

(11) Número de Publicação: **PT 1642885 E**

(51) Classificação Internacional:  
**C07C 229/42** (2007.10) **A61K 31/195** (2007.10)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

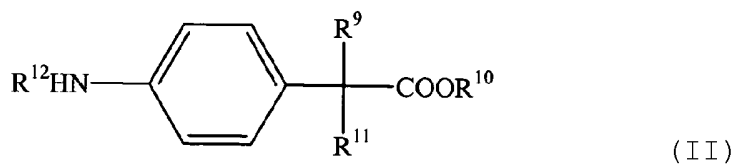
(22) Data de pedido: <b>2001.08.28</b>	(73) Titular(es): <b>BIOCON LIMITED</b>
(30) Prioridade(s): <b>2000.08.29 US 228683 P</b>	<b>20TH K.M. HOSUR ROAD, ELECTRONICS CITY</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2006.04.05</b>	<b>P.O. BANGALORE 560 100 KARNATAKA IN</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2009.11.11</b> <b>243/2009</b>	(72) Inventor(es): <b>NNOCHIRI N. EKWURIBE US</b> <b>JENNIFER RIGGS-SAUTHIER US</b>
	(74) Mandatário: <b>ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS</b> <b>RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT</b>

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO UM DERIVADO DE ÁCIDO PARA-AMINOFENILACÉTICO PARA O TRATAMENTO DE ESTADOS INFLAMATÓRIOS DO TRACTO GASTROINTESTINAL**

(57) Resumo:

**RESUMO****"UTILIZAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO UM DERIVADO DE ÁCIDO PARA-AMINOFENILACÉTICO PARA O TRATAMENTO DE ESTADOS INFLAMATÓRIOS DO TRACTO GASTROINTESTINAL"**

A invenção proporciona um ingrediente farmacêutico activo compreendendo um composto de Fórmula II:



em que  $R^9$ ,  $R^{10}$  e  $R^{11}$  são independentemente seleccionados de hidrogénio e alquilo  $C_1$  a  $C_4$ ; e  $R^{12}$  é seleccionado de hidrogénio e  $-C(O)R^{13}$ , em que  $R^{13}$  é alquilo  $C_1$  a  $C_6$  ou um grupo arilo; ou um éster ou um sal farmacêuticamente aceitável de tal composto, em mistura com adição de um diluente ou veículo farmacêutico, para utilização no tratamento de um estado inflamatório do tracto gastrointestinal num indivíduo que necessite de tal tratamento. A invenção proporciona também a utilização do referido ingrediente farmacêutico activo no fabrico de um medicamento para utilização no tratamento de um estado inflamatório do tracto gastrointestinal num indivíduo que necessite de tal tratamento.

## DESCRIÇÃO

"UTILIZAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO UM DERIVADO DE ÁCIDO PARA-AMINOFENILACÉTICO PARA O TRATAMENTO DE ESTADOS INFLAMATÓRIOS DO TRACTO GASTROINTESTINAL"

### Pedido Relacionado

Este pedido de patente reivindica o benefício do Pedido Provisório de Patente dos Estados Unidos Número 60/228,683, registado em 29 de Agosto de 2000.

### Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a compostos imunorreguladores e métodos para o tratamento de doenças com estes compostos.

### Antecedentes da Invenção

Muitas pessoas sofrem da doença inflamatória do intestino (DII). DII é um termo genérico utilizado para referir duas doenças inflamatórias, a colite ulcerosa e a doença de Crohn. A colite ulcerosa é uma doença inflamatória crónica de etiologia desconhecida que afecta várias porções do tracto gastrointestinal (GI), particularmente o tracto GI inferior, e mais particularmente o

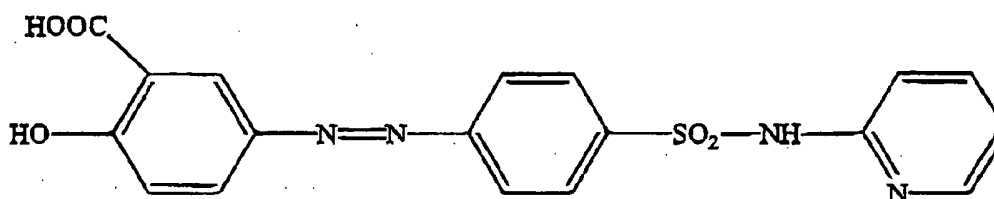
cólon e/ou o recto. A doença de Crohn é uma doença inflamatória séria do tracto GI. Predomina no intestino delgado (íleo) e no intestino grosso (cólon). Vários medicamentos estão em uso para tratar a doença inflamatória do intestino.

Conhece-se a utilização da mesalamina, ácido 5-aminossalicílico (5-ASA) para tratar a colite ulcerosa. Enquanto a mesalamina pode ser activa no tratamento da colite ulcerosa, pode ser absorvida à medida que atravessa o tracto GI. Esta absorção pode afectar negativamente a quantidade de mesalamina que atinge o tracto GI inferior, particularmente o cólon e o recto.

