

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

(22) Data de pedido: **2005.01.06**

(30) Prioridade(s): **2004.01.12 US 754547**

(43) Data de publicação do pedido: **2006.10.04**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.03.12**
084/2014

(73) Titular(es):

**NATROGEN THERAPEUTICS INTERNATIONAL,
INC.
213 VOSBURGH, NYMC VALHALLA, NY 10595**
US

(72) Inventor(es):

LONGGUI WANG **US**
XIAO MEI LIU **US**
LIAN MO **US**
SIMON K. MENCHER **US**
JAMES, P. MCCARRON **US**

(74) Mandatário:

MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA
AV LIBERDADE, Nº. 69 - 3º D 1250-148 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **MÉTODOS DE TRATAMENTO DE UMA DOENÇA DE TIPO INFLAMATÓRIO**

(57) Resumo:

INVENÇÃO REFERE-SE A COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E MÉTODOS DE TRATAMENTO DE DOENÇAS DE TIPO INFLAMATÓRIO ASSOCIADAS À EXPRESSÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E/OU À EXPRESSÃO REDUZIDA DE CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS. O MÉTODO COMPREENDE HABITUALMENTE A ADMINISTRAÇÃO DE UM OU MAIS COMPOSTOS SELECIONADOS A PARTIR DE ISOÍNDIGO, ÍNDIGO, INDIRUBINA OU DERIVADOS DOS MESMOS, TAIS COMO MEISOÍNDIGO E NATURA. PREFERENCIALMENTE, A COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDE UM OU MAIS COMPOSTOS SELECIONADOS A PARTIR DE ISOÍNDIGO, ÍNDIGO, INDIRUBINA OU DERIVADOS DOS MESMOS, UM AGENTE ANTI-INFLAMATÓRIO E UM VEÍCULO FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL.

RESUMO**"MÉTODOS DE TRATAMENTO DE UMA DOENÇA DE TIPO INFLAMATÓRIO"**

A invenção refere-se a composições farmacêuticas e métodos de tratamento de doenças de tipo inflamatório associadas à expressão de citocinas pró-inflamatórias e/ou à expressão reduzida de citocinas anti-inflamatórias. O método compreende habitualmente a administração de um ou mais compostos selecionados a partir de isoíndigo, índigo, indirubina ou derivados dos mesmos, tais como Meisoíndigo e NATURA. Preferencialmente, a composição farmacêutica compreende um ou mais compostos selecionados a partir de isoíndigo, índigo, indirubina ou derivados dos mesmos, um agente anti-inflamatório e um veículo farmaceuticamente aceitável.

DESCRIÇÃO

"MÉTODOS DE TRATAMENTO DE UMA DOENÇA DE TIPO INFLAMATÓRIO"

CAMPO TÉCNICO

A invenção refere-se a utilizações e composições farmacêuticas e métodos de tratamento de doenças de tipo inflamatório associadas à expressão de citocinas pró-inflamatórias e/ou à expressão reduzida de citocinas anti-inflamatórias, conforme definido nas reivindicações em anexo.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A inflamação irregular e/ou anormal é um dos principais componentes de uma vasta gama de doenças humanas. As pessoas que sofrem de múltiplos distúrbios degenerativos apresentam muitas vezes níveis excessivos de marcadores pró-inflamatórios no sangue. Um tipo desses marcadores pró-inflamatórios corresponde a citocinas marcadoras pró-inflamatórias, incluindo IL-1 α , β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-17, IL-18, TNF- α , LT, LIF, Oncostatina e IFN γ , β , γ .

Uma lista não limitativa de problemas médicos comuns que são causados diretamente por citocinas inflamatórias inclui: a artrite, em que as citocinas inflamatórias provocam uma lesão na membrana sinovial e a destruição do osso e da cartilagem das articulações; a insuficiência renal, em que as citocinas inflamatórias restringem a circulação e causam lesões nos néfrones; o lúpus, em que as citocinas inflamatórias induzem um ataque autoimune; a asma, em que as citocinas inflamatórias fecham as vias aéreas; a psoríase, em que as citocinas inflamatórias induzem a dermatite; a pancreatite, em que as citocinas inflamatórias induzem uma lesão nas células pancreáticas; a alergia, em que as citocinas inflamatórias induzem reações autoimunes; a fibrose, em que as citocinas inflamatórias

atacam o tecido traumatizado; as complicações cirúrgicas, em que as citocinas inflamatórias impedem a cura; a anemia, em que as citocinas inflamatórias atacam a produção de eritropoetina; e a fibromialgia, em que as citocinas inflamatórias são elevadas em pacientes com fibromialgia. Outras doenças associadas à inflamação crônica incluem o cancro, que é provocado por inflamação crônica; o ataque cardíaco, em que a inflamação crônica contribui para a aterosclerose coronária; a doença de Alzheimer, em que a inflamação crônica destrói as células cerebrais; a insuficiência cardíaca congestiva, em que a inflamação crônica causa o enfraquecimento do músculo cardíaco; o acidente vascular cerebral, em que a inflamação crônica provoca eventos tromboembólicos; e a estenose da válvula aórtica, em que a inflamação crônica causa lesões nas válvulas do coração. A arteriosclerose, a osteoporose, a doença de Parkinson, a infecção, a doença inflamatória intestinal, incluindo a doença de Crohn e a colite ulcerativa, bem como a esclerose múltipla (uma doença de tipo inflamatório autoimune típica) estão igualmente relacionadas com a inflamação (1-18). Algumas doenças em estádios avançados podem ser potencialmente fatais. Existem diversas metodologias disponíveis para o tratamento dessas doenças inflamatórias; contudo, os resultados não são geralmente satisfatórios, conforme demonstrado por uma falta de eficácia e efeitos secundários relacionados com o fármaco associados.

Doença inflamatória intestinal

A doença inflamatória intestinal (DII) compreende a doença de Crohn (DC) e a colite ulcerativa (CU), em que ambas são doenças crônicas idiopáticas que ocorrem com uma frequência crescente em muitas partes do mundo. Nos Estados Unidos, mais de 600.000 pessoas são afetadas todos os anos. A DII pode envolver o intestino delgado e/ou o intestino grosso. A DC pode envolver qualquer parte do trato

gastrointestinal, mas mais frequentemente envolve o cólon e o intestino delgado distal. A doença pode não afetar o reto ou pode causar inflamação ou infecção com drenagem à volta do reto. Normalmente, a CU causa úlceras na parte inferior do intestino grosso, começando muitas vezes no reto. Os sintomas variam, mas podem incluir diarreia, febre e dores. Os pacientes com CU prolongada têm um risco acrescido de desenvolver cancro do cólon. Atualmente, não existe nenhum tratamento satisfatório, uma vez que a causa para a DII continua a ser pouca clara, embora tenham sido propostos mecanismos infecciosos e imunológicos. Os tratamentos de DII têm como objetivo controlar os sintomas inflamatórios, utilizando convencionalmente corticosteroides, aminossalicilatos e agentes imunossupressores padrão, tais como azatioprina (6-mer-captopurina), metotrexato e ciclosporina. Destes, as únicas terapêuticas modificadoras da doença são os agentes imunossupressores azatioprina e metotrexato, em que ambos têm um início de ação lento e apenas uma eficácia moderada. A terapêutica de longa duração pode causar uma lesão no fígado (fibrose ou cirrose) e a supressão da medula óssea. Igualmente, os pacientes tornam-se muitas vezes refratários a esse tratamento. Outros regimes terapêuticos abordam meramente os sintomas (19, 20).

Psoríase

A psoríase é uma das doenças de pele crónicas imunomediadas mais comuns que surgem em diferentes formas e vários níveis de gravidade, afetando aproximadamente 2% ou mais de 4,5 milhões de pessoas nos Estados Unidos, das quais se considera que 1,5 milhões têm uma forma moderada a grave da doença. Dez a trinta por cento dos pacientes com psoríase desenvolvem igualmente uma forma de artrite - artrite psoriática, que causa lesões no osso e no tecido conjuntivo à volta das articulações. A psoríase surge como manchas de pele vermelha levantada coberta por uma camada

branca com escamas. Além disso, pode ter um aspeto tipo borbulha (psoríase pustulosa) ou queimado (eritrodérmico). A psoríase também pode causar um ardor e uma comichão intensos. Os pacientes sofrem psicologicamente, bem como fisicamente. Atualmente, existem diversas modalidades disponíveis para o tratamento de psoríase, incluindo o tratamento tópico, a fototerapia e as aplicações sistémicas. Contudo, são consideradas geralmente como sendo apenas supressoras e modificadoras da doença. Além disso, nenhuma delas é curativa. Além do mais, muitos tratamentos são indesejáveis por razões estéticas, inconvenientes para uma utilização de longa duração ou associados a uma toxicidade significativa.

Devido a uma maior compreensão das propriedades biológicas da psoríase durante as últimas 2 décadas, foram disponibilizadas terapêuticas biológicas que têm como alvo a atividade dos linfócitos T e das citocinas responsáveis pela natureza inflamatória desta doença. Atualmente, os fármacos prescritos para a psoríase incluem os inibidores TNF- α utilizados inicialmente para o tratamento de artrite reumatoide (AR), ENBREL® (etanercept), REMICADE® (infliximab) e HUMIRA® (adalimumab), e o inibidor de células T AMEVIVE® (alefacept) de Biogen aprovado em 2002 e RAPTIVA® (Efalizumab) de Genentech/Xoma aprovado em 2003 (21). AMEVIVE ALEFACEPT® é uma proteína de fusão de imunoglobulina composta pelo primeiro domínio extracelular de LFA-3 humano fundido com a charneira, domínios C(H)2 e C(H)3 de IgG(1) humano. A mesma inibe a proliferação de células T através de células NK (22). RAPTIVA® é igualmente conhecido como anti-CD11a, um anticorpo monoclonal humanizado que tem como alvo a molécula de adesão de células T, o antigénio associado à função de leucócitos-1 (LFA-1). A prevenção da ligação de LFA-1 ao respetivo ligando (ICAM-1, molécula de adesão intercelular-1) inibe a migração e ativação de linfócitos, resultando numa menor

infiltração de linfócitos, limitando assim a cascata de eventos que originam eventualmente os sinais e sintomas da psoríase (23). Contudo, os potenciais efeitos secundários para o inibidor TNF- α são graves, incluindo o desenvolvimento de linfoma (24), o que piora a insuficiência cardíaca congestiva, resultando numa infeção séria e sépsis e em exacerbações de esclerose múltipla e problemas do sistema nervoso central (25, 26). Ao passo que os efeitos secundários do inibidor de células T de AMEVIVE®/RAPTIVA® podem ser mais toleráveis no tratamento de psoríase, RAPTIVA® é um agente imunossupressor. Os agentes imunossupressores têm o potencial para aumentar o risco de infeção, reativar infeções latentes e crónicas ou aumentar o risco de desenvolvimento de cancro.

Embora tenham sido efetuados muitos avanços na compreensão das propriedades biológicas da psoríase durante as últimas 2 décadas e tenha sido disponibilizado um tratamento não convencional para a psoríase conforme descrito acima, muito do sofrimento provocado continua a não ser tratado de forma adequada. Um inquérito de mais de 40.000 pacientes americanos com psoríase efetuado pela National Psoriasis Foundation em 1998 mostrou que 79% dos pacientes mais jovens se sentiam frustrados por causa da ineficácia do respetivo tratamento. Dos pacientes com a doença grave, 32% consideravam que o tratamento não era suficientemente agressivo (27, 28).

Artrite Reumatoide

A artrite reumatoide (AR) representa outro exemplo de distúrbios inflamatórios problemáticos. Trata-se de uma doença de tipo inflamatório crónica comum caracterizada por inflamação crónica no revestimento da membrana (a membrana sinovial) das articulações e/ou outros órgãos internos. As células inflamatórias também podem invadir e causar lesões no osso e na cartilagem. A articulação envolvida pode perder o respetivo formato e alinhamento, resultando em

perda de movimento. Os pacientes com AR sentem dor, rigidez, calor, vermelhidão e inchaço na articulação, e outros sintomas sistêmicos, tais como febre, fadiga e anemia. Atualmente, estão afetados cerca de 1% da população ou 2,1 milhões de pessoas nos E.U.A., dos quais são mais mulheres (1,5 milhões) do que homens (0,6 milhões). A patologia de AR não é totalmente compreendida, embora a cascata de reações imunológicas impróprias tenha sido proposta como um mecanismo. Infelizmente, o tratamento convencional é insuficiente na AR (29). A doença não responde completamente às medicações sintomáticas, incluindo corticosteroides e fármacos anti-inflamatórios não-esteroides (NSAIDs) utilizados desde os anos 50 do século XX. Igualmente, estes medicamentos têm o risco de efeitos adversos graves. Os efeitos terapêuticos dos fármacos antirreumáticos modificadores da doença (DMARDs), tais como Metotrexato (MTX), são muitas vezes inconsistentes e de curta duração.

Uma nova classe de DMARDs (fármacos antirreumáticos modificadores da doença) biológicos para o tratamento de AR foi recentemente desenvolvida com base na compreensão do papel das citocinas, TNF- α e IL-1, no processo inflamatório. A FDA aprovou diversos DMARDs, incluindo ENBREL® (etanercept) de Immunex/Amgen Inc. em 1998, REMICADE® (infliximab) de Centocor/Johnson & Johnson, HUMIRA® (adalimumab) de Abbott Laboratories Inc. em 2002 e KINERET® (anakinra) de Amgen em 2001. ENBREL® é uma proteína recombinante do recetor TNF (TNFR) solúvel. REMICADE® é um anticorpo monoclonal anti-TNF- α (quimérico) de ratinho humanizado. HUMIRAL® é um anticorpo monoclonal anti-TNF totalmente humano criado utilizando a tecnologia de *Phage Display* (visualização de fagos) que resulta num anticorpo com regiões variáveis de cadeia pesada e leve derivadas de seres humanos e regiões constantes de IgG1:k humana. Todos estes 3 fármacos à base de proteínas têm como

alvo e ligam-se a $\text{TNF-}\alpha$ para bloquear os efeitos de $\text{TNF-}\alpha$. KINERET® é um antagonista recetor IL-1 recombinante, que é semelhante a IL-1Ra humano nativo, exceto no que respeita à adição de um único resíduo de metionina no respetivo amino-terminal. KINERET® bloqueia a atividade biológica de IL-1 inibindo de forma competitiva a ligação de IL-1 ao recetor de tipo I IL-1 (IL-1RI) e reduzindo consequentemente os efeitos pró-inflamatórios de IL-1.

O tratamento com estes DMARDs biológicos alivia os sintomas, inibe a progressão da lesão estrutural e melhora a função física nos pacientes com AR ativa moderada a grave. Os 3 agentes de bloqueio $\text{TNF-}\alpha$ comercializados têm uma eficácia semelhante quando combinados com MTX, um DMARD muito utilizado, no tratamento de pacientes com AR (30). Embora forneçam uma eficácia significativa e um bom perfil de segurança global a curto e médio prazo a muitos pacientes com AR, estes tratamentos biológicos podem criar problemas graves e efeitos secundários de longa duração, tais como no fígado, e ainda necessitam de ser avaliados. Tem existido uma associação perturbadora entre a utilização de ENBREL® ou REMICADE® e o desenvolvimento de linfoma (24). Conforme descrito acima, diversos relatórios mostraram que os pacientes tratados com ENBREL® ou REMICADE® pioraram a sua insuficiência cardíaca congestiva e desenvolveram uma infeção grave e sépsis, bem como aumentaram as exacerbações de esclerose múltipla e outros problemas do sistema nervoso central (26, 27).

Esclerose Múltipla

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença autoimune diagnosticada em 350.000 a 500.000 pessoas nos Estados Unidos. A doença é denotada por múltiplas áreas de inflamação e cicatrizes da mielina no cérebro e medula óssea. Os pacientes com EM apresentam vários graus de disfunção neurológica dependendo do local e da extensão das cicatrizes da mielina. Os sintomas comuns da EM incluem

fadiga, debilidade, espasticidade, problemas de equilíbrio, problemas de bexiga e intestinos, entorpecimento, perda de visão, tremores e depressão. O tratamento atual de EM apenas alivia os sintomas ou atrasa a progressão da incapacidade, e diversos novos tratamentos para a EM, incluindo o transplante de células estaminais e a terapia de genes, são conservadores (31, 32). Ao passo que os anticorpos anti-TNF demonstraram efeitos protetores na encefalomielite autoimune experimental (EAE), os mesmos agravaram a doença nos pacientes com EM, sugerindo que a inibição de TNF- α sozinha não é suficiente (33).

Distúrbios Neurodegenerativos

A doença de Alzheimer (DA) e a doença de Parkinson (DP) são os 2 distúrbios neurodegenerativos mais comuns. A DA é um distúrbio cerebral. Esta doença afeta gravemente a capacidade de uma pessoa para realizar a suas atividades diárias. A mesma envolve as partes do cérebro que controlam o pensamento, a memória e a fala. É estimado que cerca de 4 milhões de americanos, habitualmente com mais de 60 anos, sofram de DA.

A DP é um distúrbio progressivo do sistema nervoso central que afeta mais de 1,5 milhões de pessoas nos Estados Unidos. Clinicamente, a doença é caracterizada por uma diminuição nos movimentos espontâneos, dificuldade em andar, instabilidade postural, inflexibilidade e tremor. A DP é causada pela degeneração dos neurónios pigmentados na substância negra do cérebro, resultando numa menor disponibilidade de dopamina. As causas destes distúrbios neurodegenerativos são desconhecidas e, atualmente, não existe cura para a doença.

Deste modo, são necessárias novas abordagens para o tratamento das doenças de tipo inflamatório indicadas acima e outras. Embora os mecanismos através dos quais são causadas as doenças de tipo inflamatório sejam pouco claros, e muitas vezes variem entre si, foi demonstrado que

a disfunção do sistema imunitário causada pela desregulação de citocinas desempenha um papel importante na iniciação e progressão da inflamação (Quadro 1) (27, 34, 35).

Geralmente, as citocinas podem ser classificadas em 3 tipos: pró-inflamatórias (IL-1 α , β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-17, IL-18, TNF- α , LT, LIF, Oncostatina e IFN γ , α , β , γ); anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 e TGF β); e quimiocinas (IL-8, Gro α , MIP-1, MCP-1, ENA-78 e RANTES).

Em muitas condições inflamatórias, as citocinas pró-inflamatórias, especialmente TNF- α , IL-1 β e IL-6, bem como a citocina anti-inflamatória IL-10, parecem desempenhar um papel importante na patogênese de várias doenças de tipo inflamatório e, por conseguinte, podem servir como potenciais alvos terapêuticos. Por exemplo, foram observados níveis elevados de algumas citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN γ , IL-1, IL-2, IL-6 e IL-12) e quimiocinas (IL-8, MCP-1 e RANTES) em diversas doenças de tipo inflamatório, tais como DC, psoríase, AR, doença de Grave e tiroidite de Hashimoto (34), que são equivalentes a um aumento nos recetores TNF solúveis, antagonistas recetores IL-1 e na citocina anti-inflamatória IL-10 (36, 37). IL-10 mostrou suprimir uma produção elevada de citocinas pró-inflamatórias, tanto *in vitro* em culturas LPMC como *in vivo* em pacientes (38). A resposta positiva de pacientes com DC tratados com IL-10 demonstra que também poderá existir um desequilíbrio entre a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias na DC.

Resumindo, a abordagem do tratamento de doenças de tipo inflamatório passou por uma alteração gradual nos últimos anos, em parte como uma consequência das crescentes preocupações da gravidade destas doenças e em parte devido ao progresso considerável na compreensão do importante papel das citocinas na respetiva imunopatogénese. A maioria dos esforços concentrou-se em ter como alvo TNF- α e IL-1

(39), e diversos produtos (inibidores TNF- α : infliximab, um anticorpo anti-TNF- α monoclonal; e etanercept, o recetor TNF- α p75) são atualmente comercializados ou utilizados em ensaios clínicos para o tratamento de AR, psoríase e DII conforme mencionado acima. Diversos outros candidatos a fármaco ou estratégias que têm como alvo EL-1 (40), IL-6 ou IL-10 estão em desenvolvimento (40-42). Estes tratamentos biológicos fornecem uma eficácia significativa a curto e médio prazo em muitos pacientes com AR (43-46). Embora estes fármacos sejam bem tolerados e tenham um bom perfil de segurança global, é necessária uma farmacovigilância ativa. Com base no respetivo mecanismo de ação e nas notificações anteriores de uma vasta variedade de efeitos adversos, os riscos a longo prazo de efeitos secundários, incluindo efeitos hematológicos, infecciosos, neurológicos, oncológicos e imunológicos, necessitam de ser examinados.

As estratégias para terem como alvo uma única citocina pró-inflamatória como uma terapia anti-inflamatória ignoram um facto muito importante, que é o de as doenças de tipo inflamatório envolverem um "sistema" de rede de citocinas sofisticado. Por exemplo, as quimiocinas, uma família de moléculas imunes relacionadas com IL-8, contêm aproximadamente 50 ligandos e 20 recetores, muitas vezes funcionando com redundância, tornando assim a seleção de antagonistas específicos apropriados não só difícil, como também sem uma eficácia a longo prazo. Além disso, os produtos comercializados atualmente ou produtos em desenvolvimento são sobretudo agentes à base de proteínas, que têm uma produção dispendiosa e uma administração inconveniente (ou seja, infusão). Por conseguinte, uma vez que o funcionamento do sistema imunitário é minuciosamente equilibrado pelas atividades de citocinas ou mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, a modulação de múltiplas citocinas pró/anti-inflamatórias, em vez de bloquear apenas uma determinada citocina pró-inflamatória

através de moléculas pequenas, não só deve alcançar uma melhor eficácia terapêutica com menos efeitos secundários, como também ter as muitas vantagens dos fármacos de moléculas pequenas.

Com base neste conceito, foram examinados diversos tipos de moléculas pequenas para testar a respetiva capacidade na regulação de múltiplas citocinas e exploradas as respetivas potenciais aplicações clínicas relativamente ao tratamento de uma variedade de doenças de tipo inflamatório.

O Meisoíndigo foi utilizado para o tratamento de leucemia mieloide crónica (LMC) na China com menos efeitos secundários (47). Na patente anterior (Patente U.S. n.º 6.566.341), foi demonstrado que o Meisoíndigo e os compostos semelhantes são ativos contra os tumores sólidos através da respetiva capacidade de inibir as quinases dependentes de ciclinas, induzir diferenciação celular e provocar a apoptose. Na invenção atual, são apresentadas novas atividades terapêuticas desta classe de moléculas no tratamento de várias doenças de tipo inflamatório, incluindo doenças inflamatórias intestinais e psoríase nos roedores, bem como nos seres humanos. Foi demonstrado que este tipo de agente inibe a secreção e a expressão de múltiplas citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-6 e TNF- α nas linhas celulares, e provoca a produção da citocina anti-inflamatória IL-10. Num caso humano, o Meisoíndigo também mostra ser muito eficaz contra DII, embora não tenham sido observados nenhuns efeitos secundários significativos.

O documento EP 1 079 826 de et al., intitulado "Use of Indigoid Bisindole Derivatives for the Manufacture of a Medicament to Inhibit Cyclin Dependent Kinases", é orientado para a utilização de derivados de bisindol indigoide para o fabrico de um medicamento para o tratamento de doenças associadas à perda de controlo de

proliferação. De acordo com o documento EP 1 079 826, a psoríase, as doenças cardiovasculares, as doenças infecciosas, a nefrologia, os distúrbios neurodegenerativos e as infecções virais são todas doenças associadas à perda de controlo de proliferação celular. O documento EP 1 079 826 explica que o medicamento é eficaz no tratamento destas doenças associadas à perda de controlo de proliferação inibindo as quinases dependentes de ciclinas (CDKs).

Em oposição, os Requerentes descobriram que o isoíndigo, o índigo, a indirubina e os derivados dos mesmos podem ser utilizados para suprimir ou inibir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, por ex., TNF- α , IL-1 e IL-6, para tratar doenças de tipo inflamatório associadas à expressão de citocinas.

Embora determinadas doenças mencionadas no documento EP 1 079 826 como estando associadas à perda de controlo de proliferação celular também estejam relacionadas com a expressão de citocinas, os Requerentes descobriram que a quantidade de agente terapêutico necessária para tratar estas doenças correspondentes através da inibição dos níveis de citocina é significativamente menor em comparação com a necessária para inibir CDKs conforme explicado no documento EP 1 079 826.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção é definida nas reivindicações em anexo e permite o tratamento de uma variedade de doenças de tipo inflamatório com o mínimo de efeitos secundários. Uma das vantagens mais importantes da presente invenção é que os compostos terapêuticos não só abordam sintomas de várias doenças de tipo inflamatório, como também modificam as doenças através de supressão da expressão/secreção de múltiplas citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-17, IL-18, TNF- α , LT, LIF, Oncostatin ou IFN γ , α , β , γ) e/ou através de estimulação da expressão de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-

11, W-13 ou TGF β).

De um modo semelhante, os documentos DE 100 53 474, WO 02/074742, WO 03/100401, WO 02/092079, WO 03/051900 e US 2002/132792 são todos orientados para a atividade inibidora de CDK de compostos específicos.

A presente invenção resulta muitas vezes numa cura em vez de simplesmente numa remissão temporária dos sintomas da doença. Em oposição, as terapias existentes para as doenças de tipo inflamatório, na maioria dos casos, apenas aliviam os sintomas durante um curto período de tempo. Além disso, os compostos terapêuticos da presente invenção são moléculas pequenas que são simples, quimicamente estáveis e são substancialmente fáceis de produzir e administrar. Além do mais, os Requerentes descobriram que, em comparação, pequenas dosagens/concentrações dos compostos são geralmente suficientes para inibir substancialmente as citocinas pró-inflamatórias no paciente, reduzindo o risco dos efeitos secundários associados ao tratamento.

As composições farmacêuticas aqui descritas incluem preferencialmente, pelo menos, um composto selecionado a partir da fórmula (I) ou (II) conforme definido nas reivindicações, um agente anti-inflamatório e um veículo farmacêuticamente aceitável.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 é uma representação esquemática dos papéis das citocinas pró-/anti-inflamatórias e fatores de crescimento, bem como dos locais de ação de Meisoíndigo no processo patológico de doenças de tipo inflamatório crónicas.

A Figura 2 ilustra o efeito de Meisoíndigo na secreção de IL-1 β nas células THP-1 monocíticas humanas estimuladas por LPS. Efeito inibidor de Meisoíndigo na produção de IL-1 β nas células THP-1 monocíticas humanas estimuladas por LPS. As células THP-1 foram tratadas/estimuladas com e sem 1 μ g de lipopolissacárido (LPS, Sigma) e expostas durante

24 horas a uma série de concentrações de Meisoíndigo (de 31,25 nM a 16.000 nM). A viabilidade das células foi examinada no microscópio após a coloração com azul de tripano. Os níveis de proteína de IL-1 β segregados nos meios de cultura foram medidos através de ELISA e calculados a partir da respectiva curva padrão (painel A) utilizando um Kit de ensaio de R&D Systems conforme descrito em Materiais e Métodos no Exemplo 1 abaixo. O teste t de Student foi utilizado para determinar a significância estatística, *** indica $P < 0,001$. Conforme ilustrado no painel B, o Meisoíndigo inibe significativamente a produção de IL-1 β na concentração tão baixa como 31 nM.

A Figura 3 ilustra o efeito de Meisoíndigo na secreção e expressão de IL-6 nas células THP-1 monocíticas humanas estimuladas por LPS. Efeitos de Meisoíndigo na produção (painel B) e transcrição (painel C) de IL-6 nas células THP-1 estimuladas por LPS: as células THP-1 foram tratadas/estimuladas com e sem 1,0 μ g/ml de LPS e expostas a uma série de concentrações de Meisoíndigo (de 0,031 a 16 μ M) durante 24 horas. A proteína IL-6 nos meios foi medida através de ELISA, e a transcrição de IL-6 nas células foi medida através de PCR em tempo real conforme descrito em Materiais e Métodos no Exemplo 2 abaixo. Painel A: curva padrão estabelecida utilizando a proteína IL-6 pura e utilizada para o cálculo da produção de proteínas no painel B; Painel C: ensaio de PCR em tempo real para a transcrição de IL-6. ***: $< 0,001$. Conforme ilustrado nos painéis B e C, o Meisoíndigo inibe significativamente tanto a secreção como a transcrição de IL-6.

A Figura 4 ilustra o efeito de Meisoíndigo na secreção e expressão de TNF- α nas células THP-1 monocíticas humanas. Efeitos de Meisoíndigo na produção de proteínas (painel B) e transcrição de genes (painel C) de TNF- α nas células THP-1 estimuladas por LPS: as células THP-1 foram

tratadas/estimuladas com e sem 1,0 µg/ml de LPS e expostas a uma série de concentrações de Meisoíndigo (de 0,031 a 16 µM) durante 24 horas. A proteína TNF-α nos meios foi medida através de ELISA, e a respectiva transcrição nas células foi medida através da tecnologia de PCR em tempo real conforme descrito em Materiais e Métodos no Exemplo 3 abaixo. Painel A: curva padrão estabelecida utilizando a proteína TNF-α pura e utilizada para o cálculo da produção de proteínas no painel B. Uma inibição dependente da concentração de Meisoíndigo na secreção de TNF-α foi obtida (painel B). Painel C: ensaio de PCR em tempo real para a transcrição de TNF-α. Não foi observado nenhum efeito do agente na transcrição de TNF-α. ***: $P < 0,001$.

