

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

(22) Data de pedido: <b>1998.08.18</b>	(73) Titular(es): <b>WARNER-LAMBERT COMPANY LLC</b> <b>235 EAST 42ND STREET NY 10017</b> <b>THE BOARD OF REGENTS FOR THE</b> <b>UNIVERSITY OF OKLAHOMA</b>	<b>US</b> <b>US</b>
(30) Prioridade(s): <b>1997.08.20 US 56753 P</b> <b>1998.02.16 US 74794 P</b> <b>1998.04.24 US 82936 P</b>		
(43) Data de publicação do pedido: <b>2000.06.21</b>	(72) Inventor(es): <b>MICHAEL FRANCIS RAFFERTY</b> <b>MARIA CHOVET</b> <b>LIONEL BUENO</b> <b>ANTONIO GUGLIETTA</b> <b>CHARLES PRICE TAYLOR</b>	<b>US</b> <b>FR</b> <b>FR</b> <b>US</b> <b>US</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2010.03.24</b> <b>098/2010</b>	(74) Mandatário: <b>MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA</b> <b>AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA</b>	<b>PT</b>

(54) Epígrafe: **ANÁLOGOS DO GABA PARA PREVENIR E TRATAR LESÕES GASTROINTESTINAIS**

(57) Resumo:

**RESUMO****"ANÁLOGOS DO GABA PARA PREVENIR E TRATAR LESÕES  
GASTROINTESTINAIS"**

Os análogos do GABA são úteis para prevenir e tratar lesões gastrointestinais e a síndrome da abstinência do etanol. Os tratamentos preferidos empregam gabapentina ou pregabalina.

## **DESCRIÇÃO**

### **"ANÁLOGOS DO GABA PARA PREVENIR E TRATAR LESÕES GASTROINTESTINAIS"**

#### **ÂMBITO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se à utilização de um análogo do ácido gama-aminobutírico (GABA) para prevenir lesões viscerais e gastrointestinais, tal como úlceras gástricas por meio de administração e tratar doenças gastrointestinais, tais como doenças inflamatórias do intestino (inflammatory bowel disorders - IBD), doenças funcionais do intestino (functional bowel disorders - FBD), incluindo dispepsia e outras dores viscerais.

#### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

Os medicamentos anti-inflamatórios não-esteróides (NSAIDs) são os medicamentos prescritos com mais frequência para o tratamento da dor associada à osteoartrite e muitas outras perturbações musculoesqueléticas e inflamatórias. Nos Estados Unidos, cerca de 100 milhões de receitas são passadas a cada ano para proporcionar alívio efectivo da dor e para o tratamento de doenças inflamatórias. Os NSAIDs vulgarmente utilizados incluem sulindac, naproxeno, indometacina, ácido mefenâmico, diclofenac, fenoprofeno e diflunisal.

No entanto, existe evidência considerável que indicam que os NSAIDs têm efeitos secundários tóxicos frequentes,

graves e pesados para o tracto gastrointestinal. Estes incluem dispepsia ligeira, gastrite, úlcera péptica, bem como complicações gastrointestinais mais graves, tais como hemorragias e perfurações, por vezes conduzindo a morbidez significativa e, em menor grau, à mortalidade. Complicações GI graves devido à utilização de NSAIDs representam a maior ameaça à vida em doentes com doenças do tecido conjuntivo, apenas ultrapassada pela doença primária e respectivas complicações. Lesões gastrointestinais semelhantes são causadas pela ingestão de álcool. De facto, um estado conhecido pelo síndrome da abstinência do etanol é vulgarmente encontrado quando se termina um consumo prolongado do etanol. Para além das lesões gastrointestinais, este síndrome provoca frequentemente tremores, ansiedade, convulsões, alucinações e confusão.

Outras perturbações gastrointestinais frequentemente encontradas incluem doenças inflamatórias do intestino (inflammatory bowel disorders - IBD) e doenças funcionais do intestino (functional bowel disorders - FBD), incluindo dispepsia. Estas perturbações gastrointestinais incluem uma vasta gama de estados da doença que actualmente são apenas moderadamente controlados, incluindo a doença de Crohn, ileíte, síndrome inflamatório do intestino, dispepsia e refluxo gastroesofágico devido a FBD e outras formas de dor visceral.

O ácido gama-aminobutírico demonstrou activar os nervos aferentes gástricos que, por seu lado, demonstraram participar nos mecanismos de defesa gástricos. Descobrimos agora que os análogos do GABA reduzem dramaticamente as lesões gastrointestinais provocadas por medicamentos e álcool. Os análogos GABA tratam também os estados

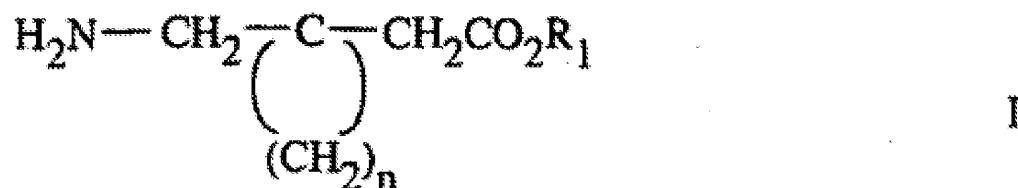
resultantes do síndrome de abstinência do etanol e perturbações GI caracterizadas como IBD e IBS.

Tudo o que é necessário para prevenir lesões gastrointestinais e tratar IBD, IBS e alcoolismo, de acordo com a presente invenção consiste em administrar a um sujeito necessitado de tratamento uma quantidade eficaz de um análogo do GABA.

São conhecidos vários análogos do GABA. Gabapentina, um análogo cíclico do GABA, encontra-se agora comercialmente disponível e é extensivamente utilizado clinicamente para o tratamento da epilepsia e dor neuropática. Estes compostos estão descritos na patente norte-americana 4.024.175. Outras séries de análogos do GABA que são agentes anti-epilépticos está descrita na patente norte-americana 5563.175.

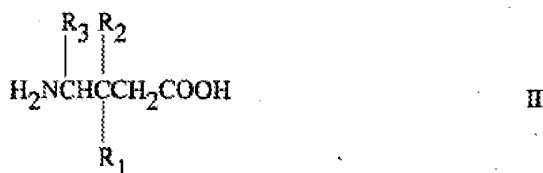
#### RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona a utilização de um análogo do GABA da fórmula I ou fórmula II para o fabrico de produtos farmacêuticos destinados à prevenção e tratamento de lesões e distúrbios gastrointestinais, desde que, quando o análogo do GABA for ácido 4-amino-3-fenilbutanóico, a utilização não se destina ao fabrico de produtos farmacêuticos para a inibição do relaxamento transitório do esfíncter esofágico inferior. Uma forma de realização preferida utiliza um composto cíclico aminoácido da fórmula I



em que  $\text{R}_1$  é hidrogénio ou um alquilo de cadeia curta e  $n$  é um número inteiro entre 4 e 6 e respectivos sais farmaceuticamente aceitáveis. Uma forma de realização especialmente preferida utiliza um composto da fórmula I em que  $\text{R}_1$  é hidrogénio e  $n$  é 5, composto esse que é ácido 1-(aminometil)ciclo-hexanoacético, conhecido genericamente por gabapentina. Outros análogos do GABA preferidos têm a fórmula I, em que o anel cíclico é substituído, por exemplo por um alquilo tal como metilo ou etilo. Compostos típicos incluem ácido 1-(aminometil-3-metilciclo-hexil)acético, ácido 1-(aminometil-3-metilciclopentil)acético e ácido 1-(aminometil-3,4-dimetilciclopentil)acético.

Noutra forma de realização, o método da invenção utiliza um análogo do GABA da fórmula II



ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, em que

$\text{R}_1$  é um alquilo de cadeia linear ou ramificada, com 1 a 6 átomos de carbono, fenilo ou cicloalquilo com 3 a 6 átomos de carbono;

$\text{R}_2$  é hidrogénio ou metilo e

$\text{R}_3$  é hidrogénio, metilo ou carboxilo.

Podem ser utilizados na invenção diastereómeros e enantiómeros dos compostos da fórmula II.

Um especialmente preferido da invenção emprega um composto da fórmula II em que  $R_2$  e  $R_3$  são ambos hidrogénio e  $R_1$  é  $-(CH_2)_{0-2}-/C_4H_9$  sob a forma de um isómero (R), (S) ou (R, S).

Uma forma de realização mais preferida da invenção utiliza ácido 3-aminometil-5-metil-hexanóico e especialmente ácido (S)3-(aminometil)-5-metil-hexanóico, conhecido agora genericamente por pregabalina, bem como CI-1008. Outro composto preferido é ácido 3-(1-aminometil)-5-metil-hexanóico-

A invenção apresenta ainda uma composição constituída por uma quantidade anti-inflamatória de um NSAID e uma quantidade citoprotectora de um análogo do GABA.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Como anteriormente indicado, o método da presente invenção utiliza um análogo GABA. Um análogo GABA é qualquer composto derivado de ou baseado no ácido gama-aminobutírico. Os compostos estão disponíveis tanto comercialmente como por metodologia de síntese bem conhecida dos especialistas na técnica da química orgânica. Os análogos GABA preferidos que serão utilizados no método da presente invenção são aminoácidos cíclicos da fórmula I. Estes encontram-se descritos na patente norte-americana 4.024.175, aqui incorporada por referência. Outro método preferido utiliza os análogos do GABA da fórmula II e estes

encontram-se descritos na patente norte-americana 5.563.175, aqui incorporada por referência.

O análogo GABA é administrado numa quantidade que é eficaz na prevenção ou tratamento de lesões e perturbações gastrointestinais, isto é no combate dos efeitos de um NSAID ou álcool ou no controlo de IBD e IBS. A invenção inclui a utilização de um análogo do GABA da fórmula I ou fórmula II para a produção de produtos farmacêuticos destinados ao tratamento do síndrome de abstinência do etanol e alcoolismo em geral. A quantidade eficaz de análogo do GABA que será utilizada será geralmente entre cerca de 1 a cerca de 300 mg por kg de peso corporal do sujeito. As doses típicas situam-se entre cerca de 10 a cerca de 5.000 mg por dia para um adulto de peso normal.

Os estados de "lesão gastrointestinal" típicos provocados pelo NSAID incluem dispepsia, gastrite, úlcera péptica, bem como hemorragia e perfuração gastrointestinal inferior. Outros efeitos do síndrome da abstinência do etanol incluem tremores, ansiedade e convulsões. Estados típicos IBD incluem ileíte, colite ulcerosa e doença de Crohn.

