

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

|                                                                                                                  |                                                                                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (22) Data de pedido: <b>2004.03.16</b>                                                                           | (73) Titular(es):<br><b>NOVARTIS AG</b><br><b>LICHTSTRASSE 35 4056 BASEL</b><br><b>CH</b>                                |
| (30) Prioridade(s): <b>2003.03.17 GB 0306070</b><br><b>2003.03.25 GB 0306868</b><br><b>2003.08.15 GB 0319226</b> | (72) Inventor(es):<br><b>HENRIETTA MOORE</b><br><b>AT</b>                                                                |
| (43) Data de publicação do pedido: <b>2005.12.28</b>                                                             | (74) Mandatário:<br><b>ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS</b><br><b>RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA</b><br><b>PT</b> |
| (45) Data e BPI da concessão: <b>2008.10.01</b><br><b>018/2009</b>                                               |                                                                                                                          |

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO UMA COMBINAÇÃO DE RAPAMICINA OU SEU DERIVADO E PIMECROLIMUS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA INFLAMATÓRIA DO INTESTINO (DII).**

(57) Resumo:

O PRESENTE INVENTO RELACIONA-SE COM COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO EM COMBINAÇÃO RAPAMICINA OU UM DERIVADO DE RAPAMICINA E UM COMPOSTO DE FÓRMULA I, E.G., ÚTIL PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS E IMUNOLOGICAMENTE MEDIADAS, INCLUINDO DOENÇAS AUTO-IMUNES.

**RESUMO**

**"COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO UMA COMBINAÇÃO DE  
RAPAMICINA OU SEU DERIVADO E PIMECROLIMUS PARA O TRATAMENTO  
DA DOENÇA INFLAMATÓRIA DO INTESTINO (DII) "**

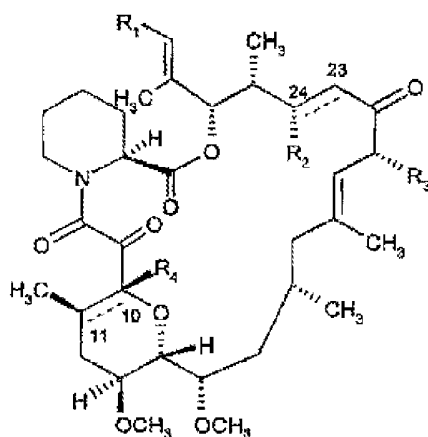
O presente invento relaciona-se com composições farmacêuticas compreendendo em combinação rapamicina ou um derivado de rapamicina e um composto de fórmula I, e.g., útil para o tratamento de doenças inflamatórias e imunologicamente mediadas, incluindo doenças auto-imunes.

## DESCRIÇÃO

### "COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO UMA COMBINAÇÃO DE RAPAMICINA OU SEU DERIVADO E PIMECROLIMUS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA INFLAMATÓRIA DO INTESTINO (DII) "

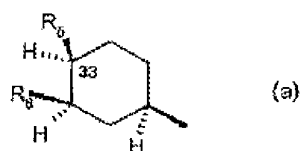
O presente invento relaciona-se com o uso de composições farmacêuticas para o tratamento de Doença Inflamatória do Intestino (DII) e doenças associadas com esta.

Num aspecto o presente invento providencia o uso de uma combinação de rapamicina ou dum derivado de rapamicina e dum composto de fórmula



em que ou

$R^1$  é um grupo (a) de fórmula



em que

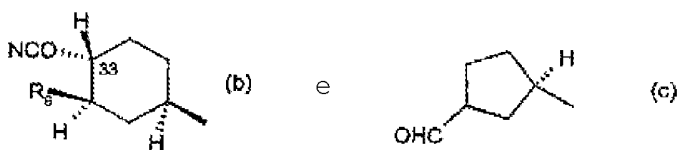
$R^5$  é cloro, bromo, iodo ou azido,

$R^6$  é hidroxilo ou metoxilo, e

$R^4$  é hidroxilo e existe uma ligação simples na posição 10,11; ou ausente, e existe uma ligação dupla na posição 10,11

ou

$R_1$  é um grupo (b) ou (c) de fórmula



em que

$R_6$  é como definido acima, e

$R_4$  é hidroxilo e existe uma ligação simples na posição 10,11,

$R_2$  é oxo e existe uma ligação simples na posição 23,24;

hidroxilo opcionalmente protegido e existe uma ligação simples ou dupla na posição 23,24; ou ausente e existe uma ligação dupla na posição 23,24;

R<sub>3</sub> é metilo, etilo, propilo ou alilo

além de pelo menos um excipiente farmacologicamente aceitável, para a manufactura de um medicamento para o tratamento de Doença Inflamatória do Intestino e doenças associadas com esta.

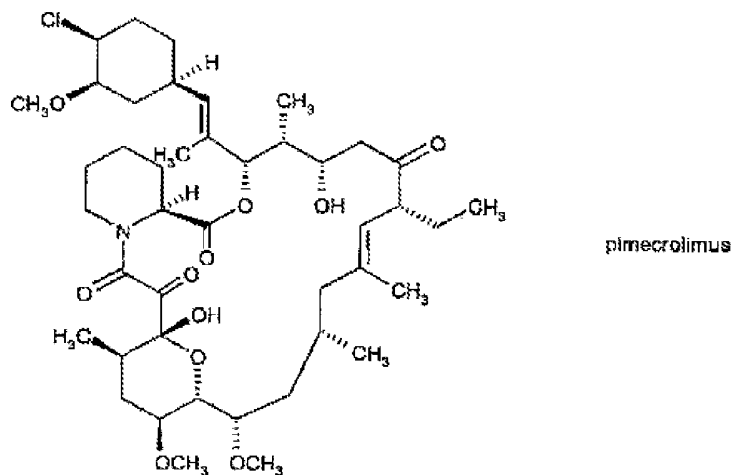
A DII no homem, como muitas outras doenças inflamatórias crónicas ou auto-imunes, pode ser vista como o resultado de uma convergência de interacções entre genes de susceptibilidade, o ambiente e o sistema imunitário. A extensão da acção combinada destes factores determinará a manifestação clínica da doença; a doença de Crohn (DC) ou a colite ulcerosa (CU) e os vários sub-grupos clínicos como definido pela gravidade e localização. A principal hipótese corrente na patogénese da DII é que é uma resposta imune desregulada a antígenos bacterianos entéricos normais (ver e.g., Kirsner JB, Inflammatory Bowel Disease, 5<sup>a</sup> Ed; W.B. Saunders, p-208-39, p. 299-304; p. 305-14 e p. 315-25). Em ambas a DC e CU o número de linfócitos T na lâmina própria está aumentado (ver e.g., Selby et al., (1984), Gut; 25 (1): 32-40). Existe evidência, principalmente nos modelos experimentais tal como o modelo SCID-DII, que os sub-conjuntos de supressores de células T evitam uma reacção à flora normal encontrada no intestino (ver e.g., Groux H, et

