

(11) Número de Publicação: **PT 1663185 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 31/00 (2006.01) **A61K 31/185** (2006.01)
A61K 31/21 (2006.01) **A61K 31/215** (2006.01)
A61K 31/56 (2006.01) **A61K 45/00** (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) **A61P 19/00** (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)

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

(22) Data de pedido: **2004.09.21**

(30) Prioridade(s): **2003.09.22 US 504717 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2006.06.07**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.12.10**
032/2009

(73) Titular(es):

**ONEPHARM RESEARCH & DEVELOPMENT
GMBH
VETERINÄRPLATZ 1 OBJEKT 1 A 1210 WIENAT**

(72) Inventor(es):

**THOMAS WILCKENS
DR. ARIANE VOLKMANN**

**DE
DE**

(74) Mandatário:

**ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA**

PT

(54) Epígrafe: **PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE PERDA ÓSSEA INDUZIDA POR INFLAMAÇÃO E/OU IMUNOMEDIADA**

(57) Resumo:

RESUMO

**"PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE PERDA ÓSSEA INDUZIDA POR
INFLAMAÇÃO E/OU IMUNOMEDIADA"**

A presente invenção refere-se à utilização de um inibidor da 11- β -HSD tipo 1 e tipo 2 para a preparação de um agente farmacêutico para a prevenção e/ou tratamento de perda óssea e/ou de cartilagem induzida por inflamação e/ou imunomediada.

DESCRIÇÃO**"PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE PERDA ÓSSEA INDUZIDA POR
INFLAMAÇÃO E/OU IMUNOMEDIADA"**

A presente invenção refere-se à utilização de um inibidor da 11- β -HSD tipo 1 e tipo 2 ou um seu sal farmacêuticamente aceitável para a preparação de um agente farmacêutico para a prevenção e/ou o tratamento de perda óssea e/ou de cartilagem induzida por inflamação e/ou imunomediada.

A morfogénese e a remodelação óssea requerem a síntese da matriz óssea por osteoblastos e a reabsorção coordenada de osso por osteoclastos. Foi estimado que cerca de 10% da massa óssea total em seres humanos está a ser remodelada todos os anos. Os osteoblastos e osteoclastos surgem de linhagens celulares e processos de maturação distintos, isto é, os osteoblastos surgem de células estaminais mesenquimais, ao passo que os osteoclastos diferenciam a partir de precursores hematopoiéticos monócito/macrófago.

Desequilíbrios entre as actividades dos osteoclastos e osteoblastos podem surgir a partir de uma ampla variedade de mudanças ou perturbações hormonais de factores inflamatórios e de crescimento, resultando em anoma-

lias esqueléticas caracterizadas pela diminuição (osteoporose) ou aumento (osteopetrose) da massa óssea. De facto, em estados patológicos associados à inflamação, células "activadas" (por exemplo, leucócitos infiltrantes, fibroblastos sinoviais e, em particular, as células T) contribuem com outras moléculas que deslocam o equilíbrio entre as actividades osteoblásticas e osteoclásticas resultando em erosão óssea debilitante e/ou osteoporose.

Uma actividade osteoclástica aumentada pode ser observada em muitas doenças osteopénicas, incluindo a osteoporose pós-menopausa, metástases ósseas líticas ou artrite reumatóide, que levam a uma reabsorção óssea aumentada e a lesão óssea debilitante. Além disso, as características das células T em tecidos periodontais doentes podem ser comparadas às da artrite reumatóide, em que a reabsorção óssea muitas vezes atribuídas ao envolvimento de células T do tipo Th1 também foi demonstrada.

Foram descritos vários factores incluindo CSF1 (MCSF), IL1, TGF β , TGF α , TNF α , TNF β , IL6, vitamina 1,25-dihidroxitamina D3, IL11, calcitonina, PGE2, ou hormona paratiróide (PTH) que afectam a osteoclastogénese em estágios distintos de desenvolvimento. No entanto, experiências de ablação genética demonstraram que estes factores não são essenciais para o desenvolvimento de osteoclastos *in vivo*.

uma composição farmacêutica compreendendo o ácido 3-O-acetilglicirretínico no tratamento de úlcera ou inflamação.

Cooper et al., (*Journal of Bone and Mineral Research* 16 (6) 2001: 1037-1044) descreve duas isoenzimas de 11- β -hidroxiesteróide-desidrogenase (11- β -HSD) que convertem a cortisona inactiva em cortisol activo (11- β -HSD1) ou o cortisol inactivo em cortisona (11- β -HSD2). Além disso, são mencionadas citocinas inflamatórias que desactivam a 11- β -HSD2 e induzem a 11- β -HSD1.

O documento JP 07 291857 A divulga a utilização do ácido glicirretínico no tratamento da doença de Paget.

O documento WO 02/076435 A descreve a utilização de inibidores de 11- β -HSD1 para a promoção de perfis lípidos ateroprotectores que devem conduzir a uma aterosclerose reduzida e taxas de doença cardíaca coronária reduzidas.

O documento US 3.934.027 divulga derivados amido do ácido 18- β -glicirretínico.

Devido aos enormes impactos sociais e económicos da perda óssea e debilitante ao bem estar humano e a busca em aumentar a duração da vida sem os "efeito secundários" da velhice, foi de primordial importância identificar os factores essenciais envolvidos no desenvolvimento de osteoclastos e remodelação óssea.

As moléculas essenciais foram recentemente identificadas como sendo as proteínas RANKL, RANK e OPG da super família TNF-TNFR. A molécula RANKL da família TNF (receptor activador do ligando NFkB; também conhecida como o ligando osteoprotegerina (RANKL); citocina induzida por activação relacionada ao TNF (TRANCE), factor de diferenciação de osteoclasto (ODF) e TNFSF11) e o seu receptor RANK (TNFRSF11 A) são reguladores chave da remodelação óssea e essenciais para o desenvolvimento e a activação de osteoclastos. O RANKL também regula as comunicações das células T/células dendríticas, a sobrevivência das célula dendríticas e a organogénese dos gânglios linfáticos.

Além disso, a produção de RANKL por células T activadas controla directamente a osteoclastogénese e a remodelação óssea e explica porque as doenças autoimunes, cancro, leucemias, asma, infecções virais crónicas e doenças periodontais resultam em perda óssea sistémica e local.

Em particular, o RANKL parece ser o princípio patogénico que provoca a destruição óssea e de cartilagem em artrite. A inibição da função do RANKL por meio do receptor chamariz natural osteoprotegerina (OPG, TNFRSF11B) evita a perda óssea em osteoporose pós-menopausa e metástases de cancro e bloqueia completamente a perda óssea e invalidez em vários modelos roedores de artrite. Intrigantemente, o RANKL e o RANK desempenham

papéis essenciais na formação de uma glândula mamária lactante na gravidez. Este sistema proporcionou um novo e inesperado paradigma que liga a morfogénese óssea, a activação das células T e a organização de tecidos linfóides e a formação de glândula mamária necessárias para a sobrevivência das espécies mamíferas.

A inibição da activação de osteoclastos induzida por inflamação e/ou imunomediada pelo bloqueio da activação com pequenas moléculas pode ser o futuro tratamento de eleição para abolir a osteoporose, perda de dente ou invalidez em artrite, bem como outros processos inflamatórios associados à erosão óssea ou perda óssea. Esta última pode ser conseguida evitando a activação das células T, bem como a infiltração da medula óssea com células inflamatórias, inibindo, deste modo, a interacção por contacto entre as células T e os precursores de osteoclastos, ou os seus respectivos receptores e ligandos RANK e RANKL.

A secção a seguir resume a racionalidade científica para evitar a activação de osteoclastos induzida por inflamação em doenças específicas.

Doença Periodontal:

As respostas inflamatórias e imunológicas dos hospedeiros a infecções bacterianas orais específicas podem resultar em doenças periodontais, isto é, a perio-

dontite. A periodontite humana é heterogénea em etiologia, mas uma característica típica é a destruição óssea alveolar uma das maiores causas de perda dentária em seres humanos. Curiosamente, a periodontite humana foi recentemente envolvida nos riscos aumentados de certas doenças sistémicas, tais como nascimento prematuro com baixo peso, pneumonia bacteriana, doenças cardíacas congestivas e derrame, possivelmente devido a um traço inflamatório subjacente. Cerca de 10-12 microrganismos subgengivais foram implicados na patogénese da periodontite, incluindo *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus* e espiroquetas mistas. Em particular, o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, uma bactéria Gram-negativa facultativa capnofílica, em forma de bastonete foi identificada como o agente etiológico de periodontite juvenil localizada (LJP) e de algumas formas graves e de progresso rápido de periodontite. A prevalência de LJP é de cerca de 1-4% entre adolescentes e jovens adultos e 10% entre doentes diabéticos insulino-dependentes. A LJP é caracterizada por uma avançada destruição do osso alveolar num padrão molar-incisivo que muitas vezes leva à mobilidade e perda do dente, resultando em défices funcionais e estéticos. O *A. Actinomycetemcomitans* é capaz de invadir o epitélio gengival e liberta vários factores de virulência, tais como citotoxinas, endotoxinas e uma potente leucotoxina. A infecção por *A. Actinomycetemcomitans* é geralmente acompanhada por respostas imunológicas locais e sistémicas específicas ao antigénio. Estudos iniciais demonstraram proporções de células T CD4+/CD8+ alteradas e

reações de linfócitos autólogos mistos em doentes com LJP e a capacidade das células T auxiliares de ir para os tecidos periodontais em modelos de ratos e ratinhos de periodontite. Além disso, foi anteriormente demonstrado que uma infecção por *A. actinomycetemcomitans* em ratinhos NOD/SCID enxertados com leucócitos de sangue periférico humano (HuPBLs) leva a uma inflamação periodontal caracterizada pela infiltração de células T CD4+, células T CD8+, células B CD20+ e macrófagos Mac1+ nos tecidos conjuntivos fibrosos adjacentes às bolsas periodontais. Estes resultados sugerem que as células T poderiam modular a inflamação periodontal induzida por bactéria e/ou a destruição de osso alveolar. Para investigar o mecanismo ou mecanismos precisos que regulam a imunidade periodontal e a destruição de osso alveolar, HuPBLs de doentes com LJP foram transplantados em ratinhos NOD/SCID (que não têm células T e B endógenas), gerando ratinhos HuPBLs-NOD/SCID. Este estudo demonstra que o desafio oral destes ratinhos "humanizados" com *A. actinomycetemcomitans* (designados Aa-HuPBLs-NOD/SCID) leva à activação funcional das células T CD4+ humanas no periodonto e desencadeia a destruição de osso alveolar local. A estimulação *in vitro* das células T CD4+ destes ratinhos com antígenos de *A. actinomycetemcomitans* leva à expressão do ligando osteoprotegerina (OPGL, também conhecido como TRANCE, ODF e RANKL), um mediador chave da osteoclastogénese e activação de osteoclastos. A inibição da função OPG-L por meio do receptor chamariz osteoprotegerina (OPG) reduz, de forma significativa, a destruição de osso alveolar detectada em

ratinhos Aa-HuPBLs-NOD/SCID depois da inoculação bacteriana, bem como os números de osteoclastos nos sítios de inflamação periodontal local. Estes resultados identificam pela primeira vez um papel crítico para as células T CD4+ reactivas a microrganismos orais em doença periodontal. Além disso, a indução da expressão de OPGL desencadeada por *A. actinomycetemcomitans* em células T e a activação de osteoclastos e a perda óssea mediada por OPGL poderia proporcionar uma explicação molecular para a destruição de osso alveolar observada em infecção periodontal local.