Várias formulações de mesalamina foram introduzidas na tentativa de proteger a mesalamina à medida que atravessa o intestino e o tracto GI superior. Uma destas formulações é uma formulação de libertação retardada que se baseia num revestimento sensível ao pH que rodeia a mesalamina. O revestimento permite que a mesalamina atravesse o intestino e o tracto GI superior sem ser absorvida de modo que a mesalamina atinja o alvo (ou seja, o tracto GI inferior, particularmente o cólon e/ou o recto) intacta. Noutra formulação, microesferas de mesalamina rodeiam um núcleo de mesalamina. Esta formulação liberta mesalamina ao longo do tracto GI, em vez de direccionar especificamente o cólon. Pode ser difícil prever a biodisponibilidade das várias formulações de mesalamina quando administradas a uma larga variedade de indivíduos.

Como resultado, pode ser difícil determinar a dosagem apropriada para um dado indivíduo.

Também se conhece a utilização de sulfassalazina com a seguinte fórmula para tratar a colite ulcerosa.

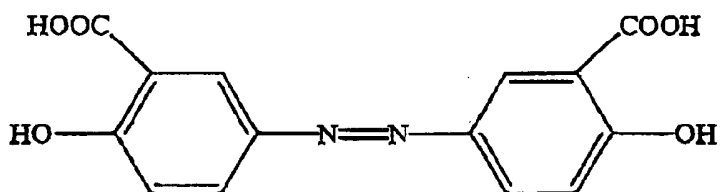


No entanto, a sulfassalazina é metabolizada no corpo para formar mesalamina (ácido 5-aminossalicílico (5-ASA)) e sulfapiridina. Foram observados vários efeitos adversos da utilização da sulfassalazina incluindo náuseas, vômitos, desconforto abdominal, e dores de cabeça, apenas para referir alguns. Estes efeitos secundários adversos são geralmente atribuídos à actividade da sulfapiridina no tracto GI, assim como daquela absorvida no sistema.

A patente WO-A-95/31194 propõe um género alargado de composições para o tratamento de doenças inflamatórias crónicas.

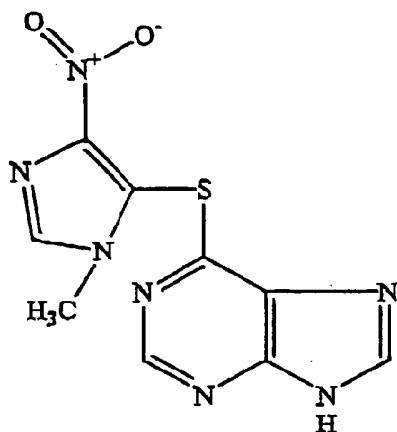
A Patente U.S. No. 4,412,992 de Chan propõe derivados da mesalamina. Ao contrário da sulfalazina, a quebra destes compostos no tracto intestinal pode não originar produtos metabólicos indesejados. De facto, os produtos metabólicos não-mesalamina podem ser inócuos.

A olsalazina com a seguinte fórmula foi utilizada para tratar a colite ulcerosa.

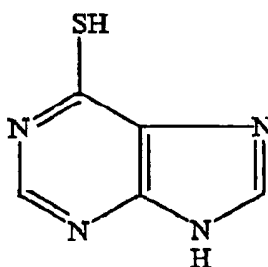


Além de ser relativamente cara de produzir, a olsalazina pode ter efeitos secundários incluindo diarreia.

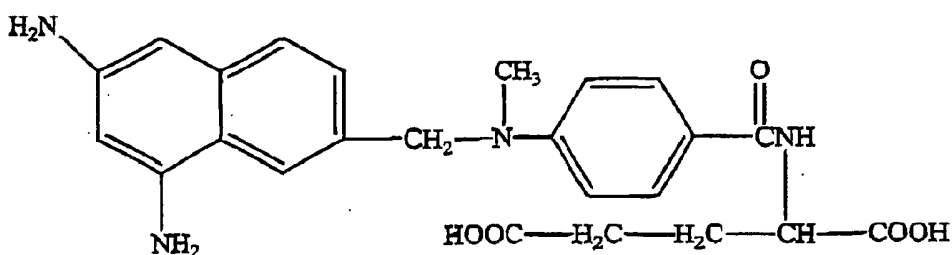
Conhece-se a utilização da azatioprina (6-(1-metil-4-nitimidazol-5-iltio)purina) no tratamento da doença inflamatória do intestino. A azatioprina tem a seguinte estrutura química:



Também se conhece a utilização da 6-mercaptopurina, um metabolito da azatioprina, para tratar a doença inflamatória do intestino. A 6-mercaptopurina tem a seguinte estrutura química:



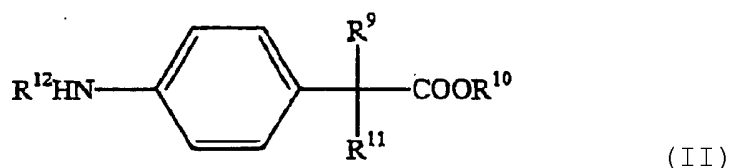
O metotrexato (ácido L-4-amino-N<sup>10</sup>-metilpteroil-glutâmico) foi também utilizado para tratar a doença inflamatória do intestino. O metotrexato tem a seguinte estrutura química:



O polipéptido ciclosporina, que foi tradicionalmente administrado a pacientes transplantados para prevenir a rejeição de órgãos, foi também utilizado para tratar a doença inflamatória do intestino. A utilização da ciclosporina para tratar a DII pode ser, no entanto, limitada pelos vários efeitos secundários associados com esta medicação. Estes efeitos secundários incluem elevada pressão sanguínea, lesões renais, tremores, dores de cabeça, ataques apopléticos, crescimento capilar excessivo, crescimento excessivo das gengivas, confusão, coma, e gota.

