues-Junior^{a,b,*}, Fernando Carreño^d,
 Guilherme O. Petersen^{a,b}, Antônio F.M. Pinto^{a,b}, Pedro F. Dalberto^{a,b,c}, Nathalia D.M. Sperotto^{a,e},
 Kenia Pissinate^{a,b}, Cristiano V. Bizarro^{a,b,c}, Pablo Machado^{a,b,c}, Maria M. Campos^{a,e,f},
 Teresa Dalla Costa^d, Diógenes S. Santos^{a,b,c}, Luiz A. Basso^{a,b,c,e,*}

^a Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Av. Ipiranga 6681 – Prédio 92A Tecnopuc, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6681 – Prédio 92A Tecnopuc, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

^d Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^e Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

^f Instituto de Toxicologia e Farmacologia, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Pharmacokinetics

Tuberculosis

IQG-607

Anti-tuberculosis activity

Isoniazid analog

ABSTRACT

IQG-607 is an analog of isoniazid with anti-tuberculosis activity. This work describes the development and validation of an HPLC method to quantify pentacyano(isoniazid)ferrate(II) compound (IQG-607) and the pharmacokinetic studies of this compound in mice. The method showed linearity in the 0.5–50 µg/mL concentration range ($r = 0.9992$). Intra- and inter-day precision was $< 5\%$, and the recovery ranged from 92.07 to 107.68%. IQG-607 was stable in plasma for at least 30 days at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ and, after plasma processing, for 4 h in the auto-sampler maintained on ice (recovery $> 85\%$). The applicability of the method for pharmacokinetic studies was determined after intravenous (i.v.) and oral (fasted and fed conditions) administration to mice. IQG-607 levels in plasma were quantified at time points for up to 2.5 h. A short half-life ($t_{1/2}$) (1.14 h), a high clearance (CL) (3.89 L/h/kg), a moderate volume of distribution at steady state (V_{dss}) of 1.22 L/kg, were observed after i.v. (50 mg/kg) administration. Similar results were obtained for oral administration (250 mg/kg) under fasted and fed conditions. The oral bioavailability (F), approximately 4%, was not altered by feeding. Plasma protein binding was $88.87 \pm 0.9\%$. The results described here provide novel insights into a pivotal criterion to warrant further efforts to be pursued towards attempts to translate this chemical compound into a chemotherapeutic agent to treat TB.

1. Introduction

Tuberculosis (TB), caused mainly by *Mycobacterium tuberculosis*, is an infectious disease responsible for a significant number of deaths worldwide (Pai et al., 2016). Lack of patients' adherence to the current anti-TB therapy may result in treatment failure that contributes to the increasing incidence of multidrug-resistant TB strains (Chetty et al., 2017; Gandhi et al., 2010; Udwadia et al., 2012). Treatment of resistant cases requires the use of second-line drugs, which are associated to a higher incidence of severe adverse effects, lower cure rates, and longer therapies (Pai et al., 2016; Chetty et al., 2017). Accordingly, there is an urgent need for developing new anti-TB drugs, ideally an oral agent effective against resistant TB and having fewer side effects to improve

patient's adherence to the treatment (WHO, 2016).

The pentacyano(isoniazid)ferrate(II) compound (IQG-607) is an isoniazid (INH) analog proposed to act against INH-resistant *M. tuberculosis* strains containing mutations in catalase-peroxidase gene, *katG* (Sousa et al., 2012; Rodrigues-Junior et al., 2012; Basso et al., 2010; Sousa et al., 2005; Oliveira et al., 2004). IQG-607 has shown *in vitro* intracellular activity against *M. tuberculosis*-infected macrophages, having a similar effect to that displayed by INH and rifampicin (Rodrigues-Junior et al., 2014). IQG-607 has also shown *in vivo* activity after oral administration in *M. tuberculosis*-infected mice, and a decrease in the mycobacterial load in lungs and spleens was observed, with a significant reduction in the number of granulomatous lesions in the lungs (Rodrigues-Junior et al., 2012). IQG-607 has been shown to be

* Corresponding authors at: Av. Ipiranga 6681, Tecnopuc, Prédio 92A, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail addresses: valnes.junior@pucrs.br (V.S. Rodrigues-Junior), luiz.basso@pucrs.br (L.A. Basso).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.10.020>

Received 16 May 2017; Received in revised form 11 October 2017; Accepted 13 October 2017

Available online 14 October 2017

0928-0987/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

stable in acidic medium ($\text{pH} \leq 2.0$) with a reversible acid-base equilibrium of CN groups with a pK_a value of 2.3 (Basso et al., 2010). It has also been provided experimental evidence showing that IQG-607 administration results in both lower toxicity compared to INH in mice (Rodrigues-Junior et al., 2012) and mild to moderate side effects after repeated doses in rats (Rodrigues-Junior et al., 2017a) and minipigs (Rodrigues-Junior et al., 2017b). Accordingly, IQG-607 may represent a metallodrug candidate to be employed in the treatment of TB.

The data from preclinical pharmacodynamic studies with IQG-607 (Rodrigues-Junior et al., 2012; Oliveira et al., 2004) and the large scale method for its synthesis (Basso et al., 2010) were deemed encouraging to pursue further efforts to advance this chemical compound in the process of drug development. Pre-clinical pharmacokinetic studies are of paramount importance in early phases of new drug development (Andrade et al., 2016). The objectives of the present study were to develop and validate a high performance liquid chromatographic (HPLC) method for quantification of IQG-607 in mouse plasma and to elucidate the pharmacokinetic profile of this compound in mice.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

IQG-607 was synthesized with purity higher than 99%, and its chemical structure was characterized according to Oliveira et al. (2016). Trichloroacetic acid $\geq 99\%$ was purchased from Sigma-Aldrich (USA). Ammonium acetate P.A. $\geq 98\%$, methanol $\geq 99\%$, and potassium chloride (KCl) P.A. $\geq 99.5\%$ were obtained from Merck (Germany). Sodium chloride (NaCl) P.A. $> 98\%$, sodium phosphate dibasic heptahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) P.A. $> 98\%$, and potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4) P.A. $> 99\%$ were from Synth (Brazil). Lyophilized mouse plasma was purchased from Sigma-Aldrich (USA). Purified water was prepared by the Milli-Q integral system (Millipore, Germany) and distilled water was also used.

PBS solution was prepared by mixing appropriate amounts of NaCl, KCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and KH_2PO_4 in distilled water.

2.2. HPLC analysis and sample preparation

The analysis of IQG-607 was carried out using a Dionex Ultimate 3000 HPLC controlled by Chromeleon software 6.80 SR11 version (Thermo Scientific, USA), with autosampler and UV/Visible detector. The chromatography separation was performed on a NUCLEODUR C18 Pyramid column, 4×250 mm, $5 \mu\text{m}$ (Macherey-Nagel, Germany). 100 mM ammonium acetate containing 25% methanol was used as mobile phase. The isocratic flow rate was 0.5 mL/min at 30°C and the detection was at 500 nm. The autosampler temperature was maintained at 6°C and the injection volume was 90 μL .

To each 100 μL of spiked plasma or test samples, 25 μL of trichloroacetic acid (deproteinizing agent) was added and vortexed (orbital vortex) for 1 min. The samples were then centrifuged at 13,000 rpm for 15 min at 4°C . The supernatants were collected and filtered through syringe filters, 0.22 μm (Millipore Millex-GV, Japan). Additionally, 50 μL of Milli-Q water were passed through syringe filters and were then injected into the HPLC system.

2.2.1. Selectivity, linearity, precision and accuracy determination

The selectivity was determined by analyzing blank plasma and plasma spiked with IQG-607 and was evaluated by comparing the chromatograms, showing that no peaks for interfering compounds from plasma were detected at the retention time of the analyte (approximately 3.5 min). To evaluate the linearity, the analytical curve in the range of 0.5–50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was constructed by spiking commercial blank plasma with IQG-607. Calibration curves were built by plotting peak area vs IQG-607 nominal concentrations. The precision and accuracy (recovery) intra-assay were determined five times in the same day at

three different concentrations (1, 25 and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and the inter-assay was determined over three consecutive days at the same concentrations (1, 25 and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The acceptance criteria were according to the US Food and Drug Administration guidelines (US FDA, 2013); namely, the precision determined at each concentration should not exceed 15% of the coefficient of variation and the mean value should be within 15% of the nominal value (85–115%) for accuracy.

2.2.2. Stability study

The stability of the compound in the spiked plasma (5 and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at -80°C (storage temperature of samples collected from mice that received IQG-607) was tested during a period of 30 days. Post-processing stability was determined by analyzing the spiked plasma (5 and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the autosampler over a period of 4 h. The post-processing stability was also assessed maintaining the samples into a container with ice over a period of 4 h. For these studies the samples were processed in triplicate.

2.3. Pre-clinical pharmacokinetic study

The animal experimental protocol was approved by the Animal Ethics Committee (CEUA/PUCRS protocol numbers 14/00415 and 14/00427). Male CF-1 mice (25–30 g) were obtained from the Central animal facility of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Brazil) and acclimatized. The cages (with 5 animals each) were maintained at constant temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) in a humidity-controlled room (60–80%) with a 12/12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM), and food and water available ad libitum.

Twenty-one mice were used for the intravenous (i.v.) administration of IQG-607, which were divided in 7 groups, each one containing 3 animals/time-point. A single bolus dose (50 mg/kg) of the compound (dissolved in 0.9% saline solution) was administered into the lateral tail vein of the animals. At scheduled times (0.08, 0.16, 0.25, 0.5, 0.75, 1 and 2 h) after dosing, animals were euthanized and blood samples were collected into heparin tubes (BD Vacutainer, USA).

IQG-607 was orally administered in fasting and nonfasting animals ($n = 21$ mice/group) to evaluate whether feeding has any effect on the pharmacokinetic parameters. In the nonfasting group, mice were allowed free access to standard food and water, whereas mice in the fasted group went through overnight fasting (12h). In both groups, the compound was orally administered by gavage (250 mg/kg, dissolved in 0.9% saline solution), animals were euthanized, and blood samples were collected at 0.08, 0.16, 0.25, 0.5, 1, 1.5 and 2.5 h post-dosing into heparin tubes. In both fasting and nonfasting conditions three mice were used per time-point, and blood samples were collected into heparin tubes. All plasma samples were obtained by centrifugation at 10,000 rpm for 10 min to remove blood cells, and stored at -80°C until analysis.

Non-compartmental analysis of the data was performed using the software Phoenix $\text{\textcircled{v}}$ 6.4 (Pharsight) to determine the following pharmacokinetic parameters (Shargel et al., 2005; DiPiro et al., 2010): elimination rate constant (K_e); elimination half-life ($t_{1/2}$); area under the compound plasma concentration-time curve ($\text{AUC}_{0 \rightarrow t}$ and $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$), mean residence time (MRT), clearance (CL) and volume of distribution at steady state (V_{dss}). The peak concentration of drug in plasma (C_{max}) and time to reach C_{max} (T_{max}) were directly obtained from the concentration-time plots. Oral bioavailability (F) was obtained from the ratio of the dose adjusted AUCs of the fasting and nonfasting states to the i.v. dose. Oral bioavailability (%F) was calculated using the dose adjusted $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$ ratio between oral and i.v. dosing ($\%F = (\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty(\text{po})} / \text{AUC}_{0 \rightarrow \infty(\text{iv})}) (\text{Dose}_{(\text{iv})} / \text{Dose}_{(\text{po})}) 100\%$). $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty(\text{po})}$ represents area under the curve from time zero to infinity after oral administration (fasting or nonfasting), and $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty(\text{iv})}$ represents area under the curve from time zero to infinity after intravenous administration, $\text{Dose}_{(\text{po})}$ is the dose administered orally (250 mg/kg, for both fasting and nonfasting groups), and $\text{Dose}_{(\text{iv})}$ is the dose administered intravenously (50 mg/kg).