A Figura 5 ilustra a estimulação de IL-10 através de Meisoíndigo nas células THP-1. Estimulação de Meisoíndigo na produção de IL-10 nas células THP-1 tratadas com LPS: as células THP-1 foram tratadas com e sem 1,0 µg/ml de LPS e expostas a uma série de concentrações de Meisoíndigo (de 0,031 a 16 µM) durante 24 horas. A proteína IL-10 nos meios foi medida através de ELISA conforme descrito em Materiais e Métodos no Exemplo 4 abaixo. Painel A: curva padrão estabelecida utilizando a proteína IL-10 pura e utilizada para o cálculo da produção de proteínas no painel B. Ao passo que o LPS estimulante inflamatório diminuiu o nível de proteínas de IL-10, o Meisoíndigo aumentou significativamente a produção de proteínas, e o efeito de estimulação máximo ocorreu a 62,5 nM com um aumento para aproximadamente o dobro da secreção de IL-10 (painel B). **: $P < 0,01$.

A Figura 6 ilustra os efeitos de Meisoíndigo e NATURA na Expressão de Citocinas Pró-inflamatórias e Quinases dependentes de Ciclinas nas células THP-1: as células THP-1 que cresceram exponencialmente foram estimuladas com (painéis A e B) e sem (painel C) 1 µg de LPS, e expostas durante 24 horas às concentrações indicadas de Meisoíndigo

ou NATURA. A viabilidade das células foi examinada através do ensaio de exceção com azul tripiano. Os níveis de proteínas de IL-1 β , IL-6 e IL-10 segregados nos meios de cultura foram medidos através de ELISA conforme descrito nos exemplos acima utilizando um Kit de ensaio de R&D Systems conforme descrito em Materiais e Métodos do Exemplo 5 abaixo. O teste t de Student foi utilizado para determinar a significância estatística, * indica $P < 0,001$. O Meisoíndigo e NATURA inibem significativamente a produção de IL-1 β e IL-6 e provocaram a produção de IL-10 em concentrações de 31,25 e 62,5 nM. Em oposição, não foi observado nenhum efeito inibidor dos compostos na CDK2 nas concentrações baixas (31,25 e 62,50 nM) nas mesmas condições experimentais.

A FIG. 7 ilustra que o Meisoíndigo é eficaz contra a colite ulcerativa aguda induzida por DSS nos ratinhos. Exemplos de histoquímica de paredes cólicas de colite ulcerativa aguda induzida por 5% de DSS em ratinhos Balb/c tratados com e sem Meisoíndigo (coloração H&E, ampliação original x 100). A indução por DSS e o tratamento com Meisoíndigo foram efetuados conforme descrito em Materiais e Métodos no Exemplo 7 abaixo. O painel A ilustra a morfologia normal da parede cólica de animais do grupo de controlo normal que beberam água potável sem DSS. O painel B ilustra a parede cólica de um ratinho com colite ulcerativa aguda induzida por 5% de DSS que indica a presença de infiltração grave de células inflamatórias (folículos linfáticos, setas vermelhas) e o desaparecimento focal de criptas da mucosa (lesões erosivas, setas azuis). O painel C ilustra a parede cólica de um ratinho tratado com Meisoíndigo com colite ulcerativa aguda induzida por 5% de DSS. A morfologia é semelhante à ilustrada no controlo normal (painel A), indicando que o Meisoíndigo é eficaz contra a colite ulcerativa aguda induzida por DSS nos ratinhos.

A FIG. 8 corresponde a fotografias de sigmoidoscopia flexível de um paciente com doença inflamatória intestinal antes e após o tratamento com Meisoíndigo. Os painéis superiores são as fotografias de dois locais de inflamação (A e B) que apresentam claramente inflamação com um edema grave. O exame patológico efetuado por um patologista do Mount Sinai Medical Center na Cidade de Nova Iorque concluiu "proctocolite crónica gravemente ativa com erosão e características sugestivas de doença inflamatória intestinal idiopática". Os painéis inferiores correspondem às fotografias de sigmoidoscopia flexível das mesmas localizações 9 semanas após o tratamento do paciente com Meisoíndigo. Após o tratamento, a superfície do cólon ficou normal, o edema desapareceu e os vasos sanguíneos podem ser observados claramente, embora existam cicatrizes na localização B (painel inferior) durante a remissão. O relatório patológico concluiu "proctocolite crónica inativa sugestiva de doença inflamatória intestinal idiopática".

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS

A presente invenção é definida nas reivindicações em anexo. Uma utilização preferida da presente invenção compreende a administração a um animal que necessita desse tratamento de um ou mais compostos conforme definido nas reivindicações.

Convém compreender que os presentes métodos incluem, mas não se limitam a, tratamento da doença de tipo inflamatório através da prevenção da inflamação associada à doença regulando as citocinas envolvidas no progresso patológico, impedindo assim o início da doença inflamatória.

A doença de tipo inflamatório é selecionada a partir do grupo que consiste em: doença inflamatória intestinal; artrite reumatoide; e lúpus. Preferencialmente, a doença inflamatória intestinal corresponde a doença de Crohn ou colite ulcerativa.

Outras doenças de tipo inflamatório aqui divulgadas, mas não reivindicadas, incluem: psoríase; esclerose múltipla; um distúrbio neurodegenerativo; insuficiência cardíaca congestiva; acidente vascular cerebral; estenose da válvula aórtica; insuficiência renal; pancreatite; alergia; fibrose; anemia; aterosclerose; uma doença metabólica; uma doença óssea; uma doença cardiovascular, uma complicação relacionada com quimioterapia/radiação; diabetes de tipo I; diabetes de tipo II; uma doença do fígado; um distúrbio gastrointestinal; uma doença oftalmológica; conjuntivite alérgica; retinopatia diabética; síndrome de Sjogren; uveíte; um distúrbio pulmonar, uma doença renal; dermatite; caquexia relacionada com o VIH; malária cerebral; espondilite anquilosante; lepra; anemia; e fibromialgia.

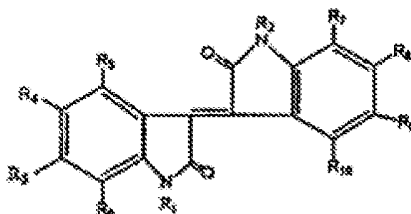
Os distúrbios neurodegenerativos aqui descritos incluem: doença de Alzheimer e doença de Parkinson; a complicação gastrointestinal é diarreia; a doença do fígado é selecionada a partir do grupo que consiste: numa hepatite autoimune, hepatite C, cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária ou insuficiência hepática fulminante; o distúrbio gastrointestinal é selecionado a partir do grupo que consiste em: doença celíaca e colite não específica; a doença óssea é osteoporose; o distúrbio pulmonar é selecionado a partir do grupo que consiste em: rinite alérgica, asma, doença pulmonar obstrutiva crónica, inflamação granulomatosa crónica, fibrose quística e sarcoidose; a doença cardiovascular é selecionada a partir do grupo que consiste em: doença cardíaca aterosclerótica, insuficiência cardíaca congestiva e restenose; e a doença renal é selecionada a partir do grupo que consiste em: glomerulonefrite e vasculite.

O composto é um quantidade para inibir a expressão de citocinas pró-inflamatórias e/ou estimular a expressão de citocinas anti-inflamatórias. Numa forma de realização, o

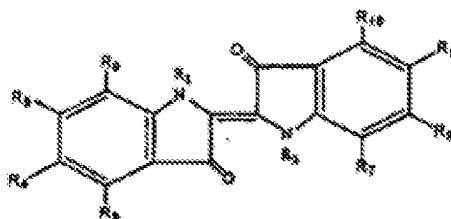
composto encontra-se preferencialmente numa quantidade para inibir, pelo menos, 30% da expressão de uma ou mais das citocinas pró-inflamatórias selecionadas a partir do grupo que consiste em: IL-1 α , β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-17, IL-18, TNF- α , LT, LIF, Oncostatina e IFN γ , α , β , γ . Mais preferencialmente, pelo menos, são inibidos 40% da expressão da citocina e, ainda mais preferencialmente, são inibidos 50% ou mais. Noutra forma de realização, o composto encontra-se preferencialmente numa quantidade para estimular a expressão de citocinas anti-inflamatórias. Nesta forma de realização, o composto encontra-se preferencialmente numa quantidade para aumentar a citocina anti-inflamatória selecionada a partir do grupo que consiste em: citocina IL-4, IL-10, IL-11, W-13 ou TGF β em, pelo menos, 25%, mais preferencialmente, pelo menos 50% e, ainda mais preferencialmente, pelo menos, 75%.

Estruturas Químicas:

A presente invenção é orientada para a utilização de um grupo específico de compostos da Fórmula (I) ou (II)



FÓRMULA (I)



FÓRMULA (II)

em que R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 e R_{10} são iguais ou diferentes e representam um átomo de hidrogénio; um grupo hidroxí; um grupo nitroso; um grupo nítro; um monossacárido; um dissacárido; um átomo de halogéneo; um grupo hidrocarbilo; ou um grupo hidrocarbilo funcional não substituído ou substituído por uma ou mais porções de hidroxí, porções de carboxí, porções de nítroxi, monossacáridos, dissacáridos, aínas, amidas, tióis, sulfatos, sulfonatos, sulfonamidas ou halogéneos, em que o hidrocarbilo tem 1 a 8 átomos de carbono; um grupo $-R_{11}R_{12}$, em que R_{11} e R_{12} podem ser iguais ou diferentes e representam um átomo de hidrogénio, um grupo alquilo de cadeia linear ou cadeia ramificada com 1 a 18 átomos de carbono que podem incluir adicionalmente um ou mais grupos hidroxí e/ou aínio, um grupo arilo substituído ou não substituído que pode compreender um ou mais heteroátomos, ou um grupo acilo, ou R_{11} e R_{12} formam em conjunto um anel com 2 a 6 grupos CH_2 opcionalmente substituídos; um grupo azo $-N=N-R_{13}$, em que R_{13} representa um sistema aromático que pode ser substituído por um ou mais grupos carboxilo e/ou grupos fosforilo, ou um grupo selecionado a partir do grupo que consiste em açúcares, aínioácidos, péptidos ou hormonas esteroides; ou R_1 e R_6 , e R_2 e R_7 , respetivamente, formam independentemente uns dos outros um anel em conjunto com 1 a 4 grupos CH_2 opcionalmente substituídos.

Os grupos R_1 e R_2 são iguais ou diferentes e representam um átomo de hidrogénio; um átomo de halogéneo; um grupo hidroxí; um grupo hidrocarbilo ou um grupo hidrocarbilo funcional não substituído ou substituído por uma ou mais porções de hidroxí, porções de carboxí, porções de nítroxi, monossacáridos, dissacáridos, aínas, amidas, tióis, sulfatos, sulfonatos, sulfonamidas ou halogéneos, em que o hidrocarbilo tem 1 a 8 átomos de carbono; um grupo mono-, di- ou triálquilsililo com 1 a 6 átomos de carbono independentemente uns dos outros em cada instância no grupo

alquilo de cadeia linear ou cadeia ramificada; um grupo mono-, di- ou triarilsililo com grupos arilo substituídos ou não substituídos independentemente uns dos outros em cada instância; um grupo $-NR_{17}R_{18}$, em que R_{17} e R_{18} podem ser iguais ou diferentes e representam um átomo de hidrogénio, um grupo alquilo de cadeia linear ou cadeia ramificada com 1 a 18 átomos de carbono que podem incluir adicionalmente um ou mais grupos hidroxil e/ou amino, um grupo arilo substituído ou não substituído que pode compreender um ou mais heteroátomos, ou um grupo acilo; um grupo metilenoamino $-CH_{17}R_{18}$, em que R_{17} e R_{18} têm as definições acima; um resíduo de aminoácido fisiológico ligado ao azoto como uma amida, monossacárido substituído ou não substituído, dissacáridos ou oligossacáridos; ou um açúcar, aminoácido, péptido ou hormona esteroide.

Os compostos preferidos são aqueles nos quais, pelo menos, um R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 ou R_{10} é independentemente um monossacárido, um dissacárido ou um grupo hidrocarbilo ou um grupo hidrocarbilo funcional substituído por uma ou mais porções de hidroxil, porções de carboxil, porções de nitroxil, monossacáridos, dissacáridos, aminas, amidas, tióis ou halogéneos, em que o hidrocarbilo tem 1 a 8 átomos de carbono; e pelo menos um de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 ou R_{10} melhora a bioatividade ou biodisponibilidade do composto.

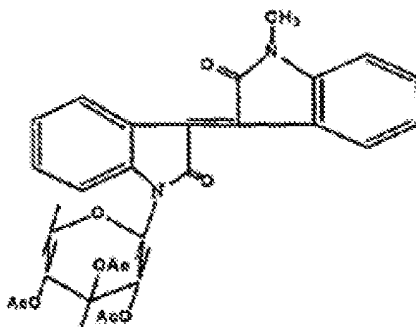
É preferível que R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 ou R_{10} melhore a bioatividade ou a biodisponibilidade do composto aumentando a solubilidade do composto. É mais preferível que tanto a bioatividade como a biodisponibilidade sejam aumentadas em um ou mais de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 ou R_{10} .

Os compostos preferidos são aqueles nos quais, pelo menos, R_1 ou R_2 é um monossacárido; um dissacárido não substituído ou substituído por uma ou mais porções de hidroxil ou porções de carboxil; um halogéneo; um grupo

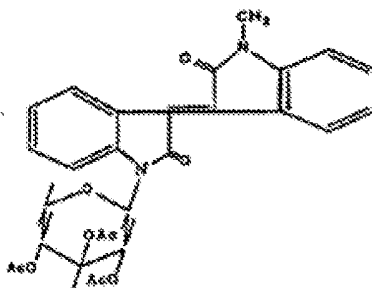
hidrocarbilo ou um grupo hidrocarbilo funcional não substituído ou substituído por uma ou mais porções de hidroxil, porções de carboxil, porções de nitroxil, monossacáridos, dissacáridos, aminas, amidas, tióis, sulfatos, sulfonatos, sulfonamidas ou halogéneos, em que o hidrocarbilo tem 1 a 8 átomos de carbono. Em muitos casos, apenas um de R_1 ou R_2 necessita de ser uma das porções indicadas, com um dos substituintes mais preferidos sendo $-CH_2CH_2OH$.

Os compostos mais preferidos da Fórmula (I) ou (II) são aqueles nos quais R_1 ou R_2 corresponde a uma molécula glicosídica, mais preferencialmente um monossacárido, e mais preferencialmente um monossacárido acetilado.

Numa forma de realização da invenção, as utilizações envolvem os compostos Meisoíndigo, glico-Meisoíndigo triacetilado (pró-fármaco) (ilustrado como Fórmula (V)) e NATURA (ilustrado como Fórmula (VI)).



FÓRMULA (V)



FÓRMULA (VI)

O termo "hidrocarbilo" no contexto da presente invenção, e nas fórmulas acima, refere-se em geral a um grupo hidrocarbono monovalente, no qual a valência é obtida por extração de um hidrogénio a um átomo de carbono. O hidrocarbilo inclui, por exemplo, grupos alifáticos (cadeia linear e ramificada), cicloalifáticos, aromáticos e de carácter misto (por ex., aralquilo e alcarilo). O hidrocarbilo inclui igualmente esses grupos com insaturação interna e insaturação ativada. Mais especificamente, o hidrocarbilo inclui (mas não se limita a) esses grupos como alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, alcarilo, alquenilo, cicloalquenilo e alquinilo, preferencialmente com, no máximo, 12 átomos de carbono. As formas de realização preferidas incluem aquelas nas quais o grupo hidrocarbilo tem 1 a 8 átomos de carbono. Estes e outros grupos hidrocarbilo podem opcionalmente conter um grupo ou grupos carbonilo (que é/são incluído(s) na contagem de carbono) e/ou um heteroátomo ou heteroátomos (tais como, pelo menos, um oxigénio, enxofre, azoto ou silício) na cadeia ou anel.

O termo "hidrocarbilo funcional" no contexto da presente invenção, e nas fórmulas acima, refere-se em geral a um hidrocarbilo com um pêndulo e/ou funcionalidades "reativas" de terminal e/ou "reativas latentes" e/ou grupos de partida. As funcionalidades reativas referem-se a funcionalidades que são reativas com funcionalidades comuns de monómero/polímero em condições normais bem compreendidas pelos peritos na técnica relevante. Os exemplos de funcionalidades reativas são grupos que contêm hidrogénio ativo, tais como hidroxilo, amino, carboxilo, tio, amido, carbamoil e metileno ativado; grupos isocianato, ciano e epoxi; grupos etilenicamente insaturados, tais como alilo e metalilo; e grupos insaturados ativados, tais como acrilóil e metacrilóil, e maleato e maleimido (incluindo as aduções de Diels-Alder dos mesmos com dienos, tais como butadieno).

As funcionalidades reativas latentes no significado da presente invenção, e tal como será claramente compreendido pelos peritos na técnica relevante, referem-se a funcionalidades reativas que são bloqueadas ou dissimuladas para impedir uma reação prematura. Os exemplos de funcionalidades reativas latentes são cetiminas e aldiminas (aminas bloqueadas, respetivamente, com cetonas e aldeídos); sais de amina-carboxilato; e isocianatos bloqueados, tais como álcool (carbamatos), oxima e variações bloqueadas de caprolactama. Um grupo "de partida" no significado da presente invenção, e tal como será claramente compreendido pelos peritos na técnica relevante, é um substituinte ligado à cadeia ou ao anel de hidrocarbilo que, durante a reação, é deslocado para criar uma valência num átomo de carbono ou heteroátomo na cadeia ou anel de hidrocarbilo. Os exemplos de grupos de saída são átomos de halogéneo, tais como cloro, bromo e iodo; sais de amónio quaternário; sais de sulfónio; e sulfonatos.

Um monossacárido ou dissacárido da presente invenção é preferencialmente glicose, frutose, ribulose, galactose, manose, celobiose, alose, altrose, ribose, xilose, arabinose, sacarose ou lactose. Mais preferencialmente, trata-se de D-glicose, D-ribose, D-galactose, D-lactose, D-xilose ou D-sacarose.

Numa forma de realização preferida, o monossacárido ou dissacárido é acetilado, preferencialmente, pelo menos, di-acetilado e, mais preferencialmente, tri-acetilado.

O termo "halogéneo" indica flúor, cloro, bromo ou iodo. Preferencialmente, trata-se de flúor ou cloro.

Conforme aqui utilizado, aminoácido significa um L- ou D-aminoácido (ou um resíduo do mesmo), preferencialmente L-, selecionado a partir do grupo que consiste em alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina,

triptofano, tirosina ou valina. O termo péptido corresponde a dois ou mais aminoácidos unidos por uma ligação peptídica, preferencialmente com 2 a 8 aminoácidos e, mais preferencialmente, com 2 a 6 aminoácidos.

Administração e Preparações Farmacêuticas

A invenção pode ser utilizada para tratar um animal com uma doença de tipo inflamatório conforme definido nas reivindicações, em que é preferível que o animal seja um mamífero e, mais preferível, que o animal seja um ser humano.

Convém igualmente mencionar que os benefícios terapêuticos são habitualmente realizados pela administração de, pelo menos, 1, 2, 3 ou mais dos compostos de forma simultânea ou sequencial. Os compostos conforme definido nas reivindicações também podem ser combinados com outras terapias para fornecer quantidades terapeuticamente eficazes combinadas. O composto pode ser administrado, por exemplo, em conjunto com agentes adicionais, preferencialmente agentes anti-inflamatórios.

Numa forma de realização preferida, a composição farmacêutica para o tratamento de uma doença inflamatória associada à expressão de citocinas pró-inflamatórias conforme definido nas reivindicações inclui um ou mais compostos conforme descrito acima; um agente anti-inflamatório, e um veículo farmaceuticamente aceitável, em que o agente anti-inflamatório é selecionado a partir do grupo que consiste: num analgésico; num agente antirreumático; num agente gastrointestinal; numa preparação contra a gota; em glicocorticoides; numa preparação oftálmica; num agente respiratório; numa preparação nasal; e num agente de membrana mucosa.

Preferencialmente, o analgésico é selecionado a partir do grupo que consiste em: naproxeno, indometacina, ibuprofeno, cetorolaco de trometamina, trissalicilato de magnésio de colina e rofecoxib; o agente antirreumático é

selecionado a partir do grupo que consiste em: ciclosporina, sulfassalazina, valdecoxib, penicilamina e dexametasona; o agente gastrointestinal é selecionado a partir do grupo que consiste em: mesalamina, balsalazida dissódica e olsalazina sódica; a preparação para a gota é sulindac; o glicocorticoide é selecionado a partir do grupo que consiste em: dexametasona, fosfato de dexametasona, acetato de metilprednisolona, hidrocortisona e fosfato de sódio de hidrocortisona; a preparação nasal é selecionada a partir do grupo que consiste em monohidrato de dipropionato de beclometasona, propionato de fluticasona, acetonido de triancinolona, flunisolida, monohidrato de furoato de mometasona e budesonida; a preparação oftálmica é cetorolaco de trometamina; o agente respiratório é nedocromil sódico; e o agente de membrana mucosa é selecionado a partir do grupo que consiste em: dipropionato de alclometasona, butirato de hidrocortisona, flurandrenolida, valerato de betametasona e propionato de clobetasol.

Noutra forma de realização preferida, a composição farmacêutica compreende meisoíndigo e/ou NATURA. Habitualmente, o veículo farmaceuticamente aceitável é um diluente inerte.

As composições farmacêuticas podem assumir uma variedade de formas adaptadas à via de administração escolhida conforme descrito acima. Os peritos na técnica irão reconhecer várias metodologias sintéticas que podem ser utilizadas para preparar composições farmaceuticamente aceitáveis não tóxicas dos compostos aqui descritos. Os peritos na técnica irão reconhecer uma grande variedade de solventes farmaceuticamente aceitáveis não tóxicos que podem ser utilizados para preparar solvatos dos compostos da invenção, tais como água, etanol, óleo mineral, óleo vegetal e dimetilsulfóxido.

As composições podem ser administradas de forma oral,

tópica, parentérica, por inalação ou pulverização ou de forma retal em formulações de unidade de dosagem que contêm veículos, adjuvantes ou veículos farmacêuticamente aceitáveis não tóxicos convencionais. É ainda compreendido que o melhor método de administração pode ser uma combinação de métodos. A administração oral na forma de um comprimido, cápsula, elixir, xarope, rebuçado, trocisco ou afins é particularmente preferida. O termo parentérico conforme aqui utilizado inclui injeções subcutâneas, injeção intradérmica, intravascular (por ex., intravenosa), intramuscular, epidural, intratecal ou técnicas de infusão ou injeção semelhantes.

As composições farmacêuticas encontram-se preferencialmente numa forma adequada para a utilização oral, por exemplo, como pastilhas, trociscos, rebuçados, suspensões aquosas ou oleosas, grânulos ou pós solúveis, emulsão, cápsulas duras ou moles ou xaropes ou elixires.

As composições destinadas à utilização oral podem ser preparadas de acordo com qualquer método conhecido na técnica para o fabrico de composições farmacêuticas, e essas composições podem conter um ou mais agentes selecionados a partir do grupo que consiste em agentes adoçantes, agentes aromatizantes, agentes corantes e agentes conservantes, de modo a fornecer preparações farmacêuticamente saborosas e com bom aspeto. As pastilhas podem conter o ingrediente ativo na mistura com excipientes farmacêuticamente aceitáveis não tóxicos adequados para o fabrico das pastilhas. Estes excipientes podem, por exemplo, ser diluentes inertes, tais como carbonato de cálcio, carbonato de sódio, lactose, fosfato de cálcio ou fosfato de sódio; agentes de granulação e desintegração, por exemplo, amido de milho ou ácido algínico; agentes de ligação, por exemplo, amido, gelatina ou acácia; e agentes de lubrificação, por exemplo, estearato de magnésio, ácido esteárico ou talco. As pastilhas podem não ser revestidas

ou podem ser revestidas através de técnicas conhecidas para adiar a desintegração e absorção no trato gastrointestinal e fornecer assim uma ação prolongada durante um período de tempo mais longo. Por exemplo, é possível utilizar um material de adiamento de tempo, tal como monoestearato de glicerilo ou diestearato de glicerilo.

As formulações para a utilização oral também podem ser apresentadas como cápsulas duras de gelatina, em que o ingrediente ativo é misturado com um diluente sólido inerte, por exemplo, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio ou caulino, ou como cápsulas moles de gelatina, em que o ingrediente ativo é misturado com água ou um meio de óleo, por exemplo, óleo de amendoim, parafina líquida ou azeite.

As suspensões aquosas contêm os materiais ativos numa mistura com excipientes adequados para o fabrico de suspensões aquosas. Esses excipientes são agentes de suspensão, por exemplo carboximetilcelulose de sódio, metilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, alginato de sódio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto e goma acácia; e agentes de dispersão ou humedecimento, que podem ser um fosfatido que ocorre naturalmente, por exemplo lecitina, ou produtos de condensação de um óxido de alquilenos com ácidos gordos, por exemplo estearato de polioxietileno, ou produtos de condensação de óxido de etileno com álcoois alifáticos de cadeia longa, por exemplo heptadecaetilenoxietanol, ou produtos de condensação de óxido de etileno com ésteres parciais derivados de ácidos gordos e um hexitol, tal como monooleato de sorbitol de polioxietileno, ou produtos de condensação de óxido de etileno com ésteres parciais derivados de ácidos gordos e anidrido de hexitol, por exemplo monooleato de sorbitano de polietileno. As suspensões aquosas também podem conter um ou mais conservantes, por exemplo etilo, ou n-propilo p-hidroxibenzoato, um ou mais agentes corantes, um ou mais agentes aromatizantes e um ou mais agentes adoçantes, tais

como sacarose ou sacarina.

As suspensões oleosas podem ser formuladas através da suspensão dos ingredientes ativos num óleo vegetal, por exemplo óleo de amendoim, azeite, óleo de sésamo ou óleo de coco, ou num óleo mineral, tal como parafina líquida. As suspensões oleosas podem conter um agente de espessamento, por exemplo cera de abelhas, parafina dura ou álcool cetílico. Os agentes adoçantes, tais como os apresentados acima, e os agentes aromatizantes podem ser adicionados para fornecer preparações orais saborosas. Estas composições podem ser conservadas através da adição de um antioxidante, tal como ácido ascórbico.

Os grânulos e pós solúveis adequados para a preparação de uma suspensão aquosa através da adição de água fornecem o ingrediente ativo numa mistura com um agente de dispersão ou humedecimento, agente de suspensão e um ou mais conservantes. Os agentes de dispersão ou humedecimento e os agentes de suspensão adequados são exemplificados pelos já mencionados acima. Os excipientes adicionais, por exemplo agentes adoçantes, aromatizantes e corantes, podem igualmente estar presentes.

As composições farmacêuticas também podem estar na forma de emulsões de óleo em água. A fase oleosa pode ser um óleo vegetal, por exemplo azeite ou óleo de amendoim, ou um óleo mineral, por exemplo parafina líquida ou misturas destes. Os agentes emulsionantes adequados podem ser gomas que ocorrem naturalmente, por exemplo goma acácia ou goma tragacanto; fosfatidos que ocorrem naturalmente, por exemplo rebento de soja, lecitina e ésteres ou ésteres parciais derivados de ácidos gordos e hexitol; anidridos, por exemplo monooleato de sorbitano; e produtos de condensação dos referidos ésteres parciais com óxido de etileno, por exemplo monooleato de sorbitano de polioxietileno. As emulsões também podem conter agentes adoçantes e aromatizantes.

Os xaropes e elixires podem ser formulados com agentes adoçantes, por exemplo glicerol, propilenoglicol, sorbitol ou sacarose. Essas formulações também podem conter um demulcente, um conservante e agentes aromatizantes e corantes. As composições farmacêuticas podem estar na forma de uma suspensão oleaginosa ou aquosa injetável esterilizada. Esta suspensão pode ser formulada de acordo com a técnica conhecida utilizando os agentes de dispersão ou humedecimento e agentes de suspensão adequados, que foram mencionados acima. A preparação injetável esterilizada também pode ser uma solução ou suspensão injetável esterilizada num solvente ou diluente não tóxico aceitável de forma parentérica, por exemplo como uma solução em 1,3-butanodiol. Entre os solventes e veículos aceitáveis que podem ser utilizados encontram-se a água, a solução de Ringer e a solução isotónica de cloreto de sódio. Além disso, os óleos fixos e esterilizados são utilizados de forma convencional como um solvente ou meio de suspensão. Para este efeito, é possível utilizar qualquer óleo fixo insípido, incluindo mono- ou diglicéridos sintéticos. Além disso, os ácidos gordos, tal como o ácido oleico, podem ser utilizados na preparação de injetáveis.

A composição também pode ser administrada na forma de supositórios, por ex., para a administração retal do fármaco. Estas composições podem ser preparadas misturando o fármaco com um excipiente adequado que não provoque irritação e que seja sólido a temperaturas normais, mas líquido à temperatura retal, derretendo-se assim no reto para libertar o fármaco. Esses materiais são manteiga de cacau e polietilenoglicóis.

Em alternativa, as composições podem ser administradas de forma parentérica num meio esterilizado. O fármaco, dependendo do veículo e concentração utilizados, pode ser suspenso ou dissolvido no veículo. Vantajosamente, os

adjuvantes, tais como os agentes de tamponamento, conservantes e anestésicos locais, podem ser dissolvidos no veículo.