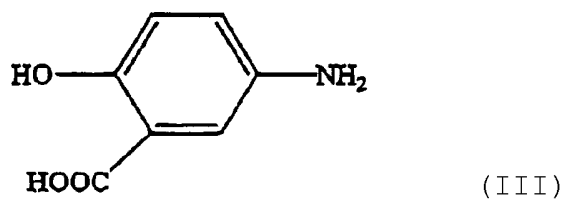
**Sumário da invenção**

De acordo com a presente invenção, proporciona-se um ingrediente farmacêutico activo compreendendo um composto da Fórmula II:



em que  $R^9$ ,  $R^{10}$  e  $R^{11}$  são independentemente seleccionados de hidrogénio e alquilo  $C_1$  a  $C_4$ ; e  $R^{12}$  é seleccionado de hidrogénio e  $-C(O)R^{13}$ , em que  $R^{13}$  é um alquilo  $C_1$  a  $C_6$  ou um grupo arilo, ou um éster ou um sal farmacêuticamente aceitável de tal composto, em mistura com adição de um diluente ou veículo farmacêutico sólido ou líquido, para utilização no tratamento de um estado inflamatório do tracto gastrointestinal num indivíduo que necessite de tal tratamento.

O ingrediente farmacêutico activo pode ainda compreender um composto de Fórmula III:



A presente invenção também considera a utilização de um composto de Fórmula II no fabrico de um medicamento



para utilização no tratamento de um estado inflamatório do tracto gastrointestinal num indivíduo que necessite de tal tratamento.

Métodos para o tratamento de um estado inflamatório do tracto GI num indivíduo que necessite de tal tratamento incluem a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz do ingrediente farmacêutico activo que inclui um composto de fórmula II.

Ao longo da descrição e das reivindicações desta especificação, as palavras "compreendem" e "contêm" e variações destas palavras, por exemplo "compreendendo" e "compreende", significa "incluir mas sem limitação a", e não pretende (nem o faz) excluir outras porções, aditivos, componentes, inteiros ou passos.

Através da descrição das reivindicações desta especificação, o singular engloba o plural excepto se o contexto de outro modo o exija. Em particular, quando se utiliza o artigo indefinido, a especificação deve ser entendida como contemplando o plural assim como o singular, excepto se o contexto de outro modo o exija.

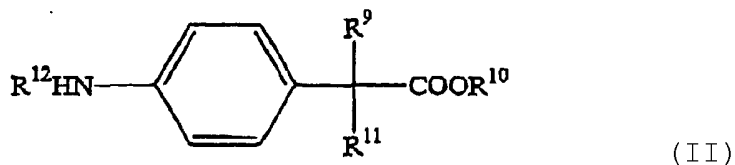
#### **Descrição Detalhada das Formas de Realização Preferidas**

A invenção será agora descrita em relação às formas de realização preferidas aqui descritas. Deve ser apreciado no entanto que estas formas de realização são

para o efeito de ilustrar a invenção, e não devem ser entendidos como limitando o âmbito da invenção tal como definida pelas reivindicações.

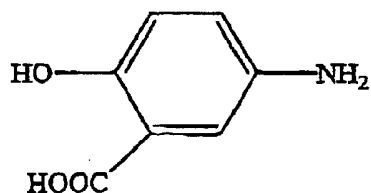
Tal como aqui utilizado, o termo "doença inflamatória do intestino" inclui colite ulcerosa e a doença de Crohn.

De acordo com as reivindicações da presente invenção, são proporcionados compostos com um ingrediente farmacêutico activo que consiste num composto de Fórmula II:



em que  $R^9$ ,  $R^{10}$  e  $R^{11}$  são independentemente seleccionados do grupo que consiste em hidrogénio e alquilo  $C_1$  a  $C_4$ ; e  $R^{12}$  é seleccionado do grupo que consiste em hidrogénio e  $-C(O)R^{13}$ , em que  $R^{13}$  é alquilo  $C_1$  a  $C_6$  ou um grupo arilo, ou um éster ou um sal farmacêuticamente aceitável de tal composto, numa mistura com adição de um diluente ou veículo farmacêutico, para utilização no tratamento de um estado inflamatório do tracto gastrointestinal num indivíduo que necessite de tal tratamento. Os referidos compostos podem ser preparados utilizando materiais e reagentes de partida conhecidos.

O ingrediente farmacêutico activo compreende ainda mesalamina, o composto de Fórmula III:



(III)

Quando o ingrediente farmacêutico activo compreende compostos de Fórmula II e Fórmula III, sendo o composto de Fórmula II preferentemente de 10 a 90 por cento em peso do ingrediente farmacêutico activo e ser mais preferentemente cerca de 40 a 60 por cento em peso do ingrediente farmacêutico activo. Quando os ingredientes farmacêuticos activos compreendem compostos de Fórmula II e Fórmula III, a razão molar do composto de Fórmula I em relação ao composto de Fórmula II é preferencialmente entre 1:10 e 10:1, e é mais preferentemente entre 1:2 e 2:1.