As composições farmacêuticas do composto da presente invenção ou respectivos sais são produzidos por formulação do composto activo em formas de dosagem unitárias com um veículo farmacêutico. Alguns exemplos de formas de dosagem unitárias são comprimidos, cápsulas, pílulas, pós, soluções aquosas e não aquosas orais e suspensões e soluções parentéricas embaladas em recipientes contendo uma ou um grande número de unidades e com possibilidade de ser subdivididas em doses individuais. Alguns exemplos de



veículos farmacêuticos adequados, incluindo diluentes farmacêuticos, são cápsulas de gelatina, açúcares, tal como lactose e sucrose, amidos como amido de milho e amido de batata, derivados de celulose como carboximetilcelulose de sódio, etilcelulose, metilcelulose e acetatoftalato de celulose; gelatina, talco, ácido esteárico, estearato de magnésio, óleos vegetais como o óleo de amendoim, óleo de semente de algodão, óleo de sésamo, azeite, óleo de milho e óleo de teobroma, propilenoglicol, glicerina, sorbitol, polietilenoglicol, água, agar, ácido algínico, soro fisiológico isotónico e soluções tampão de fosfato, bem como outras substâncias compatíveis normalmente utilizadas em formulações farmacêuticas. As composições da invenção podem ainda conter outros componentes, tal como agentes colorantes, agentes aromatizantes e/ou conservantes. Estes materiais, se estiverem presentes, são normalmente utilizados em quantidades relativamente pequenas. As composições podem, se desejado, conter ainda outros agentes terapêuticos. Para utilização no combate dos efeitos gastrointestinais dos NSAIDs, os análogos do GABA podem ser administrados isoladamente, em forma de unidoses ou em combinação com o NSAID utilizado para o doente específico.

A percentagem de ingrediente activo nas composições anteriores pode variar dentro de amplos limites, mas para fins práticos encontra-se preferivelmente presente numa concentração de pelo menos 10% numa composição sólida e pelo menos 2% numa composição líquida principal. As composições mais satisfatórias são aquelas com uma proporção muito maior do ingrediente activo, por exemplo entre 10% e 90% em peso.

As vias de administração do composto objecto ou respectivos sais são a via oral ou parentérica. Por exemplo, uma dose intravenosa útil situa-se entre 5 e 50 mg e uma dose oral útil situa-se entre 20 e 800 mg. A dosagem encontra-se dentro dos limites de dosagem utilizados no tratamento de doenças gastrointestinais, tal como úlceras e IBS ou conforme for ditado pelas necessidades do doente, conforme prescrito pelo médico.

Uma forma de dosagem unitária do análogo do GABA para ser utilizada na presente invenção pode ainda incluir outros compostos úteis na terapia de doenças gastrointestinais.

As vantagens da utilização dos compostos da fórmula I e II, em especial gabapentina e pregabalina, na presente invenção, incluem a natureza relativamente não tóxica dos compostos, a facilidade de preparação, o facto de os compostos serem bem tolerados e a facilidade de administração IV e oral dos medicamentos. Além disso, os medicamentos não são metabolizados no corpo numa grande escala.

Os indivíduos utilizados neste contexto são mamíferos, incluindo seres humanos.

A invenção apresenta também uma composição compreendendo um NSAID (medicamento anti-inflamatório não-esteróide) em conjunto com o análogo GABA. O NSAID encontra-se presente numa quantidade anti-inflamatória, de preferência pouco menos do normalmente utilizado e o análogo do GABA encontra-se presente numa quantidade citoprotectora, nomeadamente numa quantidade que será eficaz na prevenção ou redução das lesões gastrointestinais

provocadas caso contrário pelo NSAID. Em geral, o NSAID estará presente para doses de cerca de 10 a cerca de 500 mg e o análogo do GABA estará presente a cerca de 1 e cerca de 1.500 mg. Qualquer NSAID pode ser combinado com qualquer análogo do GABA de acordo com a presente invenção. Os análogos do GABA empregues preferidos são os compostos das fórmulas I e II, em especial gabapentina e pregabalina. Os NSAIDs preferidos empregues incluem sulindac, naproxeno, indometacina, ácido mefenâmico, diclofenac, fenoprofeno e diflunisal, etodolac, ibuprofeno, piroxicam, ácido acetilsalicílico, oxaprozin e bromfenac. A maioria dos NSAIDs empregues encontram-se comercialmente disponíveis, geralmente sob a forma de sais tal como sais de cálcio, sódio ou potássio, por exemplo cálcio de fensprofen e sódio de bromfenac. As combinações especialmente preferidas incluem pregabalina ou gabapentina, em conjunto com sódio de naproxeno ou de ibuprofeno. As composições podem conter excipientes farmacêuticos comuns, tal como os anteriormente descritos.

A capacidade dos análogos de GABA para tratar doenças gastrointestinais de acordo com a invenção ficou estabelecida em vários modelos de lesões gástricas induzidas e alcoolismo em animais.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1 mostra o efeito da gabapentina nas lesões gástricas provocadas por indometacina.

A figura 2 mostra o efeito da gabapentina nas respostas de manipulação na sequência da abstinência no âmbito do tratamento da dependência crónica do etanol.

A figura 3 mostra o efeito da gabapentina nas memória e torpor em animais a receber tratamento da dependência crónica do etanol.

A figura 4 mostra o efeito da gabapentina CI-1008 (pregabalina) e morfina na alodinia do cólon.

A figura 5 mostra o efeito da gabapentina e CI-1008 na dor limiar localizada no cólon em ratos.

#### EXEMPLO 1

Procedeu-se à avaliação da gabapentina em animais para determinar a sua capacidade em prevenir lesões gástricas que de contrário seriam provocadas pela indometacina.

Ratos Sprague-Dawley machos, com peso entre 240 e 250 g, foram postos em jejum durante 24 horas, tendo-se permitido livre acesso à água antes da experiência. Todos os medicamentos em ensaio foram administrados intragastricamente. Os ratos receberam um tratamento preliminar com doses diferentes de gabapentina a doses entre 40 e 60 mg. Trinta minutos depois administrou-se a indometacina (25 mg/kg).

Outros grupo de ratos recebeu 10 mg de gabapentina por duas vezes, com intervalo de 3 horas, seguido de administração da indometacina. Passadas três horas do tratamento com indometacina, os ratos foram abatidos e as lesões gástricas foram avaliadas. A gravidade das lesões foi determinada pela medição da área quadrada (mm<sup>2</sup>) de lesões visíveis.

#### Resultados

1. Indometacina provocou graves lesões hemorrágicas gástricas, as áreas lesionadas medidas eram  $42,6 \pm 5,2 \text{ mm}^2$  (média, erro padrão da média).

2. Tratamento preliminar com gabapentina reduziu significativamente a lesão gástrica induzida por indometacina. Mediu-se a lesão gástrica a doses diferentes de tratamento preliminar com gabapentina, após tratamento com indometacina:  $22,3 \pm 2,8 \text{ mm}^2$  com 40 mg,  $16,5 \pm 2,2 \text{ mm}^2$  com 60 mg/kg, e  $4,2 \pm 0,39 \text{ mm}^2$  com 10 mg duas vezes.

3. O tratamento preliminar com gabapentina reduziu também de forma drástica a hemorragia gástrica.

Os dados apresentados anteriormente encontra-se na figura 1, na qual a primeira barra é o controlo (animais tratados só com indometacina); barra 2 é para animais tratados com uma dose de 40 mg de gabapentina; barra 3 é para animais que receberam uma vez 60 mg de gabapentina e barra 4 é para animais que receberam duas vezes 10 mg de gabapentina.

#### EXEMPLO 2

Para determinar os efeitos da gabapentina em lesões gástricas induzidas pelo etanol, os ratos receberam um tratamento preliminar de 1 mL de etanol aq. 70% (v/v), seguido de gabapentina a uma dose de 40 a 60 mg, respectivamente. Outros grupo de ratos recebeu um tratamento preliminar de 20 mg de gabapentina por duas vezes, com intervalo de 3 horas, seguido de administração de etanol. Passadas trinta minutos, todos os ratos foram abatidos e as lesões gástricas foram avaliadas.

#### Resultados

1. Lesão gástrica significativa induzida pelo etanol a setenta por cento. A área lesionada media  $41,9 \pm 3,7 \text{ mm}^2$ .

2. Tratamento preliminar com gabapentina reduziu significativamente a lesão gástrica induzida por etanol. Com tratamento preliminar constituído por 2 doses de 20 mg de gabapentina, a área lesionada media  $2,1 \pm 0,3 \text{ mm}^2$ .

Com tratamento preliminar constituído por 40 a 60 mg de gabapentina, a área lesionada media  $24,4 \pm 3,5 \text{ mm}^2$  e  $18,7 \pm 2,2 \text{ mm}^2$  respectivamente.

### EXEMPLO 3

O ensaio seguinte em ratos foi executado para estabelecer mais aprofundadamente a capacidade da gabapentina e da pregabalina em reduzir as lesões gastrointestinais provocadas por NSAIDs.

Animais: Ratos CD-Sprague-Dawley machos (132-202 g) foram acolhidos e abrigados numa sala com temperatura, humidade controladas e um ciclo luz/escuridão de 12 horas. Após um período de aclimação de 4 a 5 dias e após i, período de jejum de 24 horas, os animais foram usados no estudo descrito seguidamente.

Administração de análogos do GAB e indometacina: Gabapentina e pregabalina (CI-1008) foram dissolvidos em água e administrados oralmente nas seguintes doses: 1, 10, 100, 1 e 200 mg/kg num volume de 1 mL. Os animais de controlo receberam doses com volume igual de veículo (1 mL de água). Passados sessenta minutos, todos os animais receberam 1 mL de uma solução de indometacina dissolvida em  $\text{NaHCO}_3$  aquoso a 5% (80 mg/kg). Os animais de controlo

receberam 1 mL de  $\text{NaHCO}_3$  aquoso a 5 % por via oral. Os grupos experimentais foram os seguintes:

Grupo	Tratamento preliminar	Agente agressivo
Grupo 1	Água	Nenhum ( $\text{NaHCO}_3$ )
Grupo 2	Água	Indometacina 80 mg/kg
Grupo 3	Gabapentina 1 mg/kg	Indometacina 80 mg/kg
Grupo 4	Gabapentina 10 mg/kg	Indometacina 80 mg/kg
Grupo 5	Gabapentina 100 mg/kg	Indometacina 80 mg/kg
Grupo 6	Gabapentina 200 mg/kg	Indometacina 80 mg/kg
Grupo 7	Pregabalina 1 mg/kg	Indometacina 80 mg/kg
Grupo 8	Pregabalina 10 mg/kg	Indometacina 80 mg/kg
Grupo 9	Pregabalina 100 mg/kg	Indometacina 80 mg/kg
Grupo 10	Pregabalina 200 mg/kg	Indometacina 80 mg/kg

Avaliação do efeito:

As lesões gástricas provocadas por indometacina estão associadas à inibição do produto da ciclooxigenase, prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>). Os animais foram sacrificados por decapitação 4 horas após a administração de indometacina. O estômago foi removido e aberto ao longo da curvatura maior e a sua imagem foi digitalizada e guardada em disco óptico, utilizando um computador PC 486 equipado com sistema CUE3, software de análise imagiológica (Olympus Corp., Marietta, Georgia, USA). Foram colhidas duas biopsias de 6 mm de uma região constante da mucosa gástrica, localizada de cada lado da porção glandular do estômago e respectivo conteúdo PGE<sub>2</sub> foi medido utilizando um conjunto ELISA disponível no comércio (Assay Designs Inc., Ann Arbor, Michigan, USA). A presença de lesões gástricas foi determinada utilizando a imagem electrónica guardada e a extensão das lesões foi medida utilizando o software imagiológico CUE3. Os dados são expressos em percentagem da área gástrica lesionada e teor de PGE<sub>2</sub> (pg/mL). Os dados são apresentados no quadro 1, abaixo.