Foi recentemente declarado que o conceito desenvolvido acima pode ser traduzido em doença periodontal em geral, uma vez que a esta patologia é sempre acompanhada por um processo inflamatório que resulta na activação das células T.

A doença periodontal é a segunda doença mais prevalente nos Estados Unidos depois da doença cardíaca. Embora afecte mais de 50 milhões de pessoas no nível moderado a grave, apenas 15-20% recebem tratamento. Actualmente, mais de 6 mil milhões de dólares são gastos anualmente para tratar a doença nos Estados Unidos. A doença periodontal aumenta a susceptibilidade do tecido e osso oral à degradação por bactéria, criando bolsas entre os dentes e gengivas, deste modo, tornando-a uma principal causa da perda de dentes.

Se deixada sem tratamento, as implicações da

doença estendem-se para muito além da boca. Estudos identificaram a doença periodontal como um potencial factor de contribuição para a doença cardíaca, diabetes e prematuros com baixo peso. O Relatório de 2000 do Surgeon General dos Estados Unidos aumentou mais a visibilidade pública em torno da doença periodontal como uma importante questão de saúde. Os tratamentos antimicrobianos actuais não conseguem deter a destruição óssea em curso. Mais provavelmente, uma combinação com molécula pequena que evita a infiltração da medula óssea com células inflamatórias e a activação das células T será um tratamento ideal que poderia ser seguido por uma estratégia preventiva incluindo a molécula pequena que bloqueia a infiltração da medula óssea.

Artrite Reumatóide:

A perda óssea representa um importante problema não resolvido em artrite reumatóide (AR). As complicações esqueléticas da AR consistem em erosões ósseas focais e osteoporose periarticular em locais de inflamação activa e perda óssea generalizada com massa óssea reduzida. Novas evidências indicam que os osteoclastos são os mediadores chave de todas as formas de perda óssea em AR. O TNF- α é uma das citocinas osteoclastogénicas mais potentes produzidas na inflamação e é essencial na patogénese da AR. A produção do factor de necrose tumoral- α (TNF- α) e outras citocinas pró-inflamatórias na AR é em grande parte dependente de células T-CD4 e principalmente um resultado

da secreção de interferão- γ (IFN- γ). As células T sinoviais contribuem para a sinovite pela secreção de IFN- γ e interleucina (IL)-17 bem como pela interacção directa com macrófagos e fibroblastos através de mecanismos de contacto de célula para célula. As células T sinoviais activadas expressam tanto formas solúveis como ligadas a membrana do activador do receptor do ligando NF- κ B (RANKL). No sinóvio reumatóide, os fibroblastos também proporcionam uma abundante fonte de RANKL. Além disso, o TNF- α e a IL-1 dirigem-se à células estromal-osteoblásticas para aumentar a IL-6, a IL-11 e a proteína relacionada à produção da hormona paratiróide (PTHrP), bem como a expressão de RANKL. Apenas na presença de níveis permissíveis de RANKL, o TNF- α actua directamente para estimular a diferenciação de osteoclastos e macrófagos e células progenitoras mielóides. Além disso, o TNF- α induz a libertação de IL-1 por fibroblastos sinoviais e macrófagos e a IL-1 juntamente com o RANKL é um importante sinal de sobrevivência e activação de osteoclastos nascentes. Consequentemente, o TNF- α e a IL-1 em actuação em conjunto com o RANKL podem promover, de forma potente, o recrutamento, a activação e a osteólise de osteoclastos em AR. O suporte mais convincente para esta hipótese vem de estudos *in vivo* de modelos animais. A protecção óssea na presença de inflamação contínua em ratos artríticos com osteoprotegerina (OPG) suporta o conceito de que os osteoclastos mediam exclusivamente a perda óssea, proporcionando uma prova adicional que a OPG protege a integridade óssea pela regulação descendente da osteoclastogénese e promovendo a apoptose dos osteoclastos.

O conexão entre a activação das células T, a sobreprodução de TNF- α e o sistema ligando-receptor RANKL/OPG/RANK apontam para um paradigma unificado para todo o espectro da patologia esquelética em AR. As estratégias que tratam da reabsorção óssea osteoclástica representarão uma importante e nova faceta da terapêutica para AR.

Osteoporose na população em envelhecimento:

A. Impacto de mudanças de citocina com deficiência de estrogénio sobre a osteoclastogénese

Há uma progressiva perda de tecido ósseo depois da menopausa natural ou cirúrgica que leva a fracturas aumentadas dentro de 15-20 anos a partir da cessação da função ovariana. Receptores de estrogénio (ER) foram detectados em muitas células que existem no tecido ósseo, sugerindo que a menopausa pode ter consequências directas sobre a secreção de citocina por células localizadas no interior do microambiente ósseo. Acreditava-se que as células da medula óssea da linhagem monócito/macrófago eram a fonte principal do aumento pós-menopausa na secreção de TNF- α e IL-1 em tecido ósseo. No entanto, nos últimos anos foi cada vez mais reconhecido que as células T activadas são também uma importante fonte de uma produção aumentada de TNF- α na medula óssea depois da menopausa. As citocinas pró-inflamatórias estão entre os estimulantes mais fortes de

reabsorção óssea conhecidos. Elas intervêm, directamente e através da estimulação de outros factores locais, com cada um dos passos da osteoclastogénese que determina a taxa de reabsorção óssea, desde a proliferação e diferenciação das primeiras células precursoras de osteoclastos até a capacidade de resposta e a duração do osteoclasto maduro. O primeiro passo em osteoclastogénese que determina a taxa de reabsorção óssea é a proliferação de células precursoras de osteoclastos. De facto, uma importante consequência da deficiência de estrogénio é a expansão do pool de células precursoras osteoclásticas na medula óssea. A perda da função ovariana é permissiva para a expressão de importantes citocinas que estimulam directamente a proliferação inicial do precursor de osteoclasto, isto é, M-CSF, GM-CSF e IL-6. Aumentos espontâneos nestas citocinas podem ser adicionalmente aumentados pelos aumentos paralelos em IL-1 e TNF- α com a menopausa, que são potentes estimulantes de M-CSF, GM-CSF (292, 298, 308-311) e IL-6.

Em resumo, pode-se declarar que a deficiência de estrogénio, conforme observado depois de ovariectomia ou na menopausa, está associada a uma expressão aumentada de mediadores de inflamação. Além disso, a deficiência de células T evitou de forma eficaz a perda óssea em ratinhos ovariectomizados, claramente enfatizando a via RANK/RANKL como um mecanismo essencial que contribui para aumentar a formação de osteoclastos e a perda óssea.

De interesse, a deficiência de estrogénio também

parece estar correlacionada com a incidência de várias doenças autoimunes que ligam a activação das células T, células B com o estado hormonal e a fisiologia óssea.

Conforme descrito acima, a perda óssea com deficiência de estrogénio envolve um grande número de mudanças inter-relacionadas em factores reguladores estrogénio-dependentes. No entanto, enquanto em outros estados inflamatórios, tais como a artrite inflamatória, a deficiência em citocinas pró-inflamatórias únicas não evita totalmente o processo inflamatório, a deficiência em várias citocinas únicas é suficiente para bloquear completamente a reabsorção óssea excessiva com a deficiência em estrogénio. Esta redundância da função da maior parte destas citocinas para a formação de osteoclastos pode compensar a falta de função de cada um destes componentes em situações à parte de deficiência de estrogénio. As excepções evidentes são o M-CSF e os componentes do sistema RANKL, OPG/RANK, cuja actividade é essencial para a geração de osteoclastos. Esta evidência torna o bloqueio da interacção das células T com os precursores de osteoclastos um caminho muito atraente para novas intervenções terapêutica em perda óssea induzida por estrogénio; sendo esta considerada similar à destruição óssea induzida por inflamação.

O circuito cortisona/cortisol:

A interconversão de cortisol farmacologicamente activo e cortisona inactiva é conseguida por duas 11- β -

hidroxiesteróide desidrogenases (11- β -HSD)³ independentes que exibem expressão tecido-específica. Embora tenha sido proposta uma terceira enzima, a sua existência ainda tem de ser demonstrada. Na maioria das células intactas, a 11- β -HSD1 funciona, predominantemente, como uma redutase que gera cortisol activo a partir de cortisona inactiva e, deste modo, aumenta a activação do receptor de glicocorticóide. No entanto, há forte evidência que a direcção da reacção pode depender em grande parte no tipo específico de tecido; deste modo, em células de Leydig a 11- β -HSD-1 também pode funcionar como uma desidrogenase.

A 11- β -HSD1 é amplamente distribuída entre os tecidos com a expressão predominante ocorrendo em tecidos hepáticos, adiposos, gonadal e do sistema nervoso central. Ratinhos com uma ruptura dirigida do gene 11- β -HSD1 são mais resistentes à hiperglicemia induzida por tensão ou dieta rica em matéria gorda do que os seus correspondentes do tipo selvagem, consistente com a noção emergente de que a activação de glicocorticóides por metabolismo pré-receptor pode ser fundamental ao aparecimento de muitas sequelas de resistência à insulina. A 11- β -HSD2 que é principalmente expressa na placenta e tecidos alvo de aldosterona tais como os rins e o cólon, actua exclusivamente como uma desidrogenase, evitando, deste modo, a activação de genes sensíveis ao receptor mineralocorticóide por excesso de cortisol.