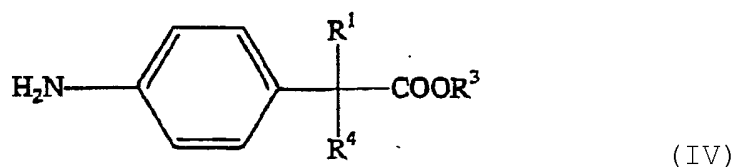
Compostos da presente invenção podem ser utilizados para a profilaxia ou o tratamento de várias doenças, particularmente estados inflamatórios do tracto GI incluindo, mas sem limitação, estados inflamatórios da boca tais como mucosites, doenças infecciosas (por exemplo doenças virais, bacterianas e fúngicas), e doença de Crohn; estados inflamatórios do esófago tais como esofagite, doenças resultantes de lesões químicas (por exemplo, ingestão de lixívia), doença do refluxo gastroesofágico, refluxo de ácido biliar, esófago de Barrett, doença de

Crohn, e estenose esofágica; doenças inflamatórias do estômago tais como gastrites (por exemplo, por *Helicobacter pylori*, doença ácido-péptica e gastrite atrófica), doença da úlcera péptica, lesões pré-cancerosas do estômago, dispepsia não ulcerosa, e doença de Crohn; doenças inflamatórias do intestino, tais como doença celíaca, doença de Crohn, crescimento bacteriano excessivo, doença da úlcera péptica, e fissuras do intestino; doenças inflamatórias do cólon, tais como doença de Crohn, colite ulcerosa, colite infecciosa (por exemplo, colite pseudomembranosa tais como colite provocada por *Clostridium difficile*, *Salmonella enteritis*, infecções por *Shigella*, yersiniose, criptosporidiose, infecções por *Microsporidia*, e infecções virais), colite induzida por radiação, colite no hospedeiro imunocomprometido (por exemplo, tiflíte), estados pré-cancerosos do cólon (por exemplo, displasia, estados inflamatórios do intestino, e pólipos do cólon), proctite, inflamação associada com hemorróidas, proctalgia essencial, e fissuras rectais; doenças da vesícula biliar e/ou do tracto biliar tais como colangite, cirrose biliar primária, e colecistite; e abscessos intestinais.

Os compostos da presente invenção podem também ser utilizados no diagnóstico de constituintes, estados, ou estados de doença em sistemas biológicos ou espécimenes, assim como para efeitos de diagnóstico em sistemas não fisiológicos. Além disso, os compostos da presente invenção podem ter aplicação na profilaxia do tratamento de estados ou doenças em sistemas de plantas. A título de exemplo, os

compostos podem ter eficácia insecticida, herbicida, fungicida, e/ou pesticida utilizável em vários sistemas de plantas.

Nalgumas formas de realização, compostos da presente invenção podem ser quebrados no tracto intestinal de modo a formar o produto metabólico de Fórmula IV:



em que  $R^1$ ,  $R^3$ , e  $R^4$  são independentemente hidrogénio ou alquilo  $C_1$  a  $C_4$ .

O produto metabólico da Fórmula IV pode possuir actividade anti-inflamatória e/ou actividade imunorreguladora. Além disso, o composto III pode possuir actividade anti-inflamatória, e mais particularmente pode proporcionar a inibição da prostaglandina sintetase I & II.

Deste modo, os compostos da presente invenção podem proporcionar actividade imunorreguladora. Os compostos da presente invenção podem ainda proporcionar a inibição da prostaglandina sintetase I e II. Os compostos da presente invenção podem ser úteis para o tratamento de várias doenças, particularmente da colite ulcerosa e da doença de Crohn.

Em utilização terapêutica, a presente invenção contempla o tratamento de um animal com ou susceptível de forma latente a condições intestinais ou estados de doença e que para estas necessite de um tratamento, compreendendo o tratamento a administração a um tal animal de uma quantidade eficaz de um composto da presente invenção que seja terapêuticamente eficaz para a referida condição ou estado de doença. Os indivíduos tratados com os compostos da presente invenção incluem tanto animais humanos como não humanos (por exemplo, aves, cães, gatos, vacas, cavalos), e são preferentemente indivíduos mamíferos, e mais preferentemente indivíduos humanos.

Dependendo da condição ou estado de doença específicos a ser combatido, os indivíduos animais podem ser administrados com compostos da presente invenção e qualquer dosagem terapêuticamente eficaz e segura adequada, tal como pode ser facilmente determinada no âmbito da técnica e sem ser necessária qualquer experimentação. Por exemplo, os compostos da presente invenção podem ser administrados numa dosagem entre cerca de 0,1 e 100 mg/kg, preferentemente entre cerca de 5 e 90 mg/kg, e mais preferentemente entre cerca de 10 e 80 mg/kg.

Os compostos da presente invenção podem ser administrados *per se* assim como na forma de ésteres, sais e outros seus derivados fisiologicamente funcionais farmacêuticamente aceitáveis.