Para a administração em animais não humanos, a composição que contém o composto terapêutico pode ser adicionada à água potável ou alimentação do animal. Igualmente, será conveniente formular produtos de água potável e alimentação do animal, de modo a que o animal ingira uma quantidade apropriada do composto na respetiva dieta. Além disso, será conveniente apresentar o composto numa composição como uma pré-mistura para a adição à alimentação ou água potável. A composição também pode ser adicionada como um suplemento alimentar ou de bebida para os seres humanos.

Os níveis de dosagem na ordem de cerca de 5 mg a cerca de 250 mg por quilograma de peso corporal por dia e, mais preferencialmente, de cerca de 25 mg a cerca de 150 mg por quilograma de peso corporal por dia são úteis no tratamento das condições indicadas acima. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com os materiais de portador para produzir uma única forma de dosagem irá variar dependendo da condição que está a ser tratada e do modo específico de administração. Geralmente, as formas de unidade de dosagem irão conter entre cerca de 1 mg e cerca de 500 mg de um ingrediente ativo. A dosagem será, preferencialmente, pelo menos, três vezes menos para tratar doenças inflamatórias através da modulação de citocinas do que a necessária para tratar distúrbios proliferativos através da inibição de CDKs. Por exemplo, uma dosagem de Meisoíndigo para tratar LMC é geralmente de cerca de 125 mg por dia, enquanto a dosagem de Meisoíndigo para tratar DII é habitualmente apenas de 25 mg por dia. Isto deve-se à quantidade inferior significativa necessária para a regulação de citocinas através desta classe de moléculas em comparação com a necessária para regular CDKs.

A frequência da dosagem também pode variar dependendo do composto utilizado e da doença específica tratada. Contudo, para o tratamento da maioria dos distúrbios, é preferido um regime de dosagem de 4 vezes por dia ou menos. Todavia, será compreendido que o nível de dose específico para qualquer paciente em particular dependerá de uma variedade de fatores, incluindo a atividade do composto específico utilizado, a idade, o peso corporal, a saúde geral, o sexo, a dieta, a duração de administração, a via de administração e a taxa de excreção, a combinação de fármacos e a gravidade da doença específica que está a ser submetida a terapêutica.

Os compostos preferidos terão propriedades farmacológicas desejáveis que incluem, mas não se limitam a, biodisponibilidade oral, baixa toxicidade, ligação de proteína de soro inferior e meias-vidas *in vitro* e *in vivo* desejáveis. A penetração da barreira hematoencefálica para compostos utilizados para tratar distúrbios do SNC é necessária, embora sejam muitas vezes preferidos níveis cerebrais baixos de compostos utilizados para tratar distúrbios periféricos.

Os ensaios podem ser utilizados para prever estas propriedades farmacológicas desejáveis. Os ensaios utilizados para prever a biodisponibilidade incluem transporte através das monocamadas de células intestinais humanas, incluindo monocamadas de células Caco-2. A toxicidade para hepatócitos cultivados pode ser utilizada para prever a toxicidade do composto. A penetração da barreira hematoencefálica de um composto nos seres humanos pode ser prevista a partir dos níveis cerebrais de animais de laboratório que recebem o composto de forma intravenosa.

A ligação de proteína de soro pode ser prevista a partir de ensaios de ligação de albumina. Esses ensaios são descritos num estudo de Oravcova, *et al.* (*Journal of Chromatography B* (1996) volume 677, páginas 1 a 27).

A meia-vida do composto é inversamente proporcional à frequência de dosagem de um composto. As meias-vidas *in vitro* dos compostos podem ser previstas a partir de ensaios de meia-vida microssomal conforme descrito por Kuhnz e Gieschen (*Drug Metabolism and Disposition*, (1998) volume 26, páginas 1120 a 1127).

A quantidade da composição necessária para a utilização no tratamento irá variar não só com o composto específico selecionado, como também com a via de administração, a natureza da condição que está a ser tratada e a idade e a condição do paciente e, por fim, ficará ao critério do clínico ou médico assistente.

Indicações Terapêuticas de Meisoíndigo e Outros Derivados de Isoíndigo, Índigo e Indirubina

A invenção é definida nas reivindicações em anexo.

Nos últimos 10 anos, o desenvolvimento dos inibidores de TNF- α e outras citocinas foi uma das áreas mais ativas do desenvolvimento de fármacos para o tratamento de várias doenças de tipo inflamatório. Embora pequenos períodos de resultados clínicos que aplicam esses inibidores específicos para o tratamento de várias doenças de tipo inflamatório sejam positivos e até entusiasmantes, e o futuro desenvolvimento da terapêutica anticitocinas e anti-TNF- α em geral seja interessante (34), a eficácia a longo prazo destes tratamentos foi desafiada pelo facto de o processo patológico de doenças de tipo inflamatório envolver não só uma única via, como um sistema de rede de citocinas complicado.

As citocinas pró-inflamatórias foram implicadas numa vasta gama de processos inflamatórios patológicos, tal como a expressão reduzida de citocinas anti-inflamatórias.

A FIG. 1 ilustra a representação esquemática de processos patológicos nas doenças de tipo inflamatório humanas que envolvem várias citocinas e fatores de crescimento fornecendo uma representação esquemática de

papéis de citocinas pró-/anti-inflamatórias e fatores de crescimento, e locais de ação de derivados, tais como Meisoíndigo, no processo patológico de doenças de tipo inflamatório crônicas: a estimulação patológica da inflamação faz com que as células recetivas inflamatórias (linfócitos, monócitos, neutrófilos, células endoteliais, macrófagos de tecido e mastócitos) libertem citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento. Como consequência, estas citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento originam a saída de células imunes, neutrófilos e monócitos do fornecimento de sangue e a respetiva acumulação subsequente nos locais de inflamação. Consequentemente, isto provoca várias doenças de tipo inflamatório e/ou distúrbios autoimunes. Estas doenças incluem doença inflamatória intestinal (DII), psoríase, artrite reumatoide, neurodegeneração e outras. O Meisoíndigo, em baixas concentrações (por ex., 30 nM) inibe a produção de múltiplas citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e estimula a citocina anti-inflamatória IL-10.

O Quadro 1 resume o envolvimento de várias citocinas no processo patológico de distúrbios autoimunes. Embora sejam detetados aumentos significativos em várias citocinas pró-inflamatórias nos tecidos/órgãos de doenças autoimunológicas, algumas citocinas reguladoras são moderadamente elevadas para equilibrar as citocinas pró-inflamatórias ativadas de forma excessiva. Igualmente, parte-se do princípio de que os distúrbios autoimunes são causados por um desequilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e as reguladoras (48).

As observações mostram que o Meisoíndigo regula de forma descendente a secreção/expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias principais: TNF- α , IL-1 e IL-6, e regula de forma ascendente as citocinas anti-inflamatórias IL-10. A expressão "consequências da libertação de citocinas pró-inflamatórias e fatores de

crescimento” refere-se a epidermotropismo de células T, indução de hiperproliferação K6/16, macrófagos de revestimento, infiltração de neutrófilos ativados e células T, aumento e ativação de mastócitos, indução de ICAM-1 e MHC de classe II, angiogénese, alteração na permeabilidade vascular, apoptose, lesão no cérebro e sistema nervoso central, regulação da proliferação de células sinoviais, degradação de cartilagem e reabsorção óssea.

QUADRO 1. Lista de citocinas de fatores de crescimento envolvidos no processo patológico de vários distúrbios inflamatórios

Crescimento Regulador Pró-inflamatório	Citocinas Reguladoras	Quimiocinas	Fatores de Crescimento
TNF- α	IL-4	IL-8	FGF
LT	IL-10	Gro α	PDGF
LIF	IL-11	MIP-1	VEGF
Oncostatina M	W-13	MCP-1	GM-CSF
W15		ENA-78	M-CSF
IFN γ		RANTES	TGF- β
IL-1 α , β			
IL-2			
IL-3			
IL-6			
IL-7			
IL-9			
IL-12			
IL-17			
IL-18			

Doença Inflamatória Intestinal (DII): a DII compreende doença de Crohn (DC) e colite ulcerativa (CU), que são 2 doenças de tipo inflamatório crônicas de sobreposição do trato gastrointestinal causadas pela desregulação do sistema imunitário (20). Os pacientes com DII têm uma função de barreira epitelial intestinal defeituosa, que

permite a colonização bacteriana dos epitélios. Como consequência, os produtos bacterianos e as citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6) causam uma estimulação inflamatória persistente. Os antígenos bacterianos são introduzidos no sistema imunitário pelas células dendríticas da mucosa e macrófagos. Em resposta, os fagócitos intestinais (sobretudo monócitos e neutrófilos) proliferam e aumentam a expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias. Tal como os inibidores de crescimento celular e os indutores de diferenciação celular demonstraram na patente anterior, o Meisoíndigo e os compostos da fórmula (I) ou (II) irão inibir eficazmente a proliferação hiperativa dessas células inflamatórias, ao mesmo tempo que suprimem a respetiva expressão/secreção das citocinas pró-inflamatórias conforme demonstrado nos Exemplos 1 a 4. Esta conclusão foi confirmada nos modelos de animal, bem como num paciente com DII, conforme ilustrado nos Exemplos 7 e 8.

Psoríase: as citocinas são mensageiros intercelulares que têm um papel importante no desenvolvimento e na manutenção da inflamação cutânea. Foi referido que diversas citocinas desempenham papéis cruciais na patogénese de distúrbios de pele inflamatórios. IL-1, TNF- α e IFN- γ induzem a expressão de ICAM-1 e o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II (48, 49). IL-1, TNF- α e o fator de estimulação de colónias de granulócitos-macrófagos são capazes de induzir a ativação, a maturação e a migração de células dendríticas, e IL-1 ativa os mastócitos (50). IL-6 e TGF- α melhoram a proliferação de queratinócitos. IL-1, TNF- α , TGF- α e VEGF induzem a angiogénese e atraem as células inflamatórias (51-53). A primazia das citocinas na obtenção das respostas imunitárias cutâneas torna-as num alvo altamente atrativo para novos modificadores de resposta biológica (18). Por conseguinte, como reguladores de múltiplas citocinas, as

moléculas pequenas reivindicadas nesta invenção, o Meisoíndigo e os compostos da fórmula (I) ou (II) serão eficazes contra a psoríase. Conforme ilustrado no Exemplo 6, foi demonstrado num modelo de roedor que o Meisoíndigo foi verdadeiramente eficaz de uma forma dependente da dose contra a psoríase e o efeito foi melhor do que o MTX do controlo positivo.

Artrite reumatoide (AR): o papel da rede de citocinas na mediação da inflamação e destruição de articulações na AR foi extensivamente investigado nos últimos anos. Além de TNF- α , IL-1 desempenha um papel central na patogénese e nas manifestações clínicas da AR (54). A capacidade de IL-1 para causar uma inflamação e um desgaste das articulações e para inibir os processos de reparação dos tecidos foi claramente estabelecida nos sistemas *in vitro* e nos modelos de animal, e o alívio dos sintomas inflamatórios em pacientes com AR foi alcançado através do bloqueio de IL-1 (55). IL-6 é uma citocina multifuncional que regula a resposta imunitária, a hematopoiese, a resposta de fase aguda e a inflamação. A desregulação da produção de IL-6 está relacionada com a patologia de diversas doenças, incluindo AR. A abordagem terapêutica para bloquear o sinal IL-6 foi realizada utilizando o anticorpo anti-IL-6R humanizado para AR entre outras doenças (11, 56). IL-10 é uma citocina anti-inflamatória. A expressão de IL-10 mostrou prevenir a artrite ou melhorar a doença em modelos de animal (57, 58). Embora seja óbvio que as citocinas, tais como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-10, têm papéis independentes, as mesmas funcionam em simultâneo na mediação de determinados processos patofisiológicos na AR. A descoberta de uma classe de moléculas descritas nesta invenção, que são capazes de modular estas citocinas diferentes, irá resultar num progresso terapêutico dramático no tratamento de AR.

Esclerose Múltipla (EM): a EM é um distúrbio

inflamatório autoimune. Embora a causa para o corpo atacar a sua própria mielina em pacientes com EM permaneça pouco clara, as citocinas desreguladas estão claramente envolvidas no processo da doença. Através da utilização de encefalomielite autoimune experimental (EAE), um modelo muito utilizado para estudos da EM com base em semelhanças autoimunes, histopatológicas, genéticas e clínicas, foi demonstrado que no estágio ativo inicial tanto a EAE como a EM são caracterizadas pela presença de círculos inflamatórios perivasculares disseminados no SNC, um processo no qual as citocinas quimioatraentes (quimiocinas) desempenham um papel importante. Existem indícios de que a expressão de quimiocinas (familiares de IL-8) durante a inflamação autoimune do SNC é regulada por algumas citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF (59). Os papéis de outras citocinas pró-/anti-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6 e IL-10, também foram confirmados em modelos de animal com EAE (60-62), bem como em seres humanos (63). IL-1 β está presente em lesões de EM. O antagonista recetor IL-1 (IL-1Ra) modera a indução de encefalomielite autoimune experimental (EAE). Foi observado um risco maior de EM em indivíduos com IL-1 elevado (relação de produção de 3 sobre IL-1Ra e relação de produção de TNF elevado sobre IL-10 (63)).

Distúrbios neurodegenerativos: a doença de Alzheimer (DA) e a doença de Parkinson (DP) são os 2 distúrbios neurodegenerativos mais comuns relacionados com a neuroinflamação. A neuroinflamação é uma característica do tecido patologicamente afetado em diversos distúrbios neurodegenerativos. Estas alterações são particularmente observadas em áreas cerebrais afetadas de casos de DA (64). O papel das citocinas foi implicado na patogénese de DA, embora o mecanismo através do qual as citocinas contribuem para a patogénese não seja totalmente compreendido. Na DA, as micróglias, especialmente as associadas a depósitos de

amiloide, têm um fenótipo que é consistente com um estado de ativação, incluindo a imunorreatividade com anticorpos para antígenos principais de histocompatibilidade de classe II e para citocinas inflamatórias, IL-1 β e TNF- α (65). Uma das principais características neuropatológicas da DA é o depósito no cérebro de placas senis que são sobretudo compostas por beta-péptido amiloide tóxico (Abeta), que é gerado a partir de uma família de Abeta que contém proteínas precursoras (AbetaPP). As citocinas demonstraram estimular a expressão de genes da transcrição de AbetaPP (66). A análise da ligação genética de locus que controla a idade no início na DA e DP revelou uma associação significativa de DA aos genes glutathione-S-transferase, omega-1 e 2 (GSTO1, GSTO2) (7). A função de GSTO1 aparece relacionada com o processamento pós-translação da citocina pró-inflamatória IL-1 β (67).

Inflamação relacionada com pós-radioterapia: as doenças inflamatórias relacionadas com lesões de radiação no reto e cólon sigmoide são as complicações mais comuns com radioterapia para cânceros na região pélvica, o que inclui cânceros da cérvix, do útero, da próstata, da bexiga e testículos. A proctosigmoidite de radiação é a forma clinicamente evidente mais comum de lesão cólica após irradiação pélvica com uma incidência de 5% a 20%. Habitualmente, os pacientes apresentam sintomas de tenesmo, hemorragia, diarreia de baixo volume e dor retal. É raro o desenvolvimento de uma obstrução de baixo grau ou tratos fistulosos nos órgãos adjacentes.

O mecanismo da radioterapia é através das respectivas lesões ao ADN nas células que proliferam ativamente. As lesões patológicas após a radioterapia localizada no intestino/cólon podem ser divididas em fases agudas e crónicas. As alterações patológicas iniciais incluem uma perda de linfócitos na lâmina própria e lesões microscópicas nas células epiteliais da mucosa e células

endoteliais vasculares. Estas alterações manifestam-se como uma diminuição de vilosidade e uma diminuição nas células regenerativas da cripta e são seguidas por um edema submucoso acentuado com um aumento da permeabilidade vascular.

A endarterite progressiva parece ser o principal mecanismo através do qual ocorrem os efeitos crónicos, que mais tarde se manifestam como fibrose progressiva originando atrofia da mucosa, formação de estritura e trombose, causando lesões isquémicas secundárias. A colite por radiação na fase crónica demonstra uma deformação de cripta muito significativa, uma telangiectasia vascular e fibrose da lâmina própria. Curiosamente, algumas destas alterações patológicas estão igualmente presentes na DII de longa duração (68).

Deste modo, as citocinas podem desempenhar um papel essencial entre várias doenças gastrointestinais nas quais a inflamação apresenta uma parte significativa. Estudos recentes concentraram-se no papel crucial das citocinas na DII crónica (69-74). Para elucidar o papel das citocinas na proctite por radiação, Indaram *et al.* (75) examinaram os níveis de citocina da mucosa cólica em pacientes com proctite por radiação e compararam estes valores com os obtidos a partir de controlos normais e pacientes com DII. Foi detetado que os níveis da mucosa de IL-2, IL-6 e IL-8 eram significativamente superiores e estatisticamente significativos ($p < 0,05$) tanto na mucosa doente ($5,62 \pm 0,13$, $1,60 \pm 0,31$, $21,45 \pm 4,03$ pg/mg) como na de aspeto normal ($3,83 \pm 0,78$, $1,36 \pm 0,34$, $13,45 \pm 3,18$ pg/mg) no grupo de proctite por radiação, em comparação com os dos controlos normais ($1,74 \pm 0,23$, $0,67 \pm 0,05$, $4,99 \pm 1,39$ pg/mg).

Deste modo, estas descobertas demonstram uma ativação semelhante de citocinas em pacientes com proctite por radiação e DII. Nos pacientes com proctite por radiação,

foi demonstrado que os níveis de IL-2, IL-6 e IL-8 na mucosa eram significativamente superiores em comparação com os controlos normais. Por sua vez, os pacientes com DII (CU e DC) demonstraram níveis significativamente superiores de citocinas, incluindo IL-1, IL-2, IL-6 e IL-8, em comparação com os controlos normais.

A semelhança na expressão de citocinas da mucosa nestas 2 doenças refere-se diretamente de uma forma plausível à natureza inflamatória intensa das doenças. Foi exigido que esta semelhança na ativação de citocinas nestas 2 doenças possa traduzir-se nas alterações patológicas semelhantes observadas na DII crónica e proctite por radiação. Esta hipótese é suportada pelo facto de a gestão médica de proctite por radiação, embora de forma muito insatisfatória, incluir o tratamento com vários derivados de ácido aminossalicílico e corticosteroides administrados de forma oral ou tópica. Estas opções de tratamento são idênticas à gestão de DII.

Conforme demonstrado na presente invenção, o Meisoíndigo e respetiva classe de moléculas pequenas são capazes da regulação descendente de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e da regulação ascendente da citocina reguladora IL-10; devem ser esperados uma elevada eficácia e poucos efeitos secundários para este tratamento.

Outras Doenças Relacionadas com a Desregulação das Citocinas: a doença cardiovascular (DCV), a aterosclerose e a doença metabólica (a síndrome metabólica) também foram associadas à secreção/expressão impróprias de citocinas pró/anti-inflamatórias (10, 12-14, 76).

Diabetes: um defeito fundamental na diabetes de tipo II é a resistência à insulina, devido à qual a insulina não consegue suprimir a produção de glicose do fígado e provocar o consumo através de tecidos periféricos, resultando em hiperglicemia. As células β pancreáticas respondem à glicose plasmática em excesso através da

secreção de mais insulina para superar os efeitos da resistência à insulina. Uma vez que a resistência à insulina melhora e as células β já não são capazes de cumprir o requisito para aumentar a quantidade de secreção de insulina, os níveis de glicose plasmática aumentam e a diabetes de tipo II desenvolve-se.

Muitos fatores podem contribuir para o início da diabetes de tipo II. Uma vez que 80% dos pacientes com diabetes de tipo II são obesos e a obesidade está sempre associada à resistência à insulina, os mediadores moleculares que associam a obesidade à resistência à insulina foram submetidos a uma investigação exaustiva. Vários fatores foram identificados como causas que contribuem para a resistência à insulina na obesidade e na diabetes de tipo II associada à obesidade, especialmente os produzidos pelo tecido adiposo, AGLs (ácidos gordos livres), $\text{TNF}\alpha$, IL-6, leptina, adiponectina e resistina. Tanto os níveis de ARNm como de proteínas de $\text{TNF}\alpha$ são altamente elevados nos tecidos adiposos de animais (77) e seres humanos (78) obesos. Todos os tipos diferentes de célula no tecido adiposo são capazes de produzir citocinas. Os adipócitos expressam recetores $\text{TNF}\alpha$ e são igualmente a origem principal de $\text{TNF}\alpha$, que se parte do princípio que funciona predominantemente de uma forma autócrina/parácrina no tecido adiposo.

A exposição a longo prazo de células cultivadas (79) ou animais (80) a $\text{TNF}\alpha$ induz resistência à insulina, ao passo que a neutralização de $\text{TNF}\alpha$ aumenta a sensibilidade à insulina e reduz a hiperglicemia num modelo de animal com diabetes de tipo II (81). A ausência de $\text{TNF}\alpha$ ou recetores $\text{TNF}\alpha$ por inativação (*knock-out*) de genes melhora significativamente a sensibilidade à insulina em modelos de animais obesos (82).

Foram propostos mecanismos para a resistência à insulina induzida por $\text{TNF}\alpha$ em adipócitos, bem como de forma

sistêmica (83). $\text{TNF}\alpha$ inibe a fosforilação de recetor de insulina e substrato do recetor de insulina-1 (IRS-1) através do inibidor Kb quinase- β (IKK- β). A ativação NF- kB através de $\text{TNF}\alpha$ é obrigatória para a repressão de genes ricos em adipócitos essenciais para a função do adipócito, e é igualmente suficiente para inibir a transcrição de genes mediada por PPAR-gama. $\text{TNF}\alpha$ também estimula a lipólise e outra expressão de citocinas no tecido adiposo e provoca a libertação de AGLs. Na realidade, os níveis de FFVs plasmáticos aumentam antes da hiperglicemia evidente em alguns modelos de animal de resistência à insulina (83). Existem vastos indícios que implicam AGLs plasmáticos em excesso na indução e progressão de resistência à insulina sistêmica. Nos hepatócitos, os AGLs contribuem para uma produção de VLDL e glicose excessiva. Nas células musculares, o nível elevado de AGL prejudica a sinalização de insulina e provoca a oxidação de AGL originando uma glicose oxidase muito reduzida.

Os fármacos de sensibilização à insulina atualmente disponíveis, que pertencem ao agonista PPAR-gama, inibem o perfil de expressão de genes de adipócitos induzidos por $\text{TNF}\alpha$ através da via NF- kB (84). Uma vez que $\text{TNF}\alpha$ derivada de adipócito funciona como um fator autócrino ou parácrino, a ministração sistêmica de anticorpo $\text{TNF}\alpha$ pode não ser eficaz no bloqueio da atividade biológica de $\text{TNF}\alpha$ expressada localmente no tecido adiposo (85). NATURA, que representa um novo tipo de inibidor $\text{TNF}\alpha$ de molécula pequena que distribui através de difusão simples, pode assim ser um agente eficaz para bloquear a função de $\text{TNF}\alpha$ expressado localmente e potencialmente útil no tratamento da diabetes de tipo 2.

A diabetes *mellitus* de tipo I é uma doença autoimune caracterizada pela infiltração de células mononucleares nos ilhéus de Langerhans e a destruição seletiva das células beta de produção de insulina. Enquanto as células T CD8+

podem ser iniciadores importantes, as células T CD4⁺ (86) e os macrófagos (87, 88) são os principais efetores celulares do processo imunitário que originam a morte de células beta. Os macrófagos ativados segregam diretamente IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF α , e provocam indiretamente a produção de INF-gama a partir de células T ativadas. O envolvimento de citocinas, como TNF α , INF-gama, IL-1 β , IL-6 e IL-10, na patogênese da diabetes de tipo 1 foi bem clarificado através de estudos de correlação da expressão de citocinas e desenvolvimento de diabetes de tipo I, estudos de aumento de citocinas e estudos de insuficiência de citocinas (89). Além dos anticorpos de neutralização de citocinas e dos recetores de citocinas solúveis, os compostos anti-inflamatórios também mostram os efeitos do adiamento ou prevenção do início da diabetes de tipo 1 nos modelos de animal.

A patogênese da diabetes, da insulite à destruição completa das células beta, é um processo relativamente crônico. Meisoíndigo, NATURA e outros derivados inibem as citocinas pró-inflamatórias e estimulam as citocinas anti-inflamatórias e, como tal, podem ser utilizados como agentes para impedir ou adiar o início da doença, bem como tratá-la.

Resumindo, a desregulação das citocinas está envolvida numa variedade de doenças, incluindo as doenças de tipo inflamatório e as normalmente não consideradas como doenças de tipo inflamatório. Uma molécula que seja capaz de modular as citocinas pró- e anti-inflamatórias deve fornecer benefícios terapêuticos com o mínimo de efeitos secundários para todos os tipos de doenças relacionadas com a disfunção destes componentes de inflamação. Conforme demonstrado na presente invenção, a natureza do Meisoíndigo, uma molécula pequena representativa de derivados de isoíndigo, índigo e indirubina, na regulação da expressão/secreção de múltiplas citocinas pró/anti-

inflamatórias permite que os compostos definidos nas reivindicações em anexo sejam utilizados eficazmente para tratar distúrbios de tipo inflamatório associados à expressão de citocinas pró-inflamatórias, conforme definido nas reivindicações em anexo.

EXEMPLOS

Exemplo 1: o Meisoíndigo Reduz a Secreção de IL-[beta] em Células THP-1 de Linha de Células Monocíticas Humanas

Materiais e Métodos

Materiais: o Meisoíndigo e NATURA foram sintetizados por Natrogen Therapeutics, Inc., purificados através de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com uma pureza de 98,5%, e as respectivas estruturas confirmadas pela espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear (RMN). O Meisoíndigo é um cristal vermelho escuro com um peso molecular de 376. Foi preparado numa solução de dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenado a -20 °C para as experiências *in vitro*. A linha de células monocíticas humanas, THP-1 (90) foi adquirida em ATCC. As células foram mantidas de acordo com as instruções do fornecedor. Aproximadamente, foram cultivadas 1×10^5 células/ml a 37 °C, 5% de CO₂ durante 24 horas no Meio RPMI-1640 Modificado (Invitrogen) completado com 10% de FBS.

Métodos: as células foram estimuladas com ou sem 1 µM de lipopolissacárido (LPS, Sigma) e expostas durante 24 horas a diferentes concentrações de Meisoíndigo (de 31,25 nM a 16.000 nM). A viabilidade das células foi examinada no microscópio após a coloração com azul de tripano. Os níveis de proteína de IL-1β segregados nos meios de cultura pelas células foram depois medidos através de ELISA e calculados a partir da respetiva curva padrão utilizando um Kit de ensaio de R&D Systems de acordo com as instruções fornecidas pelo fornecedor. O método foi estabelecido e validado através da obtenção de uma boa curva padrão. Um exemplo da curva padrão é ilustrado na Fig. 2, painel A.

Análise Estatística: todos os dados foram expressados como uma média \pm SD (desvio padrão). A significância estatística de qualquer diferença entre o controle (LPS) e os grupos experimentais foi determinada pelo teste t de Student. Os valores P entre os 2 grupos têm de ser, pelo menos, inferiores a 0,05 para serem considerados estatisticamente significativos.

Resultados e Discussão

IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória pleiotrópica envolvida no processo patológico de várias doenças de tipo inflamatório. Para elucidar a atividade de Meisoíndigo, uma molécula pequena de representação de compostos da fórmula (I) ou (II) contra a inflamação, foi examinada a atividade de Meisoíndigo na secreção de IL-1 β nas células THP-1 monocíticas humanas. Conforme ilustrado na Fig. 2, painel B, o nível básico de IL-1 β nas células THP-1 monocíticas humanas foi considerado como não sendo detetável. Anteriormente, foi demonstrado que os aumentos da proteína IL-1 β e dos níveis de ARNm em resposta ao lipopolissacárido (LPS) são predominantemente um resultado da maior transcrição do gene (91, 92). Nesta invenção, foi igualmente observado que na estimulação de LPS, as células THP-1 segregaram uma grande quantidade de IL-1 β no meio (92,38 \pm 3,667 pg/ml, Fig. 2, painel B). Curiosamente, a secreção estimulada de IL- β foi significativamente inibida ao expor simultaneamente as células ao Meisoíndigo. Mais importante, foi descoberto que o Meisoíndigo é um inibidor IL-1 β potente, mas também moderado.

Esta característica será uma vantagem para os pacientes no que respeita a uma eficácia elevada com menos efeitos secundários quando for utilizada para o tratamento de distúrbios inflamatórios. Potente, uma vez que foi obtida repetidamente uma redução de mais de 50% da secreção de IL-1 β mediada por LPS quando as células foram expostas ao Meisoíndigo em concentrações tão baixas como 31,25 nM;

moderado, uma vez que o aumento da concentração de Meisoíndigo até 8 μM não resultou numa maior redução da secreção, indicando que a atividade alcançada foi máxima. Isto é diferente do efeito de Meisoíndigo ou NATURA na inibição de quinases dependentes de ciclinas (CDKs), na qual é necessária uma concentração muito mais elevada para a inibição de 50% da atividade de CDK (aproximadamente 1,6 μM) nas células de cancro da próstata LNCaP, conforme demonstrado na patente anterior.