O ácido 18- β -glicirretínico, um componente activo

do alcaçuz é um inibidor da 11- β -HSD1 bem como da 11- β -HSD2 e a ingestão de alcaçuz ou a administração do ácido 18- β -glicirretínico ou o seu derivado hemisuccinato carbenoxolona resulta em hipertensão e alcalose metabólica devido à inibição de 11- β -HSD2 devido ao acesso aumentado a cortisol activo nos receptores mineralocorticóides nos rins. Doentes com mutações no gene que codifica a 11- β -HSD2 sofrem de síndrome do "excesso aparente de mineralocorticóides" resultando em hipocalemia e hipertensão grave. Sintomas similares foram também descritos recentemente para o ratinho knockout 11- β -HSD2.

Durante várias décadas, os glicocorticóides sintéticos encontraram utilização terapêutica como agentes anti-inflamatórios em várias doenças, tais como a artrite reumatóide, doenças alérgicas, e asma brônquica. Consistente com os efeitos pluripotentes dos glicocorticóides, o receptor de glicocorticóide está amplamente distribuído entre os tecidos periféricos. Em muitos casos, a distribuição no tecido deste receptor e a de 11- β -HSD1 se sobrepõe. Embora os glicocorticóides sejam geralmente receitados por suas acções anti-inflamatórias, até o momento relativamente poucos estudos tratam do envolvimento da 11- β -HSD em funções imunológicas mediadas por glicocorticóide. Num destes estudos, foi enfatizada a importância do metabolismo pré-receptor pelas enzimas 11- β -HSD no controlo das respostas inflamatórias demonstrando que a inibição farmacológica da actividade da 11- β -HSD presente na pele leva a um aumento da acção anti-inflamatória de cortisol aplicado

topicamente sobre as respostas de hipersensibilidade. O inibidor aplicado só não apresentou qualquer efeito. Foi proposto que o bloqueio da 11- β -HSD na pele anula a inactivação do corticóide.

Recentemente, foi investigada a expressão da 11- β -HSD numa célula efectora inflamatória primária, o monócito/macrófago. Estes estudos confirmam a completa ausência tanto da 11- β -HSD1 como da 11- β -HSD2 em monócitos humanos em circulação isolados de fresco. No entanto, a actividade 11- β -redutase foi induzida durante a cultura de monócitos ou depois de estimulação com as citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-13, sugerindo fortemente que a mesma pode desempenhar um papel importante na regulação das funções imunológicas destas células.

Uma vez que ambas as isoenzimas foram descobertas em células ósseas, foi ainda especulado que a activação da cortisona pela actividade redutase dominante da 11- β -HSD, por exemplo, a conversão exagerada em cortisol possa ser parte da perda óssea induzida pelos glicocorticóides em geral, incluindo a osteoporose observada em artrite reumatóide. Desta evidência poder-se-ia especular que o bloqueio da 11- β -HSD resultaria em perda óssea aumentada.

Deste modo, embora tenhamos proposto que o bloqueio da 11- β -HSD não só melhoraria a artrite permitindo indução de tolerância devido a concentrações aumentadas de glicocorticóide local, preocupa-nos que este tratamento aumentaria a destruição óssea.

Surpreendentemente, este não é o caso. De facto, o bloqueio de 11- β -HSD não só diminuiu a inflamação, como também evitou completamente a infiltração da medula óssea com células inflamatórias. Uma vez que foi proposto que os pré-osteoclastos são recrutados de linhas celulares sinoviais, bem como medula óssea monocítica, a prevenção da infiltração tem de ser considerada a via efectora principal para a prevenção da erosão óssea em artrite adjuvante e destruição óssea induzida por inflamação em geral. Esta última é ainda corroborada pelo facto de que a injeção do ácido 18- β -glicirretínico precisava para estar em estreita proximidade para drenar os gânglios linfáticos a fim de exibir eficácia clínica seja só ou em associação com um péptido.

Assim sendo, propomos que o bloqueio da 11- β -HSD aumenta as concentrações locais de glicocorticóide em tecidos imunológicos, o que evita a interacção entre as células T activadas e precursores de osteoclastos e/ou a activação das células T *per se*.

Dadas estas constatações, parece muito improvável que os glicocorticóides endógenos contribuam para a perda óssea durante a inflamação aguda; esta última pode, possivelmente ser o caso, em condições fisiológicas não inflamatórias. De facto, em artrite adjuvante em rato, um modelo estabelecido para a doença humana, a dexametasona, um potente glicocorticóide sintético em associação com um

anticorpo empobrecedor de CD4+, fortemente protegeu os ratos contra a erosão óssea. Além disso, a dexametasona também aumentou a melhora induzida por anti-TNF de inflamação sinovial e erosão óssea em modelos de ratos para artrite reumatóide. Assim, o aumento dos níveis locais de glicocorticóides pode ter efeitos benéficos sobre os ossos e a homeostase óssea durante inflamação aguda e/ou durante a activação de destruição óssea imunomediada. Nossas constatações contrastam claramente com a hipótese recentemente apresentada.

Além disso, é muito improvável que a 11- β -HSD expressa em osteoblastos desempenhe um papel no presente fenómeno, uma vez que a activação de osteoclastos depende da interacção com células T activadas e não osteoblastos na medula óssea. Esta evidência nega ainda um papel funcional da 11- β -HSD osteoblástica em destruição óssea induzida por inflamação.

Com base nas nossas constatações *in vivo*, investigamos a expressão do gene de 11- β -HSD e a actividade biológica em tecidos relevantes para a função imunológica. Pela primeira vez identificamos a actividade da 11- β -HSD em células dendríticas e células linfóides (não publicado) tanto em tecidos humanos como de ratos. Curiosamente, análise pelo método TaqMan indica a presença de mRNA para mais de uma 11- β -HSD. Esta evidência sugere fortemente que a 11- β -HSD pode ter um papel funcional na regulação da imunidade. Além disso, a enzima tipo 3 anteriormente

postulada, bem pode ser um homólogo do tipo 2 estabelecido. Foi proposto anteriormente que, potencialmente, podem existir diferenças nas enzimas 11- β -HSD-2 conhecidas observadas na placenta e nos rins, uma vez que os seus ADNs eram similares, mas não idênticos.

Uma vez que o ácido 18- β -glicirretínico bloqueia tanto a terceira enzima tanto a conhecido como a suposta, actualmente não se pode decidir definitivamente qual enzima é mais responsável pelo efeito benéfico do bloqueio de 11- β -HSD. O facto de que os mediadores inflamatórios, tais como as citocinas podem influenciar o equilíbrio entre a actividade da redutase e a desidrogenase seja alterando o equilíbrio entre as isoenzimas, seja mudando a direcção da reacção no nível da enzima única, necessita do desenvolvimento de inibidores mais selectivos para a identificação do alvo relevante.

Evidência recente estabelece a perda óssea induzida por inflamação e/ou imunomediada como uma interacção directa entre células T activadas e precursores de osteoclastos. Este mecanismo crucial pode ser evitado pela utilização do ácido 18- β -glicirretínico e compostos relacionados que modulam o circuito cortisol/cortisona; isto é, a actividade e/ou a expressão da 11- β -hidroxiesteróide desidrogenase, bem como inibidores selectivos úteis para a modulação da 11- β -HSD.

Era um objectivo da presente invenção propor-

cionar um agente farmacêutico para a prevenção e/ou tratamento de perda de osso e/ou de cartilagem induzida por inflamação e/ou imunomediada.

Assim sendo, a presente invenção refere-se à utilização de um inibidor da 11- β -HSD tipo 1 e tipo 2 ou um seu sal farmaceuticamente aceitável para a preparação de um agente farmacêutico para a prevenção e/ou o tratamento de perda de osso e/ou cartilagem induzida por inflamação e/ou imunomediada, em que a referida utilização é para a prevenção e/ou tratamento de metástases ósseas líticas, artrite, artrite crónica juvenil e/ou artrite adjuvante, doenças infecciosas, perda óssea por HIV, perda de dente, inflamação da medula óssea e/ou inflamação sinovial.

Pela utilização de fármacos para a terapêutica de inflamações, observou-se que a perda óssea continua a acontecer, uma vez que permanece a activação de osteoclastos. Constatou-se que a perda óssea pode ser eficazmente prevenida por meio dos inibidores da 11- β -HSD da invenção.

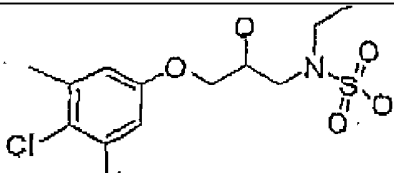
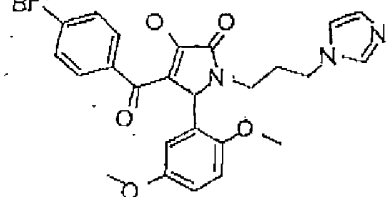
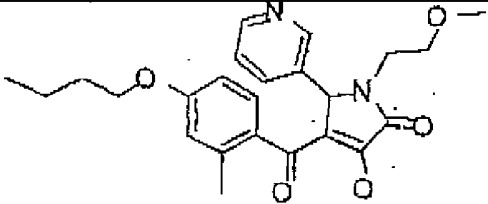
De acordo com a invenção, os inibidores da 11- β -HSD tipo 1 e tipo 2 são, preferencialmente utilizados para a prevenção e/ou tratamento de perda de osso e/ou cartilagem num mamífero, mais preferencialmente num ser humano.

Foi cuidadosamente considerado que uma perda de

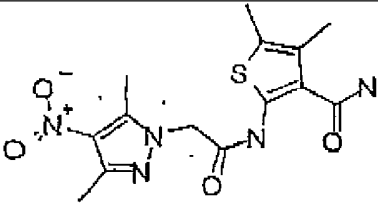
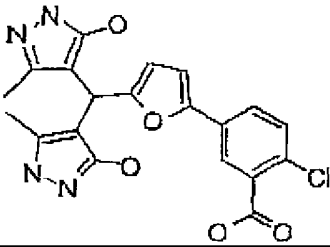
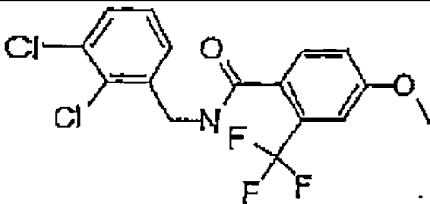
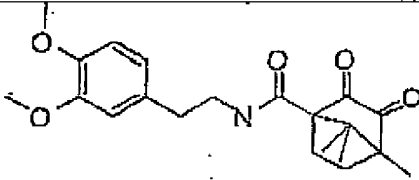
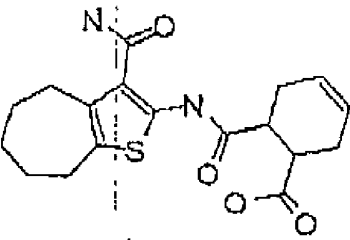
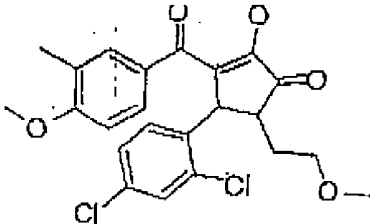
osso e/ou cartilagem induzida por inflamação e/ou imunome-diada pode incluir osteoporose, osteoporose pós-menopausa, metástases ósseas líticas, artrite, artrite crónica juvenil, artrite adjuvante, doenças infecciosas, perda óssea por cancro, perda óssea por HIV, perda de dente, inflamação da medula óssea, inflamação sinovial, erosão de cartilagem e/ou osso e/ou lesão proteoglicana.