A presente invenção contempla também as formulações farmacêuticas, tanto para utilização veterinária como para utilização médica humana, que compreende como ingrediente farmacêutico activo um ou mais compostos da presente invenção. Em tais formulações farmacêuticas e de medicamento, o ingrediente farmacêutico activo é utilizado em conjunto com um ou mais veículos farmacêuticamente activos e opcionalmente quaisquer outros ingredientes terapêuticos. Os veículos devem ser farmacêuticamente aceitáveis no sentido de ser compatível com outros ingredientes da formulação e são preferentemente não indevidamente prejudiciais para o seu receptor. O ingrediente farmacêutico activo é proporcionado numa quantidade eficaz para se conseguir o efeito farmacológico desejado, tal como acima descrito, e numa quantidade apropriada para se conseguir a dose diária desejada.

As formulações incluem aqueles adequados para administração parentérica como não parentérica, e as modalidades de administração específicas incluem, mas não se limitam a, administração oral, rectal, bucal, tópica, nasal, oftálmica, subcutânea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, intratecal, intra-articular, intra-arterial, subaracnóide, bronquial, linfática, vaginal, e intra-uterina. São preferidas formulações adequadas para a administração oral e parentérica, sendo mais preferidas formulações adequadas para administração oral.

Quando um composto da presente invenção é

utilizado numa formulação compreendendo uma solução líquida, a formulação pode com vantagem ser administrada de forma oral ou parentérica. Quando um composto da presente invenção é utilizado numa formulação de suspensão líquida ou como na forma de uma formulação em pó ou num veículo biocompatível, a formulação pode com vantagem ser administrada oralmente, rectalmente, ou bronquialmente.

Quando um composto da presente invenção é utilizado directamente na forma de um sólido em pó, o composto pode com vantagem ser administrado oralmente. Alternativamente, pode ser administrado bronquialmente, através da nebulização do pó num gás veículo, para formar uma dispersão gasosa do pó que é inspirado pelo paciente através de um circuito de respiração compreendendo um dispositivo nebulizador adequado.

As formulações compreendendo um composto da presente invenção podem convenientemente ser apresentadas em formas de dosagem única e podem ser preparadas por qualquer um dos métodos bem conhecidos na técnica farmacêutica. Tais métodos geralmente incluem o passo de associar o composto da presente invenção com um veículo que constitui um ou mais ingredientes acessórios. Tipicamente, as formulações são preparadas trazendo uniformemente e intimamente o composto da invenção em associação com um veículo líquido, um veículo sólido finamente dividido, ou ambos, e depois, se necessário, formar o produto em formas de dosagem da formulação desejada.



Formulações da presente invenção adequadas para administração oral podem ser apresentadas na forma de unidades discretas tais como cápsulas, comprimidos, ou pastilhas, cada um contendo uma quantidade predefinida de um composto da presente invenção na forma de um pó ou de grânulos; ou uma suspensão num licor aquoso ou um líquido não aquoso, tal como um xarope, um elixir, uma emulsão, ou uma dose de administração de um trago.

Um comprimido pode ser produzido pela compressão ou moldagem, opcionalmente com um ou mais ingredientes acessórios. Podem ser preparados comprimidos prensados através da compressão numa máquina adequada, com o ingrediente activo numa forma fluida tal como um pó ou grânulos que opcionalmente é misturado com um aglutinante, um desintegrante, um lubrificante, um diluente inerte, um agente tensioactivo, ou um agente de descarga. Os comprimidos moldados compreendidos por uma mistura do composto activo em pó com um veículo adequado podem ser produzidos por moldagem numa máquina adequada.

Um xarope pode ser preparado através da adição de um composto da presente invenção a uma solução aquosa concentrada de um açúcar, por exemplo sacarose, à qual pode ser também adicionado também qualquer ingrediente acessório. Tal ou tais ingredientes acessórios podem incluir, por exemplo, aromatizantes, conservantes adequados, agentes que atrasam a cristalização do açúcar, e agentes para aumentar

a solubilidade de qualquer outro ingrediente, tal como um álcool poli-hidroxiílico, por exemplo glicerol ou sorbitol.

Formulações adequadas para administração parentérica compreendem convenientemente uma preparação aquosa estéril de um composto da presente invenção, que é preferentemente isotónica com o sangue do receptor (por exemplo, uma solução salina fisiológica). Tais formulações podem incluir agentes de suspensão e agentes espessantes ou outros sistemas de micropartículas que são desenhados para dirigir o composto aos componentes do sangue ou para um ou mais órgãos. As formulações podem ser apresentadas em forma de dose unitária ou em forma multi-dose.

Formulações na forma de pulverização nasal compreendem soluções aquosas purificadas de um componente da presente invenção com agentes conservantes e agentes isotónicos. Tais formulações são preferentemente ajustadas a um pH e estado isotónico compatível com as membranas mucosas nasais.

Formulações para administração rectal podem ser apresentadas na forma de um supositório com um veículo adequado tal como manteiga de cacau, gorduras hidrogenadas, ou ácidos gordos carboxílicos hidrogenados.

Formulações oftálmicas são preparadas por um método similar ao da pulverização nasal, excepto que os factores de pH e isotónico são preferentemente ajustados para igualar aquele do olho.