2.4. Plasma protein binding

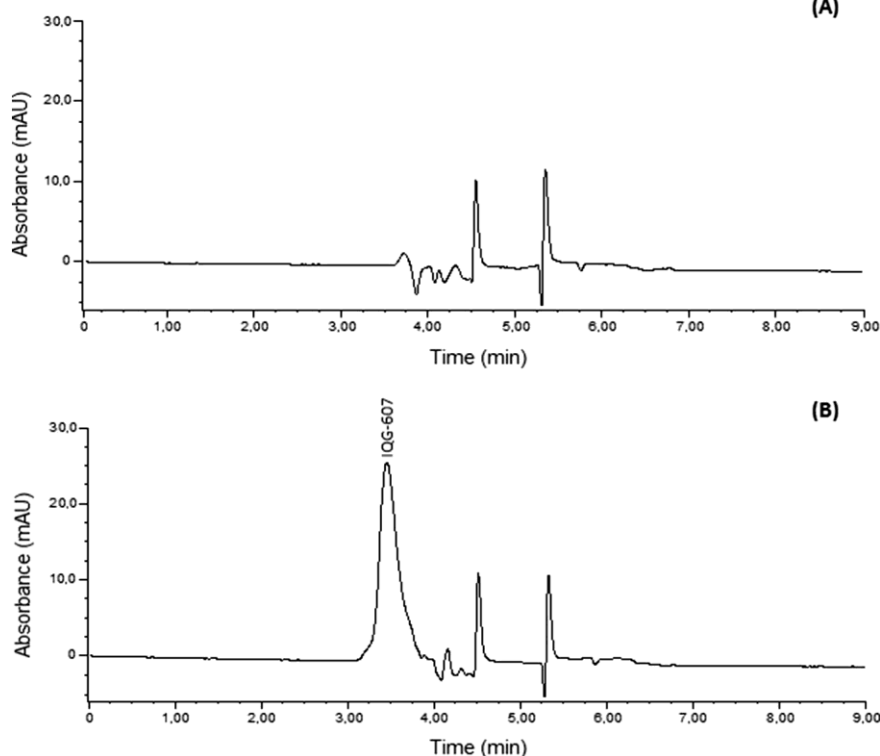
IQG-607 plasma protein binding was determined by ultrafiltration using Centrifree ultrafiltration devices (Millipore, Germany). Prior to data collection, membranes of the filtration devices were saturated with IQG-607 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS) to avoid its adsorption. In this pre-saturation procedure, 400 μL of IQG-607 solution were added to the devices and centrifuged at 5000 rpm for 10 min, followed by three centrifugations with 1 mL of ultrapure water, under the same conditions. The pre-saturation efficiency was then tested, in which PBS solution and known concentrations of IQG-607 in PSB were filtered using the pre-saturated membranes and were analyzed. IQG-607 was not detected in the PBS blank solution and the recovery of the IQG-607 solution was between 90 and 110% in test solutions.

To determine the protein binding, 400 μL of spiked plasma (25 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were homogenized and transferred into each pre-saturated ultrafiltration device. A volume of 100 μL of each spiked plasma was withdrawn, processed and analyzed by HPLC to determine the total chemical compound concentration. The volume remaining in the ultrafiltration devices was centrifuged at 5000 rpm for 10 min at 25 $^{\circ}\text{C}$, and 100 μL of the ultrafiltration was analyzed by HPLC to determine the free drug concentration. A standard curve of the IQG-607 in PBS solution was constructed (0.5–50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to quantify the ultrafiltrates ($r = 0.9992$). One minus the ratio between free and total IQG-607 concentrations represent the fraction of IQG-607 bound to plasma proteins. All experiments were performed in triplicates.

3. Results and discussion

3.1. Method validation

The chromatograms of blank plasma and IQG-607 in plasma (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) showing the method selectivity are presented in Fig. 1. The chromatograms demonstrate the absence of any interfering peak and a sharp peak for IQG-607 at retention time of approximately 3.5 min.



(A) Fig. 1. Representative chromatogram of blank mice plasma (A), and plasma spiked with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of IQG-607 (B) (retention time approximately 3.5 min).

The calibration curves were linear in the range investigated ($r = 0.9996$), and the limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) was 0.2 and 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The intra- and inter-assay precision of IQG-607 determination are presented in Table 1, in which the coefficient of variation was $< 5\%$ and the accuracy (recovery) ranged from 92.07 to 107.68% in the spiked samples. In some cases, the recovery is $> 100\%$. This can be attributed to small variations in the preparation of standard solutions, sample pre-treatment, and in the analytical system. However, according to the FDA guidelines (US FDA, 2013), the method can be considered precise and accurate.

The results for chemical stability showed that IQG-607 is stable in plasma for at least 30 days at -80°C (recovery $> 85\%$) (Table 2). After plasma processing, the compound was stable for 4 h in the auto-sampler as well as on ice at bench top (recovery $> 85\%$) (Table 2). These stability results provided the experimental conditions to carry out the analysis of IQG-607 in the mouse plasma for pharmacokinetic studies.

3.2. IQG-607 pharmacokinetics

The plasma protein binding of IQG-607 was approximately $88.9 \pm 0.9\%$, independent of the concentration investigated.

The mean plasma concentration of IQG-607 obtained after i.v. administration of 50 mg/kg in mice, and the pharmacokinetic parameters estimated by non-compartmental analysis are shown in Fig. 2 and Table 3, respectively. The IQG-607 compound showed a short $t_{1/2}$ (1.1 h) and a high CL (3.9 L/h/kg) and a moderate V_{dss} (1.2 L/kg). The remaining pharmacokinetic parameters were: $K_e = 0.61 \text{ h}^{-1}$, $\text{AUC}_{0 \rightarrow t} = 12.84 \mu\text{g}/\text{L h}$, $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty} = 13.69 \mu\text{g}/\text{L h}$, and a $\text{MRT} = 0.31 \text{ h}$ (Table 3). No preclinical data related to i.v. administration of INH in mice are available for comparisons with our study.

Following an oral administration of 250 mg/kg of IQG-607 (fasted and fed mice), the C_{max} (1.23 and 1.72 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively) was achieved after 0.25 h (t_{max}), suggesting that the compound is rapidly absorbed (Fig. 3A and B). A similar t_{max} (0.25 h) of INH in mice was

Table 1
Intra- and inter-assay variation of IQG-607 in mice plasma.

	Nominal concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Mean concentration \pm S.D. ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	Recovery (%)
Intra-assay	1	0.93 \pm 0.09	3.39	93.66
	25	24.34 \pm 2.14	3.38	97.36
	40	43.07 \pm 1.42	3.29	107.68
Inter-assay	1	1.03 \pm 0.13	4.2	103.26
	25	23.01 \pm 2.83	4.74	92.07
	40	38.85 \pm 4.71	12.13	97.12

S.D.: standard deviation; CV: coefficient of variation. n = 5 samples/concentration.

Table 2
Summary of stability experiment results of IQG-607 in mice plasma.

Nominal concentrations ($\mu\text{g/mL}$)	Stability condition	Mean \pm S.D. ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)
5	2 days ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)	4.76 \pm 0.3	95.3
	7 days ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)	4.86 \pm 0.76	97.2
	30 days ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)	4.33 \pm 0.52	86.6
	Bench top (2h ^a)	4.58 \pm 0.37	91.7
	Bench top (4h ^a)	4.27 \pm 0.19	85.5
	Autosampler (2 h)	4.46 \pm 0.04	89.2
	Autosampler (4 h)	4.35 \pm 0.14	87.1
40	2 days ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)	44.52 \pm 0.54	111.31
	7 days ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)	42.41 \pm 1.54	106.03
	30 days ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)	41.55 \pm 1.85	103.88
	Bench top (2h ^a)	45.65 \pm 3.5	114.12
	Bench top (4h ^a)	44.22 \pm 3.95	110.55
	Autosampler (2 h)	45.64 \pm 1.4	114.11
	Autosampler (4 h)	38.63 \pm 3.23	96.57

S.D.: standard deviation; n = 3 samples/concentration.

^a Samples were maintained on ice during bench top stability assay.

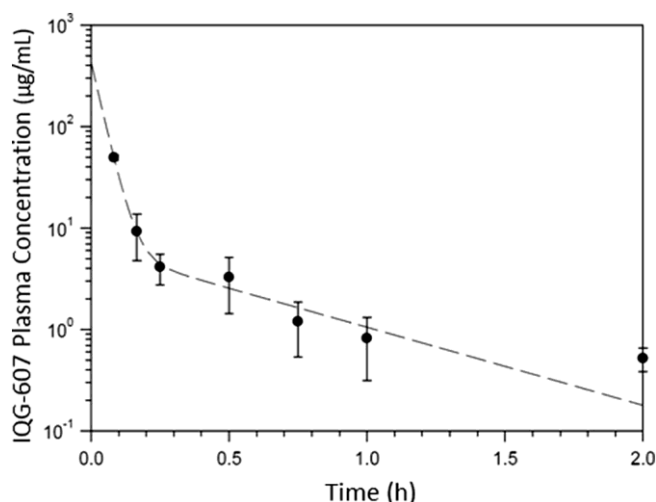


Fig. 2. Mean plasma concentration-time profile after intravenous administration of IQG-607 (50 mg/kg) to mice (n = 3 mice/sampling time point) (mean \pm S.D.).

reported by Grosset and Ji (1998). Under fasting condition, the K_e and $t_{1/2}$ elimination values were, respectively, 0.43 h^{-1} and 1.59 h (Table 3) with similar magnitude under fed condition (Table 3), showing that the elimination of IQG-607 is relatively rapid. The $t_{1/2}$ value was similar after i.v. and oral dosing (fed and fasting condition). Interestingly, Grosset and Ji (1998) found a $t_{1/2}$ value of 1.7 h for INH, showing that INH and IQG-607 (an analog of INH) have similar $t_{1/2}$ values in mice. The CL was similar for both administration routes and in both fed states. The MRT was also similar in the fasted (2.3 h) and the fed (1.8 h) groups (Table 3), bigger than the MRT following iv dosing (0.3 h). The oral bioavailability F values were found to be 3.7 and 3.8%, respectively, for fasted and fed mice (Table 3). Unfortunately, studies of INH pharmacokinetics in mice are lacking to allow comparisons with

Table 3

Pharmacokinetic parameters determined after single i.v. bolus injection and oral administration of IQG-607 to mice (n = 21/group) estimated by non-compartmental analysis.

Parameters	50 mg/kg i.v. (n = 21)	250 mg/kg oral	
		Fasted (n = 21)	Fed (n = 21)
C_{\max} ($\mu\text{g/mL}$)	–	1.23	1.72
T_{\max} (h)	–	0.25	0.25
K_e (h^{-1})	0.61	0.43	0.55
$t_{1/2}$ (h)	1.1	1.6	1.3
$\text{AUC}_{0 \rightarrow t}$ ($\mu\text{g h/L}$)	12.8	1.7	2.0
$\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$ ($\mu\text{g h/L}$)	13.7	2.6	2.7
CL (L/h/kg)	3.9	3.6	3.6
V_{dss} (L/kg)	1.2	–	–
MRT (h)	0.3	2.3	1.8
F (%)	–	3.7	3.8

C_{\max} : peak concentration; T_{\max} : time to peak plasma concentration; K_e : elimination rate constant; $t_{1/2}$: elimination half-life; AUC: area under the concentration-time curve from 0 to time t; $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$: area under the plasma concentration-time curve from time zero to infinity; CL: clearance; V_{dss} : volume of distribution at steady state; MRT: mean residence time; F: bioavailability (n = 3 animals/sampling time point for both i.v. and oral conditions).

the results here presented.