Numa forma de realização mais preferida da invenção, a perda de osso e/ou cartilagem imunomediada inclui osteoartrite, artrite reumatóide e/ou periodontite.

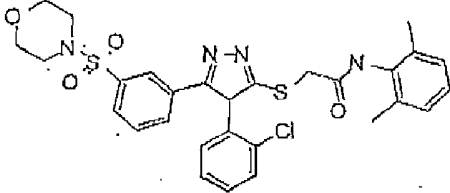
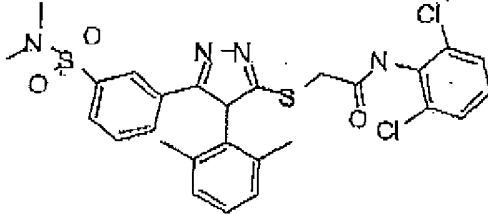
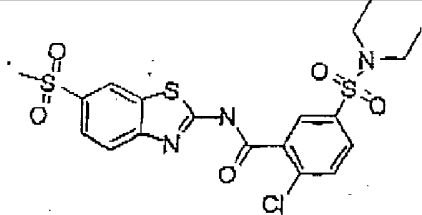
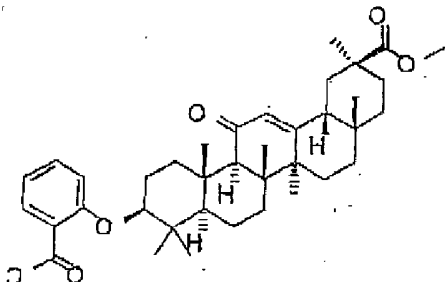
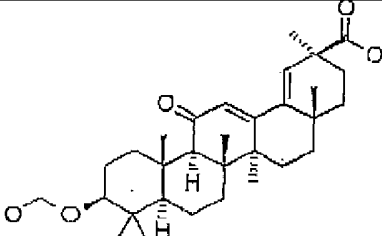
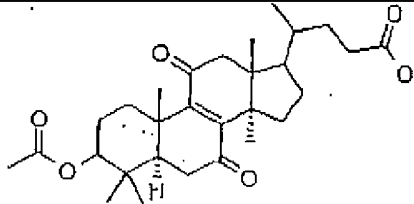
De preferência, os inibidores da 11- β -HSD tipo 1 e tipo 2 são seleccionados do grupo que consiste nas seguintes fórmulas:

Nome do Composto	Estrutura
Fórmula 1	
Fórmula 2	
Fórmula 3	

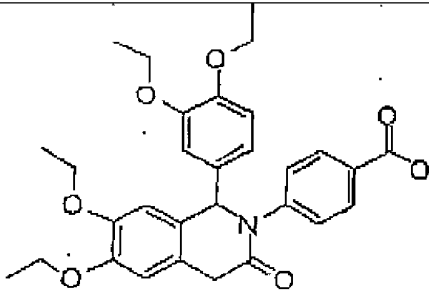
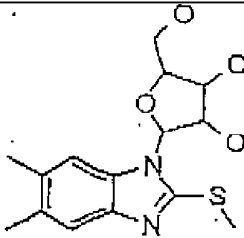
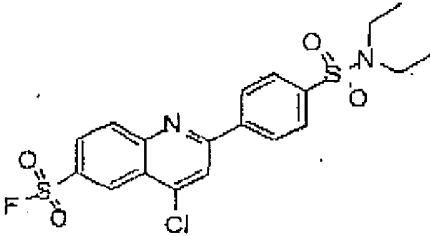
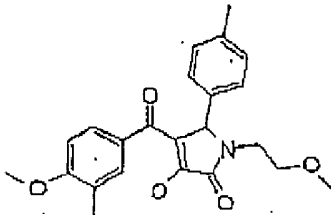
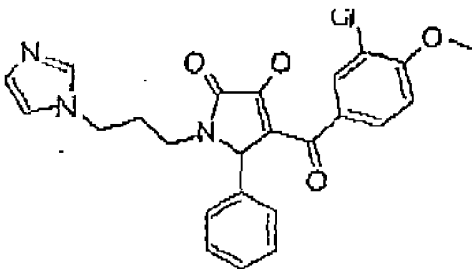
(continuação)

Nome do Composto	Estrutura
Fórmula 4	
Fórmula 5	
Fórmula 6	
Fórmula 7	
Fórmula 8	
Fórmula 9	

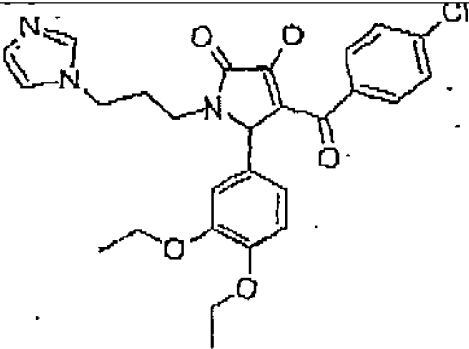
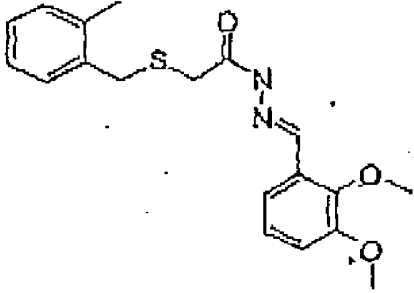
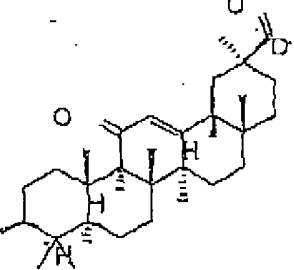
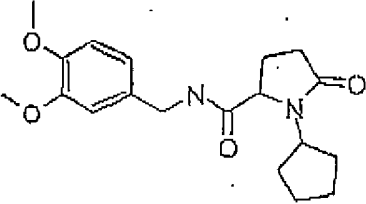
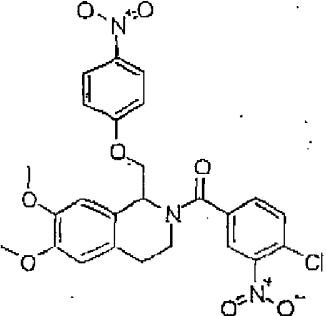
(continuação)

Nome do Composto	Estrutura
Fórmula 10	
Fórmula 11	
Fórmula 12	
Fórmula 13	
Fórmula 15	
Fórmula 16	

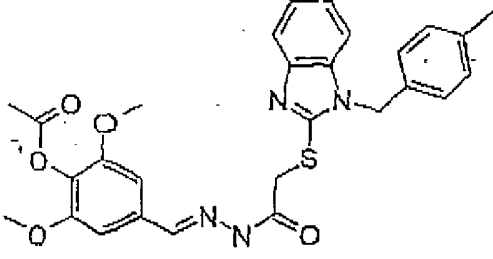
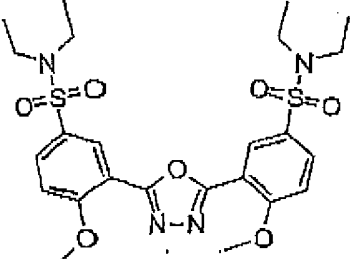
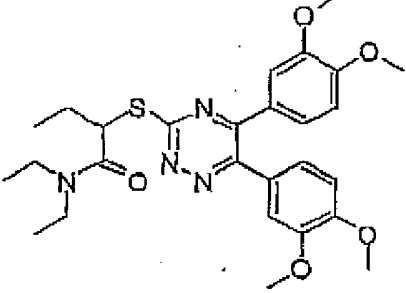
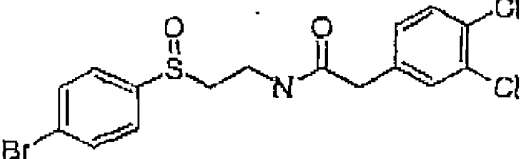
(continuação)

Nome do Composto	Estrutura
Fórmula 17	
Fórmula 18	
Fórmula 19	
Fórmula 20	
Fórmula 21	

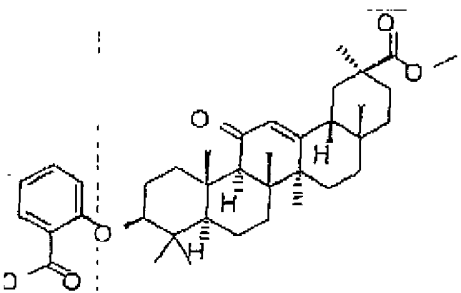
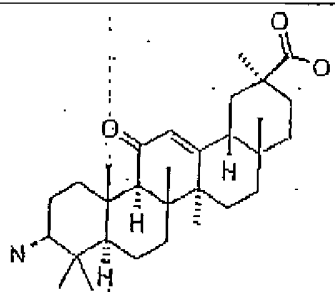
(continuação)

Nome do Composto	Estrutura
Fórmula 22	
Fórmula 23	
Fórmula 25	
Fórmula 26	
Fórmula 27	

(continuação)

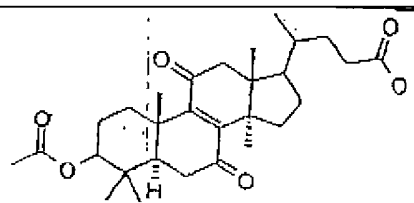
Nome do Composto	Estrutura
Fórmula 28	
Fórmula 29	
Fórmula 30	
Fórmula 31	

Numa forma de realização preferida da invenção, os inibidores da 11- β -HSD tipo 1 e tipo 2 são seleccionados do grupo que consiste nas fórmulas 13 e 25 como a seguir:

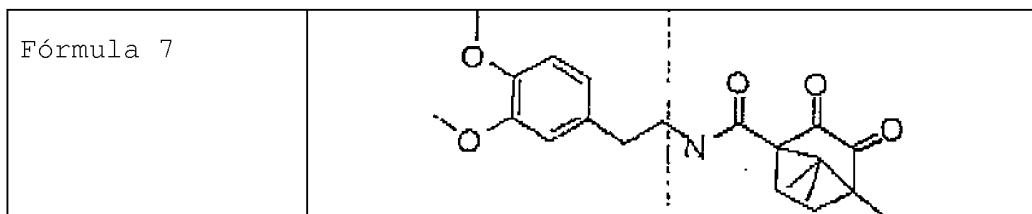
Fórmula 13	
Fórmula 25	

Verificou-se que as referidas estruturas são particularmente eficazes na inibição específica da 11- β -HSD, preferencialmente da 11- β -HSD-1, 11- β -HSD-2 e/ou 11- β -HSD-1 e 2.