QUADRO 1

Composto	Dose do medicamento	N	% de área lesionada	Síntese de PGE <sub>2</sub> (pg/ml)
Controlo	ND	10	0,00 ± 0,00*	9525,27 ± 156,00*
Indometacina + Veículo	ND	9	5.56 ± 0,48	1908.03 ± 72.31
Indometacina	1 mg/kg	5	2.99 ±	1783.66 ±



+ Gabapentina			0.46	73.47
Indometacina + Gabapentina	10 mg/kg	9	3.96 ± 0.35	3065.78 ± 37.19
Indometacina + Gabapentina	100 mg/kg	10	1.87 ± 0.1	2997.90 ± 226.80
Indometacina + Gabapentina	200 mg/kg	5	1.43 ± 0.40	2615.74 ± 165.36
Indometacina + CI-1008	1 mg/kg	4	8.07 ± 2.19	1209.95 ± 105.50
Indometacina + CI-1008	10 mg/kg	10	4.07 ± 0.42	2666.16 ± 307.45
Indometacina + CI-1008	100 mg/kg	10	1,99 ± 0,25*	3994.45 ± 318.95
Indometacina + CI-1008	200 mg/kg	5	0.34 ± 0.06*	3288.92 ± 407.43

Os valores são erro padrão médio.

\* p <0,05 com base na análise unidireccional Kruskal-Wallis da variância, seguido do ensaio de Dunn e comparado com o grupo indometacina.

Tanto a gabapentina como CI-1008 provocaram uma redução da quantidade de lesões gástricas induzidas pela

indometacina, o que, no caso de CI-1008, atingiu significado estatístico com as doses de 100 e 200 mg/kg.

As lesões gástricas provocadas por indometacina previstas estão associadas a uma significativa inibição do produto da ciclooxigenase  $PGE_2$ . Nem a gabapentina, nem CI-1008, qualquer que fosse a dose de ensaio, foram capazes de modificar significativamente este efeito. Estes dados sugerem que a redução significativa das lesões gástricas induzidas por indometacina provocada por CI-1008 não está relacionada com efeito deste análogo do GABA na enzima ciclooxigenase.

Os dados precedentes estabelecem que os análogos do GABA, tal como gabapentina e pregabalina são eficazes na prevenção de lesões gastrointestinais, tais como lesões gástricas, úlceras pépticas e hemorragias gastrointestinais ainda menores que de contrário seriam provocadas pelo consumo de álcool ou NSAIDs. Os análogos GABA tratam também os efeitos da abstinência do álcool, que é uma síndrome caracterizada por tremores, alucinações e confusão e perturbações gastrointestinais gerais, tal como IBD e IBS.

Os ensaios seguintes estabelecem que os análogos do GABA são úteis no tratamento da síndrome da abstinência do etanol.

#### EXEMPLO 4

Ratinhos albinos machos da estirpe não consanguínea T0 (Bantin e Kingman, Reino Unido) foram utilizados em todos os estudos. O peso variou entre 25 e 35 g, com uma variação nunca superior a 5 g em cada uma das experiências. Os ratinhos foram acolhidos, oito por gaiola, a  $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com  $55 \pm 10\%$  de humidade relativa e um ciclo luz/escurecimento

de 12 horas, situando-se a fase de luz entre as 09:00 e as 21:00. Todos os ratinhos receberam acesso *ad libitum* a água canalizada e ração normalizada de laboratório (RM-1, Special Diet Services, Reino Unido) até à sua utilização nas experiências ou até a sua dieta ser substituída por uma dieta de líquidos.

#### Indução da dependência física

Foi administrado etanol num programa de dieta de líquidos. Todos os ratinhos receberam dieta de controlo durante um período inicial de 2 dias. Os ratinhos tratados com etanol receberam então uma dieta contendo 3,5% (v/v) de etanol/água durante 2 dias, seguida de uma dieta contendo 7% de etanol durante mais 5 dias. A ingestão média foi de 22 a 30 g/kg/dia. Os grupos de controlo foram *pair-fed* com uma dieta de controlo, equilibrada do ponto de vista isocalórico para corresponder à dieta contendo etanol. Não houve diferenças nos pesos dos ratinhos de controlo tratados com etanol e ratinhos de controlo ao fim dos períodos de tratamento. Quando foi retirado o etanol aos ratinhos (entre 07:00 e 09:00 AM) estes receberam água canalizada até serem utilizados nas experiências.

#### Tratamento medicamentoso

A gabapentina foi dissolvida em soro fisiológico, sendo a solução preparada de fresco a cada dia do ensaio. Foram administradas injeções intraperitoneais (i.p.) de gabapentina 10 mL/kg ou soro fisiológico imediatamente após a retirada do tratamento com etanol nos estudos sobre as respostas de manipulação e 2 horas antes da medição das crises audiogénicas. Nas experiências utilizando um labirinto elevado em cruz padrão, injectou-se a gabapentina

ou soro fisiológico i.p. 8 horas depois da remoção da dieta de etanol e os ratinhos foram colocados no labirinto em cruz 60 minutos após as injeções. Nos estudos sobre coordenação motora (ataxia) e actividade locomotora, a gabapentina ou soro fisiológico foram injectados em ratinhos alimentados com ração virgens ao etanol imediatamente antes do ensaio.

As medições foram realizadas durante 60 minutos para o estudo da ataxia e durante 30 minutos no caso da actividade locomotora.

#### Medição do comportamento induzido por manipulação

Na sequência da retirada do tratamento com etanol às 09:00 AM, foram avaliadas classificações de comportamento induzido por manipulação com o mesmo experimentador, no mesmo ratinho a cada hora durante um período de 12 horas após retirada do etanol.

As classificações numéricas têm as definições indicadas no quadro 2.

#### QUADRO 2

##### Classificações comportamentais durante manipulação suave

- 
- 1 Tremor ligeiro quando apanhado e virado
  - 2 Tremor contínuo grave quando apanhado e virado
  - 3 Espasmo extensor clónico do membro anterior quando apanhado
  - 4 Espasmo extensor clónico do membro anterior quando apanhado que prosseguiu depois de colocado o ratinho em

cima da gaiola

5 Sinais espontâneos de actividade mioclónica seguidos de (4)

Cada ratinho foi erguido com delicadeza pela cauda e mantido durante 3 segundos, 30 cm sob um "candeeiro Anglepoise" com lâmpada de 60 watt. Fez-se rodar delicadamente o animal e o comportamento subsequente foi classificado numa escala 1 a 5 segundo os critérios do quadro 2. Foram utilizados grupos de 15 ratinhos em cada um dos grupos de tratamento e os dados foram calculados como medianas com amplitudes interquartis. Os dados foram também expressos como área sob a curva às 4 e 12 horas a contar da retirada do tratamento com etanol. Os resultados são apresentados na figura 2.

#### Provocação de crises audiogénicas

Às horas 8 e 12 a contar da retirada do etanol, foi medida a susceptibilidade a convulsões induzidas pelo som em grupos separados de dez ratinhos. Os ratinhos foram testados individualmente numa caixa de perspex insonorizada com 30 x 30 x 30 cm, contendo uma campainha eléctrica. A campainha foi tocada durante 2 minutos ou até aos primeiros sinais de convulsões. Contou-se o número de ratinhos que respondeu com corridas desenfreadas e convulsões clónicas. Os ratinhos foram abatidos de forma humana assim que se observou uma convulsão completa.

#### Comportamento associado a ansiedade

Os ratinhos foram retirados da dieta com etanol às 07:00 AM e testou-se o comportamento associado à ansiedade 8 horas de pois, utilizando um labirinto em cruz elevado

para murinos. Foi construído em perspex com dois braços abertos em posições opostas (30 x 5 x 0,25 cm) e dois braços fechados opostos (30 x 5 x 15 cm) prolongando-se a partir de uma plataforma central (5 x 5 cm). O chão era de perspex preto baço. Os animais foram aclimatizados à sala de experiências 1 hora antes da realização da experiência. As experiências foram conduzidas sob luz vermelha suave e cada sessão de 5 minutos foi registada em vídeo para análise posterior com um observador desconhecedor do tratamento anterior. Durante a análise (observador 3.0, Noldus Information Technology, Wageningen, Países Baixos) foram efectuadas medições do tempo gasto em cada braço do labirinto, o número de entradas em cada braço e actividade próxima. As medições foram realizadas segundo as definições do quadro 3.

#### QUADRO 3

---

##### Medições do comportamento no labirinto em cruz elevado\*

---

- Entrada do braço = Todas quatro patas num braço aberto ou num braço fechado.
  - "Mergulhar a cabeça" = movimento de avanço exploratório cabeça/ombros para o lado de um braço aberto e descendente para o chão.
  - "Mergulhos de cabeça protegidos" = movimento de avanço exploratório cabeça/ombros para o lado de um braço fechado e descendente para o chão.
  - "Postura esticar-aguardar" = postura exploratória com o corpo deitado, em que o ratinho se estica, voltando
-

em seguida, à mesma posição sem avançar.

---

#### Medição das acções atáxicas

Foram estudados os possíveis efeitos atáxicos da gabapentina em animais de controlo (isto é, que não foram sujeitos ao tratamento com etanol) pelo método da vara rotativa. Os ratinhos foram colocados sobre uma vara a rodar a 4,5 rpm e mediu-se automaticamente o tempo que permaneceram sobre a vara. Foi aplicado um tempo de interrupção de 180 segundos em todas as experiências. Antes das injeções agudas de medicamento, todos os ratinhos foram avaliados na vara rotativa para garantir que permaneciam por 180 segundos (muito poucos não conseguiram e foram excluídos dos estudos). As medições foram realizadas durante 60 minutos, a intervalos de 10 minutos, após a administração aguda do medicamento de ensaio. Foram utilizados oito ratinhos em cada grupo de tratamento.