al, (1999), Immunol. Today; 20 (10): 442-5). Na DII este equilíbrio foi perturbado e a cascata inflamatória subsequente desenvolve-se numa resposta crónica. A transferência de células T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> singenéticas que expressam níveis elevados de CD45RB (CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>HI</sup>) a ratinhos SCID (SCID-DII) induz uma colite grave e doença desgastante que resulta usualmente em morte dos ratinhos dentro de 4-8 semanas a seguir à transferência das células T CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>HI</sup> patológicas (ver e.g., Powrie F et al (1993), Int. Immunol.; 5(11): 1461-71). Este modelo grave de colite partilha muitas das características da DII humana e tem sido de facto usado desde os anos 90 para intensificar a compreensão adicional da doença no homem e é olhado como reflectindo a DII mais do que qualquer outro modelo. Estes incluem colite induzida pela administração de agentes exógenos ou por manipulação genética (ver e.g., Blumberg RS et al., (1999) Curr. Opin. Immunol.; 11 (6): 648-56; Strober W et al., (1998), Ann. Intern. Med.; 128 (10): 848-56; Strober W. et al., (1998) Scand. J. Immunol.; 48 (5):453-8). Usando o modelo SCID-DII, os anticorpos contra TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL-12 mostraram efeitos benéficos transitórios e parciais (ver e.g., Powrie F et al (1994), Immunity; 1(7):553-62; Simpson SJ, et al (1998), J. Exp. Med.; 187 (8):1225-34; Mackay F et al (1998), Gastroenterology; 115 (6):1464-75). Mais recentemente, também foram relatados efeitos benéficos com anticorpos do ligando CD134 (ao OX40L, ver e.g., Malmstrom V et al (2001), J. Immunol.; 166 (11): 6972-81); ao CD154 (ver e.g., Liu Z. et al, (2000), J. Immunol.; 164 (11): 6005-14; De Jong YP et al (2000),

Gastroenterology; 119 (3):715-23) e à integrina  $\beta 7$  ou MAdCAM-1 (ver e.g. Picarella D et al, (1997), J. Immunol.; 158 (5): 2099-106). Estes dados conjuntos demonstram que a doença pode ser repelida ou pela inibição dos mediadores inflamatórios principais incluindo  $\text{TNF}\alpha$  e/ou citocinas envolvidas na neutralização da diferenciação e função efectora do tipo Th1 ou interferindo com os passos de apresentação do antígeno que ocorrem nos nódulos linfáticos ou com o processo de leucócitos-"homing" destas células.

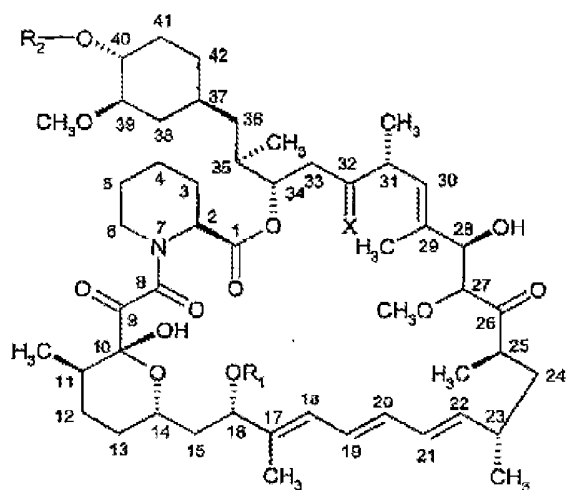
Uma composição farmacêutica compreendendo em combinação rapamicina ou um derivado da rapamicina e um composto de fórmula I é a seguir designada como "uma composição do (de acordo com o) presente invento".

Noutro aspecto do presente invento o composto de fórmula I é um composto de fórmula



Pimecrolimus (INN recomendado) (ASM981; Eli-del<sup>TM</sup>), *i.e.* {[1E-(1R, 3R, 4S)]1R, 9S, 12S, 13R, 14S, 17R, 18E, 21S, 23S, 24R, 25S, 27R}-12[2-(4-cloro-3-metoxi-clohexil)-1-metilvinil]-17-etil-1,14-dihidroxi-23,25-di-metoxi-13,19,21,27-tetrametil-11,28, dioxo-4-azatriciclo-[22.3.1.0(4,9)]octacos-18-eno-2,3,10,16-tetraona é revelado *e.g.* em EP 427 680 (33-epi-33-cloro-FR 520 do exemplo 66a).

Num outro aspecto do presente invento o derivado de rapamicina é um composto de fórmula



em que

R<sub>1</sub> é CH<sub>3</sub> ou (C<sub>3-6</sub>) alquinilo,

R<sub>2</sub> é H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH, 3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metil-propanoílo ou tetrazolilo, e

X é =O, (H,H) ou (H, OH), desde que R<sub>2</sub> seja outro que não H quando X=O e R<sub>1</sub> é CH<sub>3</sub>, ou um pró-fármaco deste quando R<sub>2</sub> é -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH, e.g. um éter deste fisiologicamente hidrolisável.

Derivados da rapamicina representativos da fórmula II incluem e.g. rapamicina 32-hidrogenada e.g. como descrito em WO 96/41807 e EUA 5 256 790, incorporada aqui como referência, tal como e.g. 32-deoxorapamicina, 16-pent-2-iniloxi-32-deoxorapamicina, rapamicina 16-O-substituída e.g. como revelado em WO 94/02136, WO 95/16691 e WO 96/41807, o teor das quais é incorporado aqui como referência, tal como e.g. 16-pent-2-iniloxi-32(S ou R)-dihidrorapamicina, 16-pent-2-iniloxi-32(S ou R)-dihidro-40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina, rapamicina 40-O-substituída e.g. como descrito em EUA 5 258 389, WO 94/09010, WO 92/05179, EUA 5 118 677, EUA 5 118 678, EUA 5 100 883, EUA 5 151 413, EUA 5 120 842, WO 93/11130, WO 94/02136, WO 94/02485 e WO 95/14023, em que todos eles são incorporados aqui como referência, tal como e.g. 40-[3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metilpropanoato]-rapamicina (também designado como CCI779) ou 40-epi-(tetrazolil)-rapamicina (também designado ABT578). Um composto preferido é e.g. 40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina (a seguir Composto A), e.g. revelado no Exemplo 8 de WO 94/09010, ou 32-deoxorapamicina, ou 16-pent-2-iniloxi-32(S)-dihidro-rapamicina, e.g. revelado em WO 96/41807. Os derivados de rapamicina podem ainda incluir (epi)análogos da rapamicina ("epi)-rapalogs"), e.g. como revelado em WO 98/02441 e WO 01/14387, e.g. os

compostos AP23573, AP23464, AP23675 ou AP23841; ou derivados tais como biolimus 7 ou biolimus 9. Os derivados de rapamicina podem também incluir pró-fármacos de rapamicina tal como TAFA93.

Derivados adequados de rapamicina são e.g. também descritos em EUA 3 929 992 e EUA 5 258 389. De preferência, as composições do presente invento compreendem rapamicina, também conhecida como sirolimus (rapamicina; Rapamune<sup>R</sup>) e/ou o derivado da rapamicina everolimus (Composto A, RAD001; 40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina; Certican<sup>R</sup>).

Todas as patentes da literatura citadas aqui são introduzidas como referência.