Formulações tópicas compreendem um composto da presente invenção dissolvido ou suspenso num ou mais meios, tais como óleo mineral petróleo, álcoois poli-hidroxicos, ou outras bases utilizadas para formulações farmacêuticas tópicas.

Além dos ingredientes acima mencionados, as formulações desta invenção podem incluir ainda um ou mais ingredientes acessórios seleccionados de diluentes, tampões, agentes aromatizantes, desintegrantes, agentes tensoactivos, espessantes, lubrificantes e conservantes (incluindo antioxidantes).

Deste modo, compostos de acordo com a presente invenção podem ser utilizados para a profilaxia ou para o tratamento do tracto GI incluindo, mas sem limitação a, doença inflamatória do intestino.

A presente invenção será agora descrita com referência aos seguintes exemplos. Deve ser apreciado que estes exemplos têm como objectivo ilustrar aspectos da presente invenção.

## **EXEMPLOS**

### **Exemplo 1- Síntese de um Composto da Presente Invenção**

Os pontos de fusão foram obtidos num equipamento de medição do ponto de fusão pelo método do capilar

Laboratory Devices Mel-Temp II e são apresentados sem correção. Os espectros de  $^1\text{H}$ RMN são obtidos num espectrómetro Varian Unity 600 MHz. Os desvios químicos ( $\delta$ ) são registados em partes por milhão (ppm) em relação ao padrão interno tetrametilsilano. Os espectros no ultravioleta e no visível foram obtidos com um espectrofotómetro Beckman DU 640i. Obteve-se espectroscopia de infravermelhos num equipamento Nicolet Impact 410 e dados de espectrometria de massa por bombardeamento com átomos rápidos (FAB) foram obtidos por M-Scan Inc. Todos os reagentes foram utilizados tal como recebidos da Aldrich Chemical Co.

#### **Síntese de ácido 2-(4-amino-fenil)-propiónico**

Um recipiente de 500 mL de três tubuladuras, seco em estufa, equipado com uma barra de agitação, foi carregado com ácido (R,S) 2-(4-nitrofenil)propiónico (5,00 g, 25,6 mmol), álcool etílico absoluto (200 mL), e paládio (10 % em peso em carbono activado, 0,27 g, 2,56 mmol). Um ambiente de hidrogénio foi introduzido no recipiente e a mistura foi então agitada a uma temperatura ambiente durante 6 horas. A mistura reaccional em bruto foi filtrada através de Celite e o álcool etílico foi removido sob pressão reduzida. O produto em bruto foi seco sob vácuo durante a noite num sólido amarelo claro (rendimento de 70%, 2,98 g): pf 125-129°C,  $^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,24 (3H, s), 1,26 (3H, s), 3,41 (1H, s), 3,43 (2H, s), 6,46 (2H, d,  $J= 7,6$  Hz), 6,91 (2H, d,  $J= 7,6$  Hz); IR (KBr) 2596, 2189,

1630, 1581, 1441, 1375, 1277, 1192, 1052, 876  $\text{cm}^{-1}$ ; FAB-MS (NBA)  $m/z$  165 (M+H)+.

## **Exemplo 2 - Efeitos Biológicos de Compostos da Presente**

### **Invenção**

O objectivo deste estudo foi avaliar a histologia e comparar os efeitos de três ingredientes farmacêuticamente activos diferentes administrados intra-rectalmente (duas vezes por dia durante quatro dias) a ratos de Lewis macho após a administração intra-rectal de ácido dinitrobenzeno sulfónico (DNBS). O DNBS induziu a colite em ratos de acordo com um modelo experimental estabelecido (Richard et al., 2000; Bertran et al., 1996; Blau et al., 2000; Kimura et al., 1998; Hogaboam et al., 1996). Os grupos SHAM e DNBS serviram, respectivamente, como controlos negativo e positivo. A distribuição dos animais a cada grupo é apresentada na Tabela 1:

**Tabela 1**

<b>GRUPO</b>	<b>NÚMERO DE ANIMAIS</b>
SHA	6
M	
DNBS	5
5-ASA	6
4-APAA	6
Mistura de 5-ASA e 4-APAA	4

## **Materiais e Métodos**

Espécimenes em bom estado de cólon de 27 ratos macho foram testados, incluindo microtomia, e coloração pela hematoxilina e eosina. As 27 lâminas resultantes (1 secção transversal por lâmina) foram examinadas por microscopia. Excepto para um rato do grupo SHAM e um rato do grupo DNBS, todas as lâminas tinham as suas etiquetas tapadas para facilitar a leitura com ocultação. As lesões foram classificadas numa escala de 1-5 (1 = mínima; 2 = ligeira; 3 = moderada; 4 = moderadamente grave; 5 = grave).