#### Actividade locomotora:

Foram também avaliados os efeitos da gabapentina em animais de controlo quanto à actividade locomotora para determinar a selectividade dos efeitos nos estudos de abstinência. Os ratinhos receberam injeções de solução de gabapentina ou soro fisiológico e colocados imediatamente em gaiolas com testes de actividade atravessadas por feixes de infra-vermelhos. Foi medido o número de interrupções do feixe de infravermelhos a cada 5 minutos durante os 30 minutos seguintes. Mediu-se a actividade de elevação com um conjunto semelhante de feixes infravermelhos situados 4 cm acima do chão da gaiola.

#### Análise Estatística

Os resultados das classificações de resposta de manipulação foram comparados com uma análise da variância não paramétrica bidireccional, concebida para medições repetidas com o mesmo animal. Os resultados dos cálculos da área sob a curva foram comparados com o teste U de Mann-Whitney. A incidência de convulsões foi analisada com o teste de probabilidade de Fisher. As medições do labirinto em cruz elevado foram sujeitas a análise unidireccional da variância, seguida de análise de comparação múltipla de Bonferroni, comparando todos os grupos com o grupo de controlo, que recebeu injeções de soro fisiológico e comparando também ambos os grupos tratados com etanol que receberam gabapentina com o grupo tratado com etanol que recebeu soro fisiológico. As medições da ataxia foram analisadas pelo teste U de Mann-Whitney e a actividade locomotora pelo teste t de Student.

## RESULTADOS

### Resposta à manipulação

As classificações do comportamento em resposta à manipulação delicada revelaram o aumento previsto na sequência da retirada do tratamento com etanol. A gabapentina (GP) a 100 mg/kg (figura 2a) reduziu significativamente este aumento nas classificações quando os resultados foram comparados ao longo de um período de ensaio de 12 horas ( $p < 0,001$ ). O efeito desta dose de gabapentina revelou uma marcada redução nas classificações da manipulação durante cerca de 4 horas. Este período de tempo foi utilizado, assim, em análise posterior para examinar a área sob a curva da manipulação com cada dose do medicamento. Os efeitos de doses inferiores de gabapentina



não foram significativos ao longo do período de medição de 12 horas, mas quando as áreas sob a curva foram calculadas durante as primeiras 4 horas do estudo (figura 2b) foram observados efeitos significativos das doses de 20 e 50 mg/kg ( $p < 0,05$ ), bem como a dose de 10 mg/kg ( $p < 0,01$ ).

#### Crises audiogénicas

No intervalo de 8 horas, 50 e 100 mg/kg de gabapentina diminuíram a incidência de convulsões após o estímulo audiogénico, atingindo a dose de 100 mg/kg significado estatístico ( $p < 0,05$ ). Não se verificou efeito das doses menores (quadro 4). Não se observou efeito de qualquer das doses de ensaio à hora 12 a contar do fim do tratamento com etanol (dados não apresentados).

QUADRO 4

Efeito da gabapentina em convulsões audiogénicas medidas 8 horas depois da retirada do etanol			
Tratamento crónico	Injecção aguda	Percentagem do grupo com convulsões clónicas	
Dieta do Controlo:	Soro fisiológico	0	
Dieta Etanol	Soro fisiológico	80* $p < 0,05$ c. f. grupo controlo/soro fisiológico	
Dieta Etanol	Gabapentina mg/kg	5 92	

Dieta Etanol	Gabapentina	20	70	
	mg/kg			
Dieta Etanol	Gabapentina	50	40	
	mg/kg			
Dieta Etanol	Gabapentina	100	30*	p <0,01 c. f.
	mg/kg		grupo	etanol/soro
			fisiológico	

#### Labirinto em cruz elevado

O efeito mais proeminente da retirada do etanol neste ensaio foi uma diminuição da percentagem de tempo gasto nos braços abertos do labirinto (figura 3a,  $F(4,50) = 5,12$ ,  $p < 0,002$ ). A gabapentina diminuiu este efeito com doses de 50 e 100 mg/kg. Os valores p foram  $p < 0,05$  para a dose de 50 mg/kg e  $p < 0,01$  para 100 mg/kg, para comparação com a administração de soro fisiológico em ambos os casos.

Os ratinhos sujeitos a abstinência do etanol revelaram também um aumento significativo de mergulhos da cabeça dos braços fechados (mergulhos da cabeça protegidos). Este efeito foi significativamente reduzido por gabapentina a 100 mg/kg ( $p < 0,01$  em comparação com os efeitos do soro fisiológico) como ilustrado na figura 3b ( $F(4,50) = 6,53$ ,  $p < 0,001$ ). Em animais de controlo, o número de mergulhos de cabeça protegidos diminuiu significativamente com doses de gabapentina de 100 mg/kg ( $p < 0,05$ , em comparação com valores de controlo após administração de soro fisiológico). Embora o tempo médio nos braços aberto tenha aumentado em animais de controlo após esta dose de

gabapentina, não foi significativamente diferente dos controlos com soro fisiológico.

#### EXEMPLO 5

##### Teste da hipersensibilidade do cólon a LPS

Foram também avaliados os análogos GABA quanto à sua capacidade em controlar e tratar as perturbações gastrointestinais, caracterizadas como IBD e IBS. O teste utilizado para avaliar os análogos do GABA mede os efeitos do composto em alodinia rectal tardia induzida por lipopolissacáridos em ratos. Sabe-se que injeções intraperitoneais (IP) da endotoxina lipopolissacárida (LPL) induzem hiperalgesia de longa duração em modelos de dor somática. O teste seguinte de hipersensibilidade do cólon-LPL foi concebido para avaliar o efeito das injeções IP de LPL no limiar visceral da dor, num modelo experimental de distensão rectal.

##### Preparação dos animais

Ratinhos Wistar machos, com peso entre 250 e 350 g, foram cirurgicamente preparados para electromiografia segundo a técnica padrão. Os ratinhos foram anestesiados por injeção i.p. de acepromazina e quetamina (Imalgene 1000, Rhône-Mérieux, Lyon, França) com doses de 0,6 e 120 mg/kg respectivamente. Dois grupos de quatro eléctrodos de fio de nicrómio (60 cm de comprimento e 80 µm de diâmetro) foram implantados bilateralmente no músculo oblíquo externo abdominal, imediatamente acima do ligamento inguinal. Os eléctrodos ficaram localizados no exterior, na parte de trás do pescoço e protegidos por um tubo de vidro preso à

pele. Os animais foram abrigados individualmente em gaiolas de polipropileno e mantidos em sala com temperatura controladas (21 °C). Foi-lhes permitido livre acesso a água e alimento (UAR pellets, Epinay, França).

#### Registo electromiográfico

O registo electromiográfico teve início 5 dias depois da cirurgia. A actividade eléctrica dos músculos estriados abdominais foi registada com um electroencefalógrafo (Mini VIII, Alvar, Paris, França), utilizando uma constante de curto prazo (0,03 seg) para remover sinais de baixa frequência (<3 Hz) e uma velocidade de registo no papel de 3,6 cm/minuto.

#### Procedimento de distensão do balão

Os ratinhos foram colocados em túneis de plástico (6 cm de diâmetro; 25 cm de comprimento) onde não se podiam movimentar, escapar ou virar para prevenir danos no balão. Foram habituados a este procedimento durante 3 ou 4 dias antes da distensão rectal (DR) para minimizar a reacção de stress durante as experiências. Determinou-se que os animais estavam habituados ao túnel de plástico utilizando dois critérios: (i) componente comportamental: Quando os animais tentavam escapar ou mudar de direcção menos de uma vez em 5 minutos, (ii) a actividade basal abdominal: Quando os músculos estriados abdominais exibiam menos de 5 contracções abdominais por 5 minutos na ausência de distensão. O balão utilizado para a distensão era um cateter de embolectomia arterial (Fogarty, Edwards Laboratories, Inc., Santa Ana, EUA). A distensão rectal (DR) foi efectuada por inserção do balão (2 mm de diâmetro; 2 cm de comprimento) no recto a 1 cm do ânus, sendo o

cateter fixado à cauda. Este foi insuflado progressivamente, 0,4 mL de cada vez, do 0 a 1,6 mL, durando cada etapa de insuflação 5 minutos. Para detectar eventuais fugas, foi verificado o volume de água introduzido no balão por remoção completa com uma seringa no fim do período de distensão.

#### Protocolo experimental

Numa primeira série de experiência, um grupo de 8 ratos foi sujeito a distensão rectal gradual. Os animais foram previamente (30 minutos) tratados com gabapentina a doses de 30 e 100 mg/kg IP ou respectivo veículo (NaCl aquoso a 9%).

Numa segunda série de experiência, o mesmo grupo de 8 ratos recebeu IP lipopolissacárido (*E. Coli*, serotipo 0111:B4) ou respectivo veículo a uma dose de 1 mg/kg IP, 1 hora depois de uma distensão rectal de controlo. Depois efectuou-se DR 12 horas depois da injeção de LPL e foi precedida (30 minutos) de administração IP de gabapentina (30 mg/kg) ou respectivo veículo (0,3 mL/ratinho).

#### Medicamentos

O LPS foi dissolvido em soro fisiológico (NaCl 9%). Foi administrada injeção intraperitoneal do veículo num volume de 0,3 mL. O LPS foi adquirido junto da Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, França).

#### Análise Estatística

A análise estatística do número de contracções abdominais que ocorreram durante cada período de 5 minutos, durante a DR, foi executada por ANOVA unidireccional,

seguido de teste t emparelhado de Student. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM e as diferenças foram consideradas significativas para  $p < 0,05$ .

Os resultados encontram-se apresentados nos quadros 5 e 6 e estabelecem que a gabapentina é eficaz na redução de perturbações gastrointestinais menores, tal como IBS.