The low oral bioavailability F determined for IQG-607 could be related to a high first pass effect following oral dosing, among other factors such as subtract to efflux transporters or low gastrointestinal permeability (Kwan, 1997; Martinez and Amidon, 2002). However, further research efforts are required to elucidate the mechanisms limiting IQG-607 absorption. It is known that some types of foods, especially carbohydrates, can reduce the oral bioavailability of INH (Männistö et al., 1982; Peloquin et al., 1999; Self et al., 1999). Accordingly, efforts were made to assess the influence of food on IQG-607 bioavailability in mice. No influence of food, however, was observed.

The low oral bioavailability determined for IQG-607, however, cannot be used to rule out this anti-TB candidate. There are various

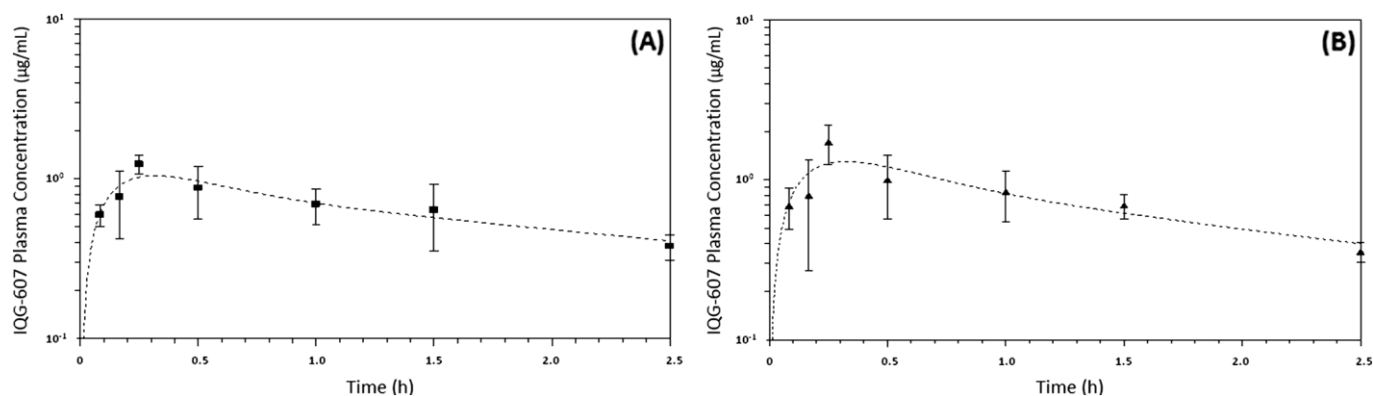


Fig. 3. Mean plasma concentration-time profiles after oral administration of IQG-607 (250 mg/kg) to fasted (A) or fed (B) mice ($n = 3$ mice/sampling time point) (mean \pm S.D.).

drugs candidates and also commercially available drugs that exhibit low oral bioavailability. For instance, reports on SQ109, a new anti-TB drug candidate in clinical trials, indicate that this drug presents 4% oral bioavailability in mice (Jia et al., 2005). Moreover, some FDA-approved drugs display low oral bioavailability, such as buspirone ($F = 3.9\%$) an atypical anxiolytic drug (Brown and Tomlin, 2010). Furthermore, the low oral bioavailability of IQG-607 is not necessarily a major drawback as long as this compound is able to exert its pharmacological effect, which has been suggested by intracellular activity against *M. tuberculosis*-infected macrophages (Rodrigues-Junior et al., 2014) and in murine model of infection (Rodrigues-Junior et al., 2012). Other determinants for the clinical outcome of a chemical compound have to be taken into consideration such as the drug candidate levels at the target site (Jia et al., 2005; Ryan, 1993; Presant et al., 1994; Joukhadar et al., 2001). Moreover, formation, if any, of pharmacologically active metabolites should be investigated. The development of an experimental protocol is currently underway to try to evaluate the *in vivo* IQG-607 stability and identity of its metabolites, if any. Further efforts should also be pursued to assess whether or not IQG-607 shows any inhibitory activity of drug-resistant strains of *M. tuberculosis*. Finally, the oral bioavailability of IQG-607 in different animal species needs to be investigated, because differences in oral bioavailability among species should be considered (Martinez and Amidon, 2002).

4. Conclusion

An HPLC method for IQG-607 quantification in plasma was described, which allowed pharmacokinetic studies in mice to be carried out. The proposed methodology represents a fundamental step to initiate pre-clinical pharmacokinetic studies and can be adapted to detect IQG-607 in samples of other animal species. The results here presented provide important insights into understanding the pharmacokinetics of IQG-607 after intravenous and oral administration. These data should serve as support for future pre-clinical pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling studies. Moreover, the results suggest that formulation efforts to improve the bioavailability of IQG-607 may be pursued. For instance, formulations using N(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA)-poly lactic acid (PLA) co-polymeric micelles (Upadhyay et al., 2017), co-spray dried chemical compound phospholipid lipospheres (Singh et al., 2017), or large unilamellar archaeosomes (Attar et al., 2017) may be sought. IQG-607 represents a metal-based (metalloid) compound with activity against *M. tuberculosis* that appears to be a promising candidate for further anti-TB drug development efforts.

Author contributions

ASD performed most experiments and wrote the manuscript. DSS, PM, LAB, and TDC participated on study conception and design. ASD, GOP, AFMP, PFD, and KP performed IQG-607 synthesis and

participated in the validation of analytical method. ASD, VSRJ, MMC, NDMS and FC performed animal and plasma protein binding experiments. LAB, TDC, and DSS performed data analysis. DSS, VSRJ, FC, TDC, MMC, and LAB performed critical revision of the manuscript.

Competing interests' statement

None.

Funding

This work was supported by FAPERGS-CAPES-CNPq [grant number 465318/2014-2]. L.A.B. (CNPq, 520182/99-5), D.S.S. (CNPq, 304051/1975-06), P.M. (CNPq, 307878/2015-5), M.M.C. (CNPq, 303842/2014-8) and T.D.C. (CNPq, 307328/2014-7) are Research Career Awardees of the National Research Council of Brazil (CNPq). A.D. is recipient of a PhD scholarship awarded by BNDES. V.S.R.J., A.F.M.P and K.P. acknowledge post-doctoral fellowships awarded by, respectively, FAPERGS-CAPES, BNDES and CNPq. P.F.D., N.D.M.S. and F.C. acknowledge PhD scholarships awarded by CNPq.

References

- Andrade, E.L., Bento, A.F., Cavalli, J., Oliveira, S.K., Schwanke, R.C., Siqueira, J.M., Freitas, C.S., Marcon, R., Calixto, J.B., 2016. Non-clinical studies in the process of new drug development – part II: good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 49, 1–19.
- Attar, A., Bakir, C., Yuce-Dursun, B., Demir, S., Cakmakci, E., Danis, O., Birbir, M., Ogan, A., 2017. Preparation, characterization, and *in vitro* evaluation of isoniazid and rifampicin-loaded archaeosomes. *Chem. Biol. Drug Des.* <http://dx.doi.org/10.1111/cbdd.13066>.
- Basso, L.A., Schneider, C.Z., Santos, A.J.A.B., Santos Jr., A.A., Campos, M.M., Souto, A.A., Santos, D.S., 2010. An inorganic complex that inhibits *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase as a prototype of a new class of chemotherapeutic agents to treat tuberculosis. *J. Braz. Chem. Soc.* 21, 1384–1389.
- Brown, D., Tomlin, M., 2010. Pharmacokinetics principles. In: Tomlin, M. (Ed.), *Pharmacology & Pharmacokinetics: A Basic Reader*. Springer, Southampton, pp. 13–51.
- Chetty, S., Ramesh, M., Singh-Pillay, A., Soliman, M.E.S., 2017. Recent advancements in the development of anti-tuberculosis drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27, 370–386.
- DiPiro, J.T., Spruill, W.J., Wade, W.E., Blouin, R.A., Pruemer, J.M., 2010. *Concepts in Clinical Pharmacokinetics*, Fifth ed. American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda.
- Gandhi, N.R., Nunn, P., Dheda, K., Schaaf, H.S., Zignol, M., Van, S.D., Jensen, P., Bayona, J., 2010. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *Lancet* 375, 1830–1843.
- Grosset, J., Ji, B., 1998. Experimental chemotherapy of mycobacterial diseases. In: Gangadharam, P.R.J., Jenkins, P.A. (Eds.), *Mycobacteria: II Chemotherapy*. Chapman & Hall, New York, pp. 51–97.
- Jia, L., Tomaszewski, J.E., Hanrahan, C., Coward, L., Noker, P., Gorman, G., Nikonenko, B., Protopenova, M., 2005. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of SQ109, a new diamine-based antitubercular drug. *Br. J. Pharmacol.* 144, 80–87.
- Joukhadar, C., Frossard, M., Mayer, B.X., Brunner, M., Klein, N., Siostrzonek, P., Eichler, H.G., Müller, M., 2001. Impaired target site penetration of beta-lactams may account for therapeutic failure in patients with septic shock. *Crit. Care Med.* 29, 385–391.