O último ponto é significativo, uma vez que o documento EP 1 079 826 do estado da técnica apenas explica como inibir CDKs, em vez de citocinas. Como consequência, são utilizadas concentrações muito inferiores de medicamentos na presente invenção em comparação com o estado da técnica. Além disso, determinados compostos também podem ser adequados para a inibição de citocinas em comparação com a inibição de CDK.

Exemplo 2: o Meisoíndigo Inibe a Secreção e Expressão de IL-6 em Células THP-1 de Linha de Células Monocíticas Humanas

Materiais e Métodos

Materiais: foi utilizado o composto representativo Meisoíndigo. A linha celular e o procedimento de ELISA foram iguais aos descritos no Exemplo 1. A proteína IL-6 padrão foi utilizada para estabelecer uma curva padrão para o cálculo de IL-6 no meio segregado pelas células (células não estimuladas ou estimuladas por LPS na presença ou ausência de Meisoíndigo). Uma curva padrão típica é ilustrada na Fig. 3, painel A. A análise estatística também seguiu o método descrito no Exemplo 1.

Métodos:

PCR em Tempo Real: o efeito de Meisoíndigo na transcrição de IL-6 (níveis de ARN) foi determinado por uma técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real). O ARN total foi extraído utilizando um

minikit Qiagen Rneasy, e o gene HPRT foi utilizado como controlo interno.

As células THP-1 monocíticas humanas na fase de crescimento exponencial foram expostas a 1 µg/ml de LPS, 1 µM de Meisoíndigo ou 1 µg/ml de LPS mais 1 µM de Meisoíndigo durante 24 horas. As células foram depois colhidas, lavadas e o ARN total extraído para o ensaio de PCR em tempo real. O ARN total (300 ng) foi tratado com DNase I (Promega, Madison, WI), e foram utilizados SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA) e oligo(dT) para a transcrição reversa de acordo com as instruções dos fabricantes. As reações de PCR em tempo real foram efetuadas num volume de 25 µL contendo ADNc diluído, Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e um *primer* específico do gene IL-6 com 2,5 µM cada: R: 5'-TCAATTCGTTCTGAAGAGG (SEQ. ID N.º 1) e F: 5'-CCCCCAGGAGAAGATTCC (SEQ. ID N.º 2). Um analisador ABI SDS7700 (Applied Biosystems) foi utilizado a 50 °C durante 2 minutos e 95 °C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos e 60 °C durante 1 minuto. Os resultados de ADNc de teste foram normalizados para o controlo interno de HPRT medido na mesma placa. Após os ciclos, a especificidade da amplificação foi validada pela geração de uma curva de fusão através da desnaturação lenta dos produtos PCR e, em seguida, pela eletroforese em gel.

Resultados e Discussão

IL-6 é outra citocina pró-inflamatória essencial envolvida na inflamação. Por conseguinte, foi examinado o efeito de Meisoíndigo na secreção/expressão. De forma semelhante a IL-1β, o nível básico de IL-6 não foi detetado nas células THP-1 monocíticas humanas. Na estimulação com 1 µg/ml de LPS, as células segregaram moderadamente IL-6 para os meios (33,64 ± 3,29 pg/ml). Foi descoberto que o Meisoíndigo inibe fortemente a secreção de IL-6 nas células THP-1 estimuladas por LPS. Aproximadamente, foi observada

uma redução de 85% da secreção quando as células estimuladas foram expostas ao Meisoíndigo na concentração mais baixa de 31,25 nM da experiência ($P < 0,001$) (Fig. 3, painel B).

Para explorar se a redução da secreção de IL-6 mediada por Meisoíndigo se deveu à respetiva inibição na expressão de IL-6 estimulada por LPS, foi aplicada uma PCR em tempo real para medir o efeito de Meisoíndigo na transcrição de ARNm de IL-6. Conforme ilustrado na Fig. 3, painel C, foi observada uma indução significativa de transcrição de IL-6 quando as células THP-1 foram expostas a 1 µg/ml de LPS, o que é consistente com os relatórios anteriores (93). Curiosamente, a transcrição de IL-6 induzida por LPS pode ser completamente suprimida expondo as células THP-1 estimuladas por LPS a 1 µM de Meisoíndigo ($P < 0,001$). Esta descoberta indica assim que a inibição de Meisoíndigo na secreção de IL-6 estimulada por LPS resulta provavelmente da supressão do agente na produção de IL-6 mediada por LPS nas células THP-1.

A estimulação de LPS nos monócitos humanos ativa vias de sinalização de transcrição de IL-6. O LPS pode ligar a uma proteína designada por proteína de ligação a LPS (LBP). Foi demonstrado que, após a respetiva transferência através de LBP para o recetor de DC 14, o LPS interagiu com o recetor de sinalização TLR4 e a proteína adicional MD-2. Esta interação resultou na ativação de NF-κB e 3 MAP quinases, aumentando assim a transcrição de IL-6 (94, 95). É necessária mais investigação sobre se a supressão de Meisoíndigo na transcrição de IL-6 mediada por LPS se deve à interrupção das vias de transdução de sinal.

Exemplo 3: o Meisoíndigo Suprime a Secreção de TNF-α nas Células THP-1 Monocíticas Humanas

Materiais e Métodos

Foi utilizado o composto representativo Meisoíndigo. A linha celular e o procedimento de ELISA para medir a

secreção de TNF- α foram iguais aos descritos no Exemplo 1, exceto o facto de a proteína TNF- α padrão ter sido utilizada para estabelecer uma curva padrão para o cálculo da proteína segregada no meio pelas células (células não estimuladas ou estimuladas por LPS na presença ou ausência de Meisoíndigo). Uma curva padrão típica é ilustrada na Fig. 4, painel A.

O efeito de Meisoíndigo na transcrição de TNF- α (níveis de ARN) foi determinado por uma técnica de PCR em tempo real utilizando os mesmos procedimentos descritos no Exemplo 2, exceto o facto de os *primers* específicos para TNF- α terem sido utilizados conforme apresentado em seguida: 5'-TGCCCAG-ACTCGGCAAAG (SEQ. ID N.º 3) e 5'-GGAGAAGGGTGACCGACT (SEQ. ID N.º 4). O ARN total foi extraído utilizando um minikit Qiagen Rneasy, e o gene HPRT foi utilizado como controlo interno.

As células THP-1 monocíticas humanas que cresceram exponencialmente foram expostas a 0,1 μ g/ml de LPS, 4 μ M de Meisoíndigo ou 1 μ g/ml de LPS mais 4 μ M de Meisoíndigo durante 24 horas. As células foram depois colhidas, lavadas e o ARN total extraído para o ensaio de PCR em tempo real, conforme descrito no Exemplo 2.

Resultados e Discussão

TNF- α é uma citocina pró-inflamatória crucial investigada extensivamente durante a última década devido às respetivas funções biológicas importantes contra o cancro e respetivo papel patológico nos distúrbios inflamatórios. Diversos inibidores de TNF- α foram comercializados para o tratamento de várias doenças de tipo inflamatório. Como um potencial agente anti-inflamatório, foi explorado um papel do Meisoíndigo na regulação de TNF- α nesta invenção.

Como um sistema de modelo estabelecido, a estimulação de células THP-1 com LPS resultou numa enorme secreção de TNF- α (Fig. 4, painel B). Contudo, o Meisoíndigo inibiu

eficazmente a secreção de TNF- α nas células THP-1 estimuladas por LPS de uma forma dependente da concentração (Fig. 4, painel B). Aproximadamente, foi alcançada uma redução de 50% da secreção quando as células estimuladas foram expostas a 2,0 μ M de Meisoíndigo durante 24 horas ($P < 0,001$, em comparação com LPS mais Meisoíndigo com LPS sozinho), em que não foram observadas nenhuma células apoptóticas utilizando coloração com azul tripiano. O aumento da concentração de Meisoíndigo até 8 μ M não causou mais redução da secreção de TNF- α e não foram observadas nenhuma mortes celulares. Contudo, foi obtida uma inibição completa quando as células estimuladas foram tratadas com 16 μ M de Meisoíndigo, em que aproximadamente só apareceram 20% de células apoptóticas.

Os ensaios de PCR em tempo real não mostraram nenhum efeito de Meisoíndigo (4 μ M) nos níveis de ARNm de TNF- α (FIG. 4, painel C), indicando que a redução da produção de TNF- α nas células THP-1 estimuladas por LPS através de Meisoíndigo ocorre no nível pós-transcrição. Foi bem estabelecido que os elementos ricos em AU (ARE) nas 3' UTR de ARNm de TNF- α estão envolvidos na estabilidade de ARNm e eficácia de translação (96). Os ARE de TNF- α são um alvo do fator Hur de estabilização de ARNm (97). A maturação de ARNm de TNF- α é afetada por um elemento cis (2-APRE) na 3'UTR, que torna a união de transcrições precursoras de TNF- α dependente da ativação da proteína quinase ativada por ARN (PKR) (98).

Embora os mecanismos através dos quais o Meisoíndigo inibe a secreção de TNF- α nas células THP-1 estimuladas por LPS necessitem de ser estabelecidos, o Meisoíndigo é uma molécula pequena nova que inibe TNF- α sem citotoxicidades, o que o torna um medicamento ideal para o tratamento de doenças de tipo inflamatório, conforme definido nas reivindicações em anexo.

Exemplo 4: o Meisoíndigo Estimula a Secreção de IL-10 nas

Células THP-1 Monocíticas Humanas

Materiais e Métodos

O Meisoíndigo e a linha de células THP-1 utilizados neste Exemplo são iguais aos descritos no Exemplo 1. Os procedimentos de ELISA para medir a secreção de IL-10 também seguiram os procedimentos descritos no Exemplo 1, exceto o facto de a proteína IL-10 padrão ter ido utilizada para estabelecer a curva padrão (FIG. 5, painel A) para o cálculo da proteína segregada no meio pelas células (células não estimuladas ou estimuladas por LPS na presença ou ausência de Meisoíndigo).

Resultados e Discussão

O funcionamento do sistema imunitário é regulado com precisão pelas atividades de citocinas ou mediadores pró-inflamatórios e reguladores, e as doenças de tipo inflamatório foram consideradas um resultado do equilíbrio entre estes tipos de moléculas (41, 46). Para compreender se os efeitos anti-inflamatórios das moléculas pequenas, conforme definido nas reivindicações em anexo da invenção, são capazes da indução de citocinas reguladoras, o efeito de Meisoíndigo na secreção de IL-10 foi investigado. Conforme ilustrado na Fig. 5, painel B, foi observada uma estimulação moderada, mas significativa da secreção de IL-10 nas células THP-1. Aproximadamente, foi alcançado um aumento de 60% na secreção de IL-10 quando as células THP-1 foram tratadas com 0,0625 μ M de Meisoíndigo ($P < 0,05$). Em oposição, como um estimulador inflamatório, o LPS diminuiu ligeiramente a secreção da citocina.

Exemplo 5: o Meisoíndigo e NATURA em baixas concentrações selecionam Citocinas em vez de CDKs como alvos moleculares primários

Materiais e Métodos

Materiais: o Meisoíndigo e NATURA foram sintetizados por Natrogen Therapeutics, Inc., conforme descrito nos exemplos acima.

A linha de células monocíticas humanas, THP-1 (90), foi adquirida em ATCC. As células foram mantidas de acordo com as instruções do fornecedor. Aproximadamente, foram cultivadas 1×10^5 células/ml a 37 °C, 5% de CO₂ durante 24 horas no Meio RPMI-1640 Modificado (Invitrogen) completado com 10% de FBS.

Métodos:

1) Efeitos de Meisoíndigo e NATURA na expressão/secreção de citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10: as células THP-1 monocíticas humanas que cresceram exponencialmente foram estimuladas com ou sem 1 μ M de lipopolissacárido (LPS, Sigma) e expostas durante 24 horas a diferentes concentrações de Meisoíndigo e NATURA (de 31,25 nM a 62,5 nM), respetivamente. A viabilidade das células foi examinada através do ensaio de exceção com azul tripano. Os níveis de proteína de IL-1 β segregado nos meios de cultura pelas células foram depois medidos através de ELISA e calculados a partir da respetiva curva padrão utilizando um Kit de ensaio de R&D Systems de acordo com as instruções fornecidas pelo fornecedor, conforme descrito nos exemplos 1 a 4.

2) Efeitos de Meisoíndigo e/ou NATURA na atividade de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) nas células THP-1 (99): as células THP-1 que cresceram exponencialmente foram expostas a 31,25, 62,5 e 1500 nM de Meisoíndigo ou NATURA, durante 24 horas, respetivamente. As células foram colhidas, lavadas e as proteínas totais extraídas conforme descrito anteriormente (100). Cem μ g das proteínas foram imunoprecipitadas utilizando anticorpos contra cdk2, cdk4/6 ou ciclina D1 durante a noite a 4 °C na presença de uma mistura de inibidores de protease. Os imunoprecipitados foram lavados 4 vezes com tampão de extração de proteína e uma vez com tampão de ensaio de quinase, e reagiram com 75 μ g/ml de histona H1 na presença de [γ -³²P]-ATP (10 μ Ci/10 μ M). A histona fosforilada H1 (representa a atividade cdk)

foi medida através de contagem de cintilação ou através de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS (101, 102).

3) Análise Estatística: todos os dados foram expressados como uma média \pm SD. A significância estatística de qualquer diferença entre o controle (LPS) e os grupos experimentais foi determinada pelo teste t de Student. Os valores P entre os 2 grupos têm de ser, no mínimo, inferiores a 0,05 para serem considerados estatisticamente significativos.

Resultados e Discussão

Uma vez que foi demonstrado que a indirubina e os respectivos derivados inibiram as quinases dependentes de ciclinas, pode ser assim um tratamento eficaz de doenças associadas à perda de controlo de proliferação através de inibição de CDK. Para examinar que moléculas celulares são os alvos primários relacionados com as propriedades anti-inflamatórias desta classe de compostos, foi comparada a forma como o Meisoíndigo e NATURA modularam as atividades de CDKs e citocinas nas mesmas condições experimentais de concentração baixa.

Conforme ilustrado na FIG. 6, semelhante à observação ilustrada nos Exemplos 1, 2 e 4, os aumentos estimulados por LPS da produção de IL-1 β e IL-6 foram significativamente inibidos pela exposição das células ao Meisoíndigo e NATURA numa concentração tão baixa como 31,25 nM, ao passo que a supressão mediada por LPS de IL-10 nas células THP-1 aumentou quase para o dobro através de Meisoíndigo e NATURA em concentrações semelhantes (FIG. 6A).

Em oposição, nas mesmas exposições, tanto o Meisoíndigo como NATURA não conseguiram inibir as atividades de 2, 4 e 6 dependentes de ciclina, bem como os níveis de ciclina D1 (dados não ilustrados). Uma inibição parcial (23%) desses compostos só foi alcançada quando as células foram tratadas com 1,5 μ M (aumento de 48 vezes) de

Meisoíndigo ou NATURA (FIG. 6B).

Além disso, o efeito de NATURA na quinase-3 β da glicogénio sintase (GSK-3 β) foi igualmente investigado na invenção atual, uma vez que os inibidores CDK também são habitualmente inibidores de GSK-3[beta]. Contudo, não foi observada nenhuma atividade quando as células foram expostas a NATURA numa concentração tão elevada como 50 μ M (dados não ilustrados).

Deste modo, os dados neste exemplo mostram claramente que o Meisoíndigo e a classe relacionada de moléculas são capazes de modular significativamente várias citocinas (inibem citocinas pró-inflamatórias e estimulam citocinas anti-inflamatórias) numa concentração extraordinariamente baixa; onde não são alcançados nenhuns efeitos inibidores na atividade de CDK. Isto demonstra que, em concentrações baixas comparadas com as necessárias para a inibição de CDK, o Meisoíndigo e os compostos semelhantes têm primeiramente como alvo as citocinas em vez de quinases dependentes de ciclinas. Esta conclusão é suportada pela recente observação de que a Indirubina não corresponde verdadeiramente a inibidores de CDK biológicos, uma vez que a inibição de CDK através desses compostos é efetuada através de agregação física em vez de reação biológica (103). Além disso, a conclusão é igualmente suportada pelas observações clínicas de que é necessária a dosagem total de **8696 mg** de Meisoíndigo para alcançar a remissão máxima de leucemia mieloide crónica (LMC) (104), ao passo que são necessários apenas **525 mg** do fármaco para obter uma cura completa da doença inflamatória intestinal.

Sumário

As células THP-1 segregaram IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , mas nenhuma IL-2, IL-4, IL-10 e IL-12 após 24 horas da estimulação do LPS, ao passo que não foram detetados os níveis básicos destas citocinas através de ELISA, o que é consistente com os relatórios anteriores (93, 105). Para

avaliar as potenciais aplicações clínicas de uma classe de moléculas pequenas da Fórmula I ou II no tratamento de várias doenças de tipo inflamatório, foram examinados os efeitos reguladores de Meisoíndigo, como exemplos na secreção e expressão de citocinas pró- e anti-inflamatórias num modelo de célula THP-1 monocítica humana. Os dados são resumidos no Quadro 2. O Meisoíndigo inibiu significativamente as secreções de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α nas células THP-1 estimuladas por LPS, e estimulou a secreção da citocina reguladora IL-10, mas não foram observados quaisquer efeitos em IL-2, simplesmente porque as células não conseguiram ser estimuladas para segregar estas citocinas pró-inflamatórias. As reduções ou estimulações máximas das secreções destas citocinas são resumidas no Quadro 2.

Quadro 2. Modulação de Meisoíndigo na secreção de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras nas células THP-1 estimuladas por LPS

Tratamento	Percentagem de Resposta Máxima Sem Citotoxicidade			
	TNF- α (Inibição)	IL-1 β (Inibição)	IL-6 (Inibição)	IL-10 (Estimulação)
LPS	100,00 \pm 4,85	100,00 \pm 3,43	100,00 \pm 9,78	-18,27 \pm 10,15
LPS/ Meisoíndigo	49,20 \pm 3,37	48,76 \pm 3,69	83,51 \pm 5,41	201,97 \pm 11,2

A redução da secreção de IL-6 através de Meisoíndigo nas células THP-1 estimuladas por LPS pode ser um resultado da regulação descendente da transcrição do gene de citocina utilizando uma técnica de PCR em tempo real. O ensaio de PCR em tempo real também mostrou uma inibição moderada de Meisoíndigo em IL-15 nas células THP-1 estimuladas por LPS (dados não ilustrados). Não foi observada nenhuma regulação descendente dessas para o gene TNF- α utilizando a mesma tecnologia. Embora os mecanismos através dos quais o Meisoíndigo e as moléculas desta classe regulam as citocinas pró- e anti-inflamatórias necessitem de ser mais

investigados, os dados na presente invenção demonstram que esta classe de moléculas pequenas é capaz de modular citocinas importantes relacionadas com várias doenças de tipo inflamatório.

Durante os últimos muitos anos, as estratégias que têm como alvo as citocinas pró-inflamatórias criaram diversos agentes à base de proteínas para o tratamento de vários distúrbios inflamatórios, incluindo inibidores TNF- α etanercept (ENBREL ®), infliximab (REMICADE ®; Centocor), adalimumab (HUMIRA ®; Abbott) e antagonista recetor IL-1 KINERET ®. Os estádios iniciais da aplicação clínica destes agentes indicaram que estes agentes terapêuticos revolucionários foram um avanço no tratamento de doenças autoimunes, tais como DII, AR e psoríase. Contudo, as terapias à base de proteínas injetáveis atuais têm riscos associados, incluindo o potencial para maiores malignidades, infeções e uma maior insuficiência cardíaca congestiva (42). Além disso, essas estratégias também têm limitações e são desafiadas pelo sofisticado sistema de rede de citocinas. Embora diversos tipos de moléculas pequenas tenham mostrado ser um inibidor específico de citocinas pró-inflamatórias, tais como inibidores de TNF- α e NF- κ B, e tenham várias vantagens sobre os agentes à base de proteínas, ter como alvo uma única citocina pró-inflamatória pode não ser forte o suficiente para interromper as vias patológicas inflamatórias, e isto limita a respetiva eficácia clínica.

Em oposição, além de todas as vantagens das moléculas pequenas na aplicação clínica, tal como o facto de terem uma criação fácil e uma administração conveniente, o mais importante é que as moléculas reivindicadas na invenção não só suprimem em simultâneo várias citocinas pró-inflamatórias, ou seja, IL-1 β , IL-6 e TNF- α , como também estimulam a citocina anti-inflamatória IL-10. Além disso, estas moléculas demonstraram na patente anterior que

induzem a diferenciação celular e inibem a proliferação celular numa concentração mais elevada. Deste modo, fornecem uma maior atividade clínica. Esta conclusão foi suportada por resultados extraordinários da eficácia alcançada utilizando Meisoíndigo para o tratamento de um paciente com DII sem quaisquer efeitos secundários. Esta demonstração é fornecida no Exemplo 7 desta invenção.

Exemplo 6: o Meisoíndigo Melhora a Diferenciação Celular Epidérmica e Inibe a Hiperplasia e a Hiperkeratose nos Roedores

Materiais e Métodos

Materiais: o Meisoíndigo foi sintetizado, purificado e a respetiva estrutura caracterizada por Natrogen Therapeutics, Inc. A pureza do composto foi de 98,5% conforme descrito nos Exemplos acima. Uma suspensão de Meisoíndigo foi recentemente preparada em 0,5% de metilcelulose de sódio e fornecida oralmente para os testes em animais descritos abaixo. Outros produtos químicos utilizados nas seguintes experiências foram adquiridos em Sigma.

Foram alojadas por gaiola 5 fêmeas de ratinhos Kunming livres de patógenos com 12 semanas de idade e pesos corporais de 22 a 25 gramas, e foram alimentadas livremente com água doce da torneira e peletes de roedor comercializadas. Os espaços dos animais foram controlados a 24 ± 2 °C com uma humidade relativa de $60 \pm 5\%$ e um ciclo de claridade/escurecimento de 12 horas (07:00 às 19:00 horas).

Métodos:

Efeito de Meisoíndigo na Diferenciação Celular Epidérmica nas Caudas dos Ratinhos: sessenta fêmeas de ratinhos Kunming foram divididas aleatoriamente em 5 grupos, 20 num grupo de controlo e 10 em 4 grupos de fármaco testado. O Meisoíndigo foi recentemente preparado como uma suspensão em 0,5% de metilcelulose de sódio. O fármaco foi fornecido oralmente em doses de 50, 100 e 200 mg/kg, respetivamente,

uma vez por dia durante 13 dias. O metotrexato (MTX) foi utilizado como um controlo positivo numa dose de 1 mg/kg, i.p. uma vez de dois em dois dias durante o mesmo período de tempo. Foram utilizados os mesmos volume e veículo para a suspensão de Meisoíndigo como um controlo negativo. Vinte e quatro horas após a última administração, os animais foram sacrificados e as respetivas caudas cortadas 1,5 cm a partir da base. Foram preparadas lamelas para o exame histológico conforme descrito originalmente por Bosman *et al.*, (106). As lamelas foram preparadas cortando as caudas em secções longitudinais, e coloridas com Hematoxilina e Eosina (H&E). As lamelas foram depois examinadas com um microscópio de luz para avaliar o grau de ortoqueratose (OK) e hiperplasia epidérmica. O primeiro foi efetuado medindo o comprimento horizontal da camada granulosa (*stratum granulosum*) totalmente desenvolvida numa escala individual em relação ao respetivo comprimento total. A atividade do fármaco foi definida pelo aumento das células de escala positiva que contêm a camada granulosa (*stratum granulosum*) entre dois folículos capilares (*folliculus pili*).

Efeitos Antimitóticos de Meisoíndigo no Epitélio Vaginal de Ratinhos: sessenta fêmeas de ratinhos Kunming foram divididas aleatoriamente em 5 grupos, 20 num grupo de controlo e 10 em 4 grupos de fármaco testado. Todos os ratinhos receberam estrogénio numa dose de 0,2 mg/animal durante 3 dias para permitir que as células epiteliais vaginais se desenvolvessem na estimulação da hormona estrogénio. O Meisoíndigo foi recentemente preparado como uma suspensão em 0,5% de metilcelulose de sódio. O fármaco foi fornecido oralmente em doses de 50, 100 e 200 mg/kg, respetivamente, uma vez por dia durante 3 dias. O metotrexato (MTX) foi utilizado como um controlo positivo numa dose de 1 mg/kg, i.p. uma vez por dia durante o mesmo período de tempo. Foram utilizados os mesmos volume e

veículo utilizados para a suspensão de Meisoíndigo como um controlo negativo. Uma hora após a última administração, os animais receberam colquicinas, i.p. 2 mg/kg para deter as células na fase M. Cinco horas depois, os animais foram sacrificados e os tecidos vaginais foram fixados em 10% de Formalina, inseridos em parafina, e as lamelas foram preparadas. As lamelas foram coloridas com H&E e, pelo menos, 500 células de fundo foram examinadas num microscópio. O índice mitótico (percentagem de células mitóticas) foi calculado.

Resultados e Discussão

O modelo de cauda de ratinho comum foi utilizado neste Exemplo para medir quantitativamente se os compostos reivindicados nesta invenção são capazes de melhorar a diferenciação celular epidérmica, diminuindo assim a hiperplasia e a hiperqueratose. Este modelo foi originalmente descrito por Jarrett A (107), e modificado por Bosman et al. (106), e é atualmente utilizado por outros (108 a 110).

O efeito de Meisoíndigo na formação de uma camada granulosa nas células epiteliais de escala de cauda de ratinho é ilustrado no Quadro 3. Um aumento significativo da formação da camada granulosa no epitélio de cauda de ratinho foi observado quando os ratinhos foram tratados com Meisoíndigo durante 13 dias de uma forma dependente da dose. O efeito terapêutico de todas as 3 dosagens foi melhor do que o do controlo positivo, em que os ratinhos foram administrados com o fármaco clínico disponível MTX para o tratamento de psoríase.

Quadro 3. O efeito de Meisoíndigo na formação da camada granulosa nas células epiteliais de escala das caudas de ratinho

Grupos	Dosagem (mg/kg)	N.º Animais	Escalas granulosas (X±SD)	Valor P
Controlo	N/D	20	14,81 ± 4,61	
MTX	1,0	10	17,22 ± 4,92	<0,05

Grupos	Dosagem (mg/kg)	N. ^o Animais	Escalas granulosas (X \pm SD)	Valor P
Meisoíndigo	50,0	10	22,37 \pm 6,20	< 0,01
Meisoíndigo	100,0	10	25,98 \pm 4,12	< 0,001
Meisoíndigo	200,0	10	31,30 \pm 7,92	< 0,001

O MTX é um agente quimioterapêutico imunossupressor que inibe significativamente a mitose celular. Para examinar se o Meisoíndigo melhora a diferenciação celular epidérmica, diminuindo assim a hiperplasia e a hiperkeratose através do mecanismo semelhante ao do MTX, o efeito de Meisoíndigo no índice mitótico (IM) do epitélio vaginal de ratinho foi investigado. Conforme ilustrado no Quadro 4, o tratamento de ratinhos com MTX durante 3 dias resultou numa diminuição significativa no IM em comparação com o controlo não tratado (14,7 \pm 64,29 do grupo tratado com MTX vs. 20,04 \pm 3,71 do controlo, P<0,001). Em oposição, conforme ilustrado no Quadro 4, não existiram nenhuns efeitos significativos de Meisoíndigo no IM em dosagens inferiores (50 e 100 mg/kg, P>0,05) nas mesmas condições experimentais. Apenas foi observada uma ligeira diminuição de IM (16,06 \pm 2,66 do grupo tratado vs. 20,04 \pm 3,71 do controlo, P<0,05) numa dose mais elevada (200 mg/kg).

Os dados mostraram que o Meisoíndigo estimulou significativamente a formação da camada granulosa no epitélio de cauda de ratinho, embora não tenha sido observado nenhum efeito no IM, sugerindo que o Meisoíndigo induziu a diferenciação de células epiteliais e provocou a maturação de células epiteliais de escala diferenciada incompleta. Esta observação *in vivo* confirma ainda o relatório anterior de que o Meisoíndigo era capaz de induzir a diferenciação de células ML-1 *in vitro* (111).

QUADRO 4. Efeito de Meisoíndigo no índice mitótico no epitélio vaginal estimulado por estrogénio de fêmeas de ratinho

Grupos	Dosagem (mg/kg)	N.º Animais	Índice Mitótico (X±SD)	Valor P
Controlo	N/D	20	20,04 ± 3,71	
MTX	1,0	10	14,76 ± 4,29	<0,001
Meisoíndigo	50,0	10	20,01 ± 3,62	>0,05
Meisoíndigo	100,0	10	17,92 ± 4,75	>0,05
Meisoíndigo	200,0	10	16,06 ± 2,66	<0,05

O modelo de cauda de ratinho utilizado neste Exemplo é um modelo *in vivo* geralmente utilizado para avaliar o valor terapêutico de agentes para o tratamento de psoríase. A presente invenção é definida nas reivindicações e não se refere ao tratamento de psoríase, contudo, as observações acima sugerem fortemente que as moléculas pequenas aqui definidas são capazes de tratar a doença de tipo inflamatório psoríase. Todavia, os mecanismos da atividade antipsoríase destas moléculas pequenas são diferentes do agente imunossupressor e quimioterapêutico, MTX, uma vez que não foi observado nenhum efeito direto do Meisoíndigo na mitose celular. Em alternativa, a modulação da secreção/expressão de vários tipos diferentes de citocinas demonstrados nos Exemplos 1 a 4 desta invenção e a capacidade de indução de diferenciação celular destas moléculas são provavelmente a base molecular da ação antipsoríase.