QUADRO 5

Efeito da gabapentina na resposta abdominal induzida por distensão rectal (número de contracções abdominais/5 minutos; média $\pm$ EPM, $n = 7-8$ , $*p < 0,05$ , $**p < 0,01$ , significativamente diferente do veículo; $n\%$ da redução em comparação com veículo).				
Volume da distensão	Veículo (0,3 mL/ratinho)	Gabapentina (30 mg/kg)	Veículo (0,3 mL/ratinho)	Gabapentina (100 mg/kg)
0,4 mL	4,4 $\pm$ 1,6	5,0 $\pm$ 2,1	3,9 $\pm$ 1,8	2,0 $\pm$ 1,4
0,8 mL	19,1 $\pm$ 2,8	10,6 $\pm$ 3,4** (-45%)	19,6 $\pm$ 2,3	7,6 $\pm$ 3,4** (-61,2%)
1,2mL	23,4 $\pm$ 2,6	16,1 $\pm$ 2,3* (-31,2%)	19,1 $\pm$ 20,3	16,72,9 (-31,2%)

QUADRO 6

---

Efeito da gabapentina na alodinia tardia induzida por LPS (12 horas) (número de contracções abdominais/5

---

minutos; média  $\pm$  EPM,  $n = 7-8$ ,  $*p < 0,001$ , significativamente diferente do valor "veículo LPS";  $n$  % da redução em comparação com "veículo LPS").

Volume da LPS (1 mg/kg) + distensão veículo (0,3 mL/rato)	LPS (1 mg/kg) + gabapentina (0,3 mL/rato)
0,4 mL	9,7 $\pm$ 1,0
0,8 mL	11,7 $\pm$ 1,2
1,2 mL	23,5 $\pm$ 2,2

A experiência precedente foi executada com o análogo de GABA pregabalina. A pregabalina a 30 mg/kg, reduziu o número de câibras em todos os volumes de distensão de 0,4 e 0,8 mL. Quando injectada 120 minutos antes da distensão rectal, a pregabalina teve um efeito semelhante tanto a 10 como a 30 mg/kg em todos os volumes de distensão. LPS aumentou o número de contracções abdominais no volume 0,4 mL (9,7  $\pm$  1,0 em comparação com 3,7  $\pm$  1,0) 12 horas depois da administração. Este efeito foi suprimido quando os animais receberam pregabalina (1,8  $\pm$  0,9 em comparação com 9,7  $\pm$  1,0) a 30 mg/kg, 30 minutos antes da distensão rectal. Estes resultados estabelecem que a pregabalina é eficaz na redução da sensibilidade rectal basal e no bloqueio da alodinia rectal induzida por LPS em ratos.

## EXEMPLO 6

## Alodinia induzida por TNBS

Os análogos do GABA foram avaliados em ratos que sofria de alodinia visceral crônica, induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS). Constou-se que injeções de TNBS no cólon dos animais induzem colite crônica. Em seres humanos, as perturbações digestivas são frequentemente associadas a dor visceral. Nestas patologias, o limiar de dor visceral diminui, indicando uma hipersensibilidade visceral.

Consequentemente, o estudo seguinte foi concebido para avaliar o efeito das injeções de TNBS no cólon, no limiar visceral da dor, num modelo experimental de distensão do cólon.

Ratinhos Sprague-Dawley machos de 340 a 400 g de peso foram utilizados nos estudo.

Os animais foram acolhidos três por gaiola, num ambiente controlado ( $20 \pm 1$  °C,  $50 \pm 5\%$  de humidade, com luz 8:00 AM até 20:00). Sob anestesia (quetamina 80 mg/kg i.p.; acepromazina 12 mg/kg i.p.), injectou-se TNBS (50 mg/kg) ou soro fisiológico (1,5 mL/kg) no cólon proximal (1 cm do cego). Após a cirurgia, os animais foram colocados em gaiolas individuais, em ambiente controlado.

Foi inserido um cateter de balão (5-6 cm de comprimento) através do ânus até ao cólon que foi mantido em posição (ponta do balão a 5 cm do ânus) fixando o cateter à base da cauda. O balão foi insuflado progressivamente, 5 mm Hg de cada vez, do 0 a 75 mm Hg, durando cada etapa de insuflação 30 segundos. Cada ciclo de



distensão do cólon foi controlado por um barostato padrão. O limiar corresponde à pressão que produziu a primeira contracção abdominal, altura em que foi descontinuado o ciclo de distensão. Para determinar o limiar do cólon, foram realizados quatro ciclos de distensão no mesmo animal.

Numa primeira série de experiências, um grupo de 8 ratos tratados com soro fisiológico foi sujeito a uma sessão de distensão do cólon.

Numa segunda série de experiências, um grupo de 8 ratos tratados com TNBS foi sujeito a uma sessão de distensão do cólon.

Numa terceira série, um grupo de oito ratos tratados com YNBS recebeu uma injeção subcutânea (sc) de gabapentina ou CI-1008 30 minutos antes do início do ciclo de distensão do cólon.

Todos os compostos de ensaio foram dissolvidos em soro fisiológico, excepto o TNBS. Dissolveu-se TNBS em EtOH 30% (p/v). Foi administrada injeção subcutânea do veículo num volume de 2 mg/kg.

O significado estatístico entre cada grupo foi determinado por ANOVA unidireccional, seguido de teste t de Student desemparelhado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a  $p < 0,05$ .

O limiar da dor (pressão de distensão indutora da primeira contracção abdominal) após determinação de distensão colónica distal no dia 7 em dois grupos de ratos em vigília: animais de controlo e animais tratados com TNBS. Foi observada uma diminuição significativa no limiar

da dor em animais tratados com TNBS. Foram medidos os parâmetros inflamatórios (peso do cólon, área de hiperemia e necrose e teor de mieloperoxidase do cólon) no dia 7 depois do tratamento com TNBS. Todos os parâmetros aumentara significativamente excepto a área de encrose.

A gabapentina (100, 300 e 500 mg/kg sc) e CI-1008 (30, 60, 100 e 200 mg/kg sc) foi administrada 30 minutos antes da distensão do cólon e medição dos parâmetros inflamatórios. A gabapentina inibiu de forma relacionada com a dose, a alodinia do cólon induzida por TNBS. A 500 mg/kg sc, a gabapentina bloqueou completamente o efeito de TNBS na dor do cólon, CI-1008 revelou igualmente inibição relacionada com a dose da diminuição do limiar da dor. A 100 mg/kg o CI-1008 suprimiu completamente a alodinia induzida por TNBS. A morfina (0,1 mg/kg sc) suprimiu completamente a diminuição induzida por TNBS no limiar da dor depois da distensão do cólon (figura 4). Em contraste, nem a gabapentina nem CI-1008 inibiram o efeito inflamatório do cólon do TNBS nestas condições de experiência.

Em condições normais (animais de controlo), a morfina (0,3 mg/kg sc) aumentou significativamente o limiar da dor do cólon enquanto, nas mesmas condições, nem a gabapentina (500 mg/kg sc) em CI-1008 (200 mg/kg sc) modificaram o limiar de dor do cólon (figura 5). Os resultados são ainda apresentados nos quadros 7 e 8.

#### QUADRO 7

---

Efeito de CI-1008, gabapentina e morfina na alodinia do cólon crónica induzida por TNBS em ratos

---

Tratamento	Limiar colónico (mm Hg)	SEM	n	p
Controlo	43,39 ±	1,98	8	
Sham	33,44 ±	3,25	8	*
TNBS	17,81 ±	1,27	8	***
CI-1008				
30 mg/kg sc	21,72	± 1,51	8	?
60 mg/kg sc	25,47	± 1,03	8	??
100 mg/kg sc	33,13	± 1,83	8	???
200 mg/kg sc	40,47	± 3,75	8	???
Gabapentina				
100 mg/kg sc	22,03	± 2,23	8	
300 mg/kg sc	24,69	± 1,27	8	?
500 mg/kg sc	36,88	± 1,46	8	???
Morfina				
0,1 mg/kg	34,22	± 1,72	8	???

sc

0,3	mg/kg	46,09	$\pm 1,43$	8	???
-----	-------	-------	------------	---	-----

sc

1	mg/kg	sc	64,84	$\pm 1,88$	8	???
---	-------	----	-------	------------	---	-----

---

\* = p <0.05, \*\* = p <0.01 vs controlo e \*\*\* = p <0.001

---

? = p <0,05, ?? = p <0,01 e ??? = p <0,001 vs TNBS.

---

## QUADRO 8

Tratamento	Limiar colónico (mm Hg)	SEM	N	p
Controlo	43,33	$\pm 1,23$	6	
CI-1008 200 mg/kg sc	46,41	$\pm 2,26$	8	NS
Gabapentina 500 mg/kg sc	43,75	$\pm 1,44$	6	NS

---

NS = Não significativo vs controlo.

---

Os dados precedentes estabelecem que os análogos do GABA, tal como gabapentina e CI-1008 suprimem a alodinia do

cólon induzida por TNBS e, por conseguinte são eficazes na hipersensibilidade do cólon anómala, reflectindo dor em IBS.

#### EXEMPLO 7

##### Dor inflamatória do cólon induzida por formalina

Os análogos de Gaba foram avaliados noutro modelo para determinar o seu efeito na dor visceral inflamatória, incluindo pancreatite e cistite intestinal.

A administração de formalina na parede do cólon de rato provoca inflamação aguda e dor visceral. O objectivo deste estudo consiste em avaliar a actividade antinociceptiva da gabapentina e CI-1008 na dor visceral induzida por injeção intraparietal colónica de formalina.

Ratinhos Sprague-Dawley fêmeas de 240 a 260 g de peso foram utilizados nos estudo. Os animais foram acolhidos três por gaiola, num ambiente controlado ( $20 \pm 1$  °C,  $50 \pm 5\%$  de humidade, com luz 8:00 AM até 20:00) antes da utilização no ensaio.

Cada animal de ensaio foi colocado numa gaiola de plástico transparente (27 x 43 x 28 cm) com uma camada de aparas de madeira no fundo. Havia água para beber à disposição. As gaiolas foram colocadas de forma a evitar interacção visual entre os animais.

Foi colocado um espelho por trás de cada gaiola para melhorar o registo dos comportamentos.

Cada animal foi deixado habituar-se ao ambiente durante 20 minutos.

Produziu-se depois anestesia com isofurano (início 4%, depois 1,5% numa mistura de 2:3 de óxido nitroso e 1:3 de oxigénio). O animal foi suspenso pela cauda, o recto foi delicadamente esvaziado com uma haste coberta de algodão e inseriu-se um coloscópio através do ânus. Este endoscópio modificado possui uma ranhura lateral que permite puncionar a parede intestinal com controlo visual, utilizando uma agulha de 51 mm de comprimento (26 ga) a cerca de 35 mm da margem anal. As soluções injectadas ou eram 50  $\mu$ L 5% de formalina aq. (v/v) ou o mesmo volume de soro fisiológico isotónico.

Os animais foram deixados recuperar da anestesia assim que ficou completa a injeção (cerca de 1 minuto) e o período de observação foi iniciado e continuado durante 2 horas. Trinta minutos depois do fim do teste de observação, administrou-se uma injeção IV de azul de Evans (1%) e 30 minutos depois sacrificou-se o animal. Abriu-se o abdómen. O local da injeção e a zona de difusão do azul de Evans foram registados com software de análise de imagem. Os dados dos ratos em que a disseminação do corante não se restringiu à parede sigmóide foram postos de parte.