- Kwan, K.C., 1997. Oral bioavailability and first-pass effects. *Drug Metab. Dispos.* 25, 1329–1336.
- Männistö, P., Mäntylä, R., Klinge, E., Nykänen, S., Koponen, A., Lamminsivu, U., 1982. Influence of various diets on the bioavailability of isoniazid. *J. Antimicrob. Chemother.* 10, 427–434.
- Martinez, M.N., Amidon, G.L., 2002. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *J. Clin. Pharmacol.* 42, 620–643.
- Oliveira, J.S., Sousa, E.H.S., Basso, L.A., Palaci, M., Dietze, R., Santos, D.S., Moreira, I.S., 2004. An inorganic iron complex that inhibits wild-type and an isoniazid-resistant mutant 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem. Commun. (Camb.)* 7, 312–313.
- Oliveira, J.S., Sousa, E.H.S., Souza, O.N., Moreira, I.S., Santos, D.S., Basso, L.A., 2016. Slow-onset inhibition of 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis* by an inorganic complex. *Curr. Pharm. Des.* 12, 2409–2424.
- Pai, M., Behr, M.A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehm, C.C., Ginsberg, A., Swaminathan, S., Spigelman, M., Getahun, H., Menzies, D., Raviglione, M., 2016. Tuberculosis. *Nat. Rev. Dis. Primers* 2, 1–23.
- Peloquin, C.A., Namdar, R., Dodge, A.A., Nix, D.E., 1999. Pharmacokinetics of isoniazid under fasting conditions, with food, and with antacids. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 8, 703–710.
- Presant, C.A., Wolf, W., Waluch, V., Wiseman, C., Kennedy, P., Blayney, D., Brechner, R.R., 1994. Association of intratumoral pharmacokinetics of fluorouracil with clinical response. *Lancet* 343, 1184–1187.
- Rodrigues-Junior, V.S., Junior, A.S., Santos, A.J., Schneider, C.Z., Calixto, J.B., Sousa, E.H.S., Lopes, L.G.F., Souto, A.A., Basso, L.A., Santos, D.S., Campos, M.M., 2012. Activity of IQG-607, a new orally active compound, in murine model of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Int. J. Antimicrob. Agents* 40, 182–185.
- Rodrigues-Junior, V.S., Junior, A.A.S., Villela, A.D., Belardinelli, J.M., Morbidoni, H.R., Basso, L.A., Campos, M.M., Santos, D.S., 2014. IQG-607 abrogates the synthesis of mycolic acids and displays intracellular activity against *Mycobacterium tuberculosis* in infected macrophages. *Int. J. Antimicrob. Agents* 43, 82–85.
- Rodrigues-Junior, V.S., Cintra, L., Machado, P., Dadda, A., Basso, L.A., Mafra, A.C.C.N., Campos, A.H., Campos, M.M., Santos, D.S., 2017a. Toxicological profile of IQG-607 after single and repeated oral administration in minipigs: an essential step towards phase I clinical trial. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 90, 78–86.
- Rodrigues-Junior, V.S., Machado, P., Calixto, J.B., Siqueira, J.M., Andrade, E., Bento, A., Campos, M.M., Basso, L.A., Santos, D.S., 2017b. Preclinical safety evaluation of IQG-607 in rats: acute and repeated 1 dose toxicity studies. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 86, 11–17.
- Ryan, D.M., 1993. Pharmacokinetics of antibiotics in natural and experimental superficial compartments in animals and humans. *J. Antimicrob. Chemother.* 31, 1–6.
- Self, T.H., Chrisman, C.R., Baciewicz, A.M., Bronze, M.S., 1999. Isoniazid drug and food interactions. *Am J Med Sci* 317, 304–311.
- Shargel, L., Wu-Pong, S., Yu, A.B.C., 2005. Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics, Fifth ed. McGraw-Hill, New York.
- Singh, C., Koduri, L.V., Bhatt, T.D., Jhamb, S.S., Mishra, V., Gill, M.S., Suresh, S., 2017. *Vitro-In Vivo* Evaluation of Novel Co-Spray Dried Rifampicin Phospholipid Lipospheres for Oral Delivery. *AAPS PharmSciTech.* Vol. 18, pp. 138–146.
- Sousa, E.H.S., Pontes, D.L., Diógenes, I.C.N., Lopes, L.G.F., Oliveira, J.S., Basso, L.A., Santos, D.S., Moreira, I.S., 2005. Electron transfer kinetics and mechanistic study of the thionicotinamide coordinated to the pentacyanoferrate(III)/(II) complexes: a model system for the *in vitro* activation of thioamides anti-tuberculosis drugs. *J. Inorg. Biochem.* 99, 368–375.
- Sousa, E.H.S., Basso, L.A., Santos, D.S., Diógenes, I.C.N., Longhinotti, E., Lopes, L.G., Moreira, I.S., 2012. Isoniazid metal complex reactivity and insights for a novel anti-tuberculosis drug design. *J. Biol. Inorg. Chem.* 17, 275–283.
- Udwadia, Z.F., Amale, R.A., Ajbani, K.K., Rodrigues, C., 2012. Totally drug-resistant tuberculosis in India. *Clin. Infect. Dis.* 54, 579–581.
- Upadhyay, S., Khan, I., Gothwal, A., Pachouri, P.K., Bhaskar, N., Gupta, U.D., Chauhan, D.S., Gupta, U., 2017. Conjugated and entrapped HPMA-PLA nano-polymeric micelles based dual delivery of first line anti TB drugs: improved and safe drug delivery against sensitive and resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Pharm. Res.* 34, 1944–1955.
- US Food and Drug Administration, 2013. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm368107> (accessed 05.09.17).
- World Health Organization, 2016. Global Tuberculosis Report. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250441/1/9789241565394-eng.pdf?ua=1> (accessed 05.09.2017).

4.2. CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO DO COMPOSTO INCT-TB551 APÓS A ADMINISTRAÇÃO ORAL EM CAMUNDONGOS

4.2.1. Método de detecção do composto INCT-TB551 por CLAE

4.2.1.1. Materiais e reagentes

O composto INCT-TB551 foi sintetizado de acordo com Giacobbo *et al.*, (2016), no Laboratório de Química, anexo ao CPBMF-PUC-RS. O composto apresentou pureza acima de 90%, e teve sua estrutura química caracterizada.

Ácido tricloroacético (CCl_3COOH) $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich), Metanol (CH_3OH) grau HPLC (Merck), acetonitrila ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$) grau HPLC (Merck), e ácido acético glacial (CH_3COOH) 100% (Synth), foram utilizados nas análises cromatográficas. Dimetil Sulfóxido ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) (DMSO) (Merck) e polietilenoglicol 400 (PEG) (Sigma-Aldrich) foram utilizados para dissolver o composto para a administração oral nos animais (veículo). Plasma de camundongo comercial (Equitech-Bio) foi necessário para o desenvolvimento do método analítico. As soluções padrão foram preparadas em DMSO e água Milli-Q (Millipore) foi utilizada para o preparo de todas as soluções. Tubos de heparina (BD Vacutainer) foram utilizados para a coleta do sangue dos animais, e filtros de seringa de 0.22 μm (Millipore Millex-GV) para a filtragem do plasma após o tratamento das amostras.

4.2.1.2. Condições cromatográficas e preparação das amostras

A análise cromatográfica do composto foi realizada no equipamento Dionex Ultimate 3000 HPLC, contendo injetor automático e detector de ultravioleta/visível (UV/VIS). A coluna utilizada foi uma NUCLEODUR C18 ec, 250 x 4.6 mm, 5 μm (Macherey-Nagel). As fases móveis foram constituídas de duas soluções, sendo elas, ácido acético 1% (A), e metanol e acetonitrila (1:1, v/v) (B). O fluxo foi mantido a 1.5 mL/min em um programa gradiente, onde 100% de A foi utilizado de 0 a 7 min. A partir de 7 min foi utilizado 10% da solução A e 90% da solução B, sendo mantido até 13 min. A partir de 13 min, retorna para 100% da solução A, até completar o tempo de corrida da análise (15 min). A temperatura do autosampler foi mantida a 20 °C, e da coluna a 30 °C. O volume de injeção foi de 90 μL , e a detecção em 250 nm.

As soluções padrão do composto INCT-TB551 foram preparadas em DMSO 50%. A partir destas, *spikes* foram realizados em água Milli-Q ou em plasma de camundongos.

Para analisar o composto em água Milli-Q, foi realizado *spike* e a amostra foi injetada para a análise sem nenhum tratamento prévio. Para analisar o composto no

plasma, realizamos *spikes* em 100 μL para obter as seguintes concentrações: 0.1, 0.25, 0.5, 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$ (faixa da curva de calibração). Logo, realizamos o tratamento da mostra, onde adicionamos 25 μL de ácido tricloroacético e em seguida as soluções foram agitadas vigorosamente (vortex orbital) por 1 minuto. Feito isso, as amostras foram levadas para a centrífuga, onde ficaram durante 15 minutos a 13000 rpm a uma temperatura de 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados e filtrados em filtros de seringa de 0.22 μm . Adicionalmente, 50 μL de água Milli-Q foi passado em cada filtro e adicionado à respectiva solução. O branco do plasma (ausência do composto) e as amostras coletadas dos animais que receberam o composto pela via oral foram tratados nas mesmas condições. Após o tratamento das amostras, as soluções foram injetadas para a análise seguindo as condições cromatográficas descritas anteriormente.

4.2.1.3. Análise do composto

No momento da análise, comparando o branco (água Milli-Q contendo ácido tricloroacético), com a mesma solução contendo o composto INCT-TB551 na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, não foi observado pico interferente no tempo de retenção (T_R) do composto (aproximadamente 8 minutos) (**Figuras 15 A, B e C**). Na análise do plasma branco não foi detectado pico interferente na região do INCT-TB551 (**Figura 16 A**). Na análise do plasma com *spike* de INCT-TB551 (10 $\mu\text{g/mL}$), o T_R do composto foi em aproximadamente 8 minutos (**Figura 16 B**).

Figura 15. Cromatogramas referentes às análises do (A) branco e do (B) INCT-TB551 (10 $\mu\text{g/mL}$) (T_R = aprox. 8 min). (C) Espectro de absorção na região do UV referente ao pico cromatográfico do analito.