Exemplo 7: o Meisoíndigo Suprime a Colite Ulcerativa Aguda Induzida nos Ratinhos Balb/c

Materiais e Métodos

Materiais: o Meisoíndigo foi sintetizado, purificado e a respetiva estrutura caracterizada por Natrogen Therapeutics, Inc. conforme descrito nos Exemplos acima. Uma suspensão de Meisoíndigo foi recentemente preparada em 0,5% de metilcelulose de sódio e fornecida oralmente para

os testes em animais descritos abaixo. O sal de DSS (Dextran Sulfate Sodium - Sódio de Sulfato de Dextrano, peso molecular: 36.000 a 44.000) foi adquirido em ICN Biomedicals. Outros produtos químicos utilizados nas seguintes experiências foram adquiridos em Sigma.

Foram alojadas por gaiola 5 fêmeas de ratinhos Balb/c livres de patógenos com 12 semanas de idade e pesos corporais de 22 a 25 gramas, e foram alimentadas livremente com água doce da torneira e péletes de roedor comercializadas. Os espaços dos animais foram controlados a 24 ± 2 °C com uma humidade relativa de $60 \pm 5\%$ e um ciclo de claridade/escurecimento de 12 horas (07:00 às 19:00 horas).

Indução de Colite Ulcerativa Aguda e colite induzida por DSS nos Ratinhos Balb/c: a colite foi induzida por DSS na água potável (MW 36.000 a 50.000, ICN biochemicals) conforme descrito anteriormente (112). Resumindo, os ratinhos foram divididos aleatoriamente em 3 grupos compostos por 10 ratinhos cada. No grupo de controlo negativo (Grupo 1), os ratinhos foram alimentados livremente com água doce da torneira e péletes MF, mudados duas vezes por semana durante 7 dias. No grupo de controlo positivo (grupo DSS ou Grupo 2), foi fornecido 5% de DSS na água da torneira durante 7 dias para induzir a colite, e os ratinhos foram alimentados com péletes MF. No grupo DSS-Meisoindigo (grupo de teste ou Grupo 3), os ratinhos receberam água potável com 5% de DSS e foram administrados oralmente com Meisoíndigo uma vez por dia numa dose de 50 mg/kg durante 7 dias consecutivos. As indicações fecais de colite foram registadas diariamente, incluindo o peso corporal e a natureza das fezes (soltas e/ou com sangue ou sangue oculto). Em seguida, os ratinhos foram sacrificados. Os tecidos do cólon foram retirados, fixos em 10% de formalina/PBS e inseridos em parafina. Para minimizar os artefactos físicos, o cólon removido foi colocado num papel de filtro qualitativo espesso sem esticar. O cólon foi

depois exposto ao contrário através do corte do mesmo de forma longitudinal. As lamelas foram coloridas com H&E e examinadas histoquimicamente de forma cega por 3 técnicos/patologistas.

Análise Estatística

Todos os dados foram expressados como uma média \pm SD. A significância estatística de qualquer diferença entre o controlo e os grupos experimentais foi determinada pelo teste t de Student com um valor P de, pelo menos, $< 0,05$.

Resultados e Discussão

Todos os animais do grupo de controlo positivo manifestaram gradualmente fezes soltas, sangue oculto e perda de peso depois de beberem 5% de DSS no dia 4. Em diversos casos graves (7/10), o sangue grosso ficou colado ao ânus além dos sintomas mencionados acima. Embora os procedimentos para induzir a colite ulcerativa nesta experiência tenham sido muito agressivos e os sintomas que ocorreram tenham sido muito agudos (manifestaram-se em 4 dias), o sangue oculto no grupo tratado com Meisoíndigo ocorreu em apenas 40% (4/10) dos animais. Os outros sintomas, tais como as fezes soltas, também foram menos graves em comparação com os do grupo de controlo. Não foram observados nenhuns sintomas de colite nos animais do grupo de controlo negativo (ratinhos normais), Fig. 7, painel A.

Os exames histológicos mostraram que os tecidos de todos os animais do grupo de controlo positivo desenvolveram lesões de tipo colite ulcerativa graves, tal como demonstrado pela infiltração de células inflamatórias, incluindo leucócitos polimorfonucleares e múltiplas lesões erosivas (classificações, 1 a 3). O abcesso da cripta e o epitélio regenerado também foram observados na mucosa cólica (Fig. 7, painel B). Para evitar a opinião subjetiva, as lesões ulcerativas do cólon nos ratinhos tanto do grupo de controlo positivo como do grupo tratado com Meisoíndigo foram calculadas de forma quantitativa e cega por 3

técnicos/patologistas no microscópio. Foi observada uma redução de 55% nas ulcerações dos animais do grupo tratado com Meisoíndigo quando comparado com o grupo de controlo positivo ($2,89 \pm 1,46$ no grupo tratado com Meisoíndigo vs. $6,38 \pm 2,20$ no grupo de controlo positivo). Na Fig. 7, o painel C ilustra a parede cólica de um ratinho tratado com Meisoíndigo com colite ulcerativa aguda induzida por 5% de DSS. A morfologia é semelhante à ilustrada no controlo normal (painel A), indicando que o Meisoíndigo é eficaz contra a colite ulcerativa aguda induzida por DSS nos ratinhos.

Exemplo 8: o Meisoíndigo Deteve Completamente a Doença Inflamatória Intestinal Idiopático num Paciente

Paciente: uma mulher com 43 anos de idade foi diagnosticada como tendo, durante um período de quatro anos, um caso de proctocolite crónica aguda com erosão e características sugestivas de doença inflamatória intestinal idiopática. O primeiro diagnóstico foi efetuado no North Shore University Hospital Manhasset, Long Island, Nova Iorque em 1999 através de colonoscopia. Os principais sintomas incluíam diarreia, fezes soltas e hemorragia, ao passo que toda a sua condição de saúde foi considerada excelente. O índice de atividade clínica (Quadro 5) (113) foi determinado como sendo entre 7 e 8. Foi-lhe prescrita espuma de hidrocortisona, que a paciente aplicou durante 10 dias de acordo com as instruções do médico. Contudo, não foi obtido nenhum efeito terapêutico a partir deste agente. Em fevereiro de 2000, a paciente regressou à sua casa na China e em diversas ocasiões consultou médicos chineses e experimentou vários medicamentos de ervas chinesas sugeridos, mas não foi observado nenhum efeito terapêutico. No início de 2002, a paciente foi a um Hospital Médico Chinês bem conhecido e respeitado em Beijing, onde foi efetuada uma Sigmoidoscopia Flexível. Novamente, foi diagnosticada como tendo doença inflamatória intestinal

ativa.

Quadro 5. Índice de Atividade Clínica para a Avaliação de Pacientes com Colite Ulcerativa (113)

Sintoma	Classificação Padrão	Classificação do Paciente	
		Antes do Tratamento	Após o Tratamento
Diarreia (N.º de evacuações diárias)			
0 a 2	0	2	0
3 ou 4	1		
5 ou 6	2		
7 a 9	3		
10 ou mais	4		
Diarreia noturna			
Não	0	0	0
Sim	1		
Sangue visível nas fezes (% de movimentos)			
0	0	2	0
<50	1		
>50	2		
100	3		
Incontinência fecal			
Não	0	1	0
Sim	1		
Dor abdominal ou câibras			
Nenhum	0	1	0
Leve	1		
Moderado	2		
Grave	3		
Bem-estar geral			
Perfeito	0	2	0
Muito bom	1		
Bom	2		
Médio	3		
Fraco	4		
Péssimo	5		

Sensibilidade abdominal			
Nenhum	0		
Leve e localizado	1		
Leve a moderado e difuso	2	0	0
Grave ou repercussão	3		
Necessidade de fármacos antidiarreia			
Não	0	1	0
Sim	1		
Classificação Máxima	21	9	0

Nesta altura, uma vez que os tratamentos anteriores não surtiram qualquer efeito, o médico prescreveu diversos medicamentos tradicionais chineses. A paciente tomou-os durante diversos meses, mas não resultou em nenhuma melhoria dos seus sintomas. Durante o período de fevereiro de 2000 até ao verão de 2002, a paciente também experimentou vários outros medicamentos tradicionais chineses devido à natureza contínua e muito problemática da sua doença, mas nada obteve êxito. No regresso aos Estados Unidos em 2002, a paciente foi ao Mount Sinai Medical Center, um centro americano reconhecido nacionalmente para o tratamento de doença inflamatória intestinal. Em outubro de 2002, o seu novo médico efetuou novamente uma colonoscopia, juntamente com um exame histológico de duas amostras de biopsia (A e B) (FIG. 8, painel A, antes do tratamento). Os exames concluíram que duas localizações (A e B) da inflamação correspondiam a "proctocolite crónica gravemente ativa com erosão e características sugestivas de doença inflamatória intestinal idiopática". O médico prescreveu CANASA® (mesalamina numa forma de supositório), um fármaco aprovado recentemente pela FDA, e considerou o melhor fármaco disponível para a condição da paciente.

Após a administração de CANASA® durante 7 dias, os sintomas pareceram aliviar; contudo, ocorreram

simultaneamente efeitos secundários significativos. Estes incluíam comichão na pele, câibras abdominais, dor e hemorragia. A paciente pediu então aconselhamento ao seu médico e recebeu instruções para utilizar esta medicação intermitentemente. Contudo, os efeitos secundários pioraram efetivamente sempre que a medicação foi utilizada. Por conseguinte, a paciente parou toda a aplicação desta medicação.

O Meisoíndigo foi sugerido como um potencial tratamento com base nas descobertas de que diversas citocinas pró-inflamatórias podem ser suprimidas e que as citocinas anti-inflamatórias, tais como a citocina IL-10, podem ser estimuladas. Uma vez que foram indicados muito menos efeitos secundários numa dose de 150 mg por dia deste medicamento na China para o tratamento de leucemia mieloide crónica, foi sugerido o Meisoíndigo.

A paciente tomou voluntariamente Meisoíndigo numa dose recomendada de 25 mg, uma vez por dia durante três semanas previstas de tratamento. Após as primeiras três doses, a paciente obteve uma remissão completa (três dias após o tratamento) e todos os sintomas inflamatórios desapareceram. Isto resultou numa classificação de zero utilizando o Índice de Atividade Clínica (Quadro 5). Após nove semanas de remissão (três semanas com o medicamento, três semanas sem o medicamento e três semanas novamente com o medicamento), a paciente visitou de novo o seu médico e pediu uma Sigmoidoscopia Flexível para determinar se a remissão era subjetiva ou objetiva. A Sigmoidoscopia Flexível foi efetuada a 4 de novembro de 2003. Depois de reavaliar os resultados, o médico concluiu que a inflamação foi completamente detida. Os exames patológicos confirmaram esta conclusão e determinaram que os espécimes A e B correspondiam agora a "proctocolite crónica inativa sugestiva de doença inflamatória intestinal idiopática". A FIG. 7 ilustra a fotografia antes (painel A, outubro de

2002) e após o tratamento (painel B, 4 de novembro de 2003) do mesmo local inflamatório nos exames com colonoscópio efetuados pelo mesmo médico.

Exemplo 9: o Efeito Terapêutico de Meisoíndigo na Colite Ulcerativa Crônica em Ratinhos Balb/c

O Meisoíndigo mostrou ser um regulador de múltiplas citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α , que são conhecidas por estarem envolvidas nos processos patológicos e na manutenção de várias doenças inflamatórias. O Meisoíndigo também mostrou ser um agente citostático que inibe um rápido crescimento da proliferação celular e provoca a maturação e diferenciação celular.

As experiências anteriores demonstraram que o Meisoíndigo tem um efeito curativo nos ratinhos Balb/c com colite ulcerativa agressiva, aguda e induzida por sódio de sulfato de dextrano (DSS). Estes resultados mostram que o Meisoíndigo é um agente eficaz contra várias doenças inflamatórias crônicas, conforme definido nas reivindicações, incluindo a doença inflamatória intestinal (DII).

Para esta experiência, foi utilizado um modelo de colite ulcerativa crônica induzida por DSS para verificar os alvos moleculares *in vivo* e para avaliar a atividade do Meisoíndigo contra DII.

Materiais e Métodos

Materiais: o Meisoíndigo foi sintetizado, purificado e a respetiva estrutura caracterizada pela Natrogen Therapeutics, Inc. Uma suspensão de Meisoíndigo foi recentemente preparada em 0,5% de metilcelulose de sódio e armazenada a 4 °C. A suspensão de fármaco foi administrada oralmente para efeitos dos testes em animais descritos abaixo. O 5-ácido aminossalicílico (5-ASA) foi adquirido em Sigma/o sal DSS (Sódio de Sulfato de Dextrano, peso molecular: 36.000 a 44.000) foi adquirido em ICN Biomedicals. Outros produtos químicos utilizados nas

seguintes experiências foram adquiridos em Sigma.

Foram alojados por gaiola cinco ratinhos Balb/c livres de patógenos com 12 semanas de idade e pesos corporais de 22 a 25 gramas, e foram alimentados livremente com água doce da torneira e péletes de roedor comercializados. Os espaços dos animais foram controlados a 24 ± 2 °C com uma humidade relativa de $60 \pm 5\%$ e um ciclo de claridade/escuridão de 12 horas (07:00 às 19:00 horas).

Métodos: indução de Colite Ulcerativa Crónica e colite induzida por DSS nos Ratinhos Balb/c: a colite ulcerativa crónica foi induzida por DSS na água potável (MW 36.000 a 44.000, ICN biochemicals) conforme descrito anteriormente [4]. Resumindo, 60 ratinhos foram divididos aleatoriamente em 5 grupos, com 12 ratinhos em cada um. O Grupo 1 foi utilizado como um controlo negativo (sem indução da doença), e foi alimentado livremente com água doce da torneira, e os péletes alimentares foram mudados duas vezes por semana, do início até ao fim da experiência. Os Grupos 2 a 5 foram utilizados para induzir cronicamente a colite ulcerativa e para examinar a atividade do Meisoíndigo. Os animais nos Grupos 2 a 5 foram alimentados normalmente, tal como o grupo de controlo negativo, e foram igualmente alimentados com água potável com 5% de DSS (MW 36.000 a 44.000) durante 7 dias, seguidos de água destilada durante 10 dias subsequentes. Os animais foram novamente alimentados com água potável com 5% de DSS durante 7 dias, seguidos de água destilada durante mais 10 dias. Este procedimento foi repetido durante um total de 3 ciclos.

Após 3 ciclos, a colite ulcerativa crónica desenvolveu-se e foi estabilizada conforme descrito. O Grupo 2 (grupo de controlo positivo) foi alimentado com soro fisiológico e o grupo 3 foi tratado com 5-ASA em 50 mg/kg/d por sonda gástrica como um controlo à base de fármaco positivo. Os Grupos 4 e 5 foram tratados com Meisoíndigo em dosagens de 25 e 75 mg/kg, uma vez por dia

durante 12 dias.

Durante o período da experiência, os índices de atividade da doença (IAD), que são expressos por pesos corporais, consistência das fezes e ocorrência de sangue oculto ou sangue retal grosso, foram determinados e registados diariamente por um investigador independente de acordo com os métodos descritos anteriormente [114, 116]. Esses parâmetros clínicos são medidas funcionais abrangentes semelhantes aos sintomas clínicos subjetivos observados na colite ulcerativa (CU) humana e correlacionam-se bem como o grau de cura histológica medida como classificações de cripta [114 a 116]. Em seguida, os ratinhos foram sacrificados. Os tecidos/órgãos do baço, cólon, bem como outros foram extraídos, examinados relativamente ao aspeto e os respetivos pesos foram registados. Para minimizar os artefactos físicos, o cólon removido foi colocado em papel de filtro qualitativo espesso sem esticar. O cólon foi exposto ao contrário através do corte de forma longitudinal. Todos os tecidos do cólon foram fixos com 10% de formalina/PBS, inseridos em parafina e foram criadas secções de lamela. As lamelas foram coloridas com H&E para o exame histológico. As lamelas foram examinadas de forma cega por técnicos/patologistas e fotografadas. As gravidades da colite ulcerativa foram classificadas numa escala de 0 a 3 e expressadas como o índice patológico de acordo com o sistema de classificação padrão: 0, normal; 1, infiltração focal de células inflamatórias, incluindo leucócitos polimorfonucleares; 2, infiltração de células inflamatórias, perda de glândulas e abcesso da cripta; 3, ulceração da mucosa. Os números de lesões ulcerativas de folículos linfóides foram calculados nas secções longitudinais médicas do cólon num microscópio de luz.

Análise Estatística

Todos os dados foram expressados como média + SD. A

significância estatística de qualquer diferença entre o controle e os grupos experimentais foi determinada pelo teste t de Student com um valor P de, pelo menos, $< 0,05$.

Resultados e Discussão

Índice de Atividade da Doença (IAD): depois de beberem 5% de DSS durante 7 dias, todos os ratinhos manifestaram inicialmente diarreia e sangue oculto nas respectivas fezes com diminuições significativas no peso corporal, ao passo que não foram observados nenhuns desses sintomas nos animais alimentados com água destilada. Contudo, estes sinais desapareceram (o IAD atingiu o ponto mais baixo em 8 a 9 dias) depois de os ratinhos terem bebido água destilada durante os 10 dias seguintes. Todavia, nas administrações subsequentes de DSS (3 ciclos de administração), estes sintomas clínicos não recuperaram, mas mais propriamente deterioraram-se durante o período de 10 dias de consumo de água destilada.

Após o terceiro ciclo de alimentação com DSS, os animais foram tratados durante 12 dias por sonda gástrica com veículo, 50 mg/kg/dia de 5-ASA, 25 ou 75 mg/kg/dia de Meisoíndigo. Vinte e quatro horas após a última administração, as classificações de IAD foram determinadas para a totalidade dos cinco grupos. Conforme ilustrado no Quadro 6 abaixo, após a cessação da alimentação com DSS durante 12 dias, o IAD diminuiu 50% no grupo tratado com veículo, o que se deveu mais provavelmente à autorregeneração [117]. Contudo, a extensão da diminuição do IAD tanto no grupo tratado com 5-ASA como nos dois grupos tratados com Meisoíndigo melhorou significativamente até 70%, o que reflete uma resposta terapêutica do tratamento de fármaco. A eficácia do Meisoíndigo em ambas as doses foi igual à do 5-ASA.

Quadro 6 – Índice de Atividade da Doença (perda de peso, consistência das fezes e hemorragia/3)

Agente		Pré- Tratamento Média±SD	Pós- Tratamento Média±SD	Recuperação (%)
Soro fisiológico	Fêmea (n=5)	2,40±0,2	1,07±1,0	
	Macho (n=6)	2,40±0,2	1,33±1,15	
	Média (n=11)	2,40±0,2	1,2±1,2	50,6
ASA 50 mg/kg	Fêmea (n=0)	N/D	N/D	
	Macho (n=10)	3,27±0,3	0,86±1,0	
	Média (n=10)	3,27±0,3	0,86±1,0	73,1 (p=0,031)
Meisoíndigo 25 mg/kg	Fêmea (n=5)	3,20±0,2	0,67±1,15	
	Macho (n=7)	2,73±0,35	0,93±1,0	
	Média (n=12)	3,00±0,1	0,80±1,06	73,3 (p=0,023)
Meisoíndigo 75 mg/kg	Fêmea (n=6)	3,11±0,68	0,93±1,0	
	Macho (n=6)	3,27±0,75	0,97±1,0	
	Média (n=12)	3,22±0,71	0,95±1,0	70,3 (p=0,033)
Nenhum	Fêmea (n=6)	0	0	N/D
	Macho (n=6)	0	0	N/D
	Média (n=12)	0	0	N/D

Classificações de Hemocultura

O Quadro 7 abaixo mostra as classificações de hemocultura em todos os grupos de animais tratados ou não tratados. Doze dias após a cessação da alimentação com DSS, os animais no grupo tratado com veículo mostraram uma ligeira recuperação (27,2%), que foi consistente com a natureza crônica da colite induzida por 3 ciclos consecutivos de alimentação com DSS, conforme indicado anteriormente [4]. Em oposição, foi observada uma melhoria

significativa tanto no grupo tratado com 5-ASA como no grupo tratado com Meisoíndigo. Os animais do grupo de Meisoíndigo de dose baixa mostraram a melhor resposta terapêutica (87%) em comparação com 75,7% do grupo com a dose elevada. A dose baixa foi igualmente melhor do que o 5-ASA do controlo positivo com uma recuperação de 80%. A cura com Meisoíndigo da hemorragia na DII induzida por DSS nos animais também é consistente com uma observação anterior de que o tratamento com Meisoíndigo produziu um fim rápido da hemorragia num paciente com colite ulcerativa.

Histologia qualitativa

As secções transversais (centrais) dos cólones dos ratinhos foram preparadas em formalina para a inserção em parafina. As lamelas foram coloridas com H&E. Foram utilizados dois ratinhos de cada grupo para a preparação das lamelas e para o exame da qualidade da preparação das lamelas e da coloração.

A histologia de animais tratados com veículo mostrou perda de epitélio superficial, perda de glândulas e a presença de inflamação crónica. As lamelas dos animais de ambos os grupos tratados com Meisoíndigo são mais semelhantes às dos grupos com 5-ASA que mostraram menos erosão e infiltrados inflamatórios mais leves em comparação com os dos ratinhos com DII.

Quadro 7 - Classificação para Sangue oculto

Agente		Pré- Tratamento Média+SD	Pós- Tratamento Média+SD	Recuperação (%)
Soro fisiológico	Fêmea (n=5)	2,4+0,89	1,2+1,09	50
	Macho (n=6)	2,0+0	2,0+0	0
	Média (n=11)	2,2+0,6	1,6+0,8	27,2

Agente		Pré- Tratamento Média+SD	Pós- Tratamento Média+SD	Recuperação (%)
ASA 50 mg/kg	Fêmea (n=0)	N/D	N/D	N/D
	Macho (n=10)	3,0+1,05	0,6+0,96	80,0
	Média (n=10)	3,0+1,05	0,6+0,96	80,0 (p=0,01)
Meisoíndigo 25 mg/kg	Fêmea (n=5)	2,8+1,09	0,8+1,0	71,4
	Macho (n=7)	3,1+1,06	0+0	100
	Média (n=12)	3,0+1,04	0,4+0,77	86,7 (p=0,01)
Meisoíndigo 75 mg/kg	Fêmea (n=6)	3,3+1,03	0,6+1,0	81,8
	Macho (n=6)	3,6+0,81	1,0+1,0	72,2
	Média (n=12)	3,5+0,9	0,83+1,0	76,3 (p=0,01)
Nenhum	Fêmea (n=6)	0	0	N/D
	Macho (n=6)	0	0	N/D
	Média (n=12)	0	0	N/D

Referências

1. Bebo, B. F., Jr., Yong, T., Orr, E. L. e Linthicum, D. S. "Hypothesis: a possible role for mast cells and their inflammatory mediators in the pathogenesis of autoimmune encephalomyelitis." *J Neurosci Res*, 45: 340 a 348, 1996.

2. Mennicken, F., Maki, R., de Souza, E. B. e Quirion, R. "Chemokines and chemokine receptors in the CNS: a possible role in neuroinflammation and patterning." *Trends Pharmacol Sci*, 20: 73 a 78, 1999.

3. Watanabe, T. e Fan, J. "Atherosclerosis and inflammation mononuclear cell recruitment and adhesion molecules with reference to the implication of ICAM-1/LFA-1 pathway in atherogenesis." *Int J Cardiol*, 66 Supl 1: S45 a 53; discussão S55, 1998.

4. Sullivan, G. W., Sarembock, I. J. e Linden, J. "The

role of inflammation in vascular diseases." *J Leukoc Biol*, 67: 591 a 602, 2000.

5. Franceschi, C., Bonafe, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E. e De Benedictis, G. "Inflammaging. An evolutionary perspective on immunosenescence." *Ann N Y Acad Sci*, 908: 244 a 254, 2000.

6. Rogers, J. e Shen, Y. "A perspective on inflammation in Alzheimer's disease." *Ann N Y Acad Sci*, 924: 132 a 135, 2000.

7. Li, Y. J., Oliveira, S. A., Xu, P., Martin, E. R., Stenger, J. E., Scherzer, C. R., Hauser, M. A., Scott, W. K., Small, G. W., Nance, M. A., Watts, R. L., Hubble, J. P., Koller, W. C., Pahwa, R., Stern, M. B., Hiner, B. C., Jankovic, J., Goetz, C. G., Mastaglia, F., Middleton, L. T., Roses, A. D., Saunders, A. M., Schmechel, D. E., Gullans, S. R., Haines, J. L., Gilbert, J. R., Vance, J. M. e Pericak-Vance, M. A. "Glutathione S-Transferase Omega 1 modifies age-onset of Alzheimer Disease and Parkinson Disease." *Hum Mol Genet*, 12: 3259 a 3267, 2003.

8. Maccarrone, M., Bari, M., Battista, N. e Finazzi-Agro, A. "Endocannabinoid degradation, endotoxic shock and inflammation." *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 1: 53 a 63, 2002.

9. Lindsberg, P. J. e Grau, A. J. "Inflammation and infections as risk factors for ischemic stroke." *Stroke*, 34: 2518 a 2532, 2003.

10. DeGraba, T. J. "The role of inflammation in atherosclerosis." *Adv Neurol*, 92: 29 a 42, 2003.

11. Ito, H. "IL-6 and Crohn's disease." *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2: 125 a 130, 2003.

12. von der Thusen, J. H., Kuiper, J., van Berkel, T. J. e Biessen, E. A. "Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential." *Pharmacol Rev*, 55: 133 a 166, 2003.

13. Schmidt, M. I. e Duncan, B. B. "Diabetes: an

inflammatory metabolic condition." *Clin Chem Lab Med*, 41:1120 a 1130, 2003.

14. Virdis, A. e Schiffrin, E. L. "Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension?" *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 12: 181 a 187, 2003.

15. Tracy, R. P. "Inflammation, the metabolic syndrome and cardiovascular risk." *Int J Clin Pract Supl* 10 a 17, 2003.

16. Haugeberg, G., Orstavik, R. E. e Kvien, T. K. "Effects of rheumatoid arthritis on bone." *Curr Opin Rheumatol*, 15: 469 a 475, 2003.

17. Tanaka, Y., Okada, Y., and Nakamura, T. "Inter- and intracellular signaling in secondary osteoporosis." *J Bone Miner Metab*, 21: 61 a 66, 2003.

18. Williams, J. D. e Griffiths, C. E. "Cytokine blocking agents in dermatology." *Clin Exp Dermatol*, 27: 585 a 590, 2002.

19. Rutgeerts, P. "A critical assessment of new therapies in inflammatory bowel disease." *J Gastroenterol Hepatol*, 17 Supl: S176 a 185, 2002.

20. Rutgeerts, P., Lemmens, L., Van Assche, G., Noman, M., Borghini-Fuhrer, I. e Goedkoop, R. "Treatment of active Crohn's disease with onercept (recombinant human soluble p55 tumour necrosis factor receptor): results of a randomized, open-label, pilot study." *Aliment Pharmacol Ther*, 17: 185 a 192, 2003.

21. Weinberg, J. M., Saini, R. e Tutrone, W. D. "Biologic therapy for psoriasis--the first wave: infliximab, etanercept, efalizumab, and alefacept." *J Drugs Dermatol*, 1: 303 a 310, 2002.

22. Cooper, J. C., Morgan, G., Harding, S., Subramanyam, M., Majeau, G. R., Moulder, K. e Alexander, D. R. "Alefacept selectively promotes NK cell-mediated deletion of CD45R0+ human T cells." *Eur J Immunol*, 33: 666 a 675, 2003.

23. Cather, J. C. e Menter, A. "Modulating T cell responses for the treatment of psoriasis: a focus on efalizumab." *Expert Opin Biol Ther*, 3: 361 a 370, 2003.

24. Brown, S. L., Greene, M. H., Gershon, S. K., Edwards, E. T. e Braun, M. M. "Tumor necrosis factor antagonist therapy and lymphoma development: twenty-six cases reported to the Food and Drug Administration." *Arthritis Rheum*, 46: 3151 a 3158, 2002.

25. Weisman, M. H. "What are the risks of biologic therapy in rheumatoid arthritis? An update on safety." *J Rheumatol Supl*, 65: 33 a 38, 2002.

26. Antoni, C. e Braun, J. "Side effects of anti-TNF therapy: current knowledge." *Clin Exp Rheumatol*, 20: S152 a 157, 2002.

27. Mendonca, C. O. e Burden, A D. "Current concepts in psoriasis and its treatment." *Pharmacol Ther*, 99: 133 a 147, 2003.

28. Schon, M. P. "Animal models of psoriasis - what can we learn from them?" *J Invest Dermatol*, 112: 405 a 410, 1999.

29. Bessis, N., Doucet, C., Cottard, V., Douar, A. M., Firat, H., Jorgensen, C., Mezzina, M. e Boissier, M. C. "Gene therapy for rheumatoid arthritis." *J Gene Med*, 4: 581 a 591, 2002.