Preferencialmente, o inibidor é de fórmula 16:

Fórmula 16	
------------	--

Numa outra forma de realização preferida da invenção, o inibidor da 11- β -HSD tipo 1 e tipo 2 é de fórmula 7:



Outros inibidores da 11- β -HSD-1 ou 2 levados em consideração são para a prevenção e/ou tratamento da perda óssea induzida por inflamação e/ou imunomediada, por exemplo, mas não limitados ao ácido 18- β -glicirretínico, progesterona, 5 α -di-hidroprogesterona, 5 β -di-hidroprogesterona, 20 α -di-hidroprogesterona, 3 β 5 α -tetra-hidroprogesterona, 17 α -OH-progesterona, 20 α -di-hidro-5 α -di-hidroprogesterona, 20 α -di-hidroprogesterona, 11 α -OH-progesterona, 11 β -OH-progesterona, corticosterona, 11 β -OH-androstenoïdona, 3-alfa, 5-beta-tetra-hidroprogesterona, 3-alfa, 5-beta-tetra-hidro-11-deoxi-corticosterona, 11-epicortisol, ácido quenodeoxicólico, ácido cólico, ácido glicirretínico (3 β -hidroxi-11-oxooleano-12-eno-30-ácido) e seus derivados tais como glicirricina, ácido glicirricínico e carbenoxolona; furosemida e seus derivados, flavonóides e seus derivados tais como naringenina, triterpinóides (por exemplo, CHAPS), cetoconazole, saiboku-to, gossipol, metirapona, 11-epiprednisolona. Outros inibidores adequados são semelhantes a esteróide, tais como dexametasona, budesonida, deflazacort e estanozolol.

Os inibidores 11- β -HSD tipo 1 e tipo 2 da presente invenção podem ser utilizados na prevenção e/ou tratamento de perda óssea e/ou de cartilagem induzida por

inflamação e/ou imunomediada sós ou em associação com pelo menos um ingrediente activo sendo eficaz na prevenção e/ou tratamento de perda óssea e/ou de cartilagem induzida por inflamação e/ou imunomediada.

Os produtos de fármaco são produzidos utilizando uma dose eficaz dos compostos da invenção ou seus sais, para além de adjuvantes, veículos e aditivos convencionais. A dosagem dos agentes farmacêuticos pode variar dependendo do modo de administração, a idade e o peso do doente, da natureza e gravidade das doenças a serem tratadas e factores similares. A dose diária pode ser dada como uma dose única, e é, em geral de 5-100 mg/kg de peso corporal, preferencialmente 7-80 mg/kg de peso corporal, mais preferencialmente 10-50 mg/kg de peso corporal e mais preferencialmente 20 mg/kg de peso corporal, em relação a uma pessoa que pesa 70 kg.

São adequadas, de acordo com a invenção, a administração oral, sublingual, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intra-arterial, intramedular, intratecal, intraventricular, intraocular, intracerebral, intracranial, respiratória, intratraqueal, nasofaríngea, transdérmica, intradérmica, subcutânea, intraperitoneal, intranasal, entérica e/ou tópica e/ou administração por via rectal, por perfusão e/ou por implante. A administração oral dos compostos da invenção é particularmente preferida. São utilizadas apresentações farmacêuticas galénicas tais como comprimidos, comprimidos revestidos, cápsulas, pós disper-

sáveis, grânulos, soluções aquosas, substâncias aquosas ou oleosas, xarope, soluções ou gotas.

As formas sólidas podem compreender ingredientes e veículos inertes tais como, por exemplo, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, fosfato de sódio, lactose, amido, manitol, alginatos, gelatina, goma de guar, estearato de magnésio ou estearato de alumínio, metilcelulose, talco, sílicas coloidais, óleo de silicone, ácidos gordos de alto peso molecular (tais como o ácido esteárico), agar-agar ou gorduras e óleos vegetais ou animais, polímeros sólidos de alto peso molecular (tais como polietilenoglicol); as preparações adequadas para a administração oral podem compreender, se desejado, aromatizantes e/ou edulcorantes adicionais.

As formas líquidas de fármaco podem ser esterilizadas e/ou, onde apropriado, podem compreender excipientes tais como conservantes, estabilizantes, agentes humedecedores, penetrantes, emulsionantes, agentes de espalhamento, solubilizantes, sais, açúcares ou álcoois de açúcar para controlar a pressão osmótica ou para tamponar e/ou reguladores de viscosidade.

Exemplos de tais adições são tampão tartarato e tampão citrato, etanol, agentes complexantes (tais como o ácido etilenodiaminatetracético e os seus sais não tóxicos). Adequados para controlar a viscosidade são os polímeros de alto peso molecular, tais como, por exemplo,

o óxido de polietileno líquido, celulosas microcristalinas, carboximetilcelulosas, polivinilpirrolidonas, dextranos ou gelatina. Exemplos de veículos sólidos são amido, lactose, manitol, metilcelulose, talco, sílicas coloidais, ácidos gordos de peso molecular mais alto (tais como o ácido esteárico), gelatina, agar-agar, fosfato de cálcio, estearato de magnésio, gorduras animais e vegetais, polímeros sólidos de alto peso molecular, tal como polietilenoglicol.

As suspensões oleosas para utilizações parentéricas ou tópicas podem ser óleos vegetais, sintéticos ou semi-sintéticos, tais como, por exemplo, ésteres líquidos de ácido gordo com, em cada caso, 8 a 22 átomos de C nas cadeias de ácido gordo, por exemplo, o ácido palmítico, láurico, tridecílico, margárico, esteárico, aráquico, místico, beénico, pentadecílico, linoléico, elaídico, brasídico, erúcico ou oleico, que são esterificados com álcoois mono-hídricos a tri-hídricos com 1 a 6 átomos de C, tais como, por exemplo, metanol, etanol, propanol, butanol, pentanol ou seus isómeros, glicol ou glicerol. Exemplos destes ésteres de ácido gordo encontram-se disponíveis comercialmente migliós, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, estearato de isopropilo, PEG 6-ácido cáprico, ésteres caprílico/cáprico de álcoois gordos saturados, trioleatos de polioxietilenoglicerol, oleato de etilo, ésteres de ácido gordo ceroso tais como gordura da glândula uropigial artificial de pato, ácido gordo de coco, éster isopropílico, oleato de oleílo, oleato de decilo, lactato de etilo, ftalato de dibutilo,

adipato de diisopropilo, ésteres poliólicos de ácido gordo, *inter alia*. São também adequados os óleos de silicone que diferem em viscosidade ou álcoois gordos, tais como álcool isotridecílico, 2-octildodecanol, álcool cetilestearílico ou álcool oleílico, ácidos gordos, tais como, por exemplo, o ácido oleico. É também possível utilizar óleos vegetais, tais como o óleo de rícino, óleo de amêndoas, azeite, óleo de sésamo, óleo de semente de algodão, óleo de amendoim ou óleo de soja.

Os solventes, formadores de gel e solubilizantes adequados são água ou solventes miscíveis com água. Exemplos adequados são álcoois tais como, por exemplo, etanol ou álcool isopropílico, álcool benzílico, 2-octildodecanol, polietilenos glicóis, ftalatos, adipatos, propilenoglicol, glicerol, di- ou tripropilenoglicol, ceras, metil Cellosolve, Cellosolve, ésteres, morfollinas, dioxano, sulfóxido de dimetilo, dimetilformamida, tetra-hidrofurano, ciclo-hexanina, etc.

Os formadores de película que podem ser utilizados são éteres de celulose capazes de dissolver ou insuflar tanto em água como em solventes orgânicos, tais como, por exemplo, hidroxipropilmetilcelulose, metilcelulose, etilcelulose ou amidos solúveis.

São também possíveis formas combinadas de formadores de gel e formadores de película. Em particular, são utilizadas macromoléculas iônicas para este fim, tais como, por exemplo, carboximetilcelulose sódica, ácido poli-

acrílico, ácido polimetilacrílico e seus sais, semiglicolato de amilopectina de sódio, ácido algínico ou alginato de propilenoglicol como sal sódico, goma arábica, goma xantana, goma de guar ou carragenina.

Outros auxiliares de formulação que podem ser utilizados são glicerol, parafina de diferentes viscosidade, trietanolamina, colagénio, alantoína, ácido novanti-sólico.

Pode também ser necessário utilizar agentes tensoactivos, emulsionantes ou humedecedores para a formulação, tais como, por exemplo, sulfato de laurilo Na, sulfatos de éter de álcool gordo, di-Na-N-lauril- β -imino-dipropionato, óleo de rícino polietoxilado ou monooleato de sorbitano, monoestearato de sorbitano, polisorbatos (por exemplo, Tween), álcool cetílico, lecitina, monoestearato de glicerilo, estearato de polioxietileno, éter alquilfenólico de poliglicol, cloreto de cetiltrimetilamónio ou éter mono/dialquilpoliglicólico, sais de monoetanolamina do ácido ortofosfórico.

Estabilizadores, tais como montmorilonitas ou sílicas coloidais para estabilizar as emulsões ou para evitar a degradação das substâncias activas, tais como antioxidantes, por exemplo, tocoferais ou hidroxianisole butilada ou conservantes tais como ésteres p-hidroxibenzóicos, podem igualmente ser necessários, onde apropriado, para preparar as formulação desejadas.

As preparações para administração parentérica podem estar presentes em formas unitárias de dose separada, tais como, por exemplo, ampolas ou frascos. Soluções do ingrediente activo são preferencialmente utilizadas, preferencialmente soluções aquosas e especialmente soluções isotónicas, mas também suspensões. Estas formas de injeções podem ficar disponíveis como um produto final ou serem preparadas apenas imediatamente antes da utilização, misturando o composto activo, por exemplo, o liofilizado, onde apropriado, com outros veículos sólidos, com o solvente ou agente de suspensão desejado.