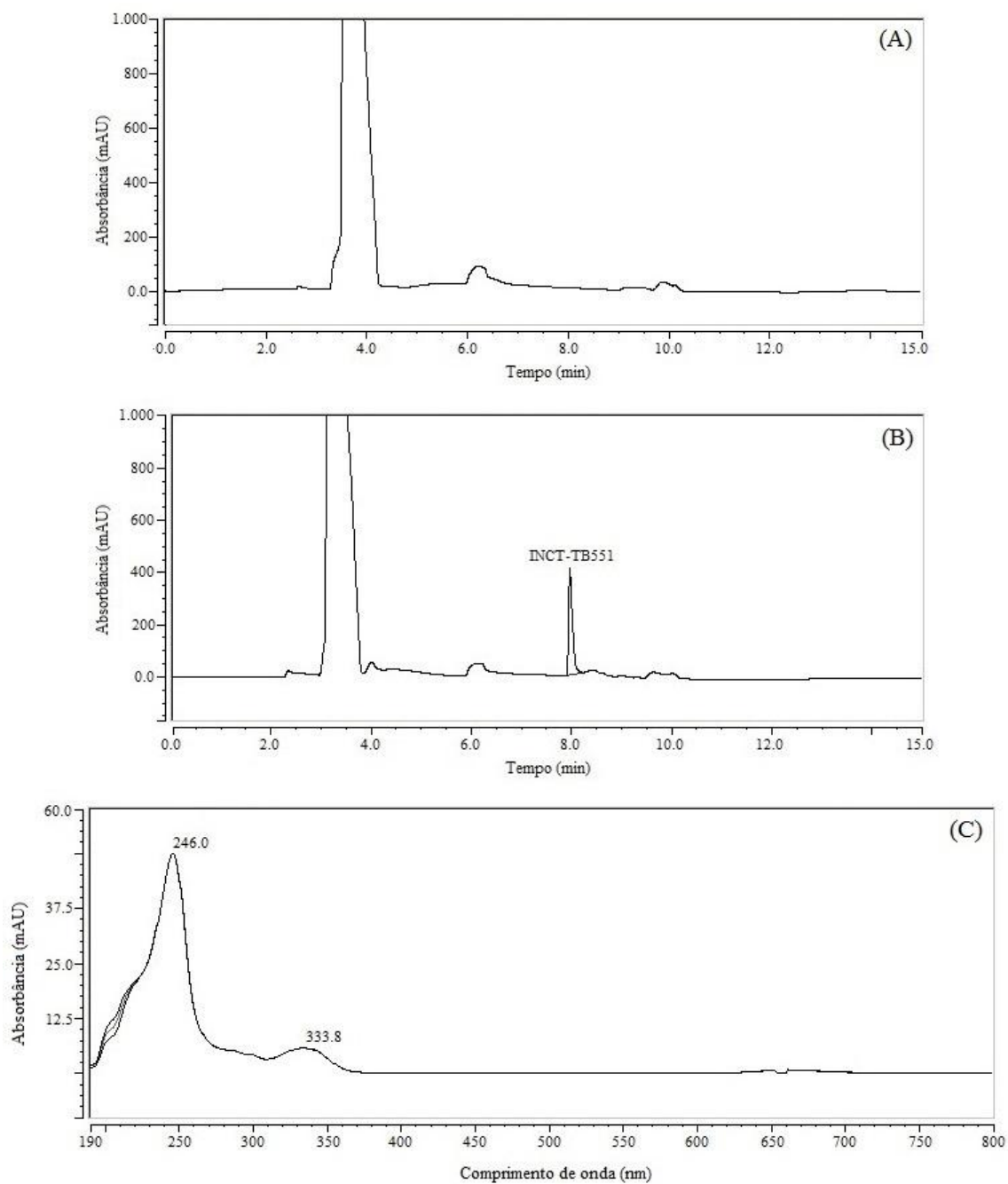
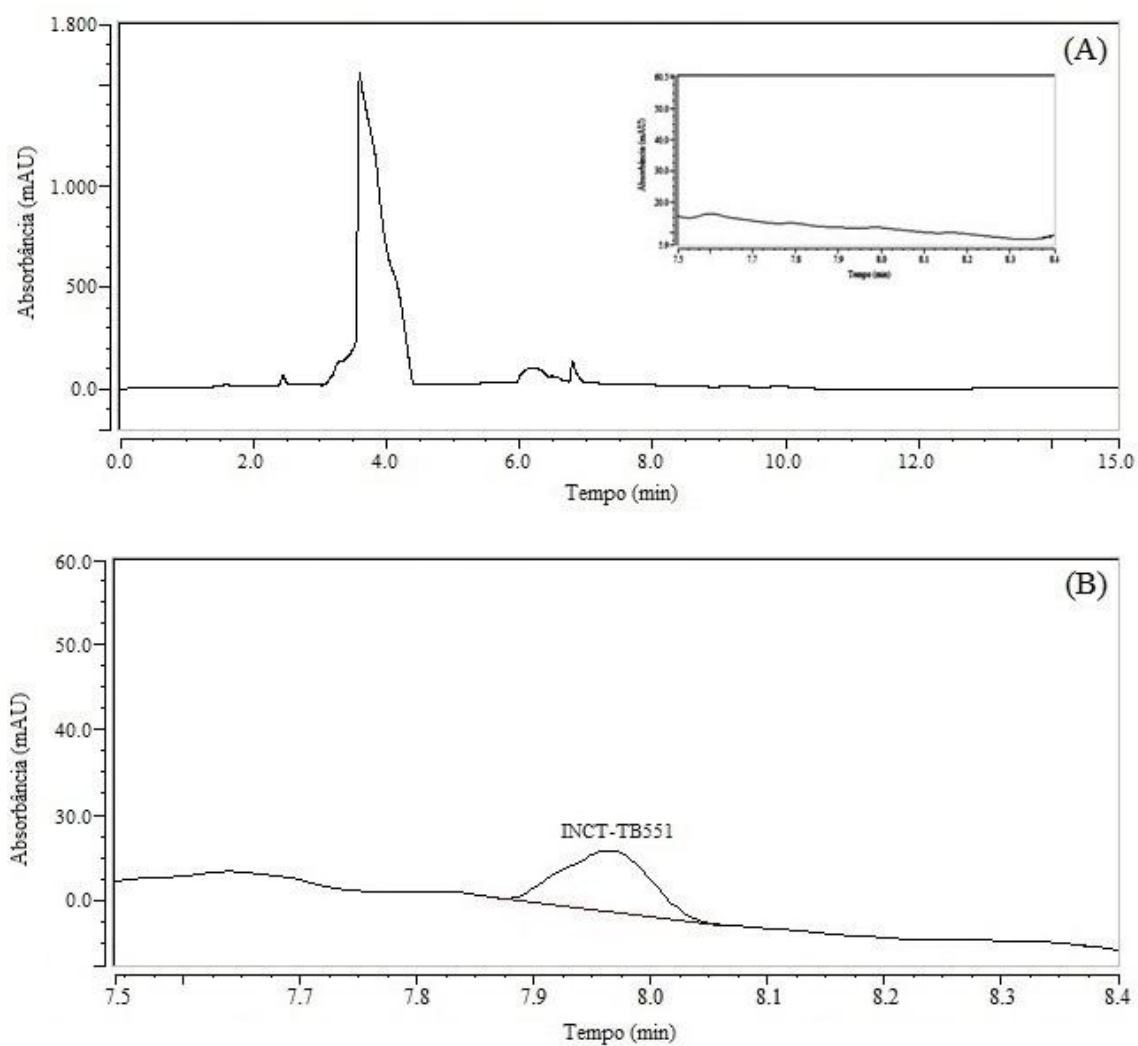
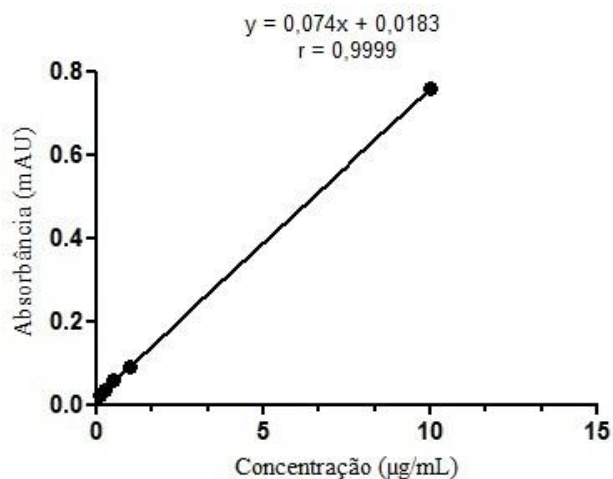


Figura 16. Cromatogramas referentes às análises do (A) plasma branco e do (B) INCT-TB551 em plasma (10 µg/mL) ($T_R = 7.95$ min). Inserção em (A): Ampliação da região selecionada do cromatograma, entre 7.5 e 8.4 min.



A linearidade do método foi avaliada a partir da curva de calibração, onde apresentou linearidade aceitável ($r = 0.9999$) na faixa de concentração escolhida (0.1 - 10 µg/mL) (FDA, 2013) (**Figura 17**).

Figura 17. Curva de calibração para o método de determinação do composto INCT-TB551 em plasma de camundongos. A curva foi obtida utilizando as seguintes concentrações: 0.1, 0.25, 0.5, 1 e 10 µg/mL.



4.2.2. Avaliação da absorção do composto INCT-TB551

4.2.2.1. Animais

Camundongos machos e fêmeas CF-1 foram usados, pesando entre 25-30 g, e o protocolo experimental foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, códigos SIPESQ 7710 e 7500. Os animais foram mantidos dentro de estantes em gaiolas apropriadas para roedores (preenchidas com maravalha de pinus), em temperatura controlada (22 °C), e ciclo claro-escuro de 12 horas. Foi fornecido ração peletizada e água filtrada *ad libitum*.

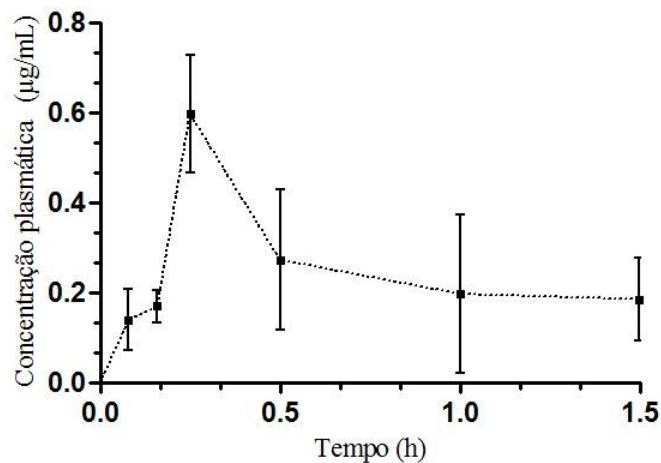
4.2.2.2. Administração do composto e análise no plasma

Dezoito animais foram utilizados para a administração do composto INCT-TB551. O composto foi administrado pela via oral (gavagem) na dose de 50 mg/kg (dissolvido em uma solução contendo 5% de DMSO e 95% de PEG). A seguir, os animais foram eutanasiados, e os sangues coletados nos seguintes tempos, após a administração: 0.08, 0.16, 0.25, 0.5, 1, e 1.5 h. Três animais foram eutanasiados em cada tempo de coleta. As amostras de sangue foram coletadas em tubos de heparina, e os plasmas separados por centrifugação a uma velocidade de 10.000 rpm durante 10 minutos. As amostras de plasma foram armazenadas no freezer -80 °C até o momento das análises.

As concentrações plasmáticas do composto INCT-TB551 quantificadas após a administração oral em camundongos está representado na Figura 18, mostrando que o composto está sendo absorvido após a administração oral. O C_{\max} do composto (0.59 $\mu\text{g/mL}$) foi atingido em 0.25 h (T_{\max}), indicando a rápida absorção do composto nos animais (**Figura 18**). Vale ressaltar que, para fins de comparação, em um estudo farmacocinético da bedaquilina (composto quinolínico) em camundongos, foi constatada um C_{\max} de 1.1 a 1.3 $\mu\text{g/mL}$ (dose de 25 mg/kg) atingido dentro de 2 a 4 h (T_{\max}), mostrando que o composto INCT-TB551 é absorvido mais rapidamente. No entanto, o INCT-TB551 apresenta um C_{\max} menor (0.59 $\mu\text{g/mL}$) em uma dose administrada duas vezes maior (50 mg/kg) que a do referido estudo (Adries *et al.*, 2005). Além disso, em um estudo farmacocinético realizado por Miyazaki *et al.*, (1999) em camundongos, é possível observar valores de T_{\max} para os fármacos moxifloxacino e ofloxacino (que possuem núcleo quinolínico) similares ao obtido no presente estudo com o INCT-TB551 (0.25 h).

Cabe mencionar que moléculas da mesma classe que o INCT-TB551 foram avaliadas em um estudo recente, e demonstrou-se que esta classe de moléculas pode ser fortemente metabolizada por enzimas esterases plasmáticas (Pitta *et al.*, 2016). Este fator pode contribuir ou ser o fator determinante para a baixa concentração encontrada, o que resultaria em uma baixa biodisponibilidade e pode estar relacionado com a ausência de efeito bactericida *in vivo* no modelo de camundongos (dados não publicados).

Figura 18. Perfil da concentração plasmática *versus* tempo após a administração oral do composto INCT-TB551 (50 mg/kg) em camundongos (n = 3 animais/tempo de coleta) (média \pm D.P.).



Para calcular os parâmetros farmacocinéticos do composto INTC-TB 551, um maior número de animais será necessário para a obtenção de mais tempos de coleta, na tentativa de obter a porção terminal da ASC, levando em consideração a sensibilidade do método analítico, e assim, calcular corretamente os parâmetros. Ainda, o método analítico precisa ser validado para que as concentrações do composto possam ser quantificadas com uma maior confiabilidade.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante aproximadamente 14 anos o grupo de pesquisa vem dedicando-se ao estudo do composto IQG-607, um promissor candidato para o tratamento da TB, doença infecto-contagiosa responsável por um significativo número de mortes em todo o mundo. O método analítico utilizando CLAE, desenvolvido para a determinação deste composto em plasma, representou um passo fundamental para iniciar o seu estudo farmacocinético pré-clínico. Os dados obtidos no estudo *in vivo* forneceram informações relevantes para a compreensão da farmacocinética do composto IQG-607 após a administração i.v., bem como, após a administração oral, tanto de animais em jejum quanto de animais alimentados. Estes dados poderão servir como suporte para estudos de modelagem farmacocinética-farmacodinâmica, e para avaliar o efeitos de diferentes formulações. Isto será realizado, observando se ocorre modificação (melhora ou não) dos parâmetros farmacocinéticos, uma vez que, a absorção pode ser influenciada pela forma farmacêutica e seus excipientes (Dokoumetzidis *et al.*, 2006). Além disso, o método analítico aqui desenvolvido poderá ser explorado para a realização de diferentes estudos em outras espécies e em futuros estudos clínicos, caso o composto continue apresentando resultados promissores. Cabe mencionar que esta metodologia já foi empregada a fim de detectar e quantificar o IQG-607 em mini pigs, que receberam administração de IQG-607, por via oral (Rodrigues-Junior *et al.*, 2017b).