Num outro aspecto do presente invento a composição farmacêutica compreendendo em combinação 40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina e pimecrolimus compreende pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável, e.g. veículo e/ou diluente apropriado, e.g., incluindo enchi-mentos, ligantes, desintegradores, condicionadores de fluxo, lubrificantes, açúcares e adoçantes, fragrâncias, conservantes, estabilizadores, agentes humidificantes e/ou emulsionantes, solubilizantes, sais para regular a pressão osmótica e/ou tampões.

Um composto de uma combinação de acordo com o presente invento, i.e. um composto de fórmula I, e.g. pimecrolimus, pode estar na forma livre, na forma de um

sal, na forma de um solvato ou na forma de um sal e solvato, em que sais e/ou solvatos existem.

Num outro aspecto do presente invento o composto de fórmula I está na forma de um sal.

Uma composição do presente invento pode compreender um ou mais derivados de rapamicina, de preferência rapamicina ou um derivado de rapamicina, e um ou mais compostos de fórmula I, de preferência um, *e.g.* pimecrolimus.

Uma composição do presente invento é adequadamente baseada em emulsões, microemulsões, pré-concentrados de emulsão ou pré-concentrados de microemulsão, ou dispersões sólidas, especialmente pré-concentrados de microemulsão água-em-óleo ou microemulsões óleo-em-água de rapamicina ou de um derivado de rapamicina, *e.g.* um composto de fórmula II, e um composto de fórmula I, *e.g.* pimecrolimus.

Uma composição do presente invento pode ainda compreender compostos farmacêuticamente activos adicionais. Tais compostos activos adicionais *e.g.* incluem agentes anti-inflamatórios e imunomoduladores.

Noutro aspecto a composição farmacêutica do presente invento compreende ainda um agente anti-inflamatório e/ou imunomodulador.

Uma composição do presente invento inclui

-combinações fixas, nas quais um composto de fórmula I, e.g. pimecrolimus, e rapamicina ou um derivado de rapamicina, e.g. um composto de fórmula II, tal como Composto A, estão na mesma formulação;

-Kits(=kit de componentes), nos quais um composto de fórmula I, e.g. pimecrolimus, e rapamicina ou um derivado de rapamicina, e.g. um composto de fórmula II, tal como o Composto A, em formulações separadas são vendidos na mesma embalagem, e.g. com instruções para co-administração; e

-combinações livres nas quais um composto de fórmula I, e.g. pimecrolimus, e rapamicina ou um derivado de rapamicina, e.g. um composto de fórmula II, tal como o Composto A, são embalados separadamente, mas são dadas instruções para administração simultânea ou sequencial.

Noutro aspecto o presente invento providencia um kit de componentes farmacêuticos compreendendo rapamicina ou um derivado de rapamicina, e.g. um derivado de rapamicina de fórmula II, e.g. Composto A, e um composto de fórmula I, e.g. pimecrolimus, além de instruções para administração simultânea ou sequencial, para a manufactura de um medicamento para o tratamento de DII e doenças associadas com estas.

Também surpreendentemente encontramos uma composição farmacêutica, e.g. sólida, tal como um comprimido, compreendendo uma combinação fixa de rapamicina ou de um derivado de rapamicina, incluindo um composto de fórmula II, e.g. Composto A, e um composto de fórmula I, e.g. pimecrolimus, como agentes activos, e.g. uma composição oral farmacêutica.

Noutro aspecto o presente invento providencia uma composição farmacêutica, e.g. uma composição farmacêutica oral como uma combinação fixa, e.g. uma composição oral sólida, na forma de uma dispersão sólida compreendendo rapamicina ou um derivado de rapamicina, e.g. Composto A, e um composto de fórmula I e.g. pimecrolimus, e um veículo, e.g. celulose, opcionalmente na presença de excipientes como mencionado acima.

Composições na forma de uma dispersão sólida podem ser administradas em qualquer forma conveniente, e.g. na forma de comprimido, cápsula, grânulo ou pó.

As composições farmacêuticas do presente invento, incluindo uma composição farmacêutica oral pode ser preparada como apropriado, e.g. de acordo, tal como de forma análoga, a um método como o convencional, ou como descrito aqui.

Para a preparação de uma composição ou combinação

oral fixa, e.g. um comprimido, do presente invento, pode ser usada uma dispersão sólida compreendendo um composto de fórmula I, e.g. pimecrolimus, e rapamicina ou um derivado de rapamicina, e.g. um composto de fórmula II, e um veículo, tal como celulose, e.g. hidroxipropilmetilcelulose. Dispersões sólidas são conhecidas ou podem ser obtidas como apropriado. Um comprimido pode ser obtido e.g. misturando os agentes activos com um veículo e opcionalmente um excipiente adicional, granulando a seco antes ou depois de adicionar excipiente adicional, e comprimindo a mistura obtida. Excipiente adicional inclui e.g.

-lubrificantes, tais como estearato de Mg,

-enchimentos, e.g. açúcares, tal como lactose,

-agentes de fluxo, tal como dióxido de silício, e.g. aerosóis,

-desintegrantes, tal como polivinilpirrolidonas, e.g. povidonas, crospovidonas (homo- ou copolímeros de N-vinil-pirrolidona).

A proporção em peso de um composto de fórmula I, e.g. pimecrolimus, e rapamicina ou um derivado de rapamicina, e.g. um composto de fórmula II, numa composição oral do presente invento não é crítica, e.g. incluindo uma proporção em peso desde, e.g. cerca de 1:10 até 800:1. Se o composto pimecrolimus e o Composto A são usados como

agentes activos, o pimecrolimus é de preferência usado em excesso, e.g. uma proporção apropriada em peso de pimecrolimus:CompostoA inclui uma proporção desde, e.g. cerca de 10:1 até 800:1.

Noutro aspecto o presente invento providencia um comprimido para administração oral, compreendendo

-Composto A e pimecrolimus como agentes activos, e.g. na forma de uma dispersão sólida,

- uma celulose como um veículo, e.g. hidroxipropilmetilcelulose,

-opcionalmente desintegrantes, e.g. uma polivinilpirrolidona,

-opcionalmente agentes de fluxo, e.g. um aerosol,

-opcionalmente lubrificantes, e.g. estearato de Mg,

-opcionalmente enchimentos, e.g. açúcares tal como lactose, para a manufactura de um medicamento para o tratamento de DII e doenças associadas com estas.

Noutro aspecto o presente invento providencia um comprimido do presente invento compreendendo em % por peso

-Pimecrolimus: 2 a 8%, e.g., 4%;

-Composto A: 0,05 a 0,25%, e.g. 0,13%;

- hidroxipropilmetilcelulose (e.g. 3 cps): 10 a 40%, e.g. 21,4%;

-lactose (e.g. 200 de malha):0,6 a 2,0%, e.g. 1,2%;

-hidroxitolueno butilado: 0,005 a 0,025%, e.g. 0,013%

-lactose seca por pulverização: 25,0 a 70,0%, e.g. 50,8%;

-crospovidona: 10,0 a 40,0%, e.g. 20,0%;

-dióxido de silício coloidal (Aerosil 200®): 0,5 a 2,5%; e.g. 1,5%

-estearato de magnésio: 0,5 a 2,0%, e.g. 1,0%.