## **Resultados**

A principal alteração histomorfológica observada nas secções do cólon de todos os ratos tratados com DNBS (independentemente de qualquer tratamento adicional) foi uma necrose de coagulação em todo o comprimento e toda ou parte da espessura. A necrose não foi observada nos ratos tratados com solução salina/metilcelulose (grupo SHAM). Em todos os casos, as áreas necróticas foram caracterizadas por uma acentuada perda de detalhe celular e afinidade da coloração; apenas em tais áreas, permaneceram traçados "fantasma" da arquitectura do cólon. Ocasionalmente, foi evidente o colapso segmentar ou de uma camada do tecido intestinal. Os tecidos necróticos foram pesadamente invadidos por diversos tipos de bactérias. Em secções que não eram completamente necróticas, o padrão da necrose

tendeu a ser laminar, afectando tipicamente a mucosa e a submucosa enquanto foram poupadas porções da muscularis externa e/ou adventícia (serosa e mesentérico adjacente). Nestas secções, uma densa zona de neutrófilos cariorréticos dividiu as camadas internas necróticas das camadas externas menos afectadas. Observou-se a vasculite necrosante fibrinóide de vasos sanguíneos da submucosa em todos os ratos tratados com DNBS. Observou-se a vasculite tanto em regiões necróticas como não necróticas, frequentemente acompanhada por trombose (fibrinosa, fibrinocelular, e/ou trombos bacterianos), e hemorragia submucosal mínima a moderada (com ou sem acumulação de fibrina). Alguns locais hemorrágicos continham macrófagos carregados de pigmentos (siderófagos - não diagnosticados separadamente). Em todas as secções dos ratos tratados por DNBS, a serosa e o mesentérico adjacente foram expandidos por proliferação fibrovascular ligeira a moderadamente grave (tecido de granulação jovem). As secções de dois ratos (#4 e #11, grupo da mistura de 5-ASA e 4-APAA), cada uma contendo um único, curto e vincadamente demarcado segmento de mucosa não necrótica, não ulcerosa. Alterações nestes segmentos das mucosas comparativamente não afectados eram limitadas a hiperplasia epitelial mínima a ligeira das criptas, dilatação mínima das criptas, e mínima infiltração neutrofílica.

A classificação da gravidade da necrose do cólon foi baseada no grau do envolvimento do tecido; no entanto, o grau 5 (grave) foi reservado para lesões nas quais a

necrose resultava em extensa perda tecidual. Dado que o padrão da necrose variava frequentemente de secção para secção, as camadas intestinais individuais foram classificadas separadamente. Geralmente, as classificações médias de gravidade para a necrose foram comparáveis entre os quatro grupos de ratos tratados com DNBS (Tabela 2). A classificação média para a necrose mucosal no grupo de mistura de 5-ASA e 4-APAA foi inferior que as classificações nos outros grupos de ratos tratados com DNBS devido às áreas poupadas da mucosa nos dois animais do grupo de mistura de 5-ASA e 4-APAA.

**Tabela 2: Classificação Média da Necrose Tecidual**

<b>Grupo</b>	<b>SHAM</b>	<b>DNBS</b>	<b>5-ASA</b>	<b>4-APAA</b>	<b>Mistura 5-ASA &amp; 4-APAA</b>
No. Animais	(6)	(5)	(6)	(6)	(4)
Mucosa	0,00	4,20	4,50	4,33	3,50
Submucosa	0,00	4,20	4,17	4,00	4,25
Muscularis	0,00	3,60	3,5	3,17	3,00
Adventícia	0,00	1,40	1,67	1,67	1,50

### **Resumo**

A principal alteração histomorfológica observada nas secções do cólon de todos os ratos tratados com DNBS (independentemente de qualquer tratamento adicional) foi uma necrose de coagulação em todo o comprimento e toda ou parte da espessura. Alterações associadas incluíram uma invasão bacteriana maciça do tecido necrótico, vasculite



necrosante fibrinóide com trombose e hemorragia, e uma significativa infiltração neutrofílica. A necrose não foi observada nos ratos tratados com solução salina/metilcelulose (grupo SHAM). A gravidade (extensão) da necrose foi comparável entre os outros quatro grupos de ratos tratados com DNBS (DNBS, 5-ASA, 4-APAA, e mistura de 5-ASA e 4-APAA), excepto que segmentos únicos de mucosa eram comparativamente poupados em 2/4 ratos do grupo da mistura de 5-ASA e 4-APAA.

### **Exemplo 3 - Actividade Anti-inflamatória da Mistura de Fármacos**

Induziu-se colite (sem anestesia com éter) com ácido dinitrobenzeno sulfónico (DNBS) em 4 grupos de 6 ratos Lewis cada. Um grupo DNBS foi doseado com veículo (metil celulose a 0,7%) assim como um grupo teste fictício de 6 animais que receberam um clister salino em vez de DNBS. A dosagem inter-rectal (ir) foi levada a cabo em animais conscientes duas vezes ao dia durante 4 dias. Os tratamentos com fármacos foram como se segue:

ácido 5-aminossalicílico (5-ASA): 50 mg/kg

ácido 4-aminofenilacético (4-APAA): 49,5 mg/kg

(equimolar a 5-ASA)

Mistura: 5-ASA + 4-APAA: 50 mg/kg + 49,5 mg/kg

Os fármacos foram suspensos no veículo acima mencionado e o pessoal técnico mantido em desconhecimento relativamente aos grupos de fármacos. Foram registados

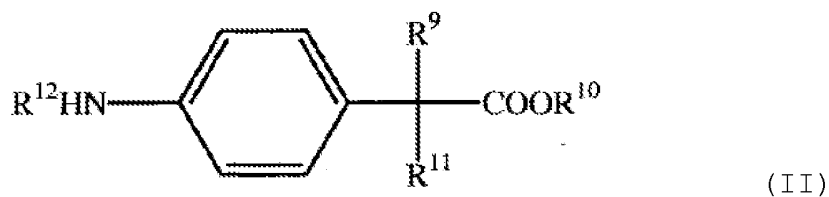
diariamente os pesos e os teores de diarreia. No 5º dia pós-irritação os ratos foram sacrificados, realizaram-se laparotomias e classificaram-se as adesões e as estenoses intestinais; realizaram-se colectomias e registou-se o peso do cólon, os cólones foram abertos longitudinalmente e classificadas as inflamações/ulcerações.