Com relação ao estudo piloto realizado com o composto INCT-TB551, observamos que há absorção desta molécula após a administração oral em camundongos, de acordo com as concentrações plasmáticas que foram observadas. No entanto, apesar de absorvido, o composto não está apresentando atividade satisfatória contra *M. tuberculosis* neste modelo *in vivo*, mesmo quando a dose foi aumentada para 100 mg/kg/dia (dados não publicados). Novos estudos serão necessários para avaliar o que pode estar ocorrendo *in vivo* e que impede o seu efeito terapêutico. Um exemplo pode ser a insuficiente concentração plasmática, que não apresenta a ação desejada (concentração terapêutica não atingida devido a metabolismo de primeira passagem no fígado), a formação de metabólitos inativos, e/ou ainda pode ter relação com as propriedades físico-químicas do composto (Baca *et al.*, 2011, Schmidt *et al.*, 2010). Outro fator que pode ser avaliado, futuramente, é o possível metabolismo por enzimas esterases plasmáticas, assim como foi fortemente sugerido para moléculas muito semelhantes (Pitta *et al.*, 2016). Cabe mencionar que a capacidade de um composto de

conseguir exercer o seu efeito terapêutico após a administração oral depende de muitas variáveis, e somente a fração do composto (podendo ser também seus metabólitos, caso sejam formados) que consegue ligar-se a receptores ou enzimas específicas terá um efeito terapêutico (Baca *et al.*, 2011, Song *et al.*, 2004). Ainda, o método analítico precisa ser mais bem explorado, e deve ser validado para quantificações mais precisas, para que possa ser realizado um estudo farmacocinético. A investigação de possível formação de metabólitos inativos também precisa ser realizada, assim como a estabilidade da molécula em diferentes condições de armazenamento e manipulação. Somado a isto, mais tempos de coleta dos plasmas dos animais serão necessários para que os parâmetros farmacocinéticos do composto possam ser calculados.

Os protocolos apresentados neste trabalho poderão ser utilizados futuramente e otimizados para estudos iniciais de farmacocinética de novos candidatos a fármacos obtidos pelo grupo de pesquisa, a fim de entender o perfil farmacocinético desses compostos, colaborando para o avanço nas etapas necessárias para o desenvolvimento de possíveis fármacos anti-TB.

REFERÊNCIAS

- ABBADI, B. L. *et al.* Revisiting activation of and the mechanism of resistance to the compound IQG-607 in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 12, Nov. 2017.
- ADHVARYU, M.; VAKHARIA, B. Drug-resistant tuberculosis: emerging treatment options. **Clin Pharmacol**, v. 3, p. 51–67. Dec. 2011.
- ADRIES, K. *et al.* A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 307, n. 5707, p. 223-227, Jan. 2005.
- ALLEN JR., L. V. **Remington: an introduction to pharmacy**. 1 ed. London: Pharmaceutical Press, 2013. 672 p.
- ARROWSMITH, J.; MILLER, P. Phase II and phase III attrition rates 2011–2012. **Nat Rev**, v. 12, p. 569, Aug. 2013.
- AUBRY, A. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase: interaction with quinolones and correlation with antimycobacterial drug activity. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 4, p. 1281–1288, Apr. 2004.
- BACA, Q. J.; GOLAN, D. E. Pharmacokinetics. In: GOLAN, D. E. *et al.* **Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011. p. 27-42.
- BAILER, A. J. Testing for equality of area under curves when using destructive measures techniques. **J Pharmacokinet Pharmacodyn**, v. 16, n. 3, p. 303-309, Jun. 1988.
- BALDAN, H. M. *et al.* The effect of rifampicin and pyrazinamide on isoniazid pharmacokinetics in rats. **Biopharm Drug Dispos**, v. 28, n. 8, p. 409-13, Nov 2007.
- BALLELL, L. *et al.* Fueling Open-Source Drug Discovery: 177 Small-Molecule Leads against Tuberculosis. **ChemMedChem**, v. 8, n. 2, p. 313-21, Jan. 2013.

BANERJEE, A. *et al.* *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 263, n. 5144, p. 227-30, Jan. 1994.

BASSO, L. A. *et al.* An inorganic complex that inhibits *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase as a prototype of a new class of chemotherapeutic agents to treat tuberculosis. **J Braz Chem Soc**, v. 21, n. 7, p. 1384-89, Mar 2010.

BLACK, M. T. *et al.* Mechanism of action of the antibiotic NXL101, a novel nonfluoroquinolone inhibitor of bacterial type II topoisomerases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 9, p. 3339–49, Sept. 2008.

BLANCHARD, J. S. Molecular mechanisms of drug resistance in mycobacterium tuberculosis. **Annu Rev Biochem**, v. 65, n. 11, p. 215-39, Nov. 1996.

BOOGAARD, J. *et al.* New drugs against tuberculosis: problems, progress, and evaluation of agents in clinical development. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 3, p. 849-62, Mar. 2009.

BRENNAN, P. J. Tuberculosis in the context of emerging and reemerging diseases. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 18, n. 4, p. 263-269, Aug. 1997.

CANNON, J. G. **Pharmacology for chemists**. 2 ed. New York: American Chemical Society, 2007. 21 p.

CHAN, E. D.; ISEMAN, M. D. Current medical treatment for tuberculosis. **BMJ**, v. 325, n. 7375, p. 1282-86, Nov. 2002.

COLLIN, F.; KARKARE, S.; MAXWELL, A. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 92, n. 3, p. 479-97, Nov. 2011.

D'AMBROSIO, L. *et al.* New anti-tuberculosis drugs and regimens: 2015 update. **Eur Respir J**, v. 1, n. 1, p. 1-15, Apr. 2015.

DADDA, A. S. **Detecção do composto IQG-607: uma etapa essencial para futuros estudos de farmacocinética**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Faculdade de Biociências. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

DADDA, A. S. *et al.* Voltammetric detection and quantification of pentacyano(isoniazid)ferrate(II) - a metal-based drug candidate for the treatment of tuberculosis. **Curr Top Pharmacol**, v. 19, p. 75-86, 2015.

DHILLON, S.; GILL, K. Basic pharmacokinetics. In: DHILLON, S.; KOSTRZEWSKI, A. (Eds.). **Clinical pharmacokinetics**. 5 ed. London: Pharmaceutical Press, 2006. p. 1-44.

DIEL, R. *et al.* Tuberculosis: cost of illness in Germany. **Eur Respir J**, v. 40, n. 1, p. 143–151, July 2012.

DIPIRO, J. T. *et al.* **Concepts in clinical pharmacokinetics**. 5 ed. Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists, Inc., 2010. 250 p.

DIXIT, R. Pharmacokinetics and toxicokinetics: fundamentals and applications in toxicology. In: GUPTA, R. C. (Ed.). **Veterinary toxicology - basic and clinical principles**. New York: Academic Press, 2007. p. 25-41.

DOKOUMETZIDIS, A.; MACHERAS, P. A century of dissolution research: from Noyes and Whitney to the biopharmaceutics classification system. **Int J Pharm**, v. 321, p. 1-11, Sept. 2006.

DYE, C. *et al.* Global burden of tuberculosis: Estimated incidence, prevalence, and mortality by country. **JAMA-J Am Med Assoc**, v. 282, n. 7, p. 677–686, Aug. 1999.

EMMERSON, A. M.; JONES, A. M. The quinolones: decades of development and use. **J Antimicrob Chemoth**, v. 51, p. 13-20, May 2003.

ESMAIL, H. *et al.* The ongoing challenge of latent tuberculosis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 369, n. 1645, p. 1-14, June 2014.

ETTE, E. I.; GARG, V.; JAYARAJ, A. Drug development and regulatory issues. In: BONATE, P. L.; HOWARD, D. R. (Eds.). **Pharmacokinetics in drug development: regulatory and development paradigms**. 2 ed. Arlington: American Association of Pharmaceutical Scientists, 2004. p. 3-36.

FALZON, D. *et al.* Resistance to fluoroquinolones and second-line injectable drugs: impact on multidrug-resistant TB outcomes. **Eur Respir J**, v. 42, n. 1, p.156–168, July 2013.

FAN, J.; LANNOY, I. A. M. Pharmacokinetics. **Biochem Pharmacol**, v. 87, n. 1, p. 93-120, Jan. 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) 2013. Guidance for industry: bioanalytical method validation.

GETAHUN, H. *et al.* Latent Mycobacterium tuberculosis infection. **New Engl J Med**, v. 372, n. 22, p. 2127–35, May 2015.

GENGENBACHER, M.; KAUFMANN, S. H. E. Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy. **Fems Microbiol Rev**, v. 36, n. 3, p. 514-32, May 2012.

GIACOBBO, B. C. **2-((quinolin-4-il)oxi)-fenilacetamidas: síntese, caracterização estrutural e atividade inibitória sobre o crescimento do mycobacterium tuberculosis**. 2016. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Faculdade de Biociências. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

GIBALDI, M.; PERRIER, D. Non compartmental analysis based on statistical moment theory. In: DEKKER, M. (Ed.). **Pharmacokinetics**. 2 ed. New York: CRC Press, 1982. p. 409-424.

GOMEZ, L. *et al.* Novel pyrazole derivatives as potent inhibitors of type II topoisomerases. Part 1: synthesis and preliminary SAR analysis. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 17, n. 10, p. 2723–27, May 2007.

GUIMARÃES, M. D. Pulmonary tuberculosis in Brazilian indians: a picture of this context depicted through radiography. **Radiol Bras**, v. 48, n. 15, p.5-6, Set./Out. 2015.

GUNARATNA, C. Drug metabolism and pharmacokinetics in drug discovery: a primer for bioanalytical chemists, part II. **Curr Sep**, v. 19, n. 3, p. 87-92, Jun. 2001.

HARPER, C. Tuberculosis, a neglected opportunity? **Nat Med**, v. 13, n. 3, p. 309-12, Mar. 2007.

HENDERSON, W.; MCINDOE, J. S. **Mass spectrometry of inorganic and organometallic compounds**. Chichester: Wiley-Interscience, 2005. 292 p.

HERBER, R. F. M. Toxicokinetics and toxicodynamics. In: DUFFUS, J. H.; WORTH, H. G. J. (Eds.). **Fundamental toxicology for chemists**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1996. p. 17-25.

JANG, J. *et al.* Efflux Attenuates the Antibacterial Activity of Q203 in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 7, p. 1-8, Apr. 2017.

KAUFMANN, S. H. E. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nat Rev Immunol**, v. 1, n. 1, p. 20–30, Oct. 2001.

KOLA, I.; LANDIS, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? **Nat Rev**, v. 3, p. 711-715, Aug. 2004.

KUHLMAN, J. J. Jr. *et al.* Human pharmacokinetics of intravenous, sublingual, and buccal buprenorphine. **J Anal Toxicol**, v. 20, n. 6, p. 369-378, Oct. 1996.

KUMAR, N. *et al.* Pharmacokinetics and dose response of anti-TB drugs in rat infection model of tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 94, n. 3, p. 282-86, May. 2014.