Tal comprimido pode e.g. conter, e.g. cerca de, 10 a 60 mg de pimecrolimus, e.g. 30 mg, e 0,1 a 2 mg do Composto A, e.g. 1 mg.

Uma composição do presente invento pode ser

administrada por uma via apropriada, e.g. de forma análoga à administração de um composto de fórmula I, e.g. pimecrolimus e rapamicina ou um derivado de rapamicina, e.g. um composto de fórmula II.

As composições do presente invento podem ser preparadas como apropriado, e.g. de forma análoga a um método convencional, e.g. misturando um composto de fórmula I, e.g. pimecrolimus, e rapamicina ou um derivado de rapamicina, em combinação ou cada um separadamente, além de pelo menos um excipiente farmacologicamente aceitável.

Também verificámos que uma classe de compostos incluindo FK506 em combinação com rapamicina ou derivado de rapamicina é útil para o tratamento de doenças inflamatórias ou imunologicamente mediadas.

A utilidade de derivados de rapamicina de fórmula II e de combinações do invento como descrito acima no tratamento de doenças e estados como especificados acima, pode ser demonstrada em testes clínicos ou animais padrão, e.g. como descrito a seguir.

As dosagens diárias requeridas na prática dos métodos do presente invento variarão dependendo, por exemplo, da natureza química e dos dados farmacocinéticos de um composto do presente invento utilizado, do hospedeiro individual, do modo de administração e da natureza e gravidade dos estados a serem tratados. Contudo, em geral,

para resultados satisfatórios em mamíferos maiores, por exemplo, humanos, uma dosagem diária indicada está num intervalo similar, mas mais baixo, do que o intervalo para o qual um composto de fórmula I, e.g. pimecrolimus, e rapamicina ou derivado de rapamicina são geralmente administrados.

Um intervalo preferido de dosagem diária é cerca de 0,1 a 25 mg de rapamicina ou derivado de rapamicina de fórmula II, e.g. Composto A, como dose única ou em doses divididas. Dosagens diárias adequadas para doentes estão na ordem de e.g. 0,1 a 25 mg p.o. de rapamicina ou derivado de rapamicina de fórmula II, e.g. Composto A.

Uma composição do presente invento pode ser administrada por qualquer via apropriada, e.g. de forma análoga à administração de um composto de fórmula I, e.g. pimecrolimus e rapamicina ou derivado de rapamicina, e.g. um composto de fórmula II. Por exemplo, rapamicina ou derivado de rapamicina de fórmula II, e.g. Composto A, pode ser administrado por qualquer via convencional, em particular entérica, e.g. oral, e.g. na forma de comprimidos, cápsulas, soluções bebíveis, nasal, pulmonar (por inalação) ou parentérica, e.g. na forma de soluções ou suspensões injectáveis. Formas de dosagem unitária adequadas para administração oral compreendem desde ca. 0,05 a 12,5 mg, usualmente 0,25 a 10 mg de rapamicina ou derivado de rapamicina de fórmula II, e.g. Composto A, juntamente com um ou mais diluentes ou veículos farmacêuticamente aceitáveis.

Na presente descrição os termos "tratamento" ou "tratar" referem-se ambos a tratamento preventivo ou profilático bem como curativo ou tratamento modificador da doença, incluindo tratamento de doentes em risco de contrair doença ou suspeitos de terem contraído a doença bem como doentes que estão doentes ou aos quais foi diagnosticado como sofrendo da doença ou de um estado clínico.

### **Descrição das Figuras**

#### Figura 1 a Figura 3

Mostram o peso corporal dos ratinhos SCID-DII após terem sido reconstituídos com  $2 \times 10^5$  de células T  $CD_4^+CD45RB^{HI}$  tratados e não tratados com pimecrolimus (ASM), Composto A e uma combinação de ASM + Composto A. Ratinhos-PBS são ratinhos não transferidos. O tratamento começou no dia 1 após transferência e continuou diariamente. Os dados são expressos como a % média do peso corporal (relativa ao peso no dia 0)  $\pm$  s.e.m. para  $n=8$  (com algumas exceções onde  $n=5, 6$  ou  $7$ ) ratinhos por grupo  $**p<0,01$ ,  $*p<0,05$  a perda de peso corporal relativa ao grupo tratado com veículo é mostrada.

São mostrados na Figura 1 os resultados de usar a Dosagem 1 (Composto A:  $0,1$  mg/kg/d, ASM:  $60$  mg/kg/d), na Figura 2 os resultados de usar a Dosagem 2 (Composto A:  $0,1$

mg/kg/d, ASM: 30 mg/kg/d) e na Figura 3 os resultados de usar a Dosagem 3 (Composto A:0,05 mg/kg/d, ASM: 10 mg/kg/d).

#### Figura 4

Mostra a gravidade da inflamação do cólon em ratinhos SCIB-DII após vários tratamentos; as pontuações da gravidade são dadas como descrito no exemplo 1.

As temperaturas são dadas em graus Celsius (°) e não são corrigidas.

São usadas aqui as seguintes abreviaturas:

|       |                                                 |
|-------|-------------------------------------------------|
| ASM   | pimecrolimus                                    |
| AUC   | Área sob a curva                                |
| ANOVA | Análise de variância                            |
| BW    | Peso corporal                                   |
| DC    | Doença de Crohn                                 |
| CyA   | Ciclosporina A                                  |
| FACS  | Separador de células activado por fluorescência |

|                |                                                                                 |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| H & E          | Hematoxilina & eosina                                                           |
| HTAB           | Brometo de hexadeciltrimetilamônio                                              |
| DII            | Doença Inflamatória do Intestino                                                |
| IFN            | Interferão                                                                      |
| IL-            | Interleucina                                                                    |
| i.p.           | Intra-peritoneal                                                                |
| MPO            | Mieloperoxidase                                                                 |
| MLN            | Nódulo linfático mesentérico                                                    |
| MTOR           | Alvo mamífero da Rapamicina                                                     |
| PBS            | Fosfato salino tamponizado                                                      |
| (ratinhos)-PBS | Ratinhos SCID recebendo PBS i.p.<br>em vez de células-T causadoras de<br>doença |
| p.o.           | Por os                                                                          |
| RAD            | Composto A, everolimus                                                          |

|        |                                 |
|--------|---------------------------------|
| SCID   | Imunodeficiente combinado grave |
| s.e.m. | Desvio padrão da média          |
| SD     | Desvio padrão                   |
| TMB    | 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina   |
| TNF    | Factor de necrose tumoral       |
| CU     | Colite ulcerosa                 |

### **Exemplo 1**

### **Métodos de Teste**

### **Modelo do ratinho SCID-DII**

Ratinhos fêmeas BALB/cJ e C.B.17 scid/scid (Fox Chase SCID®, Bomholtgaard, Dinamarca) são mantidos em grades de gaiolas ventiladas (Micro-vent tipo 84-II, Allentown Caging Equipment Co, Allentown, New Jersey, EUA) em condições isentas de organismos patogénicos específicos. Os procedimentos experimentais realizados nos ratinhos são autorizados sob a licença número MA 1048/00 (Magistrat-  
abteilung N° 58, Amt der Wiener Landesregierung).