As preparações intranasais podem ser na forma de soluções aquosas ou oleosas ou de suspensões aquosas ou oleosas. Podem ser também na forma de liofilizados que são preparados antes da utilização com o solvente ou agente de suspensão adequado.

A preparação, engarrafamento e cerre dos produtos tem lugar em condições antimicrobianas e assépticas habituais.

Numa outra forma de realização preferida da invenção, a composição farmacêutica é seleccionada do grupo que consiste na fórmula 13 e 25 conforme definido acima.

Mais preferencialmente, a estrutura é a fórmula 16, conforme definido acima.

Numa outra forma de realização da presente invenção, a composição farmacêutica tem a fórmula 7, conforme definido acima.

De acordo com a invenção, uma composição farmacêutica é, preferencialmente, para a prevenção e/ou o tratamento da perda de osso e/ou de cartilagem induzida por inflamação e/ou imunomediada, mais preferencialmente, para a prevenção e/ou o tratamento de osteoporose, osteoporose pós-menopausa, metástases ósseas líticas, artrite, osteoartrite, artrite reumatóide, artrite crónica juvenil, artrite crónica, artrite adjuvante, doenças infecciosas, perda óssea por cancro, perda óssea por HIV, perda de dente, inflamação da medula óssea, inflamação sinovial, erosão de cartilagem/osso e/ou lesão proteoglicana.

A composição farmacêutica da presente invenção, para além de um inibidor de 11- β -HSD tipo 1 e/ou tipo 2 e um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável, pode compreender pelo menos um ingrediente activo sendo eficaz na prevenção e/ou tratamento de perda de osso e/ou de cartilagem induzida por inflamação e/ou imunomediada.

As composições farmacêuticas podem ser administradas por qualquer número de vias incluindo, mas não limitada a administração oral, sublingual, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intra-arterial, intramedular, intratecal, intraventricular, intraocular, intracerebral, intracranial, respiratória, intratraqueal, nasofaringeal, transdérmica, intradérmica, subcutânea, intrape-

ritoneal, intranasal, entérica e/ou tópica e/ou administração por via rectal, por perfusão e/ou por implante. De preferência, a referida via de administração é oral.

O termo "farmaceuticamente aceitável" significa um material não tóxico que não interfere com a eficácia da actividade biológica dos ingredientes activos. Tais preparações podem rotineiramente conter concentrações farmaceuticamente aceitáveis de sais, agentes tampões, conservantes, veículos compatíveis, agentes imunopotenciadores suplementares tais como adjuvantes e citocinas e, opcionalmente, outros agentes terapêuticos, tais como agentes quimioterapêuticos.

Quando utilizados em medicamentos, os sais devem ser farmaceuticamente aceitáveis, mas sais não farmaceuticamente aceitáveis podem ser utilizados de forma conveniente para preparar seus sais farmaceuticamente aceitáveis e não estão excluídos do âmbito da invenção.

As composições farmacêuticas podem conter agentes tampões adequados, incluindo o ácido acético na forma de um sal; o ácido cítrico na forma de um sal; o ácido bórico na forma de um sal; e o ácido fosfórico na forma de um sal.

As composições farmacêuticas, opcionalmente, também podem conter conservantes adequados, tais como cloreto de benzalcónio, clorobutanol, parabenos e tio-mersal.

As composições farmacêuticas podem, convenientemente, ser apresentadas em forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por meio de qualquer um dos métodos conhecidos na técnica de farmácia. Todos os métodos incluem o passo de pôr o agente activo em associação com um veículo que constitui um ou mais ingredientes acessórios. De um modo geral, as composições são preparadas pondo o composto activo, de forma uniforme e íntima, em associação com um veículo líquido, um veículo sólido finamente dividido ou ambos e, depois, se necessário, dar forma ao produto.

As composições adequadas para a administração oral podem ser apresentadas como unidades distintas, tais como cápsulas, comprimidos, pastilhas, cada uma contendo uma quantidade determinada do composto activo. Outros compostos incluem suspensões em líquidos aquosos ou líquidos não aquosos tais como xarope, elixir ou uma emulsão.

As composições adequadas para a administração parentérica compreendem, convenientemente, uma preparação estéril aquosa ou não aquosa que é preferencialmente isotónica com o sangue do recipiente. Esta preparação pode ser formulada de acordo com métodos conhecidos utilizando agentes de dispersão ou humedecimento adequados e agentes de suspensão. A preparação estéril injectável também pode ser uma solução ou suspensão injectável estéril num diluente ou solvente não tóxico parentericamente

aceitável, por exemplo, como uma solução em 1,3-butano diol. Entre os veículos e solventes aceitáveis que podem ser utilizados estão a água, solução de Ringer e solução de cloreto de sódio isotónica. Além disso, óleos fixos estéreis são utilizados convencionalmente como solvente ou um meio de suspensão. Para este fim, qualquer óleo fixo suave pode ser utilizado incluindo mono ou diglicéridos sintéticos. Além disso, ácidos gordos, tais como o ácido oleico, podem ser utilizados na preparação de injectáveis.

Formulações veículo adequadas para administrações oral, subcutânea, intravenosa, intramuscular, etc., podem ser encontradas em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA.

Numa forma de realização preferida da invenção, as composições farmacêuticas são administradas a um mamífero, preferencialmente um ser humano, numa dose de 5-100 mg/kg de peso corporal por dia, mais preferencialmente 7-80 mg/kg de peso corporal por dia, ainda mais preferencialmente 10-50 mg/kg de peso corporal por dia e, mais preferencialmente, 20 mg/kg de peso corporal por dia. Esta dose refere-se a uma pessoa que pesa 70 kg.

Numa outra forma de realização preferida da invenção, a composição farmacêutica é para a inibição da actividades dos osteoclastos, uma vez que o desequilíbrio entre as actividades dos osteoclastos e osteoblastos o sentido da actividade dos osteoclastos resulta em

anomalias esqueléticas caracterizados pela perda de osso e/ou de cartilagem.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Artrite induzida por adjuvante (AIA)

Uma injeção na base da cauda, com *Mycobacterium tuberculosis* morta por calor em Adjuvante de Freund resulta em artrite destrutiva em 14 dias em estirpes de ratos DA ou LEW susceptíveis de linha pura. A AIA também pode ser induzida com paredes celulares de outros tipos bacterianos em IFA, embora a artritogenicidade varie.

A síntese aumentada do factor de necrose tumoral α (TNF- α), da interleucina 1 (IL-1) e da IL-6 é detectada já no dia quatro depois da injeção de adjuvante. A doença progride rapidamente durante várias semanas no que parece ser clinicamente um processo monofásico.

Os granulócitos e as células CD4 auto-reactivas desempenham papéis importantes na doença. Os mecanismos imunológicos humorais não parecem contribuir para o processo da doença. Este modelo específico de doença em rato representa um processo sistémico que envolve não apenas as articulações mas também os tractos gastrointestinal e gènito-urinário, a pele e os olhos. Embora clínica e histologicamente a AIA tenha semelhanças com a artrite reumatóide humana.

Neste modelo animal foi demonstrado de forma impressionante que a perda óssea e parcialmente a destruição da cartilagem relacionada essencialmente depende da activação dos osteoclastos pelas células T.

Deste modo, este modelo animal serve, de forma ideal, para investigar os mecanismos e alvos que podem ser adequados para o desenvolvimento de novas terapêuticas com eficácia terapêutica melhorada. De facto, a maior parte dos tratamentos actuais para a artrite e outros estados associados à perda óssea imunomediada apenas melhora a inflamação mas não detém a perda de osso e cartilagem.

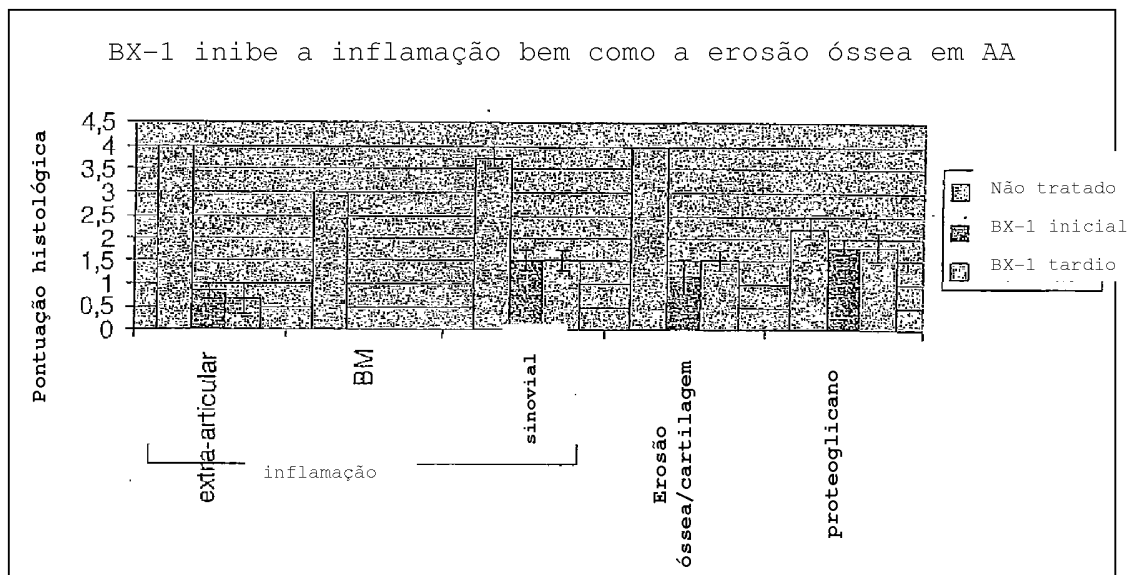
A Figura 2 apresenta o efeito do ácido 18- β -glicirretínico (BX-1) sobre a inflamação, bem como a perda óssea e de cartilagem.

BX-1 inicial: BX-1 injectado i.d. no momento da indução da doença (dia 0) e dia 2, dia 4

BX-1 tardio: BX-1 injectado i.d. aos primeiros sinais de artrite, dia 9, dia 11, dia 13

As amostras são do membro esquerdo e direito tra-seiros de três ratos por grupo de uma experiência representativa.

Os dados são apresentados como EPM (Erro Padrão da Média).



Histologia

Articulações extirpadas de rato foram manchadas com H&E. Uma pontuação histológica sinovial foi determinada sobre as secções manchadas utilizando uma escala semiquantitativa que mede a inflamação sinovial (0-4) erosões ósseas e de cartilagem (0-4), infiltração na medula (0-4) e inflamação extra-articular (0-4) (pontuação máxima, 16).