Como listado por ordem crescente de intensidade da dor, estes comportamentos foram: (i) lambe e morder a zona abdominal (L), (ii) esticar o corpo, isto é, esticar para trás sobre os membros posteriores (B) (iii) contracção dos flancos, por vezes evoluindo para uma atitude de estivar (C) e (iv) contracção de todo o corpo, o rato permanece erecto com as costas curvadas, ocasionalmente com maior intensidade conforme a duração do episódio em questão:  $W_1$  durante menos de 30 segundos,  $W_2$  entre 30 segundos e 1 minuto e  $W_3$  durante mais de 1 minuto. Os comportamentos

foram registados para cada animais ao longo de um teste de 2 horas em gráficos individuais. O nível de dor (S) foi depois calculado para cada um dos períodos sucessivos de 15 minutos utilizando a seguinte fórmula:  $S = 1L + 2B + 3C + 4W_1 + 5W_2 + 6W_3$

Sendo o nível de dor proporcional a (i) o número de episódios de cada comportamento seleccionado e (ii) o coeficiente, entre 1 e 6, atribuído a cada comportamento.

Todos os compostos dissolvidos em soro fisiológico. Foi administrada injeção subcutânea do veículo num volume de 2,5 mg/kg. A formalina foi adquirida junto da Prolabo.

O significado estatístico entre cada grupo foi determinado por ANOVA unidireccional, seguido de teste t de Student desemparelhado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a  $p < 0,05$ .

A hiperalgesia foi induzida por injeção intramural de formalina (5%, 50  $\mu$ L/rato) na parede colónica em ratos Sprague-Dawley fêmeas.

Foram testados gabapentina e CI-1008 a 100, 300, 500 e 100, 200 mg/kg sc respectivamente. A gabapentina e CI-1008 reduziram significativamente e de forma dependente da dose o nível de dor induzido por formalina intracolónica. O efeito inibidor máximo foi observado após 500 mg/kg de gabapentina e 200 mg/kg de CI-1008. Os resultados são apresentados no quadro 9.

O estudo estabelece que os análogos de GABA exibem um efeito antinociceptivo em dor induzida por formalina intracolónica, sendo assim eficaz no tratamento de IBD e IBS e dor visceral, incluindo pancreatite e cistite intestinal.

## QUADRO 9

Efeito da injeção subcutânea de gabapentina e CI-1008 na dor inflamatória colónica, induzida por injeção intramural de formalina 5%.

Tratamento	% Antinocicepção	EPM	n	p
CI-1008				
100 mg/kg sc	18,55	$\pm 7,41$	7	***
200 mg/kg sc	70,81	$\pm 7,47$	6	***
Gabapentina				
0,3 mg/kg sc	-7,73	$\pm 10,43$	3	NS
100 mg/kg sc	13,62	$\pm 12,65$	9	NS
300 mg/kg sc	55,07	$\pm 9,98$	6	***
500 mg/kg sc	88,01	$\pm 16,96$	6	***
*** = NS = Não significativo vs controlo.				

Os exemplos seguintes ilustram mais detalhadamente as composições apresentadas pela invenção, que contém um análogo GABA em combinação com um NSAID.

Formulação para comprimidos

Sódio de naproxen 200 mg

Gabapentina 300 mg

Estearato de magnésio 20 mg



Celulose microcristalina 100 mg

Povidona 100 mg

Talco 50 mg

Os ingredientes são misturados até estarem uniformes e são prensados em comprimidos. Os comprimidos são administrados 1 a 3 vezes ao dia para o tratamento de estados inflamatórios, tal como artrite reumatóide, espondilite anquilosante, osteoartrite, bursite, tendinite e artrite gotosa aguda.

#### EXEMPLO 9

Formulação para cápsulas

Cálcio de fenoprofeno USP 150 mg

Pregabalina 50 mg

Celulose 100 mg

Gelatina 50 mg

Dióxido de titânio 10 mg

Amido de milho 50 mg

Os ingredientes são misturados até estarem uniformes e são colocados em cápsulas de gelatina. As cápsulas são administradas 1 a 4 vezes ao dia para o tratamento da artrite reumatóide e osteoartrite.

As combinações apresentadas pela presente invenção incluem um NSAID (por exemplo naproxeno ou ácido meclofenâmico) e um análogo de GABA (por exemplo pregabalina ou gabapentina). Estas combinações têm demonstrado ser sinérgicas na sua capacidade para tratar a dor. Por exemplo, a gabapentina e o sódio de naproxeno

foram combinados em quantidades sinérgicas e avaliados no teste de hiperalgesia térmica subplantar induzida por carragenina padrão.

Este teste utiliza um extracto de algas (carragenina) que, quando injectado na região subplantar dos animais de ensaio, provoca uma inflamação estéril, baixando assim o limiar de dor. Agentes analgésicos, incluindo análogos de GABA, tal como gabapentina, trazem o limiar da dor de volta ao normal, permitindo assim que o animal tolere uma fonte externa de dor durante mais tempo relativamente aos animais de controlo sem tratamento. No teste precedente, foram avaliadas várias combinações fixas de gabapentina e sódio de naproxeno, com concentrações entre cerca de 50 partes em peso de análogo de GABA para 1 partes em peso de NSAIDs para combinações de 1:1. Os resultados são apresentados na figura 6 (para combinações fixas de 1:1 a várias dosagens) e na figura 7 (para combinações 50:1 fixas a várias dosagens). Os dados estabelecem que as combinações de um análogo de Gaba e um NSAID são sinérgicas na sua capacidade para aliviar a dor aguda e crónica e induzir analgesia.

## REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista das referências citadas pelo requerente serve apenas para conveniência do leitor. Não faz parte do documento da patente europeia. Apesar da compilação cuidadosa das referências, os erros ou as omissões não podem ser excluídos e o IEP rejeita toda a responsabilidade a este respeito.

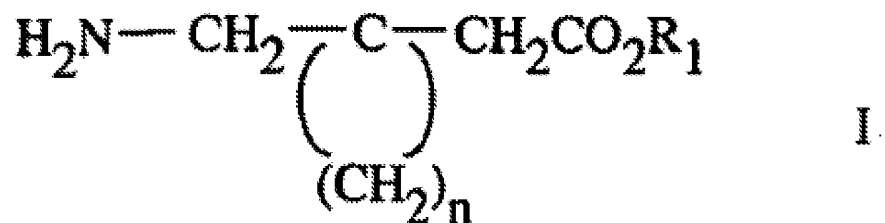
Documentos de patente citados na descrição:

- US 4024175 A [0007] [0014]
- WO 9611680 A [0007]
- US 5563175 A [0007] [0014]

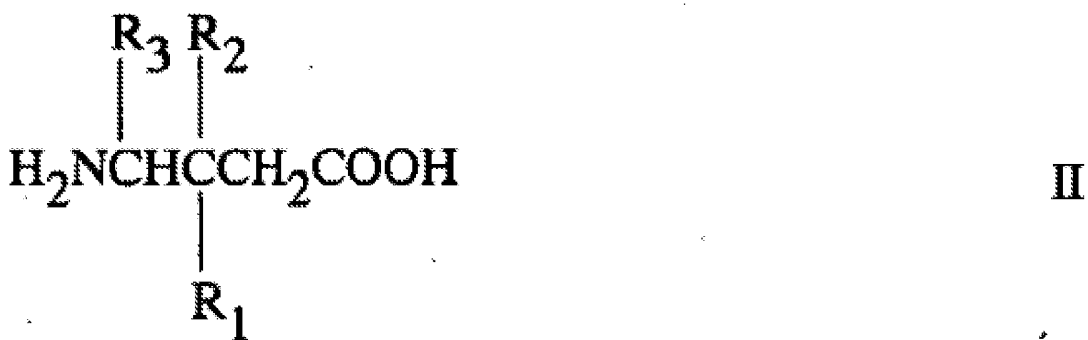
Lisboa, 11/05/2010

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um análogo de GABA da fórmula (I)



em que  $\text{R}_1$  é hidrogénio ou um alquilo de cadeia curta e  $n$  é um número inteiro de 4 a 6, e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis ou fórmula II



em que  $\text{R}_1$  é um alquilo de cadeia linear ou ramificada, com 1 a 6 átomos de carbono, fenilo ou cicloalquilo com 3 a 6 átomos de carbono;

$\text{R}_2$  é hidrogénio ou metilo e

$\text{R}_3$  é hidrogénio, metilo ou carboxilo.

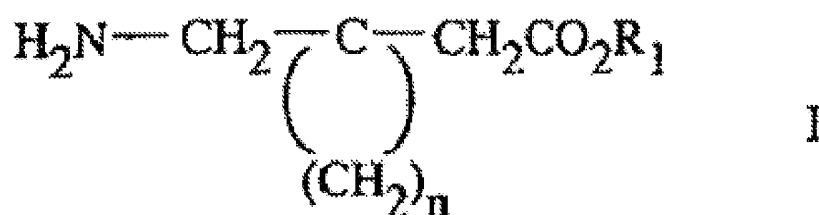
e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis

para o fabrico de produtos farmacêuticos destinados à prevenção e tratamento de lesões e distúrbios gastrointestinais, desde que, quando o análogo do GABA for ácido 4-amino-3-fenilbutanóico, a utilização não se destina ao fabrico de produtos farmacêuticos para a inibição do relaxamento transitório do esfíncter esofágico inferior.

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o composto da fórmula I é gabapentina.
3. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o composto de fórmula I é seleccionado de entre ácido 1-(aminometil-3-metilciclo-hexil)acético, ácido 1-(aminometil-3-metilciclopentil)acético e ácido 1-(aminometil-3,4-dimetilciclopentil)acético.
4. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o composto da fórmula II é pregabalina.
5. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o composto da fórmula II é ácido R-(3)-(aminometil)-5-metil-hexanóico.
6. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o composto da fórmula II é ácido 3-(1-aminometil)-5-metil-hexanóico.
7. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a lesão gastrointestinal encontra-se num sujeito a receber ou que irá receber terapêutica com NSAIDs.
8. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a lesão gastrointestinal é **caracterizada por** ser uma doença inflamatória do intestino ou síndrome do intestino irritável.