Resumindo, linfócitos T  $CD4^+CD45RB^{HI}$  são isolados do baço do ratinho BALB/c por um separador-FACS a duas

cores através de sonda "live/dead" e injectados ( $2 \times 10^5$  células/ratinho, i.p.) em ratinhos fêmea SCID de 6-9 semanas de idade. Os ratinhos do controle negativo recebem PBS i.p. e um tal ratinho está em cada gaiola como uma sentinela para monitorizar possíveis infecções nesta colónia imunodeficiente (ratinhos-PBS).

Os ratinhos SCID são primeiro reconstituídos com as células T  $CD4^+CD1745RB^{HI}$  e depois tratados com compostos teste ou veículo como controles. Como compostos teste são usados o Composto A (RAD) e pimecrolimus (ASM). São realizados 3 estudos separados usando diferentes dosagens. Em cada estudo ambos os compostos são administrados sozinhos e combinados. Todos os 3 estudos seguem o mesmo protocolo básico de 4 grupos de ratinhos com um grupo recebendo, por administração diária oral por sonda gástrica, ambos os veículos (placebo), um grupo o Composto A sozinho, um grupo ASM sozinho, e um grupo uma combinação do Composto A e pimecrolimus, desde o dia 1 até ao dia 29 após a transferência celular. Dosagens administradas:

Estudo 1: Dosagem 1: Composto A: 0,1 mg/kg/d,  
ASM: 60 mg/kg/d

Estudo 2: Dosagem 2: Composto A: 0,1 mg/kg/d,  
ASM: 30 mg/kg/d, e

Estudo 3: Dosagem 3: Composto A: 0,05 mg/kg/d,  
ASM: 10 mg/kg/d.

O peso corporal de cada ratinho é monitorizado durante todo o tempo e no final do estudo os ratinhos são pesados.

Os ratinhos são anestesiados no final do estudo e é retirado sangue via punção cardíaca para separação de soro que é congelado e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

O sangue é também tomado em EDTA 10 mM para preparação da análise FACS.

O baço e MLN são retirados de cada ratinho, pesados e processados para análise FACS de suspensões celulares únicas.

É tirada uma fotografia da cavidade abdominal aberta e depois um pedaço do colón, mesmo acima do recto, de 1 cm de comprimento é fixado em formalina para histologia.

Os espécimes são embebidos em parafina, são cortadas secções (espessura 3  $\mu\text{m}$ ) e coradas com H & E.

A análise FACS a quatro cores é realizada nas suspensões de células preparadas a partir do sangue, baço e nódulos linfáticos mesentéricos (MLNs) de cada ratinho.

Os anti-corpos são obtidos a partir de

Pharmlingen. As células que são duplamente positivas para CD3 e CD4 são contadas como linfócitos. As células positivas para Ly-6G (antigénio de diferenciação mielóide) e negativa para CD3 e CD4 são neutrófilos (também as suas características celulares (dispersão frontal e lateral) distingue-as das outras células).

O número de células por amostra é calculado a partir do número total de células em cada suspensão celular e a % de células positivamente identificadas por amostra (amostras analisadas num FACS Calibur® usando software CeliQuest Pro®).

A média destes valores para um grupo de ratinhos pode assim ser calculada. Para processar ainda mais alguns dos dados, os valores determinados são ajustados pelo valor de fundo encontrado nos ratinhos não transferidos e calculando a % de redução, ou mesmo aumento, na média do número de células, relativo ao grupo tratado com placebo.

Todos os dados apresentados como valores médios são qualificados por um valor s.e.m. Os dados de peso corporal são analisados quer por análise de medições repetidas quer encontrando primeiro o AUC médio e aplicando depois um teste de comparação múltipla ANOVA com correcção Tuckey *post hoc*. Os resultados da histologia são representados como o resultado da média da gravidade e comparados com um teste Wilcoxon-Mann-Whitney com valores-

p exactos (software StatXact-5) e factor de correcção Bonferroni *post hoc*. Todos os outros dados são primeiro analisados para distribuição normal e depois é aplicado o teste ANOVA para comparação múltipla. A significância estatística é tomada como  $p < 0,05$ .

A reacção de desenvolvimento no ratinho SCID para a transferência de células T  $CD4^+CD45RB^{HI}$  mostra que a expansão das células T é o primeiro evento e seguem-se as sequelas inflamatórias, que podem ser medidas como perda crítica de peso corporal, uma inflamação grave do cólon e sinais sistémicos tais como níveis aumentados de haptoglobina no soro e neutrofilia. O aumento da população de células T com o tempo também resulta num aumento do tamanho dos órgãos linfóides que são por outro lado comparativamente menores no ratinho SCID não transferido. Pelo dia 28 pós transferência de células T a inflamação é relativamente consistente dentro do grupo de ratinhos e isto foi adoptado como o tempo mais curto onde os efeitos precisos do tratamento com os compostos teste podem ser medidos. Os efeitos de um intervalo de dosagem do Composto A e ASM como compostos preventivos únicos são, em resumo, intervalos de dosagem comparativamente efectivos que se encontram desde 30 a 100 mg/kg/d de ASM e 0,1 a 1 mg/kg/d do Composto A. Nos testes presentes são usadas doses sub-máximas de cada composto e é determinado o efeito de tratamento único e combinado no mesmo estudo.

## Resultados

### Efeito sinérgico do tratamento combinado de ratinhos SCID-DII com Composto A e ASM na perda de peso corporal

O primeiro sintoma visível resultante da transferência das células T  $CD4^+CD45RB^{HI}$  causadoras da doença em ratinhos SCID é uma perda grave de peso corporal, usualmente significativa 21 dias após a transferência. Estes ratinhos (designados como placebo nestes estudos, e.g, nas Figuras) continuam a perder peso corporal até ocorrer a morte, geralmente 4 a 8 semanas após a transferência de células. Ratinhos não transferidos (designados como "(ratinho-)PBS" nas Figuras) permanecem estáveis ou ganham peso no decurso do estudo. Nos 3 estudos individuais descritos aqui, a % média da diferença em peso corporal entre os ratinhos não transferidos e os ratinhos tratados com veículo é calculada como sendo  $16,3 \pm 1,8\%$ .

Se os ratinhos SCID são tratados com o Composto A sozinho ou com ASM sozinho, uma inibição significativa, mas baixa, de perda de peso é apenas encontrada para os ratinhos tratados com ASM a uma dosagem de 60 mg/kg/d. Enquanto as dosagens de qualquer um dos compostos usados sozinhos têm apenas efeitos menores na perda de peso corporal, uma administração combinada do Composto A e ASM tem um efeito protector significativo, mesmo nas doses mais baixas de ASM (10 mg/kg/d) e Composto A (0,05 mg/kg/d), ver

e.g. Figura 3. Visto que a dose administrada do Composto A e ASM sozinhos não têm ou têm apenas um pequeno efeito significativo na perda de peso, o efeito protector de uma administração combinada não pode ser aditivo, mas sinérgico.