Estatística

Testes *t* de Student de duas vias não emparelhados foram utilizados para comparar os níveis Ab, níveis de citocina, pontuações de artrite clínica e pontuações de histologia utilizando StatView (SAS Institute, Cary, NC) e software de computador Mathsoft (Mathsoft, Cambridge, MA).

Resultados histológicos de secções da articulação
traseira de ratos artríticos

Lâminas de tornozelos de rato foram avaliadas histologicamente de acordo com cinco critérios (avaliação cega por DL Boyle *et al.*, Universidade da Califórnia em San Diego (*J. Immunol.*, Janeiro 2002; 168:51-56)):

1. Inflamação extra-articular
2. Inflamação da medula óssea (BM)
3. Inflamação sinovial
4. Erosão de cartilagem/osso
5. Lesão proteoglicana

A completa ausência de infiltração da medula óssea não foi observada com nenhum tratamento a curto prazo e/ou tratamento descontinuado com um fármaco de molécula pequena anteriormente.

Os dados indicam ainda que o BX-1 (ácido 18- β -glicirretínico) influencia, de forma positiva, todos os ramos da patologia da artrite; a activação das células T e células dendríticas, a inflamação sistémica e a infiltração da medula óssea. Efeitos similares foram observados com o hemissucinato de BX-1, a carbenoxolona (não ilustrado).

As constatações histológicas podem explicar porque os animais entram em remissão depois do tratamento

tardio, isto é, depois do aparecimento da doença e porque não há absolutamente nenhum sinal de reexacerbação da doença depois da cessação do tratamento em que qualquer modelo que investigamos até agora; isto é, a artrite adjuvante e a artrite induzida por pristano.

Como um todo, estes dados sugerem que o BX-1 pode ser um fármaco ideal para reduzir a destruição óssea induzida por inflamação e/ou imune conforme observado não apenas em artrite reumatóide, mas também doenças periodontais e outros estados inflamatórios. De facto, a patologia das doenças periodontais e outras patologias que resultam na destruição óssea parece seguir uma via similar como esta actualmente aceite para a destruição óssea em artrite reumatóide (*Annu. Rev. Immunol.*, Janeiro de 2002; 20: 795-823), que abre novas oportunidades *ad hoc* para o BX-1 e fármacos relacionados. Uma vez que o BX-1 é um inibidor estabelecido da 11- β -HSD tipo 1 e tipo 2, as enzimas que bloqueiam estas com inibidores parecem ser uma via muito promissora para curar as doenças associadas à inflamação e/ou a perda óssea imunomediada.

Exemplo 2

Materiais

Os reagentes de cultura celular foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA) [1,2,6,7-³H]-cortisona da American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO) e [1,2,6,7-³H]-cortisol da Amersham Biosciences (General

Electrics Healthcare, Piscataway, NJ). As placas de cromatografia de camada fina (TLC) (SIL G-25 UV254) foram adquiridas da Macherey-Nagel, Oensingen, Suíça.

Ensaio para detecção da actividade de 11 β -HSD

O ensaio de rastreio utilizado para determinar a inibição da actividade da enzima 11 β -HSD tem por base a conversão de cortisona ou cortisol radiomarcados em lisados celulares de células HEK-293, tranfectadas de forma estável com 11 β -HSD-1 humana ou 11 β -HSD-2 humana (Schweizer *et al.*, 2003, Frick *et al.*, 2004). As células foram desenvolvidas em placas de 10 cm por 80% de confluência e incubadas durante 16 horas em meio livre de esteróide (soro bovino fetal (FCS) tratado com carvão da HyClone, Logan, Utah). As células foram enxaguadas uma vez com soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS), separadas e centrifugadas durante 3 minutos a 150 x g. O sobrenadante foi removido e o grânulo de células foi rapidamente congelado num banho de etanol de gelo seco. No dia da experiência, os grânulos de células foram suspensos em tampão TS2 (NaCl 100 mM, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 1 mM, sacarose 250 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,4), sonificado e as actividades determinadas imediatamente. A taxa de conversão de cortisol em cortisona ou a reacção inversa foi determinada em placas de reacção de PCR óptico de 96 poços (Applied Biosystems, Foster City, CA) num volume final de 22 μ L e os tubos foram tampados durante a reacção para evitar evaporação.

Determinação da actividade de oxidase:

As reacções foram iniciadas adicionando simultaneamente 10 µL de lisado celular e 12 µL de tampão TS2 contendo a concentração apropriada do composto inibidor a ser testado, NAD⁺, 30 nCi de [1,2,6,7-³H]-cortisol e cortisol não marcado. Foi utilizada uma concentração final de 400 µM de NAD⁺ e 25 nM de cortisol. As soluções mãe dos inibidores em metanol ou DMSO foram diluídas em tampão TS2 para dar as concentrações apropriadas, de modo que a concentração de metanol ou DMSO nas reacções foram mantidas inferiores a 0,1%. Foram realizadas reacções de controlo com ou sem 0,1% do solvente. A incubação foi a 37 °C durante 10 minutos com agitação, as reacções foram terminadas pela adição de 10 µL de solução de interrupção contendo 2 mM de cortisol não marcado e cortisona dissolvida em metanol. A conversão do cortisol radiomarcado foi determinada pela separação do cortisol e cortisona utilizando TLC e um sistema de solvente de 9:1 (v/v) de clorofórmio:metanol, seguido por contagem por cintilação. Na ausência de inibidores, aproximadamente 30% de cortisol foi convertido em cortisona.

Determinação da actividade de redutase:

As reacções foram iniciadas simultaneamente pela adição de 10 µL de lisado celular e 12 µL de tampão TS2 contendo a concentração apropriada do composto inibidor a ser testado, NADPH, 30 nCi de [1,2,6,7-³H]-cortisona e cortisona não marcada, de modo que as concentrações finais

eram de 400 μ M de NADPH e 100 nM de cortisona. As actividades foram determinadas imediatamente depois da ruptura celular medindo a conversão da cortisona radiomarcada em cortisol durante 10 minutos.

A cinética enzimática foi analisada por regressão não linear utilizando Data Analysis Toolbox (MDL Information Systems Inc.) adoptando taxa de cinética de primeira ordem. Os dados representam a média \pm DP de quatro a cinco experiências independentes.

Referências

Schweizer, R. A. Atanasov, A. G., Frey, B. M., e Odermatt, A. (2003) *Mol Cell Endocrinol* **212**, 41-49.

Christoph Frick, Atanas G. Atanasov, Peter Arnold, Juris Ozols e Alex Odermatt (2004) *J Biol Chem*, **279**, 131-138.

Exemplo 3

A inibição da 11 β -HSD1 foi determinada em 100 nM de cortisona, a inibição da 11 β -HSD2 em 25 nM de cortisol como substratos (em aproximadamente 30% de concentrações K_m aparentes).

O ensaio com 20 μ M do composto correspondente na mistura de reacção, adicionado simultaneamente com o substrato:

11 β -HSD1	% de controlo de 11 β -HSD1	% de controlo de 11 β -HSD2
controlo	99,9999986	100
10 μ M de CBX	4,43030125	15,52151455
BNW1	102,112595	96,77455646
BNW2	78,8440316	77,95067459
BNW3	60,2536577	53,56660046
BNW4	82,2425505	95,04764105
BNW5	69,7522595	97,47129918
BNW6	79,6439869	145,0319346
BNW7	9,59257261*	139,5062669
BNW8	41,7056688	102,7042587
BNW9	30,6544131	77,43471825
BNW10	64,325535	128,6701314
BNW11	70,0994104	120,918247
BNW12	85,3624514	132,1217751
BNW13	3,87940281*	14,37405632*
BNW14	20,1589034*	25,52077188*
BNW15	50,3669741	56,94887208
BNW16	2,70799056*	27,37171929
BNW17	88,2225144	120,1411745
BNW18	92,0338994	82,80931996
BNW19	51,0824709	73,62927124
BNW20	46,8261929	120,655235
BNW21	48,9418364	121,5916615
BNW22	41,3182359	104,3264654
BNW23	85,0676295	132,6608
BNW24	3,93928545*	13,34505396*
BNW25	2,88437681*	13,92786069*
BNW26	94,0659079	136,7564992
BNW27	78,6422701	126,3527217
BNW28	76,7298316	136,975487
BNW29	75,2887485	115,4231371
BNW30	48,3569192	139,9742227

Exemplo 4

Determinação dos valores IC₅₀ utilizando 7 concentrações diferentes de inibidores em intervalos de 2 factores:

11 β -HSD1		Todos os valores em μ M					
		BNW7	BNW13	BNW14	BNW16	BNW24	BNW25
IC 50	1	1,95e+0	6,66e-1	2,75e+0	1,49e-1	7,33e-1	1,47e-1
	2	1,91e+0	7,56e-1	3,09e+0	1,68e-1	9,05e-1	2,06e-1
	3	2,24e+0	6,52e-1	2,58e+0	1,14e-1	7,74e-1	1,61e-1
	Valor médio	2,03e+0	6,91e-1	2,81e+0	1,44e-1	8,04e-1	1,72e-1
	Desvio padrão	0,178522195	0,05642599	0,25800854	0,02724464	0,08980411	0,033079395
11 β -HSD2							
IC 50	1	Não inibiu	Fora da gama	Fora da gama	Fora da gama	Fora da gama	Fora da gama
	2	Não inibiu	2,63e-1	2,01e+0	4,04e+0	1,69e-1	5,46e-2
	3	Não inibiu	2,99e-1	2,69e+0	3,87e+0	2,34e-1	6,49e-2
	Valor médio	n.d.	2,81e-1	2,35e+0	3,95e+0	2,02e-1	5,97e-2
	Desvio padrão	n.d.	0,02520514	0,48148793	0,11686909	0,04659304	0,00731635

Lisboa, 9 de Fevereiro de 2009

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um inibidor de 11- β -HSD tipo 1 e tipo 2 ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, para a preparação de um agente farmacêutico para a prevenção e/ou o tratamento de perda óssea e/ou cartilagem induzida por inflamação e/ou imunomediada, em que a referida utilização é para a prevenção e/ou tratamento de metástases ósseas líticas, artrite, artrite crónica juvenil e/ou artrite adjuvante, doenças infecciosos, perda óssea por HIV, perda de dente, inflamação da medula óssea e/ou inflamação sinovial.

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1 para a prevenção e/ou tratamento da perda de osso e/ou de cartilagem induzida por inflamação e/ou imunomediada num mamífero.