30. Hochberg, M. C., Tracy, J. K., Hawkins-Holt, M. e Flores, R H. "Comparison of the efficacy of the tumour necrosis factor alpha blocking agents adalimumab, etanercept, and infliximab when added to methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis*, 62 Supl 2: ii13 a 16, 2003.

31. Fassas, A. e Kimiskidis, V. K. "Stem cell transplantation for multiple sclerosis: What is the evidence?" *Blood Rev*, 17: 233 a 240, 2003.

32. Furlan, R., Pluchino, S. e Martino, G. "Gene therapy-mediated modulation of immune processes in the

central nervous system." *Curr Pharm Des*, 9: 2002 a 2008, 2003.

33. Ghezzi, P. e Mennini, T. "Tumor necrosis factor and motoneuronal degeneration: an open problem." *Neuroimmunomodulation*, 9: 178 a 182, 2001.

34. Andreakos, E. T., Foxwell, B. M., Brennan, F. M., Maini, R. N. e Feldmann, M. "Cytokines and anti-cytokine biologicals in autoimmunity: present and future." *Cytokine Growth Factor Rev*, 13: 299 a 313, 2002.

35. Najarian, D. J. e Gottlieb, A. B. "Connections between psoriasis and Crohn's disease." *J Am Acad Dermatol*, 48: 805 a 821; questionário 822 a 804, 2003.

36. Noguchi, M., Hiwatashi, N., Liu, Z. e Toyota, T. "Secretion imbalance between tumour necrosis factor and its inhibitor in inflammatory bowel disease." *Gut*, 43: 203 a 209, 1998.

37. Autschbach, F., Braunstein, J., Helmke, B., Zuna, I., Schurmann, G., Niemir, Z. I., Wallich, R., Otto, H. F. e Meuer, S. C. "In situ expression of interleukin-10 in noninflamed human gut and in inflammatory bowel disease." *Am J Pathol*, 153: 121 a 130, 1998.

38. Schreiber, S., Heinig, T., Thiele, H. G. e Raedler, A. "Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease." *Gastroenterology*, 108: 1434 a 1444, 1995.

39. Baugh, J. A. e Bucala, R. "Mechanisms for modulating TNF alpha in immune and inflammatory disease." *Curr Opin Drug Discov Devel*, 4: 635 a 650, 2001.

40. Gabay, C. "IL-1 trap. Regeneron/Novartis." *Curr Opin Investig Drugs*, 4: 593 a 597, 2003.

41. Palladino, M. A., Bahjat, F. R., Theodorakis, E. A. e Moldawer, L. L. "Anti-TNF-alpha therapies: the next generation." *Nat Rev Drug Discov*, 2: 736 a 746, 2003.

42. Girolomoni, G., Pastore, S., Albanesi, C. e Cavani, A. "Targeting tumor necrosis factor-alpha as a

potential therapy in inflammatory skin diseases." *Curr Opin Investig Drugs*, 3: 1590 a 1595, 2002.

43. Elliott, M. J., Maini, R. N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bijl, H. e Woody, J. N. "Repeated therapy with monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) in patients with rheumatoid arthritis." *Lancet*, 344:1125 a 1127, 1994.

44. Moreland, L. W., Baumgartner, S. W., Schiff, M. H., Tindall, E. A., Fleischmann, R. M., Weaver, A. L., Ettlinger, R. E., Cohen, S., Koopman, W. J., Mohler, K., Widmer, M. B. e Bloesch, C. M. "Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein." *N Engl J Med*, 337: 141 a 147, 1997.

45. Campion, G. V., Lebsack, M. E., Lookabaugh, J., Gordon, G. e Catalano, M. "Dose-range and dose-frequency study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis. The IL-1Ra Arthritis Study Group." *Arthritis Rheum*, 39: 1092 a 1101, 1996.

46. Feldmann, M. "Pathogenesis of arthritis: recent research progress." *Nat Immunol*, 2: 771 a 773, 2001.

47. Ji, X. J., Liu, X. M., Li, K., Chen, R. H. e Wang, L. G. "Pharmacological studies of meisoindigo: absorption and mechanism of action." *Biomed Environ Sci*, 4: 332 a 337, 1991.

48. Dustin, M. L., Rothlein, R., Bhan, A. K., Dinarello, C. A. e Springer, T. A. "Induction by IL 1 and interferongamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1)." *J Immunol*, 137:245 a 254, 1986.

49. Strange, P., Skov, L. e Baadsgaard, O. "Interferon gamma-treated keratinocytes activate T cells in the presence of superantigens: involvement of major histocompatibility complex class II molecules." *J Invest*

Dermatol, 102:150 a 154, 1994.

50. Subramanian, N. e Bray, M. A. "Interleukin 1 releases histamine from human basophils and mast cells in vitro." *J Immunol*, 138: 271 a 275, 1987.

51. Grossman, R. M., Krueger, J., Yourish, D., Graneli-Piperno, A., Murphy, D. P., May, L. T., Kupper, T. S., Sehgal, P. B. e Gottlieb, A. B. "Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 6367 a 6371, 1989.

52. Schreiber, A. B., Winkler, M. E. e Derynck, R. "Transforming growth factor-alpha: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor." *Science*, 232: 1250 a 1253, 1986.

53. Detmar, M., Brown, L. F., Claffey, K. P., Yeo, K. T., Kocher, O., Jackman, R. W., Berse, B. e Dvorak, H. F. "Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis." *J Exp Med*, 180: 1141 a 1146, 1994.

54. Dayer, J. M. "The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis." *Rheumatology (Oxford)*, 42 Supl 2: ii3 a 10, 2003.

55. Bresnihan, B., Alvaro-Gracia, J. M., Cobby, M., Doherty, M., Doxnljan, Z., Emery, P., Nuki, G., Pavelka, K., Rau, R., Rozman, B., Watt, I., Williams, B., Aitchison, R., McCabe, D. e Musikic, P. "Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist." *Arthritis Rheum*, 41: 2196 a 2204, 1998.

56. Ishihara, K. e Hirano, T. "IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease." *Cytokine Growth Factor Rev*, 13: 357 a 368, 2002.

57. Whalen, J. D., Lechman, E. L., Carlos, C. A., Weiss, K., Kovesdi, I., Glorioso, J. C., Robbins, P. D. e Evans, C. H. "Adenoviral transfer of the viral IL-10 gene periarticularly to mouse paws suppresses development of

collagen-induced arthritis in both injected and uninjected paws." *J Immunol*, 162: 3625 a 3632, 1999.

58. Lechman, E. R., Jaffurs, D., Ghivizzani, S. C., Gambotto, A., Kovesdi, I., Mi, Z., Evans, C. H. e Robbins, P. D. "Direct adenoviral gene transfer of viral IL-10 to rabbit knees with experimental arthritis ameliorates disease in both injected and contralateral control knees." *J Immunol*, 163: 2202 a 2208, 1999.

59. Glabinski, A. R., Bielecki, B. e Ransohoff, R. M. "Chemokine upregulation follows cytokine expression in chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis." *Scand J Immunol*, 58: 81 a 88, 2003.

60. Diab, A., Zhu, J., Xiao, B. G., Mustafa, M. e Link, H. "High IL-6 and low IL-10 in the central nervous system are associated with protracted relapsing EAE in DA rats." *J Neuropathol Exp Neurol*, 56: 641 a 650, 1997.

61. Samoilova, E. B., Horton, J. L., Hilliard, B., Liu, T. S. e Chen, Y. "IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells." *J Immunol*, 161: 6480 a 6486, 1998.

62. Robertson, J., Beaulieu, J. M., Doroudchi, M. M., Durham, H. D., Julien, J. P. e Mushynski, W. E. "Apoptotic death of neurons exhibiting peripherin aggregates is mediated by the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha." *J Cell Biol*, 155: 217 a 226, 2001.

63. de Jong, B. A., Huizinga, T. W., Bollen, E. L., Uitdehaag, B. M., Bosma, G. P., van Buchem, M. A., Remarque, E. J., Burgmans, A. C., Kalkers, N. F., Polman, C. H. e Westendorp, R G. "Production of IL-1beta and IL-1Ra as risk factors for susceptibility and progression of relapse-onset multiple sclerosis." *J Neuroimmunol*, 126: 172 a 179, 2002.

64. McGeer, E. G. e McGeer, P. L. "Inflammatory processes in Alzheimer's disease." *Prog*

Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 27: 741 a 749, 2003.

65. Dickson, D. W., Lee, S. C., Mattiace, L. A., Yen, S. H. e Brosnan, C. "Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease." *Glia*, 7: 75 a 83, 1993.

66. Lahiri, D. K., Chen, D., Vivien, D., Ge, Y. W., Greig, N. H. e Rogers, J. T. "Role of cytokines in the gene expression of amyloid beta-protein precursor: identification of a 5'-UTR-binding nuclear factor and its implications in Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis*, 5: 81 a 90, 2003.

67. Laliberte, R. E., Perregaux, D. G., Hoth, L. R., Rosner, P. J., Jordan, C. K., Peese, K. M., Eggler, J. F., Dombroski, M. A., Geoghegan, K. F. e Gabel, C. A. "Glutathione s-transferase omega 1-1 is a target of cytokine release inhibitory drugs and may be responsible for their effect on interleukin-1beta posttranslational processing." *J Biol Chem*, 278: 16.567 a 16.578, 2003.

68. Haboubi, N. Y., Kaftan, S. M. e Schofield, P. F. "Radiation colitis is another mimic of chronic inflammatory bowel disease." *J Clin Pathol*, 45: 272, 1992.

69. Brynskov, J., Tvede, N., Andersen, C. B. e Vilien, M. "Increased concentrations of interleukin 1 beta, interleukin-2, and soluble interleukin-2 receptors in endoscopical mucosal biopsy specimens with active inflammatory bowel disease." *Gut*, 33: 55 a 58, 1992.

70. Matsuura, T., West, G. A., Youngman, K. R., Klein, J. S. e Fiocchi, C. "Immune activation genes in inflammatory bowel disease." *Gastroenterology*, 104: 448 a 458, 1993.

71. Beagley, K. W. e Elson, C. O. "Cells and cytokines in mucosal immunity and inflammation." *Gastroenterol Clin North Am*, 21: 347 a 366, 1992.

72. MacDermott, R. P. "Alterations in the mucosal immune system in ulcerative colitis and Crohn's disease." *Med Clin North Am*, 78: 1207 a 1231, 1994.

73. Isaacs, K. L., Sartor, R. B. e Haskill, S. "Cytokine messenger RNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by polymerase chain reaction amplification." *Gastroenterology*, 103: 1587 a 1595, 1992.

74. Indaram, A. V., Nandi, S., Weissman, S., Lam, S., Bailey, B., Blumstein, M., Greenberg, R. e Bank, S. "Elevated basal intestinal mucosal cytokine levels in asymptomatic first-degree relatives of patients with Crohn's disease." *World J Gastroenterol*, 6: 49 a 52, 2000.

75. Indaram, A. V., Visvalingam, V., Locke, M. e Bank, S. "Mucosal cytokine production in radiation-induced proctosigmoiditis compared with inflammatory bowel disease." *Am J Gastroenterol*, 95: 1221 a 1225, 2000.

76. Ito, T. e Ikeda, U. "Inflammatory cytokines and cardiovascular disease." *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2:257 a 265, 2003.

77. Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. e Spiegelman, B. M. "Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance." *Science*, 259: 87 a 91, 1993.

78. Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L. e Spiegelman, B. M. "Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance." *J Clin Invest*, 95: 2409 a 2415, 1995.

79. Hotamisligil, G. S., Murray, D. L., Choy, L. N. e Spiegelman, B. M. "Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 4854 a 4858, 1994.

80. Lang, C. H., Dobrescu, C. e Bagby, G. J. "Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output." *Endocrinology*, 130: 43-52, 1992.

81. Hotamisligil, G. S. e Spiegelman, B. M. "Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-

diabetes link." *Diabetes*, 43: 1271 a 1278, 1994.

82. Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W. e Hotamisligil, G. S. "Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function." *Nature*, 389:610 a 614, 1997.

83. Ruan, H. e Lodish, H. F. "Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha." *Cytokine Growth Factor Rev*, 14: 447 a 455, 2003.

84. Ruan, H., Pownall, H. J. e Lodish, H. F. "Troglitazone antagonizes tumor necrosis factor-alpha-induced reprogramming of adipocyte gene expression by inhibiting the transcriptional regulatory functions of NF-kappaB." *J Biol Chem*, 278: 28.181 a 28.192, 2003.

85. Ofei, F., Hurel, S., Newkirk, J., Sopwith, M. e Taylor, R. "Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM." *Diabetes*, 45: 881 a 885, 1996.

86. Suri, A. e Katz, J. D. "Dissecting the role of CD4+ T cells in autoimmune diabetes through the use of TCR transgenic mice." *Immunol Rev*, 169: 55 a 65, 1999.

87. Jun, H. S., Santamaria, P., Lim, H. W., Zhang, M. L. e Yoon, J. W. "Absolute requirement of macrophages for the development and activation of beta-cell cytotoxic CD8+ T-cells in T-cell receptor transgenic NOD mice." *Diabetes*, 48: 34 a 42, 1999.

88. Yoon, J. W., Jun, H. S. e Santamaria, P. "Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells." *Autoimmunity*, 27:109 a 122, 1998.

89. Rabinovitch, A. e Suarez-Pinzon, W. L. "Role of cytokines in the pathogenesis of autoimmune diabetes mellitus." *Rev Endocr Metab Disord*, 4: 291 a 299, 2003.

90. Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T. e Tada, K. "Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)." *Int J Cancer*, 26: 171 a 176, 1980.
91. Schumann, R. R., Belka, C., Reuter, D., Lamping, N., Kirschning, C. J., Weber, J. R. e Pfeil, D. "Lipopolysaccharide activates caspase-1 (interleukin-1-converting enzyme) in cultured monocytic and endothelial cells." *Blood*, 91: 577 a 584, 1998.
92. Yoza, B. K., Hu, J. Y. e McCall, C. E. "Protein-tyrosine kinase activation is required for lipopolysaccharide induction of interleukin 1beta and NFkappaB activation, but not NFkappaB nuclear translocation." *J Biol Chem*, 271:18.306 a 18.309, 1996.
93. Haversen, L., Ohlsson, B. G., Hahn-Zoric, M., Hanson, L. A. e Mattsby-Baltzer, I. "Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappa B." *Cell Immunol*, 220: 83 a 95, 2002.
94. Guha, M., O'Connell, M. A., Pawlinski, R., Hollis, A., McGovern, P., Yan, S. F., Stern, D. e Mackman, N. "Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression." *Blood*, 98:1429 a 1439, 2001.
95. Guha, M. e Mackman, N. "LPS induction of gene expression in human monocytes." *Cell Signal*, 13: 85 a 94, 2001.
96. Wang, E., Ma, W. J., Aghajanian, C. e Spriggs, D. R. "Posttranscriptional regulation of protein expression in human epithelial carcinoma cells by adenine-uridine-rich elements in the 3'-untranslated region of tumor necrosis factor-alpha messenger RNA." *Cancer Res*, 57: 5426 a 5433, 1997.
97. Dean, J. L., Wait, R., Mahtani, K. R., Sully, G.,

Clark, A. R. e Saklatvala, J. "The 3' untranslated region of tumor necrosis factor alpha mRNA is a target of the mRNA-stabilizing factor HuR." *Mol Cell Biol*, 21: 721 a 730, 2001.

98. Osman, F., Jarrous, N., Ben-Asouli, Y. e Kaempfer, R. "A cis-acting element in the 3'-untranslated region of human TNF-alpha mRNA renders splicing dependent on the activation of protein kinase PKR." *Genes Dev*, 13:3280 a 3293, 1999.

99. Liu, J. H., Wei, S., Burnette, P. K., Gamero, A. M., Hutton, M. e Djeu, J. Y. "Functional association of TGF-beta receptor II with cyclin B." *Oncogene*, 18: 269 a 275, 1999.

100. Wang, L. G., Liu, X. M., Kreis, W. e Budman, D. R. "Down-regulation of prostate-specific antigen expression by finasteride through inhibition of complex formation between androgen receptor and steroid receptor-binding consensus in the promoter of the PSA gene in LNCaP cells." *Cancer Res*, 57: 714 a 719, 1997.

101. Wang, L. G., Liu, X. M., Wikel, H. e Bloch, A. "Activation of casein kinase II in ML-1 human myeloblastic leukemia cells requires IGF-1 and transferrin." *J Leukoc Biol*, 57: 332 a 334, 1995.

102. Kong, M., Barnes, E. A., Ollendorff, V. e Donoghue, D. J. "Cyclin F regulates the nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction." *Embo J*, 19: 1378 a 1388, 2000.

103. McGovern, S. L. e Shoichet, B. K. "Kinase inhibitors: not just for kinases anymore." *J Med Chem*, 46: 1478 a 1483, 2003.

104. Group, C. "Phase III clinical trials of Meisoindigo on the treatment of chronic myeloid leukemia." *J. Chinese Hematology*, 18: 69 a 72, 1997.

105. Tang, X., Fenton, M. J. e Amar, S. "Identification and functional characterization of a novel

binding site on TNF-alpha promoter." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 4096 a 4101, 2003.

106. Bosman, B., Matthiesen, T., Hess, V. e Friderichs, E. "A quantitative method for measuring antipsoriatic activity of drugs by the mouse tail test." *Skin Pharmacol*, 5: 41 a 48, 1992.

107. Jarrett, A. "The physiology and pathophysiology of the skin." *Lancet*, 2: 445, 1973.

108. Sebok, B., Szabados, T., Kerenyi, M., Schneider, I. e Mahrle, G. "Effect of fumaric acid, its dimethylester, and topical antipsoriatic drugs on epidermal differentiation in the mouse tail model." *Skin Pharmacol*, 9: 99 a 103, 1996.

109. Sebok, B., Bonnekoh, B., Kerenyi, M. e Gollnick, H. "Tazarotene induces epidermal cell differentiation in the mouse tail test used as an animal model for psoriasis." *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 13: 285 a 291, 2000.

110. Feldman, S. R., Garton, R., Averett, W., Balkrishnan, R.e Vallee, J. "Strategy to manage the treatment of severe psoriasis: considerations of efficacy, safety and cost." *Expert Opin Pharmacother*, 4: 1525 a 1533, 2003.

111. Liu, X. M., Wang, L. G., Li, H. Y. e Ji, X. J. "Induction of differentiation and down-regulation of c-myb gene expression in ML-1 human myeloblastic leukemia cells by the clinically effective anti-leukemia agent meisoindigo." *Biochem Pharmacol*, 51: 1545 a 1551, 1996.

112. Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y. e Nakaya, R. "A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice." *Gastroenterology*, 98: 694 a 702, 1990.

113. Lichtiger, S., Present, D. H., Kornbluth, A., Gelernt, I., Bauer, J., Galler, G., Michelassi, F. e Hanauer, S. "Cyclosporine in severe ulcerative colitis

refractory to steroid therapy." *N Engl J Med*, 330: 1841 a 1845, 1994.

114. Cooper, H.S., et al., "Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis", *Lab Invest*, Vol. 69, págs. 238 a 249, 1993.

115. Murthy, S., et al., "The efficacy of BATy1015 in dextran sulfate model of mouse colitis", *Inflamm Res* Vol. 46, N.º 6, págs. 224 a 233, 1997.

116. Murthy, S.N., et al., "Treatment Of Dextran Sulfate Sodium-Induced Murine Colitis By Intracolonic Cyclosporine", *Digestive Diseases and Sciences*, Vol. 38, N.º 9, págs. 1722 a 1734, 1993.

117. Okayasu, I., et al., "A novel method in induction or reliable experimental acute and chronic colitis in mice", *Gastroenterology* Vol. 98, págs. 694 a 702, 1990.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> Natrogen Therapeutics, Inc. Wang, Longgui Liu, Xiao Mei Mo, Lian Mencher, Simon K. McCarron, Jr., James P.

<120> MÉTODOS DE TRATAMENTO DE UMA DOENÇA DE TIPO INFLAMATÓRIO

<130> 81481-301

<150> US 10/754.547

<151> 12-01-2004

<160> 4

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> *Primer* específico do Gene IL-6

<400> 1

tcaattcggt ctgaagagg 19

<210> 2

<211> 18

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> *Primer* específico do Gene IL-6

<400> 2

ccccccaggag aagattcc 18

<210> 3

<211> 18

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> *Primer* específico de TNF-alfa

<400> 3

tgcccagact cggcaaag 18

<210> 4

<211> 18

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> *Primer* específico de TNF-alfa

<400> 4

ggagaagggt gaccgact 18

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- US 6566341 B [0020]
- EP 1079826 A, Eisenbrand [0021] [0023] [0105]
- DE 10053474 [0025]
- WO 02074742 A [0025]
- WO 03100401 A [0025]
- WO 02092079 A [0025]
- WO 03051900 A [0025]
- US 2002132792 A [0025]
- US 10754547 B [0168]

Literatura não relacionada com patentes referida na descrição

- ORAVCOVA et al. *Journal of Chromatography B*, 1996, vol. 677, 1-27 [0070]
- KUHNZ ; GIESCHEN. *Drug Metabolism and Disposition*, 1998, vol. 26, 1120-1127 [0071]
- BEBO, B. F., JR. ; YONG, T. ; ORR, E. L. ; LINTHI-CUM, D. S. Hypothesis: a possible role for mast cells and their inflammatory mediators in the pathogenesis of autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res*, 1996, vol. 45, 340-348 [0167]
- MENNICKEN, F. ; MAKI, R. ; DE SOUZA, E. B. ; QUIRION, R. Chemokines and chemokine receptors in the CNS: a possible role in neuroinflammation and patterning. *Trends Pharmacol Sci*, 1999, vol. 20, 73-78 [0167]
- WATANABE, T. ; FAN, J. Atherosclerosis and

inflammation mononuclear cell recruitment and adhesion molecules with reference to the implication of ICAM-1/LFA-1 pathway in atherogenesis. *Int J Car-diol*, 1998, vol. 66 (1), S45-53S55 [0167]

- **SULLIVAN, G. W. ; SAREMBOCK, I. J. ; LINDEN, J.** The role of inflammation in vascular diseases. *J Leukoc Biol*, 2000, vol. 67, 591-602 [0167]
- **FRANCESCHI, C. ; BONAFE, M. ; VALENSIN, S. ; OLIVIERI, F. ; DE LUCA, M. ; OTTAVIANI, E. ; DE BENEDICTIS, G.** Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, vol. 908, 244-254 [0167]
- **ROGERS, J. ; SHEN, Y.** A perspective on inflammation in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, vol. 924, 132-135 [0167]
- **LI, Y. J. ; OLIVEIRA, S. A. ; XU, P. ; MARTIN, E. R. ; STENGER, J. E. ; SCHERZER, C. R. ; HAUSER, M. A. ; SCOTT, W. K. ; SMALL, G. W. ; NANCE, M. A.** Glutathione S-Transferase Omega 1 modifies age-at-onset of Alzheimer Disease and Parkinson Disease. *Hum Mol Genet*, 2003, vol. 12, 3259-3267 [0167]
- **MACCARRONE, M. ; BARI, M. ; BATTISTA, N. ; FI-NAZZI-AGRO, A.** Endocannabinoid degradation, en-dototoxic shock and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2002, vol. 1, 53-63 [0167]
- **LINDSBERG, P. J. ; GRAU, A. J.** Inflammation and infections as risk factors for ischemic stroke. *Stroke*, 2003, vol. 34, 2518-2532 [0167]
- **DEGRABA, T. J.** The role of inflammation in atherosclerosis. *Adv Neurol*, 2003, vol. 92, 29-42 [0167]
- **ITO, H.** IL-6 and Crohn's disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2003, vol. 2, 125-130 [0167]
- **VON DER THUSEN, J. H. ; KUIPER, J. ; VAN BER-KEL, T. J. ; BIESSEN, E. A.** Interleukins in atherosclerosis:

molecular pathways and therapeutic potential. *Pharmacol Rev*, 2003, vol. 55, 133-166 [0167]

- **SCHMIDT, M. I. ; DUNCAN, B. B.** Diabetes: an inflammatory metabolic condition. *Clin Chem Lab Med*, 2003, vol. 41, 1120-1130 [0167]
- **VIRDIS, A. ; SCHIFFRIN, E. L.** Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension?. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2003, vol. 12, 181-187 [0167]
- **TRACY, R. P.** Inflammation, the metabolic syndrome and cardiovascular risk. *Int J Clin Pract*, 2003, 10-17 [0167]
- **HAUGEBERG, G. ; ORSTAVIK, R. E. ; KVIEN, T. K.** Effects of rheumatoid arthritis on bone. *Curr Opin Rheumatol*, 2003, vol. 15, 469-475 [0167]
- **TANAKA, Y. ; OKADA, Y. ; NAKAMURA, T.** Inter-and intracellular signaling in secondary osteoporosis. *J Bone Miner Metab*, 2003, vol. 21, 61-66 [0167]
- **WILLIAMS, J. D. ; GRIFFITHS, C. E.** Cytokine blocking agents in dermatology. *Clin Exp Dermatol*, 2002, vol. 27, 585-590 [0167]
- **RUTGEERTS, P.** A critical assessment of new therapies in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002, vol. 17, 176-185 [0167]
- **RUTGEERTS, P. ; LEMMENS, L. ; VAN ASSCHE, G. ; NOMAN, M. ; BORGHINI-FUHRER, I. ; GOED-KOOP, R.** Treatment of active Crohn's disease with onercept (recombinant human soluble p55 tumour necrosis factor receptor): results of a randomized, open-label, pilot study. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003, vol. 17, 185-192 [0167]
- **WEINBERG, J. M. ; SAINI, R. ; TUTRONE, W. D.** Biologic therapy for psoriasis--the first wave: infliximab, etanercept, efalizumab, and alefacept. *J Drugs Dermatol*, 2002, vol. 1, 303-310 [0167]
- **COOPER, J. C. ; MORGAN, G. ; HARDING, S. ; SUBRAMANYAM, M. ; MAJEAU, G. R. ; MOULDER, K. ;**

- ALEXANDER, D. R.** Alefacept selectively promotes NK cell-mediated deletion of CD45R0+ human T cells. *Eur J Immunol*, 2003, vol. 33, 666-675 [0167]
- **CATHER, J. C. ; MENTER, A.** Modulating T cell responses for the treatment of psoriasis: a focus on efalizumab. *Expert Opin Biol Ther*, 2003, vol. 3, 361-370 [0167]
 - **BROWN, S. L. ; GREENE, M. H. ; GERSHON, S. K. ; EDWARDS, E. T. ; BRAUN, M. M.** Tumor necrosis factor antagonist therapy and lymphoma development: twenty-six cases reported to the Food and Drug Administration. *Arthritis Rheum*, 2002, vol. 46, 3151-3158 [0167]
 - **WEISMAN, M. H.** What are the risks of biologic therapy in rheumatoid arthritis? An update on safety. *J Rheumatol*, 2002, vol. 65, 33-38 [0167]
 - **ANTONI, C. ; BRAUN, J.** Side effects of anti-TNF therapy: current knowledge. *Clin Exp Rheumatol*, 2002, vol. 20, 152-157 [0167]
 - **MENDONCA, C. O. ; BURDEN, A D.** Current concepts in psoriasis and its treatment. *Pharmacol Ther*, 2003, vol. 99, 133-147 [0167]
 - **SCHON, M. P.** Animal models of psoriasis - what can we learn from them?. *J Invest Dermatol*, 1999, vol. 112, 405-410 [0167]
 - **BESSIS, N. ; DOUCET, C. ; COTTARD, V. ; DOUAR, A. M. ; FIRAT, H. ; JORGENSEN, C. ; MEZZINA, M. ; BOISSIER, M. C.** Gene therapy for rheumatoid arthritis. *J Gene Med*, 2002, vol. 4, 581-591 [0167]
 - **HOCHBERG, M. C. ; TRACY, J. K. ; HAWKINS-HOLT, M. ; FLORES, R H.** Comparison of the efficacy of the tumour necrosis factor alpha blocking agents adalimumab, etanercept, and inflix-imab when added to methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2003, vol. 62 (2), ii13-16 [0167]
 - **FASSAS, A. ; KIMISKIDIS, V. K.** Stem cell

transplantation for multiple sclerosis: What is the evidence?. *Blood Rev*, 2003, vol. 17, 233-240 [0167]

- **FURLAN, R. ; PLUCHINO, S. ; MARTINO, G.** Gene therapy-mediated modulation of immune processes in the central nervous system. *Curr Pharm Des*, 2003, vol. 9, 2002-2008 [0167]
- **GHEZZI, P. ; MENNINI, T.** Tumor necrosis factor and motoneuronal degeneration: an open problem. *Neuroimmunomodulation*, 2001, vol. 9, 178-182 [0167]
- **ANDREAKOS, E. T. ; FOXWELL, B. M. ; BREN-NAN, F. M. ; MAINI, R. N. ; FELDMANN, M.** Cy-tokines and anti-cytokine biologicals in autoimmunity: present and future. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002, vol. 13, 299-313 [0167]
- **NAJARIAN, D. J. ; GOTTLIEB, A. B.** Connections between psoriasis and Crohn's disease. *J Am Acad Dermatol*, 2003, vol. 48, 805-821 822-804 [0167]
- **NOGUCHI, M. ; HIWATASHI, N. ; LIU, Z. ; TOYOTA, T.** Secretion imbalance between tumour necrosis factor and its inhibitor in inflammatory bowel disease. *Gut*, 1998, vol. 43, 203-209 [0167]
- **AUTSCHBACH, F. ; BRAUNSTEIN, J. ; HELMKE, B. ; ZUNA, I. ; SCHURMANN, G. ; NIEMIR, Z. I. ; WALLICH, R. ; OTTO, H. F. ; MEUER, S. C.** In situ expression of interleukin-10 in noninflamed human gut and in inflammatory bowel disease. *Am J Pathol*, 1998, vol. 153, 121-130 [0167]
- **SCHREIBER, S. ; HEINIG, T. ; THIELE, H. G. ; RAE-DLER, A.** Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 1995, vol. 108, 1434-1444 [0167]
- **BAUGH, J. A. ; BUCALA, R.** Mechanisms for modulating TNF alpha in immune and inflammatory disease. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2001, vol. 4, 635-650 [0167]
- **GABAY, C.** IL-1 trap. Regeneron/Novartis. *Curr Opin*