Foram obtidos dados adicionais (não mostrados) que confirmam o efeito sinérgico de uma combinação de acordo com o presente invento.

Em resumo, verificámos um efeito sinérgico de uma combinação de ASM e (composto A no modelo SCID-DII, quando usando dose sub-máximas de 60, 30 e 10 mg/kg/d de ASM e 0,1, 0,1 e 0,05 mg/kg/d do Composto A, respectivamente. A dose de 60 mg/kg/d de ASM sozinho ainda mostrou efeitos significativos por si só mas em todos os outros grupos de tratamento único resultou apenas em inibição moderada da doença.

Especificamente obtivemos os seguintes resultados:

-Todas as três combinações, mais notavelmente também as doses mais baixas de 10 mg/kg/d de ASM e 0,05 mg/kg/d de Composto A, resultam em ausência de perda de peso corporal (dados mostrados, ver Figures 1 a 3)

-Nas combinações de dose baixa de 10 e 0,05 mg/kg/d mostra-se um efeito sinérgico na inflamação do

cólon. Qualquer composto sozinho teve muito pouco efeito, enquanto os resultados de gravidade no grupo de tratamento combinado são na maior parte suaves (dados não mostrados).

-O ASM reduz potencialmente os níveis de haptoglobina no soro a 60 e 30 mg/kg/d enquanto o Composto A tem actividade muito fraca a 0,1 ou 0,05 mg/kg/d. De novo, o sinergismo é evidente no estudo de dose baixa onde a % de redução de cada composto sozinho foi de 32,7% (ASM 10 mg/kg/d) ou 27,4% (Composto A, 0,05 mg/kg/d) enquanto o grupo de tratamento combinado é inibido de forma significativa de 81,0% (dados não mostrados).

-No estudo de dose baixa não houve redução significativa no número de linfócitos em nenhum dos grupos de tratamento, embora os números no grupo combinado sejam reduzidos (46,5, 19,0 e 48,0% no sangue, baço e MLN, respectivamente) relativo aos ratinhos tratados com veículo. No estudo onde o ASM e o Composto A são dados em doses mais elevadas (30 mg/kg/d e 0,1 mg/kg/d, respectivamente; estudo 2) houve reduções significativas no número de linfócitos (73,0, 80,3 e 90,7% no sangue, baço e MLN, respectivamente) enquanto os números nos grupos de tratamento único (ASM ou Composto A, respectivamente, administrados sozinhos) não foram reduzidos. De forma similar, com a dose mais elevada de ASM (60 mg/kg/d; estudo 1) que sozinho diminui o número de linfócitos especificamente no MLN (73,5%), a combinação com o Composto A (0,1 mg/kg/d) resulta em reduções significativas quer no

sangue (65,4%) quer no baço (64,8%) para além de um aumento da redução (93,2%) no MLN. A dose de 0,1 mg/kg/d do Composto A sozinho tem apenas, se tiver, um efeito fraco, no número de linfócitos.

ASM981 combinado com o Composto A actua sinergicamente para reduzir a inflamação do cólon em ratinhos SCID-DII

A inflamação no cólon de ratinhos SCID-DII partilha muitas das características observadas no tecido lesionado de um cólon com doença de Crohn. De modo a examinar os danos na mucosa intestinal em ratinhos SCID-DII foi realizado um exame histológico das secções do cólon de acordo com parâmetros morfológicos definidos. A colite grave associada com este modelo de DII é caracterizada por um infiltrado celular maciço que nos locais envolve quase toda a sub-mucosa. O infiltrado é misto e compreende linfócitos, macrófagos, neutrófilos e alguns eosinófilos. Também evidente é a perda da arquitectura das criptas, alongação extensa e hiperplasia epitelial. Uma secção do cólon gravemente inflamada também terá abscessos das criptas. Foram dadas várias pontuações de acordo com o esquema seguinte: é dada uma pontuação de 0 a 3 para o infiltrado de leucócito em que 1 é suave, 2 é moderado e 3 é um infiltrado grave incluindo a camada da sub-mucosa. É dada uma pontuação de 0 a 2 para uma depleção de células Goblet em que 2 é dado para ausência total de coloração

azul alciano, 0 é dado para uma quantidade normal de coloração e 1 é intermédio. É dada uma pontuação de 0 a 3 para hiperplasia da mucosa e alterações degenerativas que incluem alongação das criptas, hiperplasia epitelial, presença de abscessos das criptas, erosões e necrose epitelial. A pontuação máxima possível é 8 e ratinhos-(PBS) são pontuados com 0.

Verificámos que a dose de 60 mg/kg/d de ASM981 sozinho tinha um efeito significativo. Doses do Composto A abaixo de 0,5 mg/kg/d não são significativamente activas e também não neste modelo. Contudo, os dois compostos juntos reduzem a inflamação (Figura 5) para níveis suaves (pontuações inferiores a 4) que não poderiam ter sido atingidos pelos efeitos aditivos de cada um sozinho.

Em conclusão, o modelo SCID-DII, em dosagens que sozinhas têm efeitos mínimos, o tratamento combinado com pimecrolimus e Composto A resulta numa prevenção altamente significativa da doença. O forte efeito que vemos no peso corporal e inflamação do cólon não se correlaciona só com o número de linfócitos. O efeito sinérgico não é exclusivo do número de linfócitos mas pode estar a afectar a actividade ou função dos linfócitos bem como de outras células envolvidas na doença. Estes dados confirmam que uma combinação de pimecrolimus e Composto A actua sinergicamente no modelo do ratinho SCID-DII.

**Exemplo 2****Preparação de um comprimido contendo Composto A e pimecrolimus**

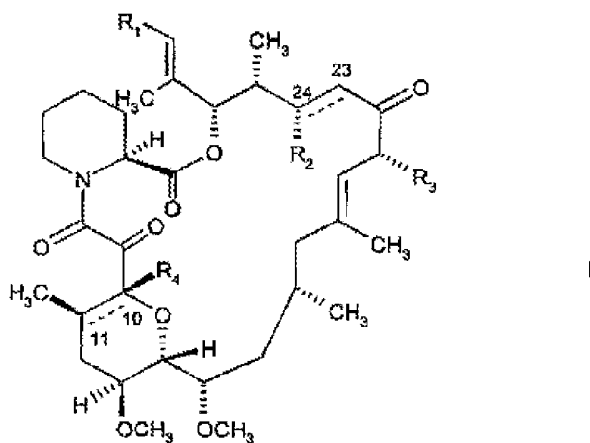
Por comprimido tendo um peso total de ca., 750 mg de uma dispersão sólida de 30 mg de pimecrolimus e uma dispersão sólida de 1,00 mg de Composto A com 160 mg de hidroxipropilmetilcelulose (3 cps) como veículo são misturados com 8,90 g de lactose (200 de malha), 0,10 mg de hidroxitolueno butilado, 381,25 mg de lactose seca por pulverização, 150,00 mg de crospovidona, 11,25 mg de dióxido de sílicio (Aerosil 200®) e são misturados 7,50 mg de estearato de magnésio; a mistura obtida é sujeita a granulação a seco e a mistura granulada é prensada em comprimidos de 750 mg (+/- 10%) de peso total.