Os resultados indicaram que 5-ASA, 4-APAA, e a mistura produzem uma actividade anti-inflamatória similar (~31 % de redução na razão cólon:peso corporal [%PC]). A gravidade da inflamação aproximou-se da máxima. É possível que a gravidade pudesse ser titulada por redução da dose de DNBS e realizou-se um pequeno estudo para testar esta hipótese. É possível que com uma ligeira agressão possa se evidenciar uma maior separação dos efeitos do tratamento.

A colite por DNBS foi induzida em 6 ratos de Lewis (3 a 30 e 3 a 15 mg/rato DNBS) e permitiu-se o desenvolvimento durante 5 dias sem tratamento de modo a determinar a gravidade da inflamação. A diarreia foi anotada nos dias 1-4 e os ratos foram sacrificados no dia 5, classificados, e determinou-se a razão peso cólon:corpo. Os resultados indicam que 15 mg/rato DNBS produz uma inflamação mais suave mas inconsistente em comparação com 30 mg. O resultado de 30 mg/kg DNBS foi consistente com as observações anteriores.

**REIVINDICAÇÕES**

1. Uma composição farmacêutica activa consistindo num composto de Fórmula II:



em que  $R^9$ ,  $R^{10}$  e  $R^{11}$  são independentemente seleccionados de hidrogénio e alquilo  $C_1$  a  $C_4$ ; e

$R^{12}$  é seleccionado de hidrogénio e  $-C(O)R^{13}$ , em que  $R^{13}$  é alquilo  $C_1$  a  $C_6$  ou um grupo arilo;

ou um éster ou um sal farmacêuticamente aceitável de tal composto, em mistura com adição de um diluente ou veículo farmacêutico,

numa quantidade suficiente para utilização no tratamento de um estado inflamatório do tracto gastrointestinal num indivíduo que necessite de tal tratamento.

2. A composição farmacêutica activa de acordo com a Reivindicação 1, em que  $R^9$ ,  $R^{10}$  e  $R^{11}$  são independentemente seleccionados de H,  $CH_3$ ,  $CH_2CH_3$ , e  $CH(CH_3)_2$ .

3. A composição farmacêutica activa de acordo com a Reivindicação 1 ou 2, em que  $R^9$ ,  $R^{10}$  e  $R^{11}$  são independentemente seleccionados de H e  $CH_3$ .

4. A composição farmacêutica activa de acordo com a Reivindicação 1, 2 ou 3, em que  $R^{12}$  é hidrogénio.

5. A composição farmacêutica activa de acordo com uma das Reivindicações 1 a 4, em que o composto de Fórmula II é ácido 4-aminofenilacético.

6. Uma composição farmacêutica activa consistindo em (a) ácido 4-aminofenilacético e/ou seus ésteres de sais farmacêuticamente aceitáveis e (b) ácido 5-aminossalicílico e/ou ésteres ou seus sais farmacêuticamente aceitáveis numa quantidade suficiente para utilização no tratamento de um estado inflamatório do tracto gastrointestinal num indivíduo que necessite de tal tratamento.

7. A composição farmacêutica activa de acordo com a Reivindicação 6, em que o ácido 4-aminofenilacético é de desde cerca de 10 a 90 por cento em peso da referida composição farmacêutica activa.

8. A composição farmacêutica activa de acordo com a Reivindicação 6, em que a razão molar do ácido 4-aminofenilacético do ácido 5-aminossalicílico é entre cerca de 1:10 e 10:1.

9. A composição farmacêutica activa de acordo com qualquer Reivindicação anterior, em que o estado inflamatório do tracto gastrointestinal é colite ulcerosa.

10. A composição farmacêutica activa de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 8, em que o estado inflamatório do tracto gastrointestinal é a doença de Crohn.

11. A composição farmacêutica activa de acordo com qualquer Reivindicação anterior, em que o referido ingrediente farmacêutico é administrado oralmente a um indivíduo numa quantidade eficaz.

12. A composição farmacêutica activa de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 10, em que o referido ingrediente farmacêutico é administrado rectalmente a um indivíduo numa quantidade eficaz.

13. A utilização da composição farmacêutica activa de acordo com qualquer Reivindicação anterior no fabrico de um medicamento para utilização no tratamento de um estado inflamatório do tracto gastrointestinal num indivíduo que necessite de tal tratamento.

Lisboa, 11 de Dezembro de 2009

**REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

*Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.*

**Documentos de patentes citadas na Descrição**

- US 80238683 B
- WO 9531194 A
- US 4412982 A