Investig Drugs, 2003, vol. 4, 593-597 [0167]

- **PALLADINO, M. A. ; BAHJAT, F. R. ; THEODOR-AKIS, E. A. ; MOLDAWER, L. L.** Anti-TNF-alpha therapies: the next generation. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, vol. 2, 736-746 [0167]
- **GIROLOMONI, G. ; PASTORE, S. ; ALBANESI, C. ; CAVANI, A.** Targeting tumor necrosis factor-alpha as a potential therapy in inflammatory skin diseases. *Curr Opin Investig Drugs*, 2002, vol. 3, 1590-1595 [0167]
- **ELLIOTT, M. J. ; MAINI, R. N. ; FELDMANN, M. ; LONG-FOX, A. ; CHARLES, P. ; BIJL, H. ; WOODY, J. N.** Repeated therapy with monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) in patients with rheumatoid arthritis. *Lancet*, 1994, vol. 344, 1125-1127 [0167]
- **MORELAND, L. W. ; BAUMGARTNER, S. W. ; SCHIFF, M. H. ; TINDALL, E. A. ; FLEISCHMANN, R. M. ; WEAVER, A. L. ; ETTLINGER, R E. ; COHEN, S. ; KOOPMAN, W. J. ; MOHLER, K.** Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N Engl J Med*, 1997, vol. 337, 141-147 [0167]
- **CAMPION, G. V. ; LEBSACK, M. E. ; LOOKABAUGH, J. ; GORDON, G. ; CATALANO, M.** Dose-range and dose-frequency study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis. The IL-1Ra Arthritis Study Group. *Arthritis Rheum*, 1996, vol. 39, 1092-1101 [0167]
- **FELDMANN, M.** Pathogenesis of arthritis: recent research progress. *Nat Immunol*, 2001, vol. 2, 771-773 [0167]
- **JI, X. J. ; LIU, X. M. ; LI, K. ; CHEN, R. H. ; WANG, L. G.** Pharmacological studies of meisoindigo: absorption and mechanism of action. *Biomed Environ Sci*, 1991, vol. 4, 332-337 [0167]

- **DUSTIN, M. L. ; ROTHLEIN, R. ; BHAN, A. K. ; DIN-ARELLO, C. A. ; SPRINGER, T. A.** Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1. *J Immunol*, 1986, vol. 137, 245-254 [0167]
- **STRANGE, P. ; SKOV, L. ; BAADSGAARD, O.** In-terferon gamma-treated keratinocytes activate T cells in the presence of superantigens: involvement of major histocompatibility complex class II molecules. *J Invest Dermatol*, 1994, vol. 102, 150-154 [0167]
- **SUBRAMANIAN, N. ; BRAY, M. A.** Interleukin 1 releases histamine from human basophils and mast cells in vitro. *J Immunol*, 1987, vol. 138, 271-275 [0167]
- **GROSSMAN, R. M. ; KRUEGER, J. ; YOURISH, D. ; GRANELLI-PIPERNO, A. ; MURPHY, D. P. ; MAY, L. T. ; KUPPER, T. S. ; SEHGAL, P. B. ; GOTTLIEB, A. B.** Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, vol. 86, 6367-6371 [0167]
- **SCHREIBER, A. B. ; WINKLER, M. E. ; DERYNCK, R.** Transforming growth factor-alpha: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science*, 1986, vol. 232, 1250-1253 [0167]
- **DETMAR, M. ; BROWN, L. F. ; CLAFFEY, K. P. ; YEO, K. T. ; KOCHER, O. ; JACKMAN, R. W. ; BER-SE, B. ; DVORAK, H. F.** Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *J Exp Med*, 1994, vol. 180, 1141-1146 [0167]
- **DAYER, J. M.** The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 2003, vol. 42 (2), ii3-10 [0167]
- **BRESNIHAN, B. ; ALVARO-GRACIA, J. M. ; COBBY, M. ; DOHERTY, M. ; DOXNLJAN, Z. ; EMERY, P. ; NUKI, G. ;**

- PAVELKA, K. ; RAU, R ; ROZMAN, B.** Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum*, 1998, vol. 41, 2196-2204 [0167]
- **ISHIHARA, K. ; HIRANO, T.** IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002, vol. 13, 357-368 [0167]
 - **WHALEN, J. D. ; LECHMAN, E. L. ; CARLOS, C. A. ; WEISS, K. ; KOVESDI, I. ; GLORIOSO, J. C. ; ROBBINS, P. D. ; EVANS, C. H.** Adenoviral transfer of the viral IL-10 gene periarticularly to mouse paws suppresses development of collagen-induced arthritis in both injected and uninjected paws. *J Immunol*, 1999, vol. 162, 3625-3632 [0167]
 - **LECHMAN, E. R ; JAFFURS, D. ; GHIVIZZANI, S. C. ; GAMBOTTO, A. ; KOVESDI, I. ; MI, Z. ; EVANS, C. H. ; ROBBINS, P. D.** Direct adenoviral gene transfer of viral IL-10 to rabbit knees with experimental arthritis ameliorates disease in both injected and con-tralateral control knees. *J Immunol*, 1999, vol. 163, 2202-2208 [0167]
 - **GLABINSKI, A. R. ; BIELECKI, B. ; RANSOHOFF, R. M.** Chemokine upregulation follows cytokine expression in chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand J Immunol*, 2003, vol. 58, 81-88 [0167]
 - **DIAB, A. ; ZHU, J. ; XIAO, B. G. ; MUSTAFA, M. ; LINK, H.** High IL-6 and low IL-10 in the central nervous system are associated with protracted relapsing EAE in DA rats. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1997, vol. 56, 641-650 [0167]
 - **SAMOILOVA, E. B. ; HORTON, J. L. ; HILLIARD, B. ; LIU, T. S. ; CHEN, Y.** IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of

IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol*, 1998, vol. 161, 6480-6486 [0167]

- **ROBERTSON, J. ; BEAULIEU, J. M. ; DOROUD-CHI, M. M. ; DURHAM, H. D. ; JULIEN, J. P. ; MUSH-YNISKI, W. E.** Apoptotic death of neurons exhibiting peripherin aggregates is mediated by the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α . *J Cell Biol*, 2001, vol. 155, 217-226 [0167]
- **DE JONG, B. A. ; HUIZINGA, T. W. ; BOLLEN, E. L. ; UITDEHAAG, B. M. ; BOSMA, G. P. ; VAN BUCHEM, M. A. ; REMARQUE, E. J. ; BURGMANS, A. C. ; KALKERS, N. F. ; POLMAN, C. H.** Production of IL-1 β and IL-1Ra as risk factors for susceptibility and progression of relapse-onset multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 2002, vol. 126, 172-179 [0167]
- **MCGEER, E. G. ; MCGEER, P. L.** Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2003, vol. 27, 741-749 [0167]
- **DICKSON, D. W. ; LEE, S. C. ; MATTIACE, L. A. ; YEN, S. H. ; BROSAN, C.** Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia*, 1993, vol. 7, 75-83 [0167]
- **LAHIRI, D. K. ; CHEN, D. ; VIVIEN, D. ; GE, Y. W. ; GREIG, N. H. ; ROGERS, J. T.** Role of cytokines in the gene expression of amyloid beta-protein precursor: identification of a 5'-UTR-binding nuclear factor and its implications in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 2003, vol. 5, 81-90 [0167]
- **LALIBERTE, R. E. ; PERREGAUX, D. G. ; HOTH, L. R. ; ROSNER, P. J. ; JORDAN, C. K. ; PEESE, K. M. ; EGGLE, J. F. ; DOMBROSKI, M. A. ; GE-OGHEGAN, K. F. ; GABEL, C. A.** Glutathione s-transferase omega 1-1 is a target of cytokine release inhibitory drugs and may be

responsible for their effect on interleukin-1 β posttranslational processing. *J Biol Chem*, 2003, vol. 278, 16567-16578 [0167]

- **HABOUBI, N. Y. ; KAFTAN, S. M. ; SCHOFIELD, P. F.** Radiation colitis is another mimic of chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol*, 1992, vol. 45, 272 [0167]
- **BRYNSKOV, J. ; TVEDE, N. ; ANDERSEN, C. B. ; VILLEN, M.** Increased concentrations of interleukin 1 β , interleukin-2, and soluble interleukin-2 receptors in endoscopical mucosal biopsy specimens with active inflammatory bowel disease. *Gut*, 1992, vol. 33, 55-58 [0167]
- **MATSUURA, T. ; WEST, G. A. ; YOUNGMAN, K. R. ; KLEIN, J. S. ; FIOCCHI, C.** Immune activation genes in inflammatory bowel disease. *Gastroenter-ology*, 1993, vol. 104, 448-458 [0167]
- **BEAGLEY, K. W. ; ELSON, C. O.** Cells and cytokines in mucosal immunity and inflammation. *Gastroenter-ol Clin North Am*, 1992, vol. 21, 347-366 [0167]
- **MACDERMOTT, R. P.** Alterations in the mucosal immune system in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Med Clin North Am*, 1994, vol. 78, 1207-1231 [0167]
- **ISAACS, K. L. ; SARTOR, R. B. ; HASKILL, S.** Cy-tokine messenger RNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by polymerase chain reaction amplification. *Gastroenterology*, 1992, vol. 103, 1587-1595 [0167]
- **INDARAM, A. V. ; NANDI, S. ; WEISSMAN, S. ; LAM, S. ; BAILEY, B. ; BLUMSTEIN, M. ; GREEN-BERG, R. ; BANK, S.** Elevated basal intestinal mu-cosal cytokine levels in asymptomatic first-degree relatives of patients with Crohn's disease. *World J Gas-troenterol*, 2000, vol. 6, 49-52 [0167]
- **INDARAM, A. V. ; VISVALINGAM, V. ; LOCKE, M. ; BANK,**

S. Mucosal cytokine production in radiation-induced proctosigmoiditis compared with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, 2000, vol. 95, 1221-1225 [0167]

- **ITO, T. ; IKEDA, U.** Inflammatory cytokines and cardiovascular disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2003, vol. 2, 257-265 [0167]
- **HOTAMISLIGIL, G. S. ; SHARGILL, N. S. ; SPIEGELMAN, B. M.** Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 1993, vol. 259, 87-91 [0167]
- **HOTAMISLIGIL, G. S. ; ARNER, P. ; CARO, J. F. ; ATKINSON, R. L. ; SPIEGELMAN, B. M.** Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, 1995, vol. 95, 2409-2415 [0167]
- **HOTAMISLIGIL, G. S. ; MURRAY, D. L. ; CHOY, L. N. ; SPIEGELMAN, B. M.** Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, vol. 91, 4854-4858 [0167]
- **LANG, C. H. ; DOBRESU, C. ; BAGBY, G. J.** Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. *Endocrinology*, 1992, vol. 130, 43-52 [0167]
- **HOTAMISLIGIL, G. S. ; SPIEGELMAN, B. M.** Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes*, 1994, vol. 43, 1271-1278 [0167]
- **UYSAL, K. T. ; WIESBROCK, S. M. ; MARINO, M. W. ; HOTAMISLIGIL, G. S.** Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature*, 1997, vol. 389, 610-614 [0167]
- **RUAN, H. ; LODISH, H. F.** Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, vol. 14, 447-455 [0167]

- **RUAN, H. ; POWNALL, H. J. ; LODISH, H. F.** Troglitazone antagonizes tumor necrosis factor- α -induced reprogramming of adipocyte gene expression by inhibiting the transcriptional regulatory functions of NF- κ B. *J Biol Chem*, 2003, vol. 278, 28181-28192 [0167]
- **OFEI, F. ; HUREL, S. ; NEWKIRK, J. ; SOPWITH, M. ; TAYLOR, R.** Effects of an engineered human anti-TNF- α antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes*, 1996, vol. 45, 881-885 [0167]
- **SURI, A. ; KATZ, J. D.** Dissecting the role of CD4+ T cells in autoimmune diabetes through the use of TCR transgenic mice. *Immunol Rev*, 1999, vol. 169, 55-65 [0167]
- **JUN, H. S. ; SANTAMARIA, P. ; LIM, H. W. ; ZHANG, M. L. ; YOON, J. W.** Absolute requirement of macrophages for the development and activation of beta-cell cytotoxic CD8+ T-cells in T-cell receptor transgenic NOD mice. *Diabetes*, 1999, vol. 48, 34-42 [0167]
- **YOON, J. W. ; JUN, H. S. ; SANTAMARIA, P.** Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells. *Autoimmunity*, 1998, vol. 27, 109-122 [0167]
- **RABINOVITCH, A. ; SUAREZ-PINZON, W. L.** Role of cytokines in the pathogenesis of autoimmune diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab Disord*, 2003, vol. 4, 291-299 [0167]
- **TSUCHIYA, S. ; YAMABE, M. ; YAMAGUCHI, Y. ; KOBAYASHI, Y. ; KONNO, T. ; TADA, K.** Establishment and characterization of a human acute mono-cytic leukemia cell line (THP-1. *Int J Cancer*, 1980, vol. 26, 171-176 [0167]
- **SCHUMANN, R. R. ; BELKA, C. ; REUTER, D. ; LAMPING, N.**

- ; KIRSCHNING, C. J. ; WEBER, J. R. ; PFEIL, D. Lipopolysaccharide activates cas-pase-1 (interleukin-1-converting enzyme) in cultured monocytic and endothelial cells. *Blood*, 1998, vol. 91, 577-584 [0167]
- YOZA, B. K. ; HU, J. Y. ; MCCALL, C. E. Protein-tyrosine kinase activation is required for lipopolysaccharide induction of interleukin 1beta and NFkappaB activation, but not NFkappaB nuclear translocation. *J Biol Chem*, 1996, vol. 271, 18306-18309 [0167]
 - HAVERSEN, L. ; OHLSSON, B. G. ; HAHN-ZORIC, M. ; HANSON, L. A. ; MATTSBY-BALTZER, I. Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cy-tokine production in monocytic cells via NF-kappa B. *Cell Immunol*, 2002, vol. 220, 83-95 [0167]
 - GUHA, M. ; O'CONNELL, M. A. ; PAWLINSKI, R. ; HOLLIS, A. ; MCGOVERN, P. ; YAN, S. F. ; STERN, D. ; MACKMAN, N. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood*, 2001, vol. 98, 1429-1439 [0167]
 - GUHA, M. ; MACKMAN, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*, 2001, vol. 13, 85-94 [0167]
 - WANG, E. ; MA, W. J. ; AGHAJANIAN, C. ; SPRIGGS, D. R. Posttranscriptional regulation of protein expression in human epithelial carcinoma cells by adenine-uridine-rich elements in the 3'-un-translated region of tumor necrosis factor-alpha messenger RNA. *Cancer Res*, 1997, vol. 57, 5426-5433 [0167]
 - DEAN, J. L. ; WAIT, R. ; MAHTANI, K. R. ; SULLY, G. ; CLARK, A. R. ; SAKLATVALA, J. The 3' untranslated region of tumor necrosis factor alpha mRNA is a target of the mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol Cell*

Biol, 2001, vol. 21, 721-730 [0167]

- **OSMAN, F. ; JARROUS, N. ; BEN-ASOULI, Y. ; KAEMPFFER, R.** A cis-acting element in the 3'-un-translated region of human TNF-alpha mRNA renders splicing dependent on the activation of protein kinase PKR. *Genes Dev*, 1999, vol. 13, 3280-3293 [0167]
- **LIU, J. H. ; WEI, S. ; BURNETTE, P. K. ; GAMERO, A. M. ; HUTTON, M. ; DJEU, J. Y.** Functional association of TGF-beta receptor II with cyclin B. *Onco-gene*, 1999, vol. 18, 269-275 [0167]
- **WANG, L. G. ; LIU, X. M. ; KREIS, W. ; BUDMAN, D. R.** Down-regulation of prostate-specific antigen expression by finasteride through inhibition of complex formation between androgen receptor and steroid receptor-binding consensus in the promoter of the PSA gene in LNCaP cells. *Cancer Res*, 1997, vol. 57, 714-719 [0167]
- **WANG, L. G. ; LIU, X. M. ; WIKIEL, H. ; BLOCH, A.** Activation of casein kinase II in ML-1 human myeloblastic leukemia cells requires IGF-1 and transferrin. *J Leukoc Biol*, 1995, vol. 57, 332-334 [0167]
- **KONG, M. ; BARNES, E. A. ; OLLENDORFF, V. ; DONOGHUE, D. J.** Cyclin F regulates the nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction. *Embo J*, 2000, vol. 19, 1378-1388 [0167]
- **MCGOVERN, S. L. ; SHOICHET, B. K.** Kinase inhibitors: not just for kinases anymore. *J Med Chem*, 2003, vol. 46, 1478-1483 [0167]
- **Group, C.** Phase III clinical trials of Meisoindigo on the treatment of chronic myeloid leukemia. *J. Chinese Hematology*, 1997, vol. 18, 69-72 [0167]
- **TANG, X. ; FENTON, M. J. ; AMAR, S.** Identification and functional characterization of a novel binding site on TNF-alpha promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, vol. 100, 4096-4101 [0167]

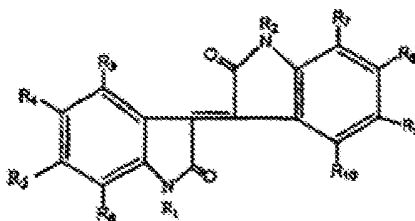
- **BOSMAN, B. ; MATTHIESEN, T. ; HESS, V. ; FRIDERICH, E.** A quantitative method for measuring antipsoriatic activity of drugs by the mouse tail test. *Skin Pharmacol*, 1992, vol. 5, 41-48 [0167]
- **JARRETT, A.** The physiology and pathophysiology of the skin. *Lancet*, 1973, vol. 2, 445 [0167]
- **SEBOK, B. ; SZABADOS, T. ; KERENYI, M. ; SCHNEIDER, I. ; MAHRLE, G.** Effect of fumaric acid, its dimethylester, and topical antipsoriatic drugs on epidermal differentiation in the mouse tail model. *Skin Pharmacol*, 1996, vol. 9, 99-103 [0167]
- **SEBOK, B. ; BONNEKOH, B. ; KERENYI, M. ; GOLLNICK, H.** Tazarotene induces epidermal cell differentiation in the mouse tail test used as an animal model for psoriasis. *Skin Pharmacol Appl Skin Phys-iol*, 2000, vol. 13, 285-291 [0167]
- **FELDMAN, S. R. ; GARTON, R. ; AVERETT, W. ; BALKRISHNAN, R. ; VALLEE, J.** Strategy to manage the treatment of severe psoriasis: considerations of efficacy, safety and cost. *Expert Opin Pharmacother*, 2003, vol. 4, 1525-1533 [0167]
- **LIU, X. M. ; WANG, L. G. ; LI, H. Y. ; JI, X. J.** Induction of differentiation and down-regulation of c-myc gene expression in ML-1 human myeloblastic leukemia cells by the clinically effective anti-leukemia agent meisoindigo. *Biochem Pharmacol*, 1996, vol. 51, 1545-1551 [0167]
- **OKAYASU, I. ; HATAKEYAMA, S. ; YAMADA, M. ; OHKUSA, T. ; INAGAKI, Y. ; NAKAYA, R.** A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 1990, vol. 98, 694-702 [0167]
- **LICHTIGER, S. ; PRESENT, D. H. ; KORNBLUTH, A. ; GELERNT, I. ; BAUER, J. ; GALLER, G. ; MICHELASSI, F. ; HANAUER, S.** Cyclosporine in severe ulcerative

colitis refractory to steroid therapy. *N Engl J Med*, 1994, vol. 330, 1841-1845 [0167]

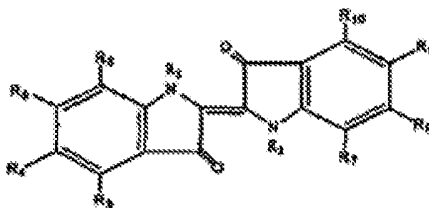
- **COOPER, H.S. et al.** Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest*, 1993, vol. 69, 238-249 [0167]
- **MURTHY, S. et al.** The efficacy of BATy1015 in dextran sulfate model of mouse colitis. *Inflamm Res*, 1997, vol. 46 (6), 224-233 [0167]
- **MURTHY, S.N. et al.** Treatment Of Dextran Sulfate Sodium-Induced Murine Colitis By Intracolonic Cyclosporine. *Digestive Diseases and Sciences*, 1993, vol. 38 (9), 1722-1734 [0167]
- **OKAYASU, I. et al.** A novel method in induction or reliable experimental acute and chronic colitis in mice. *Gastroenterology*, 1990, vol. 98, 694-702 [0167]

REIVINDICAÇÕES

1. Uma composição farmacêutica para a utilização no tratamento de uma doença de tipo inflamatório associada aos níveis de expressão de citocinas, que compreende, pelo menos, um composto da Fórmula (I) ou Fórmula (II)



FÓRMULA (I)



FÓRMULA (II)

em que o composto é administrado numa quantidade suficiente para tratar a doença de tipo inflamatório através da inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias ou da estimulação da expressão de citocinas anti-inflamatórias;

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ e R₁₀ são iguais ou diferentes e representam um átomo de hidrogénio; um grupo hidroxil; um grupo nitroso; um grupo nitro; um monossacárido; um dissacárido; um átomo de halogénio; um grupo hidrocarbilo ou um grupo hidrocarbilo funcional não substituído ou substituído por uma ou mais frações hidroxil, frações carboxil, frações nitroxil, monossacáridos,

dissacáridos, aminas, amidas, tióis, sulfatos, sulfonatos, sulfonamidas ou halogéneos, em que o hidrocarbilo tem 1 a 8 átomos de carbono; um grupo -R11R12, em que R11 e R12 podem ser iguais ou diferentes e representam um átomo de hidrogénio, um grupo alquilo de cadeia linear ou cadeia ramificada com 1 a 18 átomos de carbono que podem incluir adicionalmente um ou mais grupos hidroxí e/ou amino, um grupo arilo substituído ou não substituído que pode compreender um ou mais heteroátomos, ou um grupo acilo, ou R11 e R12 formam em conjunto um anel com 2 a 6 grupos CH₂ opcionalmente substituídos; um grupo azo -N=N-R13, em que R13 representa um sistema aromático que pode ser substituído por um ou mais grupos carboxilo e/ou grupos fosforilo, ou um grupo selecionado a partir do grupo que consiste em açúcares, aminoácidos, péptidos ou hormonas esteroides; ou R1 e R6, e R2 e R7, respetivamente, formam independentemente uns dos outros um anel em conjunto com 1 a 4 grupos CH₂ opcionalmente substituídos; e

R1 e R2 são iguais ou diferentes e representam um átomo de hidrogénio; um átomo de halogéneo; um grupo hidroxí; um grupo hidrocarbilo ou um grupo hidrocarbilo funcional não substituído ou substituído por uma ou mais frações hidroxí, frações carboxí, frações nitroxí, monossacáridos, dissacáridos, aminas, amidas, tióis, sulfatos, sulfonatos, sulfonamidas ou halogéneos, em que o hidrocarbilo tem 1 a 8 átomos de carbono; um grupo mono-, di- ou trialkilsililo com 1 a 6 átomos de carbono independentemente uns dos outros em cada instância no grupo alquilo de cadeia linear ou cadeia ramificada; um grupo mono-, di- ou triarylsililo com grupos arilo substituídos ou não substituídos independentemente uns dos outros em cada instância; um grupo -NR17R18, em que R17 e R18 podem ser iguais ou diferentes e representam um átomo de hidrogénio, um grupo alquilo de cadeia linear ou cadeia ramificada com 1 a 18 átomos de carbono que podem incluir

adicionalmente um ou mais grupos hidroxí e/ou amino um grupo arilo substituído ou não substituído que pode compreender um ou mais heteroátomos, ou um grupo acilo; um grupo metilenoamino -CH₂-NR₁₇R₁₈, em que R₁₇ e R₁₈ têm as definições acima; um resíduo de aminoácido fisiológico ligado ao azoto como uma amida, monossacárido substituído ou não substituído, dissacáridos ou oligossacáridos; ou um açúcar, aminoácido, péptido ou hormona esteroide;

e em que a doença do tipo inflamatório é selecionada a partir do grupo que consiste em: doença inflamatória intestinal; artrite reumatoide; e lúpus.

2. Utilização de, pelo menos, um composto de acordo com o definido na reivindicação 1 no fabrico de um medicamento para o tratamento de uma doença de tipo inflamatório associada aos níveis de expressão de citocinas num animal,

em que o composto está numa quantidade suficiente para tratar a doença de tipo inflamatório através da inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias ou da estimulação da expressão de citocinas anti-inflamatórias;

e em que a doença inflamatória é selecionada a partir do grupo que consiste em: doença inflamatória intestinal; artrite reumatoide; e lúpus.

3. Pelo menos um composto da Fórmula (I) ou Fórmula (II) de acordo com o definido na reivindicação 1 para a utilização no tratamento de uma doença de tipo inflamatório associada aos níveis de expressão de citocinas num animal,

em que o composto está numa quantidade suficiente para tratar a doença de tipo inflamatório através da inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias ou da estimulação da expressão de citocinas anti-inflamatórias;

e em que a doença de tipo inflamatório é selecionada a partir do grupo que consiste em: doença inflamatória intestinal; artrite reumatoide; e lúpus.

4. A composição para a utilização de acordo com a reivindicação 1, ou a utilização de acordo com a reivindicação 2 ou o composto para a utilização de acordo com a reivindicação 3, em que, pelo menos, R1 ou R2 é um monossacárido, um dissacárido não substituído ou substituído por uma ou mais frações hidroxí ou frações carboxí; um halogéneo; um grupo hidrocarbilo ou um grupo hidrocarbilo funcional não substituído ou substituído por uma ou mais frações hidroxí, frações carboxí, frações nitroxí, monossacáridos, dissacáridos, aminas, amidas, tióis, sulfatos, sulfonatos, sulfonamidas ou halogéneos, em que o hidrocarbilo tem 1 a 8 átomos de carbono.

5. A composição para a utilização, ou a utilização ou o composto para a utilização de acordo com a reivindicação 4, em que, pelo menos, R1 ou R2 é um monossacárido tri-acetilado.

6. A composição para a utilização, ou a utilização ou o composto para a utilização de acordo com a reivindicação 4, em que, pelo menos, R1 ou R2 é um grupo metilo.

7. A composição para a utilização, ou a utilização ou o composto para a utilização de acordo com a reivindicação 6, em que R1 ou R2 é um monossacárido acetilado.

8. A composição para a utilização de acordo com a reivindicação 1, ou a utilização de acordo com a reivindicação 2 ou o composto para a utilização de acordo com a reivindicação 3, em que o composto da Fórmula (I) é Meisoíndigo ou é glico-Meisoíndigo tri-acetilado ou é NATURA.

9. A composição para a utilização de acordo com a

reivindicação 1, que compreende ainda um agente anti-inflamatório.

10. A utilização de acordo com a reivindicação 2, em que o medicamento compreende ainda um agente anti-inflamatório.

11. O composto para a utilização de acordo com a reivindicação 3, em que o composto é administrado em conjunto com um agente anti-inflamatório.

12. A composição para a utilização de acordo com a reivindicação 9, ou a utilização de acordo com a reivindicação 10 ou o composto para a utilização de acordo com a reivindicação 11, em que o agente anti-inflamatório é selecionado a partir do grupo que consiste: num analgésico; num agente antirreumático; num agente gastrointestinal; numa preparação contra a gota; em glicocorticoides; numa preparação oftálmica; num agente respiratório; numa preparação nasal; e num agente de membrana mucosa.

13. A composição para a utilização, ou a utilização ou o composto para a utilização de acordo com a reivindicação 12, em que o analgésico é selecionado a partir do grupo que consiste em: naproxeno, indometacina, ibuprofeno, cetorolaco de trometamina, trissalicilato de magnésio de colina e rofecoxib; o agente antirreumático é selecionado a partir do grupo que consiste em: ciclosporina, sulfassalazina, valdecoxib, penicilamina e dexametasona; o agente gastrointestinal é selecionado a partir do grupo que consiste em: mesalamina, balsalazida dissódica e olsalazina sódica; a preparação para a gota é sulindac; o glicocorticoide é selecionado a partir do grupo que consiste em: dexametasona, fosfato de dexametasona, acetato de metilprednisolona, hidrocortisona e fosfato de sódio de hidrocortisona; a preparação nasal é selecionada a partir

do grupo que consiste em monohidrato de dipropionato de beclometasona, propionato de fluticasona, acetonido de triancinolona, flunisolida, monohidrato de furoato de mometasona e budesonida; a preparação oftálmica é cetorolaco de trometamina; o agente respiratório é nedocromil sódico; e o agente de membrana mucosa é selecionado a partir do grupo que consiste em dipropionato de alclometasona, butirato de hidrocortisona, flurandrenolida, valerato de betametasona e propionato de clobetasol.