É obtido um comprimido para uso oral.

Lisboa, 29 de Dezembro de 2008

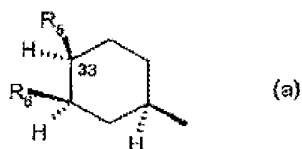
**REIVINDICAÇÕES**

1. O uso de uma combinação de rapamicina ou de um derivado de rapamicina e um composto de fórmula



em que ou

$R^1$  é um grupo (a) de fórmula



em que

$R^5$  é cloro, bromo, iodo ou azido,

$R^6$  é hidroxilo ou metoxilo, e

$R^4$  é hidroxilo e existe uma ligação simples na posição 10,11; ou  $R_4$  está ausente, e existe uma ligação dupla na posição 10,11

ou

$R_1$  é um grupo (b) ou (c) de fórmula



em que

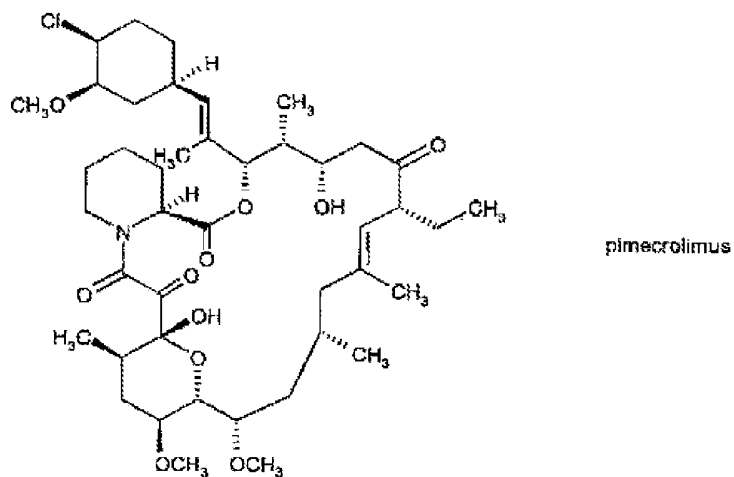
$R_6$  é como definido acima, e

$R_4$  é hidroxilo e existe uma ligação simples na posição 10,11,

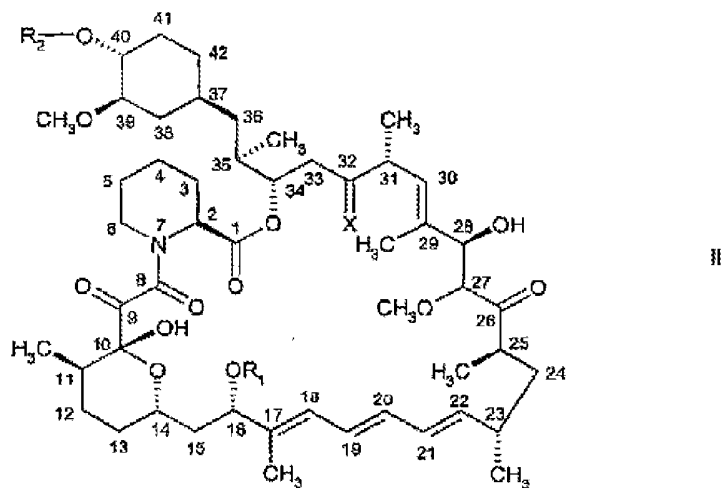
$R_2$  é oxo e existe uma ligação simples na posição 23,24; ou  $R_2$  é hidroxilo opcionalmente protegido e existe uma ligação simples ou dupla na posição 23,24; ou  $R_2$  está ausente e existe uma ligação dupla na posição 23,24; e

$R_3$  é metilo, etilo, propilo ou alilo

2. O uso da reivindicação 1, em que um composto de fórmula I é um composto de fórmula



3. O uso de qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, em que o derivado de rapamicina é um composto de fórmula



em que

R<sub>1</sub> é metilo ou (C<sub>3-6</sub>)alquinilo,

R<sub>2</sub> é H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH, 3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metil-propanoílo ou tetrazolilo, e

X é =O, (H,H) ou (H, OH), desde que R<sub>2</sub> seja outro que não H quando X=O e R<sub>1</sub> é CH<sub>3</sub>, ou um pró-fármaco deste quando R<sub>2</sub> é -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH.

4. O uso de qualquer uma das reivindicações 1 ou 3, em que o derivado de rapamicina é 40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina.