KUMAR, S. *et al.* Screening of antitubercular compound library identifies novel ATP synthase inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 108, p. 56-63, Jan. 2018.

KWON, Y. **Handbook of essential pharmacokinetics, pharmacodynamics and drug metabolism for industrial scientists**. New York: Springer, 2001. 291 p.

LEANDRO, K. C. *et al.* Development and validation of an electroanalytical methodology for determination of isoniazid and rifampicin content in pharmaceutical formulations. **Braz J Pharm Sci**, v. 45, n. 2, p. 331-37, Apr./Jun. 2009.

LILIENKAMPF, A. *et al.* Structure-activity relationships of quinoline-based compounds active against replicating and nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. **J Med Chem**, v. 52, n. 7, p. 2109-18, Mar. 2009.

Ma, Z. *et al.* Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. **Lancet**, v. 375, n. 9731, p. 2100-9, Jun. 2010.

MAHAJAN, R. Bedaquiline: first FDA-approved tuberculosis drug in 40 years. **Int J Appl Basic Med Res**, v. 3, n. 1, p. 1-2, Jan./Jun. 2013.

MATTELLI, A. *et al.* TMC207: the first compound of a new class of potent antituberculosis. **Future Microbiol**, v. 5, n. 6, p. 1-15, Jun. 2010.

MIGLIORI, G. B. *et al.* Drug resistance beyond extensively drug-resistant tuberculosis: individual patient data meta-analysis. **Eur Respir J**, v. 42, n. 1, p. 169-179, Oct. 2012.

MILLER, A. A. *et al.* Discovery and characterization of QPT-1, the progenitor of a new class of bacterial topoisomerase inhibitors. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 8, p. 2806-12, Aug. 2008.

MILONE, M. C. Therapeutic drug monitoring of selected anticancer drugs. In: DASGUPTA, A. (Ed.). **Therapeutic drug monitoring: newer drugs and biomarkers**. 1 ed. San Diego: Academic Press, 2012. p. 291-322.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS) - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim Epidemiológico**. 2017. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/23/2017-V-48-N-8-Indicadores-priorit-rios-para-o-monitoramento-do-Plano-Nacional-pelo-Fim-da-Tuberculose-como-Problema-de-Sa--de-P--blica-no-Brasil.pdf>>. Acesso em: 08 Nov. 2017.

MIYAZAKI, E. *et al.* Moxifloxacin (BAY12-8039), a new 8-methoxyquinolone, is active in a mouse model of tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 3, n. 1, p. 85-89, Jan. 1999.

MUTSCHLER, E. *et al.* **Drug actions: basic principles and therapeutic aspects**. 1 ed. Stuttgart: CRC Press, 1995. 800 p.

NARASIMHAN, P. *et al.* Risk Factors for Tuberculosis. **Pulmonary Medicine**, v. 2013, p. 1-11, Jan. 2013.

OLIVEIRA, J. S. *et al.* An inorganic iron complex that inhibits wild-type and an isoniazid-resistant mutant 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Chem Commun (Camb)**, v. 7, n. 3, p. 312-3, Feb. 2004.

OLIVEIRA, J. S. *et al.* Slow-onset inhibition of 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis* by an inorganic complex. **Curr Pharm Des**, v. 12, n. 19, p. 2409-24, Feb. 2006.

PAGE, S. W.; MADDISON, J. E. Principles of clinical pharmacology. In: MADDISON, J. E.; PAGE, S. W.; CHURCH, D. B. (Eds.). **Small animal clinical pharmacology**. 2 ed. Philadelphia: Saunders, 2008. p. 1-26.

PARADKAR, A. R.; BAKLIWAL, S. **Biopharmaceutics & pharmacokinetics**. 3 ed. Pune: Nirali Prakashan, 2008. 150 p.

PETHE, K. *et al.* Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis. **Nat Med**, v. 19, p. 1157-1160, Aug. 2013.

PHUMMARIN, N. *et al.* SAR and identification of 2-(9-quinolin-4-yl)oxyacetamides as *Mycobacterium tuberculosis* cytochrome *bcl* inhibitors. **MedChemComm**, v. 7, n. 11, p. 2122-2127, Nov. 2016.

PIRZAD, R. *et al.* Differential-pulse cathodic stripping voltammetric determination of sodium nitroprusside at a hanging mercury drop electrode aided by copper(II) and poly-L-lysine modification. **Analyst**, v. 119, n. 5, p. 963-69, Jan. 1994.

PISSINATE, K. *et al.* 2-(Quinolin-4-yl)oxyacetamides are active against drug-susceptible and drug-resistant mycobacterium tuberculosis strains. **ACS Med Chem Lett**, v. 7, n. 3, p. 235-9, Jan. 2016.

PITTA, E. *et al.* Searching for new leads for tuberculosis: design, synthesis, and biological evaluation of novel 2-quinolin-4-yl)oxyacetamides. **J Med Chem**, v. 59, n. 14, p. 6709-6728, June 2016.

PRESS, B.; DI GRANDI, D. Permeability for Intestinal Absorption: Caco-2 Assay and Related Issues. **Curr Drug Metab**, v. 9, n. 9, p. 893-900, Nov. 2008.

RATAIN, M. J.; PLUNKETT, W. K. Principles of pharmacokinetics. In: KUFEL, D. W. *et al.* (Eds.). **Holland-Frei cancer medicine**. 6 ed. Hamilton: BC Decker, 2003. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12354/>.

RIVIRE, J. E. **Comparative pharmacokinetics: principles, techniques and applications**. 2 ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2011. 456 p.

RODRIGUES-JUNIOR, V. S. *et al.* Activity of IQG-607, a new orally active compound, in murine model of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Int J Antimicrob Agents**, v. 40, n. 2, p. 182-85, Aug. 2012.

RODRIGUES-JUNIOR, V. S. *et al.* IQG-607 abrogates the synthesis of mycolic acids and displays intracellular activity against *Mycobacterium tuberculosis* in infected macrophages. **Int J Antimicrob Agents**, v. 43, n. 1, p. 82-5, Jan. 2014.

RODRIGUES-JUNIOR, V. S. *et al.* Preclinical safety evaluation of IQG-607 in rats: Acute and repeated dose toxicity studies. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 86, p. 11-17, June 2017a.

RODRIGUES-JUNIOR, V. S. *et al.* Toxicological profile of IQG-607 after single and repeated oral administration in minipigs: An essential step towards phase I clinical trial. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 90, p. 78-86, Aug. 2017b.

ROLAN, P.; MOLNÁR, V. Clinical pharmacokinetics. In: Griffin, J. P. (Ed.). **The textbook of pharmaceutical medicine**. 6 ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2009. p. 167-184.

ROUAN, M. C. *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of TMC207 and Its N-desmethyl metabolite in a murine model of tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 3, p. 1444-51, Mar. 2011.

RUIZ-GARCIA, A. *et al.* Pharmacokinetics in drug discovery. **J Pharma Sci**, v. 97, n. 8, p. 654-90, Mar. 2007.

RYU, J. Y. Diagnosis of pulmonary tuberculosis: recent advances and diagnostic algorithms. **Tuberc Respir Dis**, v. 78, n. 2, p. 64-71, Apr. 2015.

SAN PEDRO, A.; OLIVEIRA, R. M. de. Tuberculosis and socioeconomic indicators: systematic review of the literature. **Rev Panam Salud Publica**, v.33, n. 4, p. 294-301, Apr. 2013.

SAUNDERS, B. M.; FRANK, A. A.; ORME, I. M. Granuloma formation is required to contain bacillus growth and delay mortality in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Immunology**, v. 98, n. 3, p. 324-8, Nov. 1999.

SCHMIDT, S.; GONZALEZ, D.; DERENDORF, H. Significance of protein binding in pharmacokinetics and pharmacodynamics. **J Pharm Sci**, v. 99, n. 3, p. 1107-22, Mar. 2010.

SENTHILKUMAR, P. *et al.* Antimycobacterial activities of novel fluoroquinolones. **Biomed Pharmacother**, v. 63, n. 1, p. 27-35, Jan. 2009.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. B. C. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**, 6 ed. New York: McGraw-Hill Education, 2012. 811 p.

SHEINER, L.; WAKEFIELD, J. Population modelling in drug development. **Stat Methods Med Res**, v.8, n. 3, p.183-193, Sept. 1999.

SHEN, D. D. Toxicokinetics. In: KLAASSEN, C.; WATKINS III, J. B. (Eds.). **Casarett & Doull's essentials of toxicology**. 2 ed. New York: McGraw-Hill Education / Medical, 2010. p. 99- 108.

SINGH, S. *et al.* Quinoline and quinolones: promising scaffolds for future antimycobacterial agents. **J Enzyme Inhib Med Chem**, v. 30, n. 3, p. 1-13, July 2015.

SMITH, I. Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, n. 3, p. 463–96, July 2003.

SONG, N.; ZHANG, S.; LIU, C. Overview of factors affecting oral drug absorption. **Asian Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 4, n. 3, p. 167-176, Aug. 2004.

SOUSA, E. H. *et al.* [Fe(CN)₅(isoniazid)]³⁻: An iron isoniazid complex with redox behavior implicated in tuberculosis therapy. **J Inorg Biochem**, v. 140, n. 10, p. 236-44, Nov. 2014.

SOUSA, E. H. *et al.* Isoniazid metal complex reactivity and insights for a novel anti-tuberculosis drug design. **J Biol Inorg Chem**, v. 17, n. 2, p. 275-83, Feb. 2012.

SOUSA, E. H. S. *et al.* Electron transfer kinetics and mechanistic study of the thionicotinamide coordinated to the pentacyanoferrate(III)/(II) complexes: a model system for the *in vitro* activation of thioamides anti-tuberculosis drugs. **J Inorg Biochem**, v. 99, n. 2, p. 368-75, Feb. 2005.

SUBTIL, F. T. *et al.* Activity of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates and identification of their molecular target by whole genome sequencing. **Int J Antimicrob Agents**. v. 17, p. 30315-1. Aug. 2017.

TASSO, L.; BETTONI, C. C.; DALLA COSTA, T. Pharmacokinetic, plasma profile and bioavailability evaluation of gatifloxacin in rats. **Lat Am J Pharm**, v. 27, n. 2, p. 270-73, Mar. 2008.

TOMA, H. E.; CREUTZ, C. Pentacyanoferrate(II) Complexes: Evaluation of Their Formal Potentials and Mechanism of Their Quenching of Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) Luminescence. **Inorg Chem**, v. 16, n. 3, p. 545-50, Aug. 1977.

TRACY, T. S. Drug absorption and distribution. In: CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E. (Eds.). **Modern pharmacology with clinical applications**. 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003. p. 20-33.

TURNER, J. R. **New drug development: design, methodology, and analysis**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2007. 270 p.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), 2013. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation.

VASCONCELOS, I. *et al.* The mode of inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* wild-type and isoniazid-resistant 2-trans-enoyl-ACP(CoA) reductase enzymes by an inorganic complex. **Anti-Infect Agents Med Chem**, v. 7, n. 1, p. 50-62, Dec. 2008.

VELAYATI, A. A. *et al.* Totally drug-resistant tuberculosis strains evidence of adaptation at cellular level. **Eur Respir J**, v. 34, n. 5, p. 1202-1203, Nov. 2009.

YOUNG, D.; STARK, J.; KIRSCHNER, D. Systems biology of persistent infection: tuberculosis as a case study. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 7, p. 520-8, July 2008.

WANG, J. C. DNA topoisomerases. **Annu Rev Biochem**, v. 65, p. 635-92, July 1996.