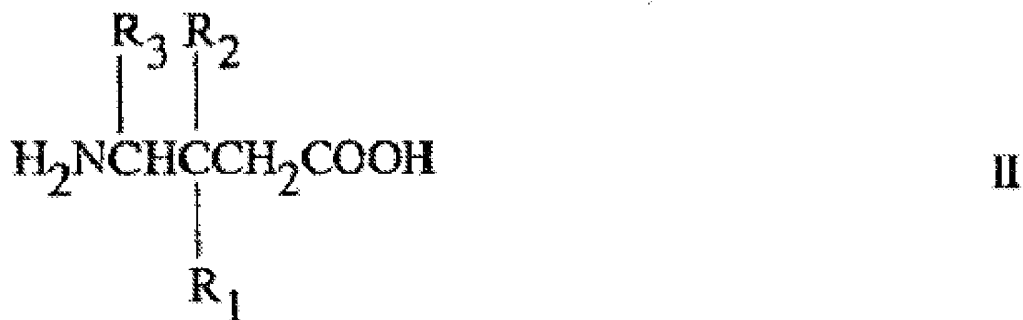
9. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que o estado patológico tratado é seleccionado de entre doença de Crohn, ileíte, doença isquémica do intestino, dispepsia e colite ulcerosa.

10. Composição farmacêutica compreendendo um análogo de GABA da fórmula I



em que  $\text{R}_1$  é hidrogénio ou um alquilo de cadeia curta e  $n$  é um número inteiro de 4 a 6,

e os seus sais farmaceuticamente aceitáveis ou fórmula II



em que  $\text{R}_1$  é um alquilo de cadeia linear ou ramificada, com 1 a 6 átomos de carbono, fenilo ou cicloalquilo com 3 a 6 átomos de carbono;

$\text{R}_2$  é hidrogénio ou metilo e

$\text{R}_3$  é hidrogénio, metilo ou carboxilo.

e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis em combinação com um medicamento anti-inflamatório não-esteróide e um excipiente, veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável, desde que o fármaco anti-inflamatório não-esteróide não seja naproxeno ou aspirina.

11. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 10, em que o análogo de GABA da fórmula I é gabapentina.
12. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 10, em que o análogo de GABA da fórmula I é seleccionado de entre ácido 1-(aminometil-3-metilciclohexil)acético, ácido 1-(aminometil-3-metilciclopentil)acético e ácido 1-(aminometil-3,4-dimetilciclopentil)acético.
13. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 10, em que o análogo de GABA da fórmula II é pregabalina.
14. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 13, em que o fármaco anti-inflamatório não-esteróide é seleccionado de entre sulindac, indometacina, ácido mefenâmico, diclofenac, fenoprofeno, diflunisal, etodolac, ibuprofeno, piroxicam, oxaprozin e bromfenac ou respectivos sais farmacêuticos.

15. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 14, em que o fármaco anti-inflamatório não-esteróide é seleccionado de entre ibuprofeno ou indometacina.
16. Composição farmacêutica compreendendo naproxeno sódico e pregabalina.
17. Composição farmacêutica compreendendo naproxeno sódico e gabapentina.
18. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 15 compreendendo ibuprofeno e pregabalina.
19. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 15 compreendendo ibuprofeno e gabapentina.