14. A composição para a utilização de acordo com a reivindicação 1, ou a utilização de acordo com a reivindicação 2 ou o composto para a utilização de acordo com a reivindicação 3, em que a doença inflamatória intestinal é a doença de Crohn ou colite ulcerativa.

15. A composição para a utilização de acordo com a reivindicação 1, ou a utilização de acordo com a reivindicação 2 ou o composto para a utilização de acordo com a reivindicação 3, em que o composto é administrado numa concentração suficiente para inibir a citocina IL-1 α , β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-17, IL-18, TNF- α , LT, LIF, Oncostatina ou IFN γ , α , β , γ .

16. A composição para a utilização de acordo com a reivindicação 1, ou a utilização de acordo com a reivindicação 2 ou o composto para a utilização de acordo com a reivindicação 3, em que o composto é administrado numa concentração suficiente para estimular a expressão de citocinas IL-4, IL-10, IL-11, W-13 ou TGF β .

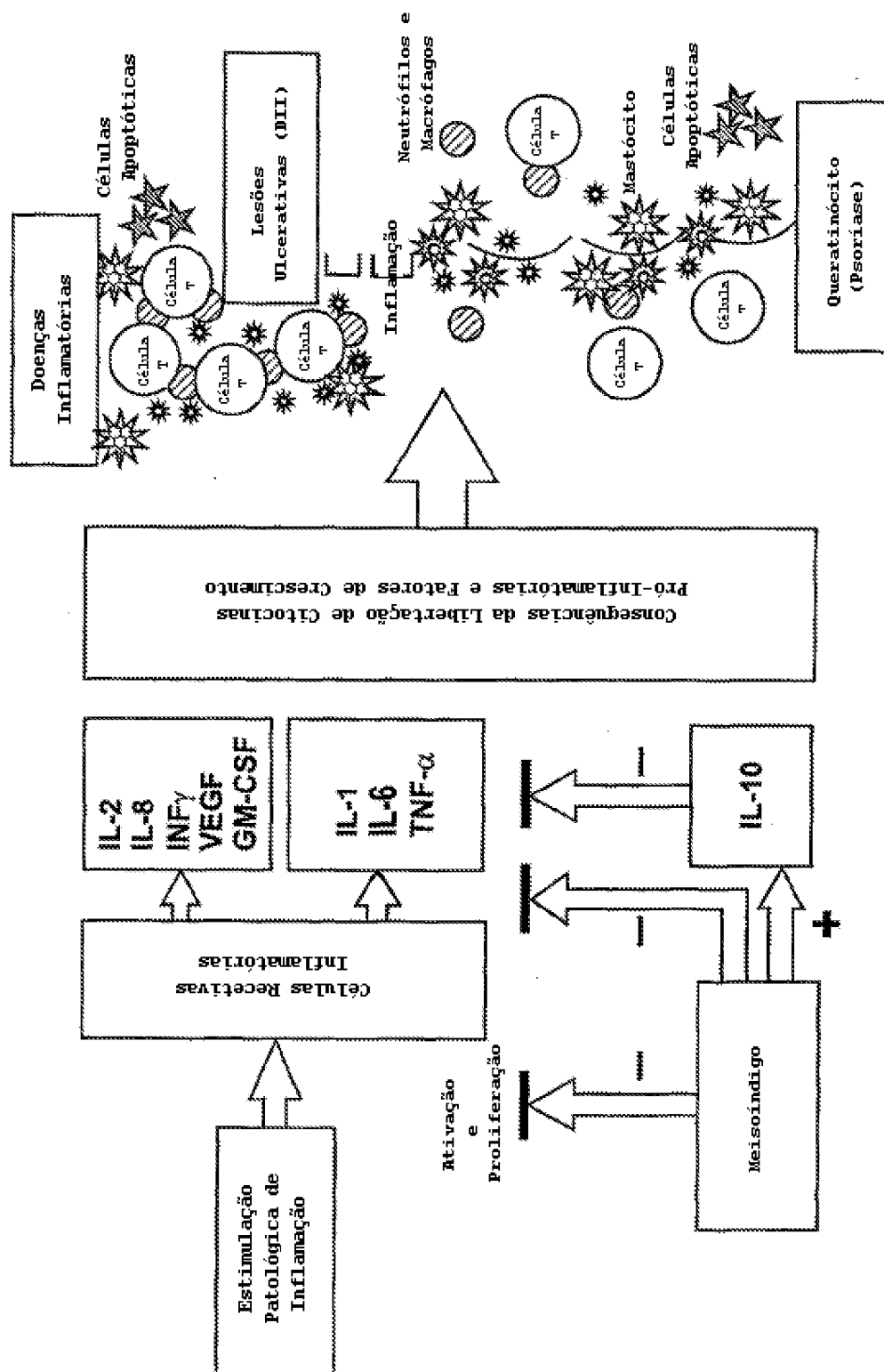


FIG. 1

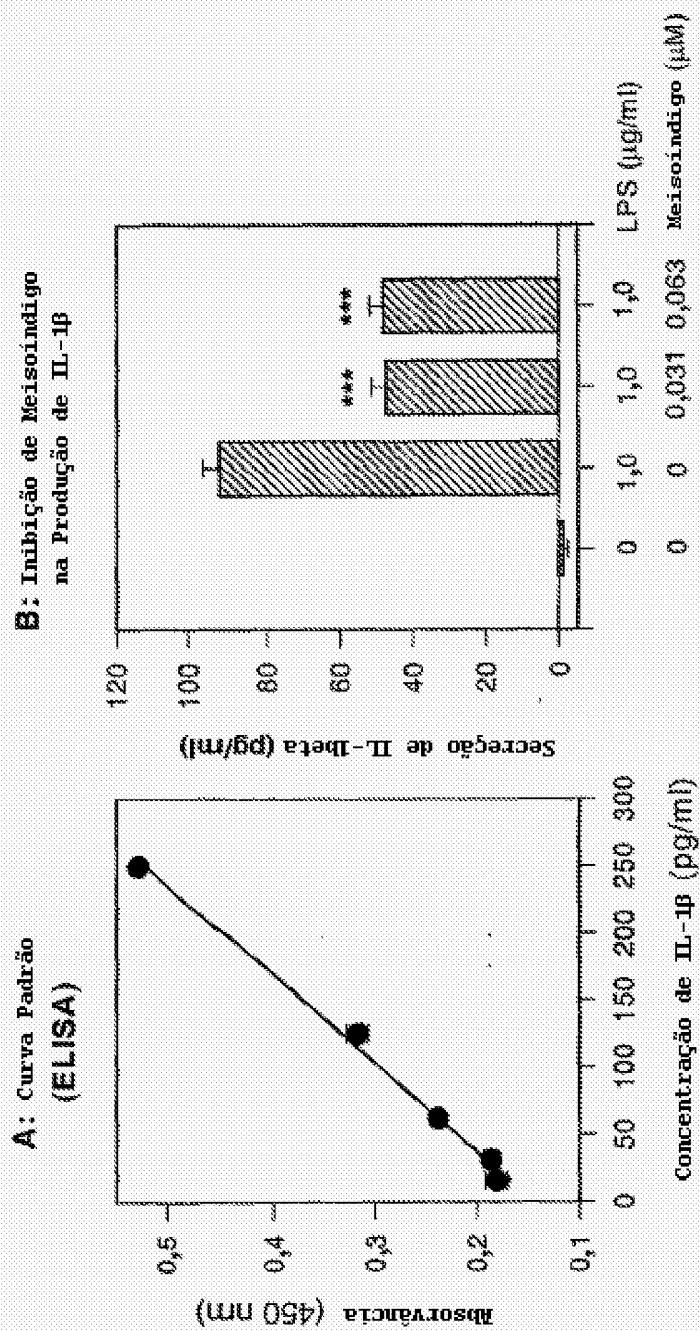


FIG. 2

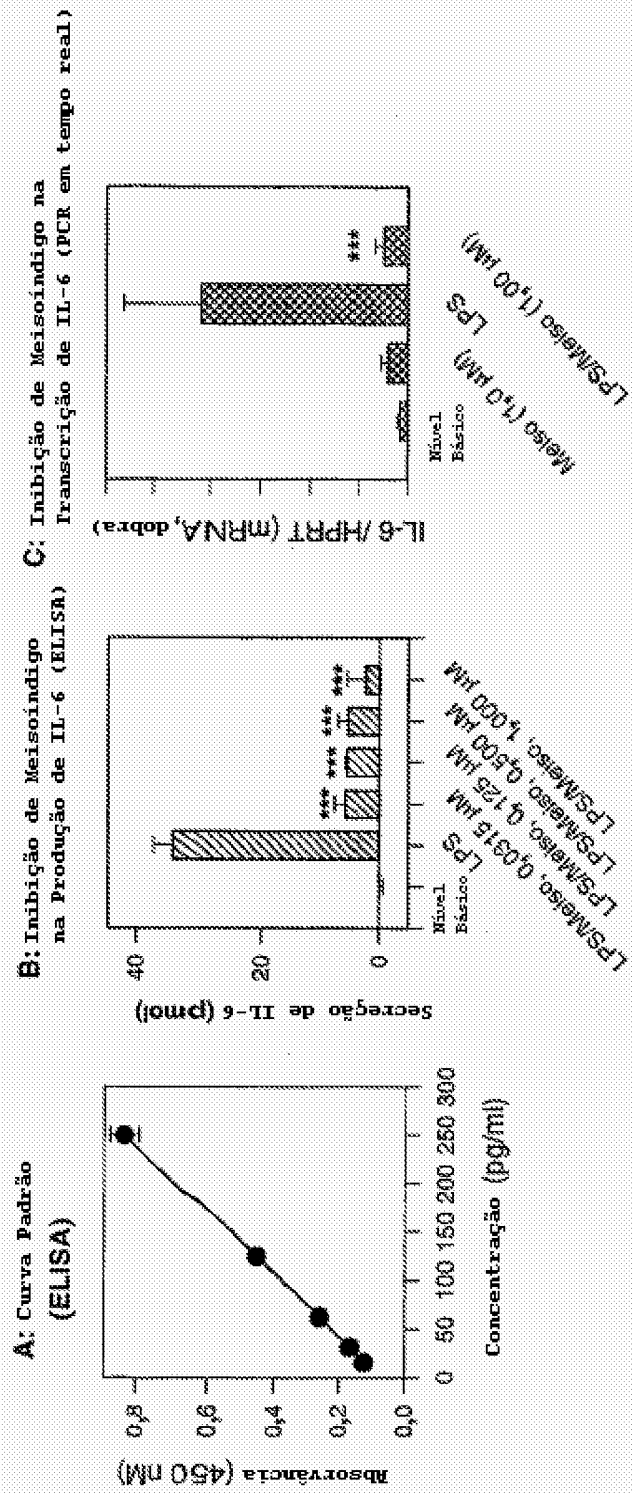
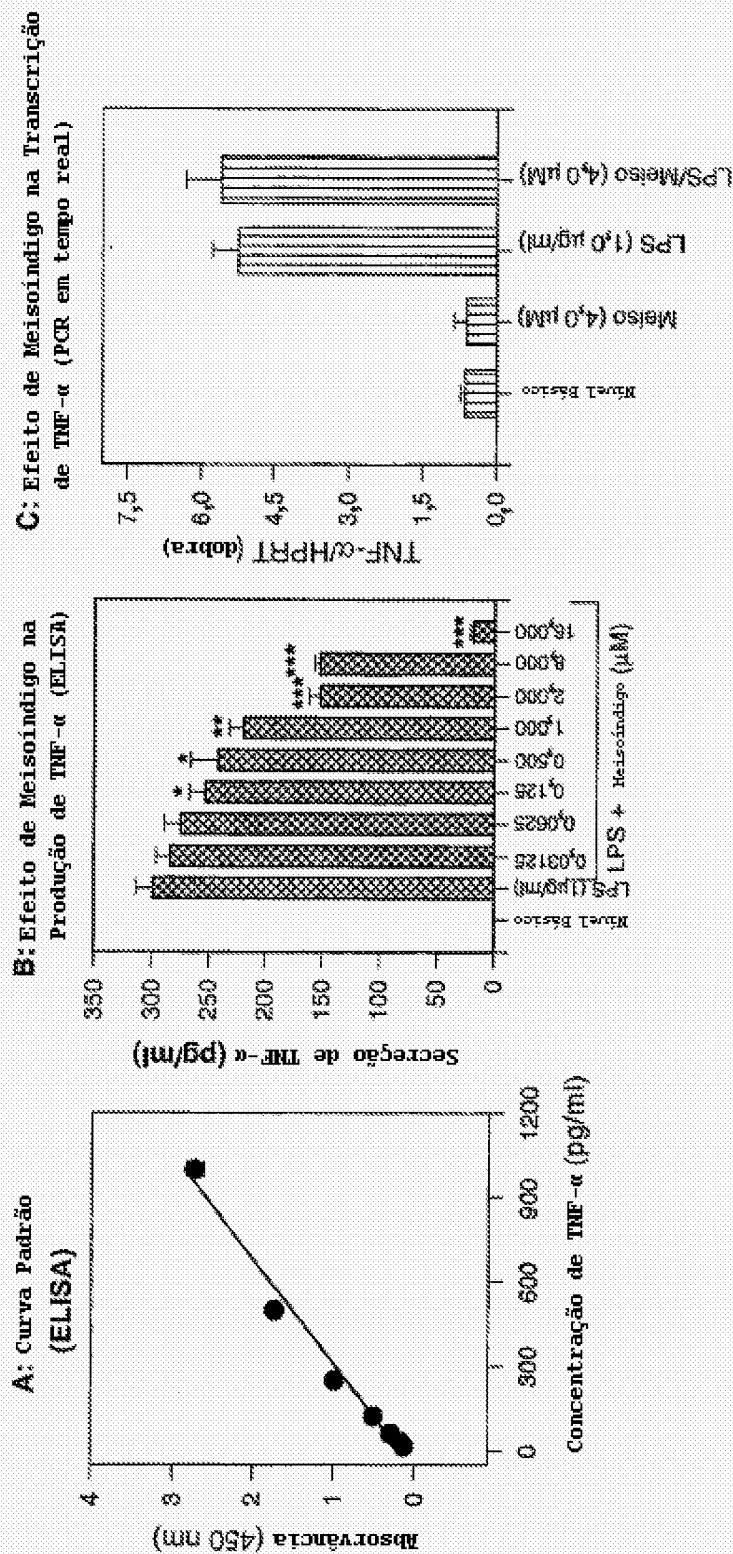


FIG. 3



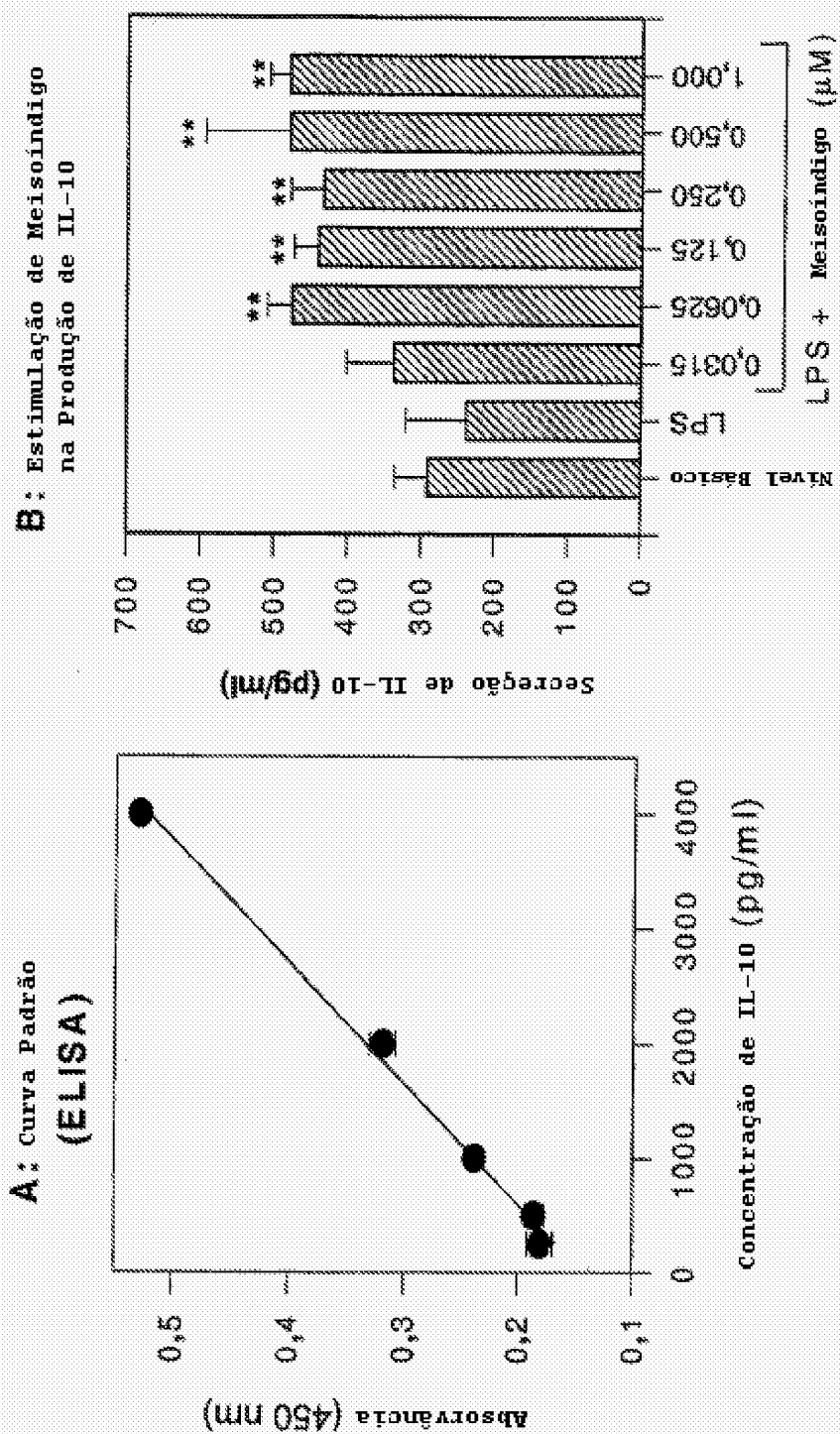


FIG. 5

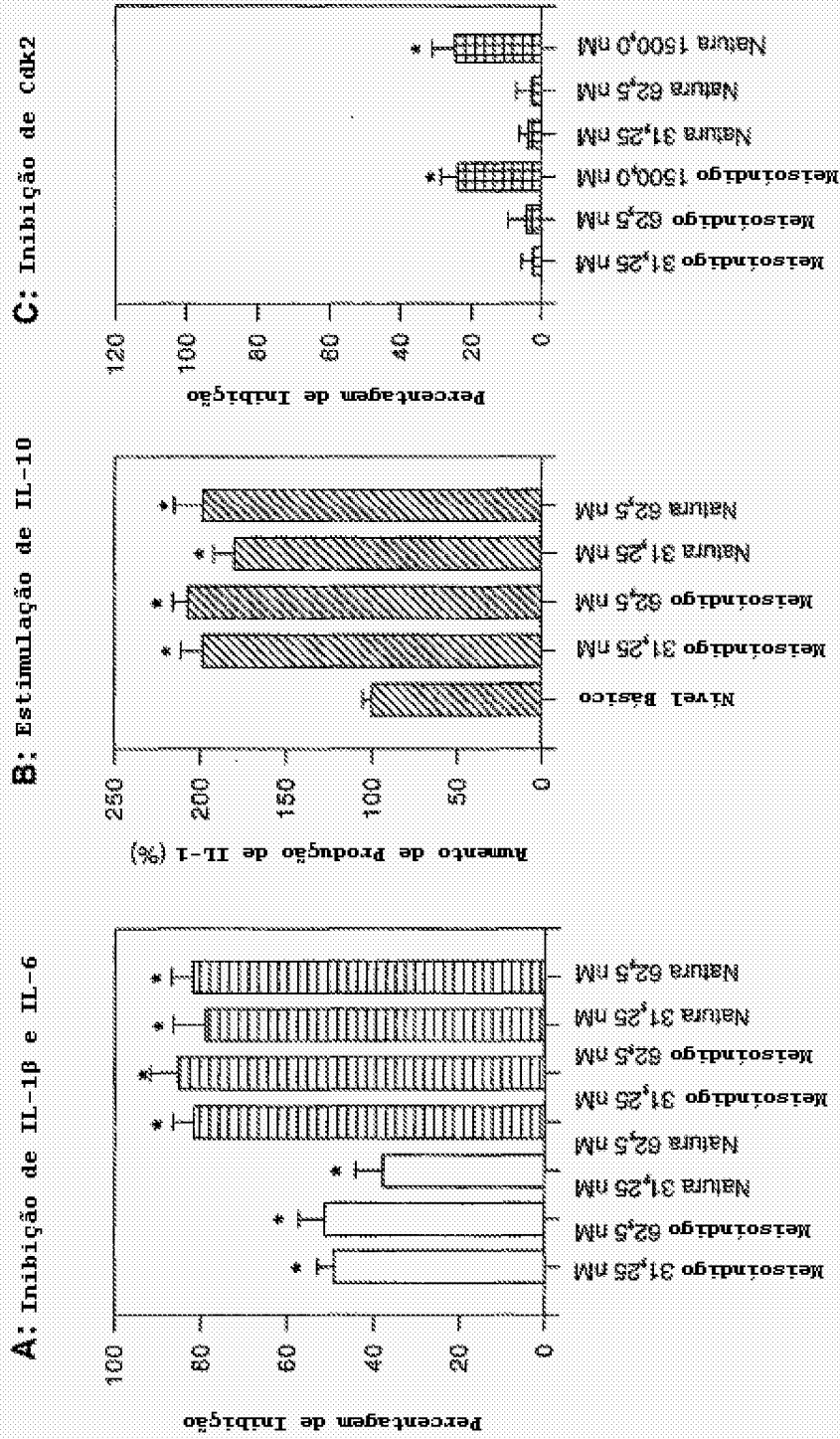


FIG. 6

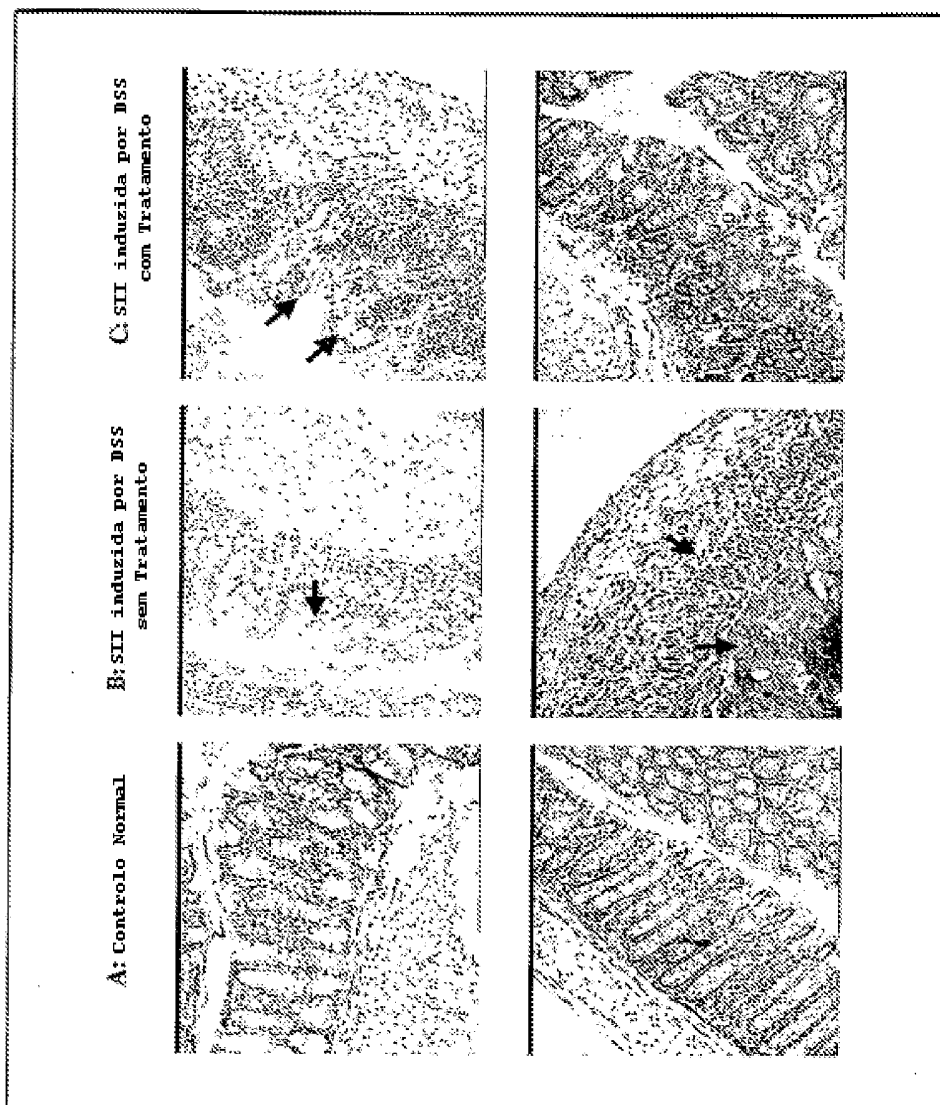


FIG. 7

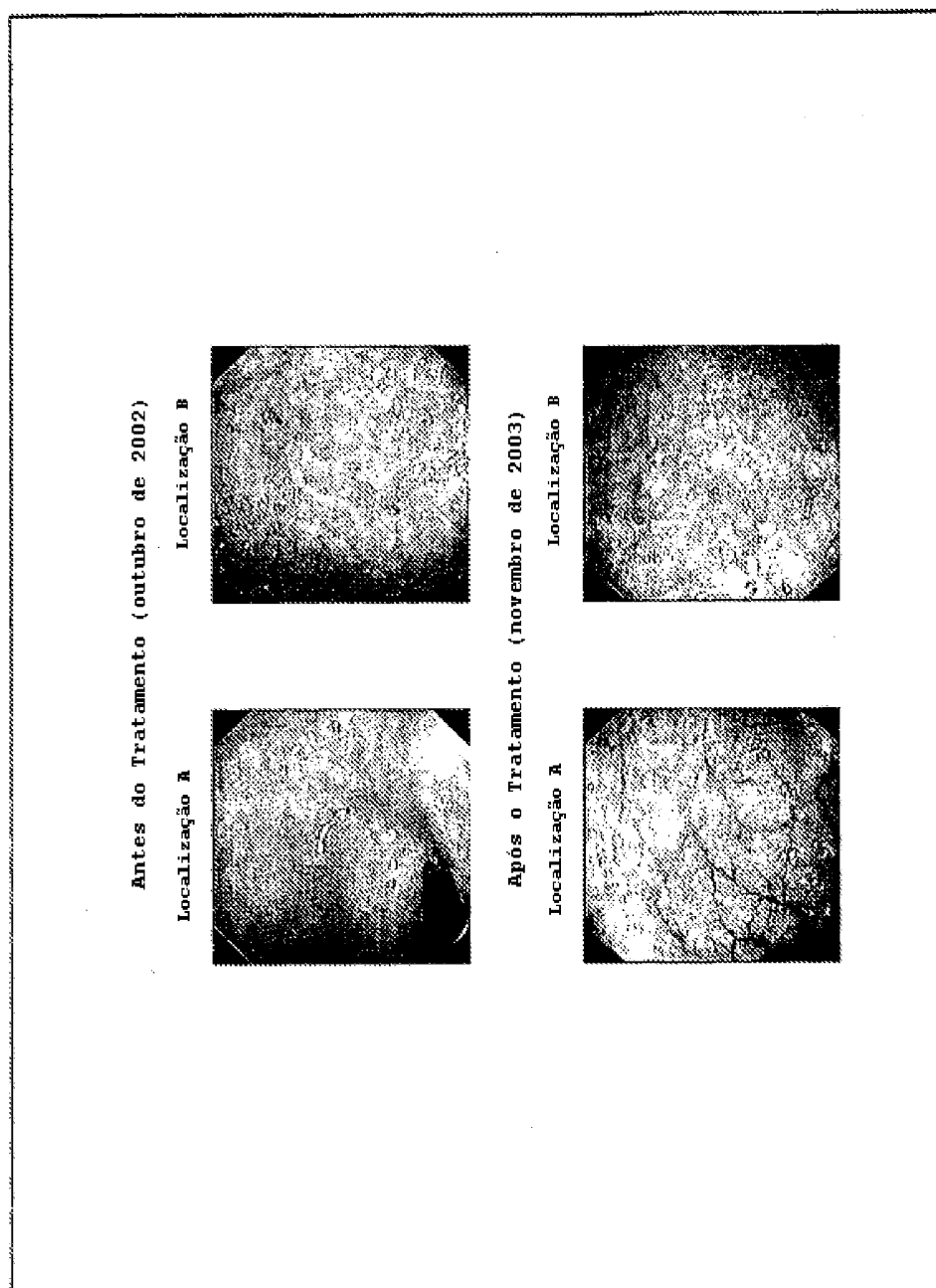


FIG. 8