5. O uso de qualquer uma das reivindicações 1 ou 4, em que o composto de fórmula I é pimecrolimus.

Lisboa, 29 de Dezembro de 2008

Figura 1/4

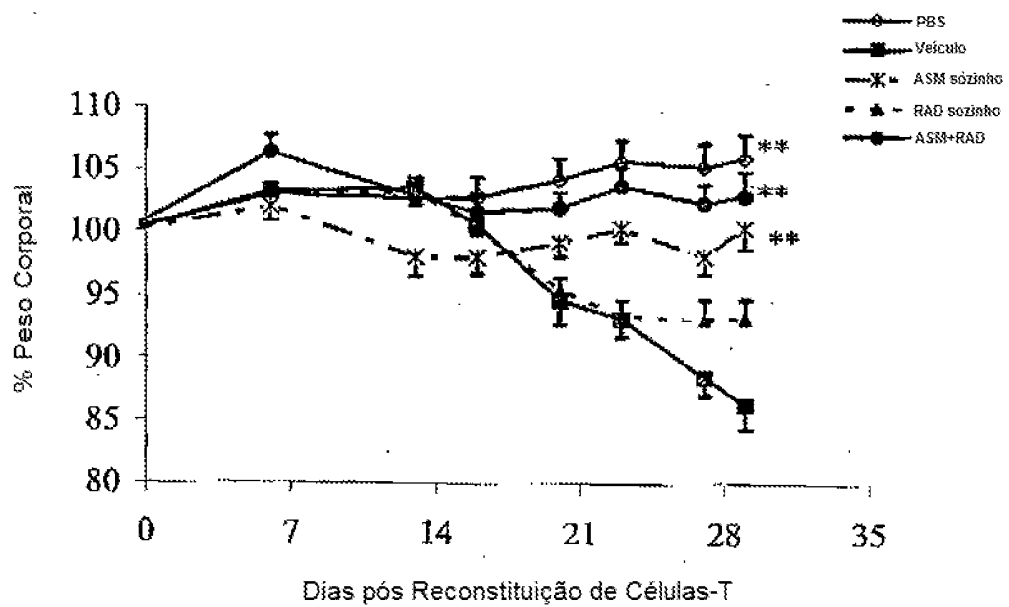


Figura 2/4

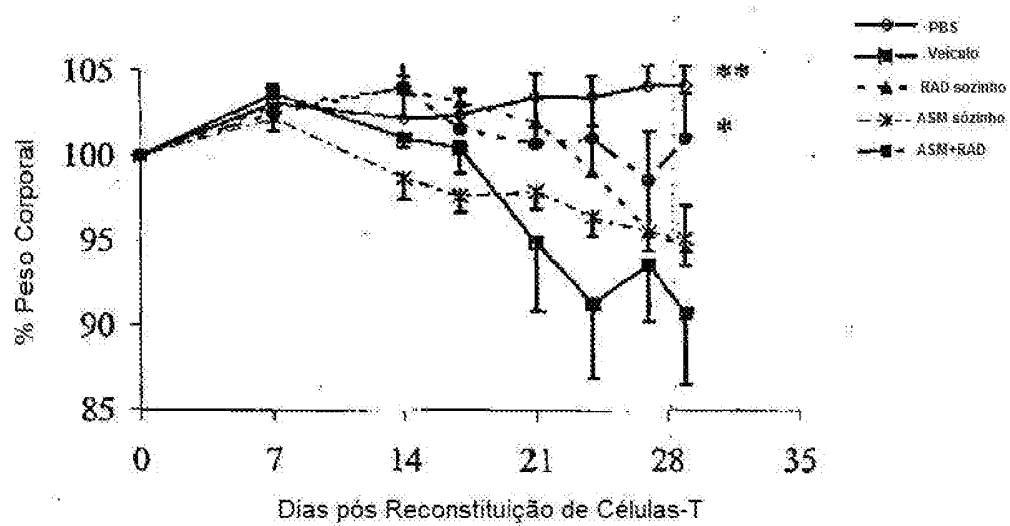


Figura 3/4

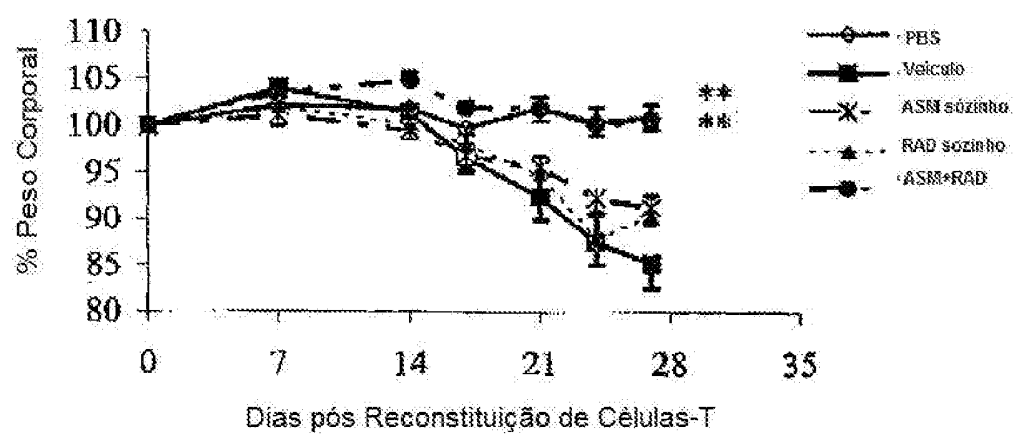
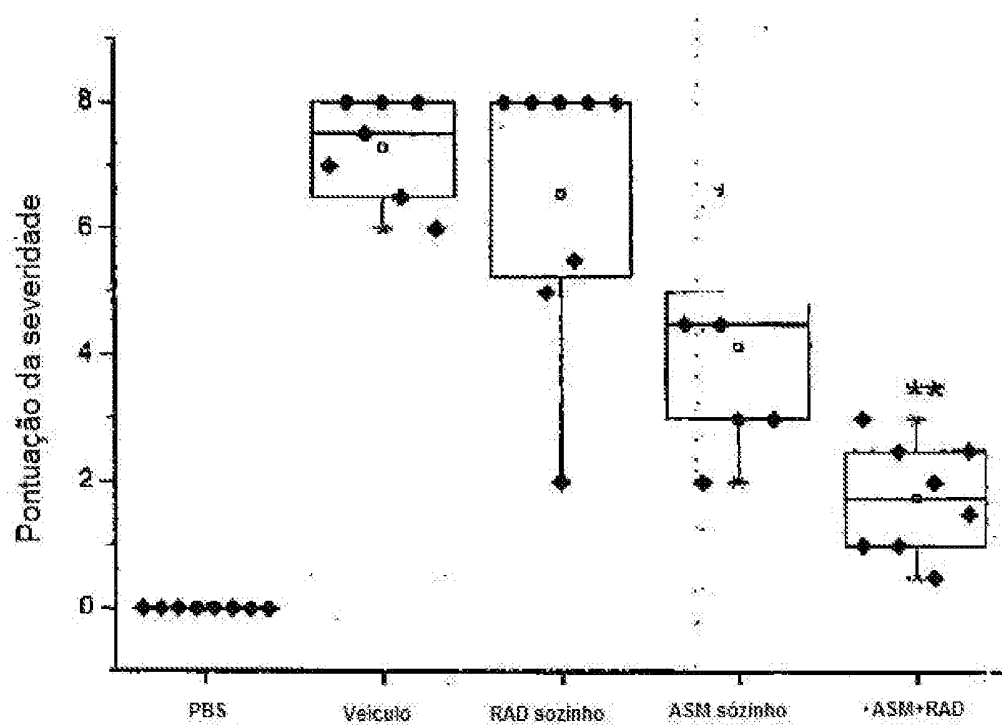


Figura 4/4



**REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

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

**Documentos de patentes citadas na Descrição**

- EP 42768033 A
- FR 520
- WO 9641807 A
- US 5256790 A
- WO 9402136 A
- WO 9516891 A
- US 5258389 A
- WO 9409810 A
- WO 9205179 A
- US 5118677 A
- US 5118678 A
- US 5180883 A
- US 5151413 A
- US 5120842 A
- WO 9311130 A
- WO 9402485 A
- WO 9514823 A
- WO 9802441 A
- WO 0114387 A
- US 3929992 A

**Literatura que não é de patentes citada na Descrição**

- KIRSNER JB. Inflammatory Bowel Disease. W.B. Saunders, 208-39299-394385-14315-25
- SELBY et al. *Gut*, 1984, vol. 25 (1), 32-40
- GROUX H et al. *Immunol. Today*, 1999, vol. 20 (10), 442-5
- POWRIE F et al. *Int.Immunol.*, 1993, vol. 5 (11), 1461-71
- BLUMBERG RS et al. *Curr.Opin.Immunol.*, 1999, vol. 11 (6), 648-56
- STROBER W et al. *Ann.Intern.Med.*, 1998, vol. 128 (10), 848-56
- STROBER W et al. *Scand.J.Immunol.*, 1998, vol. 48 (5), 453-8
- POWRIE F et al. *Immunity*, 1994, vol. 1 (7), 553-62
- SIMPSON SJ et al. *J.Exp.Med.*, 1998, vol. 187 (8), 1225-34
- MACKAY F et al. *Gastroenterology*, 1998, vol. 115 (6), 1464-75
- MALMSTROM V et al. *J.Immunol.*, 2001, vol. 166 (11), 6972-81
- LIU Z. et al. *J.Immunol.*, 2000, vol. 164 (11), 6005-14
- DE JONG YP et al. *Gastroenterology*, 2000, vol. 119 (3), 715-23
- PICARELLA D et al. *J.Immunol.*, 1997, vol. 158 (5), 2699-106