Lisboa, 11/05/2010



FIG-1

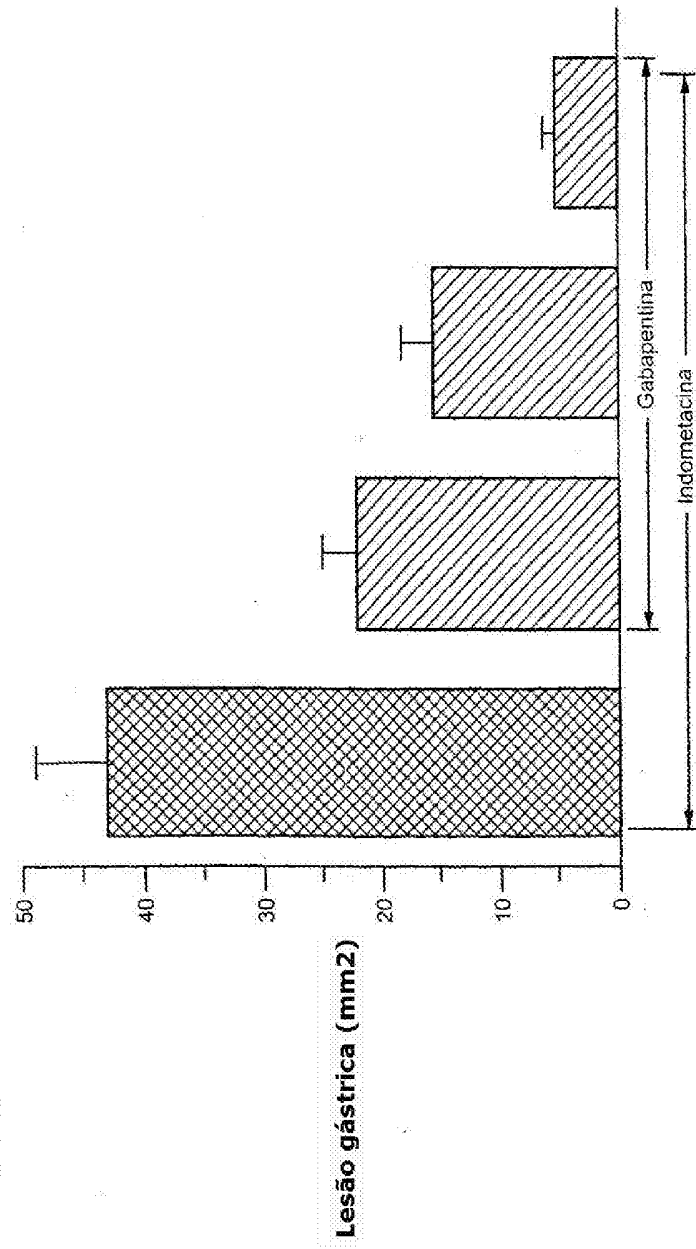


FIG-2a

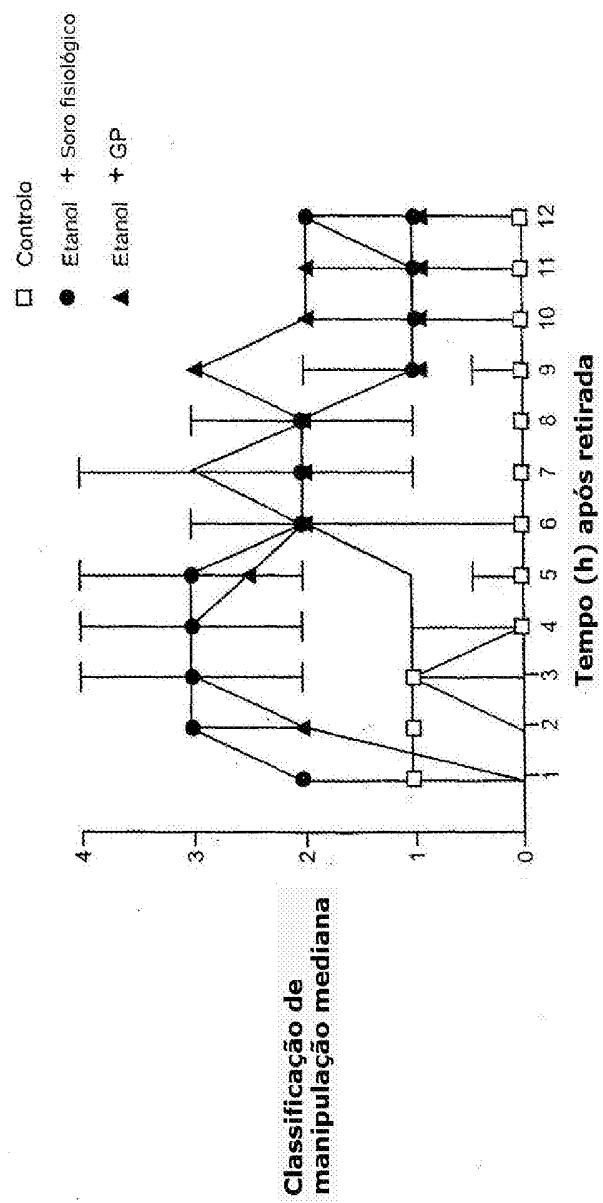


FIG-2b

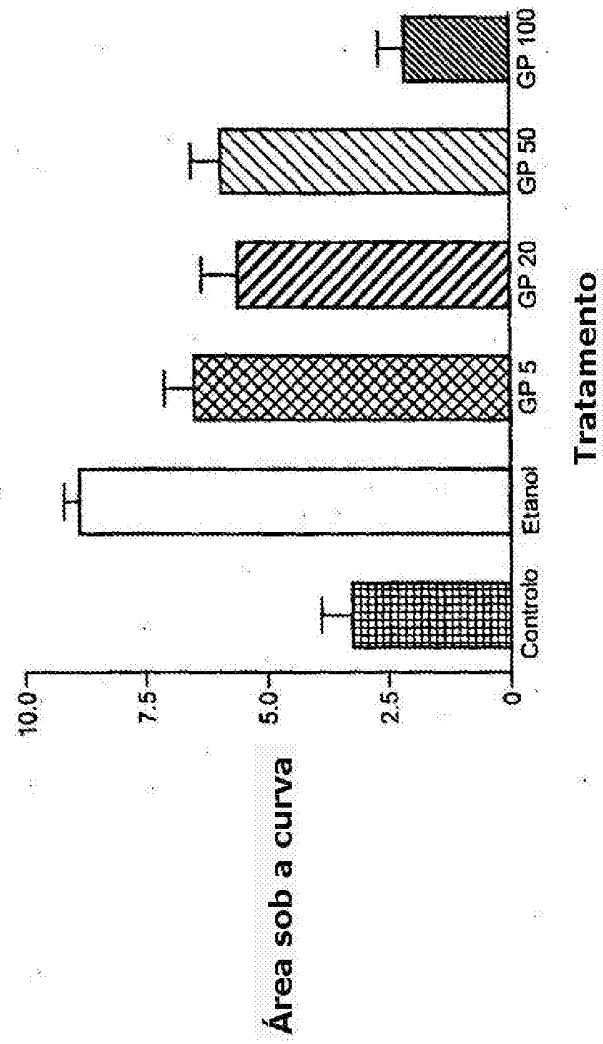


FIG-3a

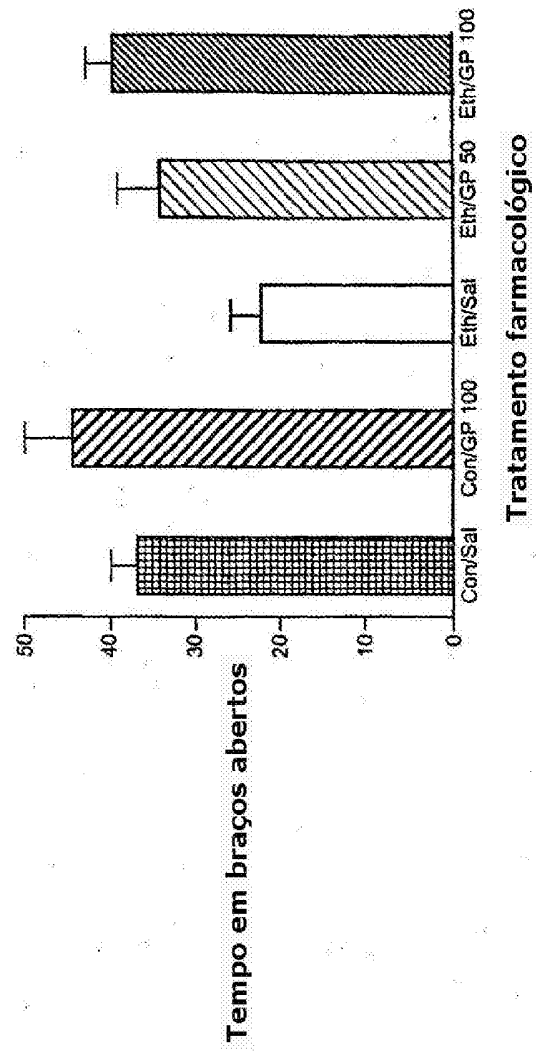


FIG-3b

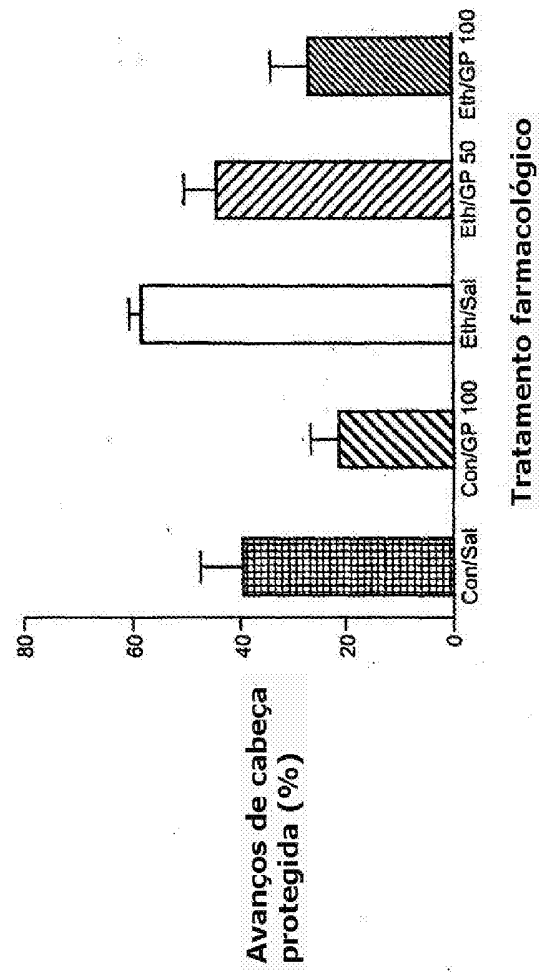


FIG-4

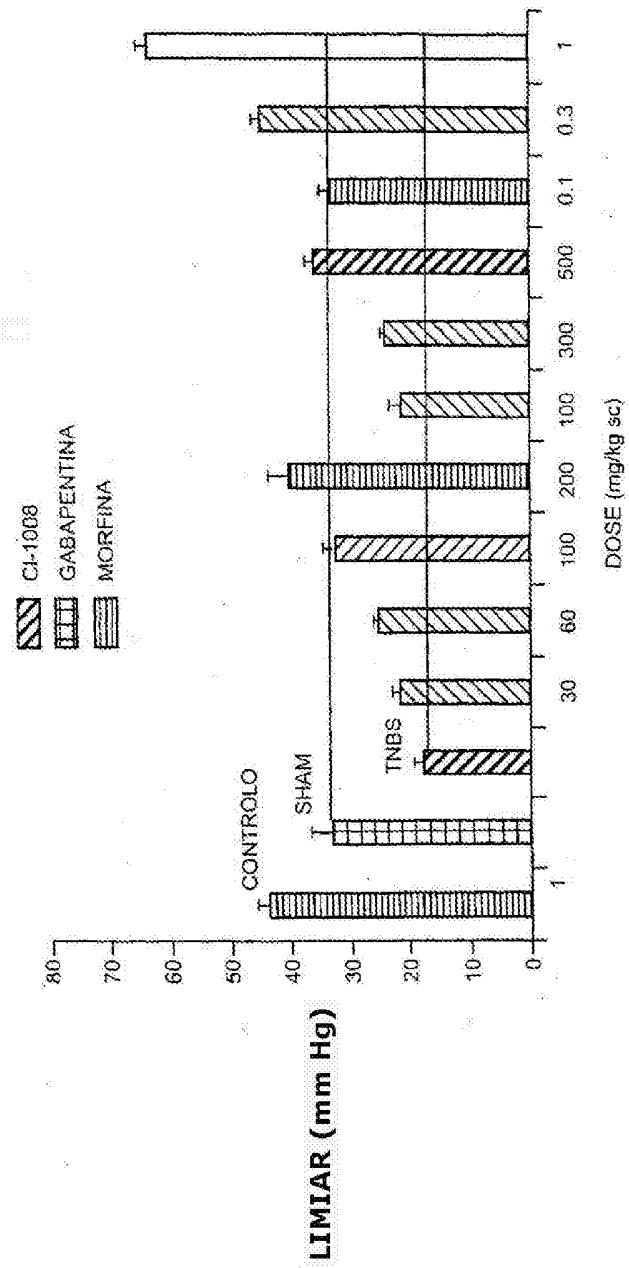
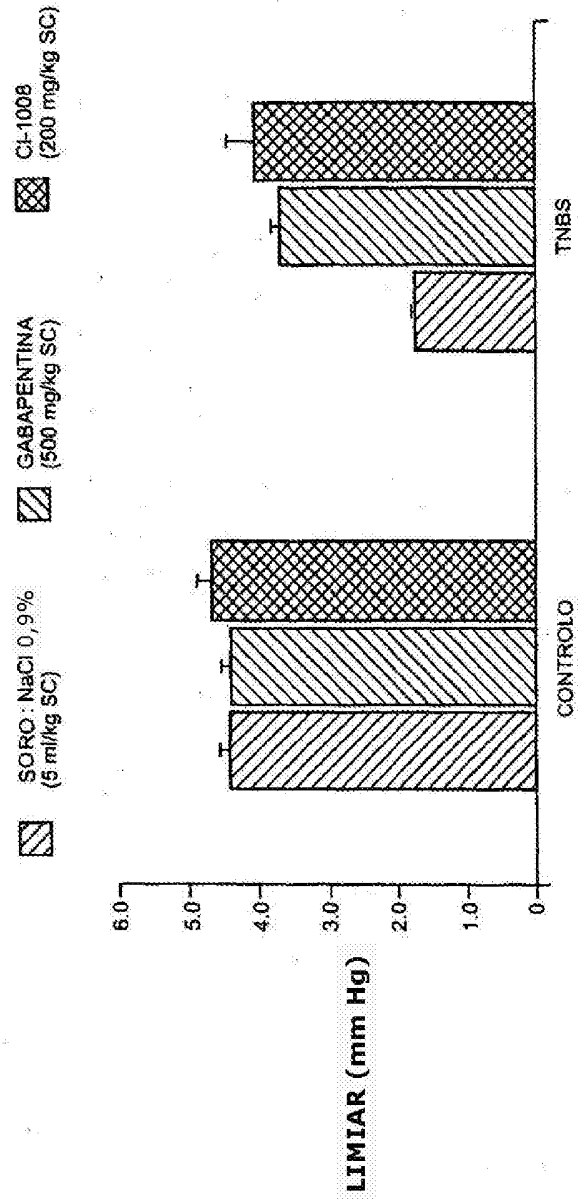
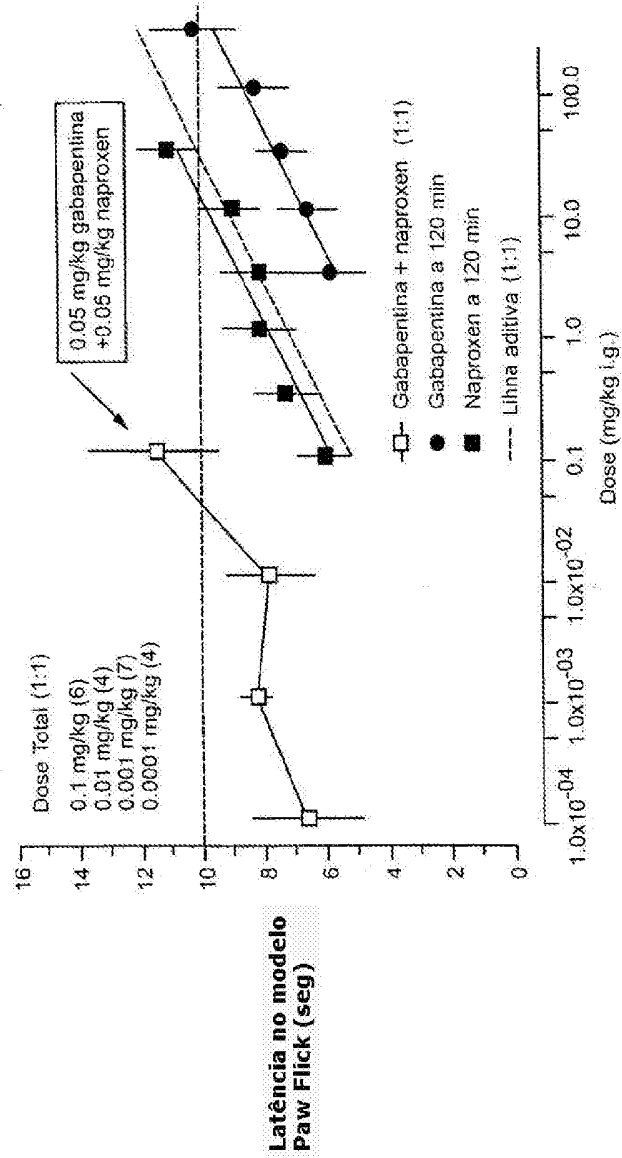


FIG-5



**Misturas de Gabapentina e Naproxeno Demonstram Sinergia em Hiperálgesia Térmica na Pata de ratinho induzida por Carragenina**

**FIG-6**





**Misturas de Gabapentina e Naproxeno Revelam Sinergia em  
Hiperalgisia Térmica na Pata de ratinho induzida por Carragenina**

**FIG-7**