WALLIS, R. S. *et al.* Tuberculosis—advances in development of new drugs, treatment regimens, host-directed therapies, and biomarkers. **Lancet**, v. 16, n. 4, p. 36-46, Apr. 2016.

WATT, P. M.; HICKSON, I. D. Structure and function of type II DNA topoisomerases. **Biochem J**, v. 303, n. 3, p. 681-95, Nov. 1994.

WALKER, D. K. The use of pharmacokinetic and pharmacodynamic data in the assessment of drug safety in early drug development. **Br J Clin Pharmacol**, v. 58, n. 6, p. 601-608, Dec. 2004.

WILKINSON, G. R. Pharmacokinetics: the dynamics of drug absorption, distribution, and elimination. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (Eds.). **Goodman & Gilman's - The pharmacological basis of therapeutics**. 10 ed. Chicago: McGraw-Hill Medical Publishing Division, 2001. p. 3-29.

WORKMAN, L. M.; LACHARITY, L. A. **Understanding pharmacology: essentials for medication safety**. 2 ed. St Louis: Saunders, 2015. 560 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2014. Global Tuberculosis Report.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2015. Global Tuberculosis Report.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2016. Global Tuberculosis Report.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2017. Global Tuberculosis Report.

ZHANG, R. L. *et al.* Effects of rifampicin on pharmacokinetics of isoniazid and its metabolite acetylhydrazine in rats. **Acta Pharmacol Sin**, v. 13, n. 16, p. 494-96, Nov. 1992.

ZHOU, Y. *et al.* Effects of pyridoxine on the intestinal absorption and pharmacokinetics of isoniazid in rats. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet**, v. 38, n. 1, p. 5-13, Mar. 2013.

ANEXO A

CARTA DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

Registro CEUA – 14/00427



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 04/2015 - CEUA

Porto Alegre, 22 de janeiro de 2015.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

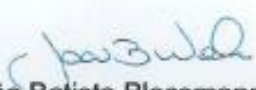
A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 14/00427, intitulado "**Detecção de IQG-607 e seus possíveis metabólitos em plasmas de camundongos: uma etapa essencial para futuros estudos de farmacocinética**".

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
40	Mus musculus	01/2015 – 01/2017

Atenciosamente,


Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Luiz Augusto Basso
FABIO
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512
CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS

Fone: (51) 3353-6365

E-mail: ceua@pucrs.br

ANEXO B

CARTA DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

Código SIPESQ: 7710



SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 7710

Porto Alegre, 29 de setembro de 2017

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLOS PARA ESTUDOS DE FARMACOCINÉTICA DE NOVOS CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTITUBERCULOSE" coordenado por LUIZ AUGUSTO BASSO.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Duração do Projeto: 29/09/2017 - 29/09/2018

Nº de Animais	Espécie
99	Mus musculus
Total de Animais: 99	

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA)

ANEXO C

CARTA DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

Código SIPESQ: 7500



SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 7500

Porto Alegre, 24 de novembro de 2016.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "2-(QUINOLIN-4-ILOXI)ACETAMIDAS: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFECÇÃO COM Mycobacterium tuberculosis E DO PERFIL TOXICOLÓGICO" coordenado por LUIZ AUGUSTO BASSO.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
116	Mus musculus	24/11/2016 - 24/03/2020

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

ANEXO D

TOXICOLOGICAL PROFILE OF IQG-607 AFTER SINGLE AND REPEATED
ORAL ADMINISTRATION IN MINIPIGS: AN ESSENTIAL STEP TOWARDS
PHASE I CLINICAL TRIAL



Contents lists available at ScienceDirect

Regulatory Toxicology and Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yrtph

Toxicological profile of IQG-607 after single and repeated oral administration in minipigs: An essential step towards phase I clinical trial



Valnês S. Rodrigues-Junior^{a,*}, Luciana Cintra^b, Pablo Machado^{a, c}, Adílio Dadda^{a, c}, Luiz Augusto Basso^{a, c, d}, Ana Carolina Cintra Nunes Mafra^e, Alexandre Holthausen Campos^b, Maria Martha Campos^{d, f}, Diógenes Santiago Santos^{a, c}

^a Centro de Pesquisas Em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Em Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande Do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6681 – Prédio 92A Tecnopuc, 90619-900 Porto Alegre, Brazil

^b Centro de Experimentação e Treinamento Em Cirurgia (CETEC), Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein, São Paulo, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação Em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

^d Programa de Pós-Graduação Em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

^e Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil

^f Instituto de Toxicologia e Farmacologia, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 May 2017

Received in revised form

18 August 2017

Accepted 20 August 2017

Available online 23 August 2017

Keywords:

Tuberculosis

IQG-607

Drug development

Predclinical toxicology

Minipig

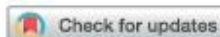
ABSTRACT

IQG-607 is an anti-tuberculosis drug candidate, with a promising safety and efficacy profile in models of tuberculosis infection both *in vitro* and *in vivo*. Here, we evaluated the safety and the possible toxic effects of IQG-607 after acute and 90-day repeated administrations in minipigs. Single oral administration of IQG-607 (220 mg/kg) to female and male minipigs did not result in any morbidity or mortality. No gross lesions were observed in the minipigs at necropsy. Repeated administration of IQG 607 (65, 30, or 15 mg/kg), given orally, for 90 days, in both male and female animals did not cause any mortality and no significant body mass alteration. Diarrhea and alopecia were the clinical signs observed in animals dosed with IQG-607 for 90 days. Long-term treatment with IQG-607 did not induce evident alterations of blood cell counts or any hematological parameters. Importantly, the repeated schedule of administration of IQG-607 resulted in increased cholesterol levels, increased glucose levels, decrease in the globulin levels, and increased creatinine levels over the time. Most necropsy and histopathological alterations of the organs from IQG-607-treated groups were also observed for the untreated group. In addition, pharmacokinetic parameters were evaluated. IQG-607 represents a potential candidate molecule for anti-tuberculosis drug development programs. Its promising *in vivo* activity and mild to moderate toxic events detected in this study suggest that IQG-607 represents a candidate for clinical development.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

ANEXO E

THERMODYNAMICS, FUNCTIONAL AND STRUCTURAL
CHARACTERIZATION OF INOSINE-URIDINE NUCLEOSIDE HYDROLASE
FROM *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*

Cite this: *RSC Adv.*, 2017, 7, 48861

Thermodynamics, functional and structural characterization of inosine–uridine nucleoside hydrolase from *Leishmania braziliensis*†

Pedro Ferrari Dalberto,^a Leonardo Kras Borges Martinelli,^a Jose Fernando Ruggiero Bachega,^b Luis Fernando Saraiva Macedo Timmers,^b Antonio Frederico Michel Pinto,^a Adilio da Silva Dadda,^a Guilherme Oliveira Petersen,^a Fernanda Teixeira Subtil,^a Luiza Galina,^a Anne Drummond Villela,^a Kenia Pissinate,^a Pablo Machado,^a Cristiano Valim Bizarro,^a Osmar Norberto de Souza,^b Edgar Marcelino de Carvalho Filho,^c Luiz Augusto Basso^{✉*} and Diogenes Santiago Santos^a

Leishmaniasis is considered one of the main endemic diseases in the world, and Brazil is among the countries with the highest incidence of cutaneous and mucocutaneous forms of leishmaniasis caused mainly by *Leishmania braziliensis*. The first-line drugs used in the treatment of leishmaniasis have several limitations: parenteral administration, long duration of treatment, and serious toxicity. One key metabolic characteristic of these parasites is the lack of a *de novo* purine biosynthesis pathway, making them auxotrophic to purines. Accordingly, they rely solely on the purine salvage pathway for nucleotide synthesis. A better understanding of the purine salvage pathway can reveal details of the biology of *L. braziliensis* that could, in turn, be used to develop new strategies to combat this parasite. The inosine–uridine nucleoside hydrolase from *L. braziliensis* (LbIU-NH) plays an important role in the salvage process and is an attractive drug target as there is no similar catalytic activity in mammals. Here is described cloning, heterologous protein expression, and a three-step purification protocol that yielded homogenous recombinant protein. The determination of LbIU-NH steady-state kinetic constants for inosine, adenosine, cytidine, uridine and *p*-nitrophenyl β -*D*-ribofuranoside is also reported. These data suggest that LbIU-NH displays characteristics of a nonspecific hydrolase. The thermodynamic profile suggests that *D*-ribose can bind to free enzyme with favorable enthalpic (ΔH^\ddagger) and entropic (ΔS^\ddagger) contributions. Thermodynamic activation parameters (E_a , ΔG^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔH^\ddagger) for the LbIU-NH-catalyzed chemical reaction, pre-steady-state kinetics, solvent kinetic isotope effects, and pH-rate profiles are also presented. In addition, the crystal structure of LbIU-NH in complex with β -*D*-ribose and Ca^{2+} at 1.5 Å resolution is described.

Received 30th June 2017
Accepted 30th October 2017

DOI: 10.1039/c7ra07268f

rsc.li/rsc-advances

ANEXO F

EFFECT OF THE BRADYKININ 1 RECEPTOR ANTAGONIST SSR240612 AFTER
ORAL ADMINISTRATION IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*-INFECTED
MICE



Contents lists available at ScienceDirect

Tuberculosis

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/tube

Drug Discovery and Resistance

Effect of the bradykinin 1 receptor antagonist SSR240612 after oral administration in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice

Valnês S. Rodrigues-Junior^{a,b}, Priscilla B. Pail^c, Anne D. Villela^{a,b}, Virgínia C.A. Falcão^{a,c}, Adílio S. Dadda^{a,c}, Bruno L. Abbadini^{a,c}, João B. Pesquero^d, Diógenes S. Santos^{a,c}, Luiz A. Basso^{a,b,c}, Maria M. Campos^{a,b,e,*}

^a Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

^d Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

^e Instituto de Toxicologia e Farmacologia, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords

Tuberculosis
Drug development
Kinin receptors
SSR240612

ABSTRACT

The role, if any, played by the kinin system in tuberculosis infection models, either *in vivo* or *in vitro*, was investigated. The effects of *Mycobacterium tuberculosis* infection on C57BL/6 wild type, B₂R^{-/-}, B₂R^{-/-} and double B₁R/B₂R knockout mice were evaluated. Immunohistochemistry analysis was carried out to assess B₁R and B₂R expression in spleens and lungs of *M. tuberculosis*-infected mice. In addition, *in vitro* experiments with *M. tuberculosis*-infected macrophages were performed. The *in vivo* effects of HOE-140 and SSR240612 on the mice model of infection were also evaluated. Infected B₂R^{-/-} mice exhibited increased splenomegaly, whereas decreased spleen weight in infected double B₁R/B₂R knockout mice was observed. The bacterial load, determined as colony-forming units, did not differ in the spleens and lungs of the studied mouse strains. Importantly, immunohistochemical analysis revealed that B₁R was upregulated in both spleens and lungs of infected mice. *M. tuberculosis*-infected macrophages incubated with SSR240612, alone or in combination with des-Arg⁸-BK, for four days, displayed a marked inhibitory effect on CFU counts. However, the pre-incubation of the selective B₁R (des-Arg⁸-BK and SSR240612) and B₂R (BK and HOE-140) agonists and antagonists, respectively, did not significantly affect the bacterial loads. A statistically significant reduction in the CFU of *M. tuberculosis* in lungs and spleens of animals treated with SSR240612, but not with HOE-140, was observed. Further efforts should be pursued to clarify whether or not SSR240612 might be considered an option for the treatment of tuberculosis.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br