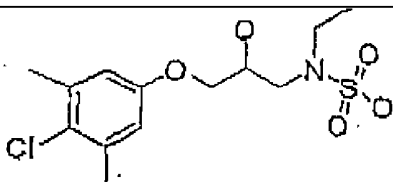
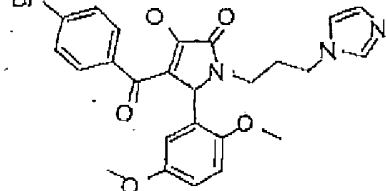
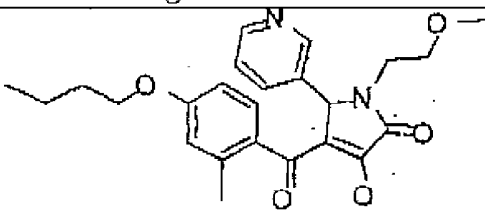
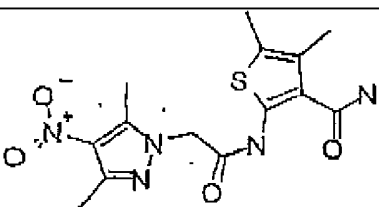
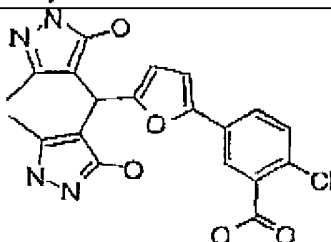
3. Utilização de acordo com a reivindicação 2, em que o mamífero é um ser humano.

4. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a referida utilização é para a prevenção e/ou tratamento de periodontite e/ou artrite seleccionada do grupo que consiste em osteoartrite e/ou artrite reumatóide.

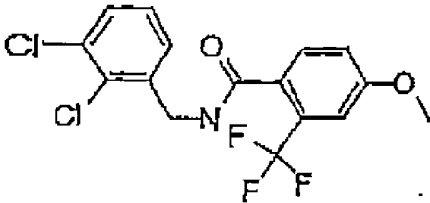
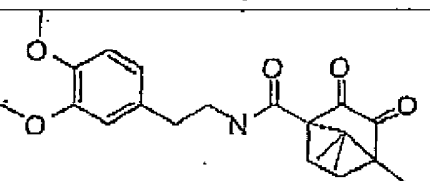
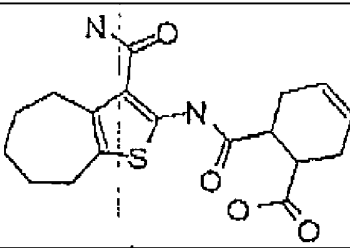
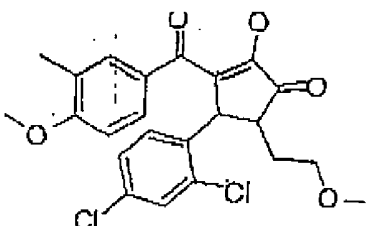
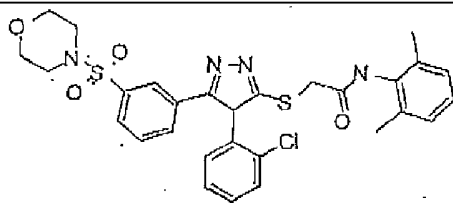
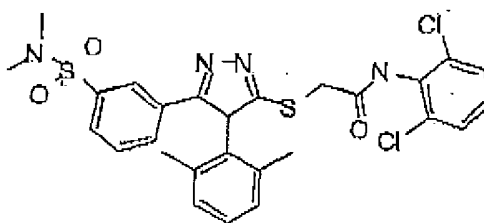
5. Utilização de acordo com qualquer das

reivindicações 1 a 4, em que o inibidor de 11- β -HSD tipo 1 e tipo 2 é o ácido 18- β -glicirretínico ou um seu derivado, tal como a glicirrizina ou a carbenoxolona.

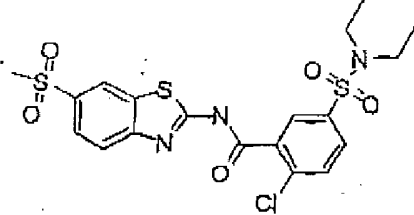
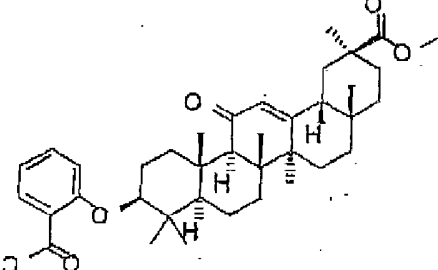
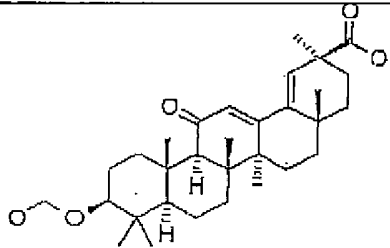
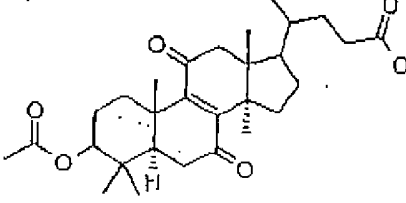
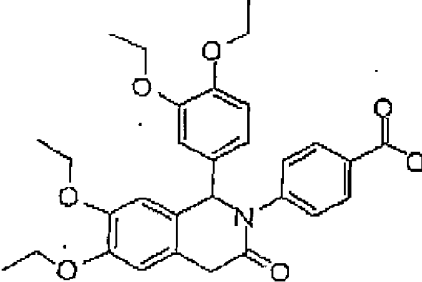
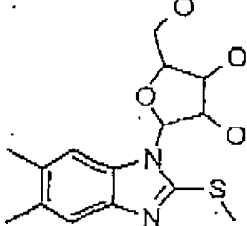
6. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, em que o inibidor de 11- β -HSD tipo 1 e tipo 2 é seleccionado do grupo que consiste nas seguintes fórmulas:

Nome do Composto	Estrutura
Fórmula 1	
Fórmula 2	
Fórmula 3	
Fórmula 4	
Fórmula 5	

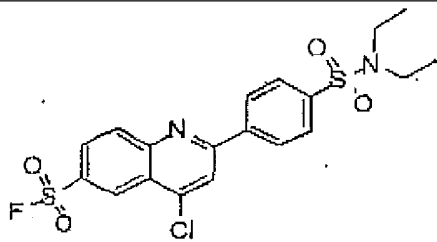
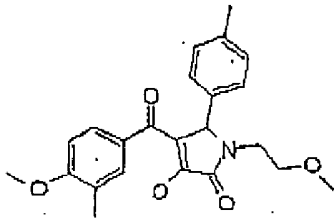
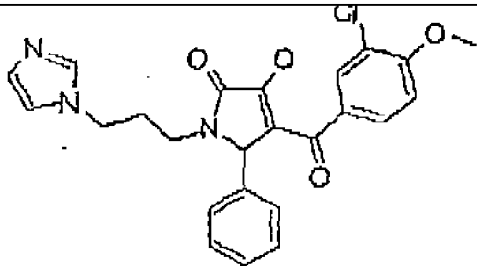
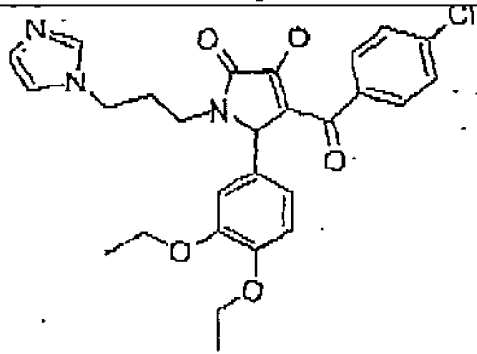
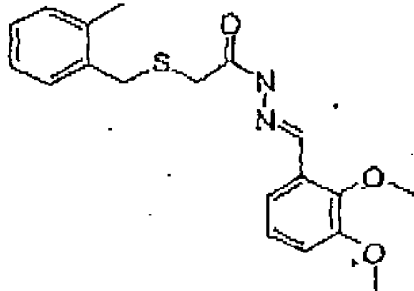
(continuação)

Nome do Composto	Estrutura
Fórmula 6	
Fórmula 7	
Fórmula 8	
Fórmula 9	
Fórmula 10	
Fórmula 11	

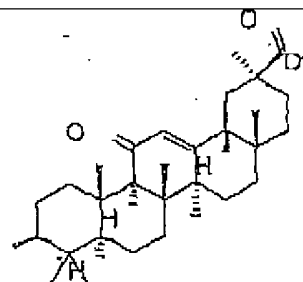
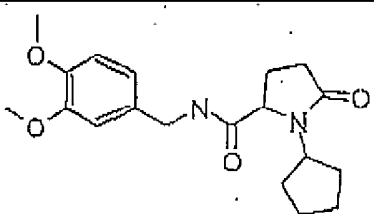
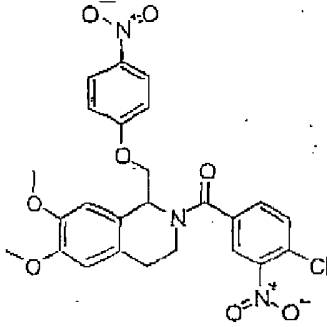
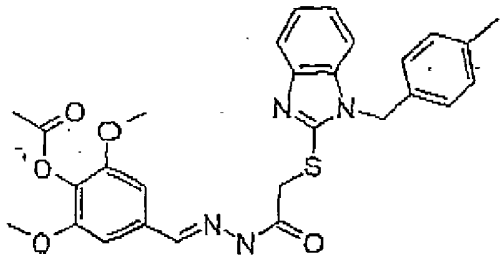
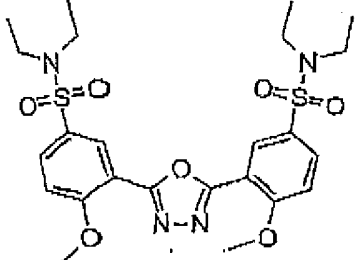
(continuação)

Nome do Composto	Estrutura
Fórmula 12	
Fórmula 13	
Fórmula 15	
Fórmula 16	
Fórmula 17	
Fórmula 18	

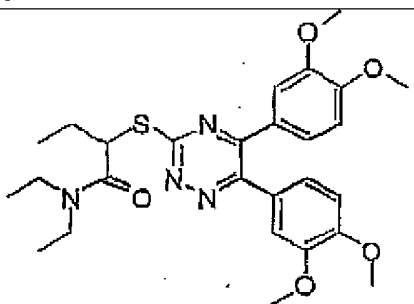
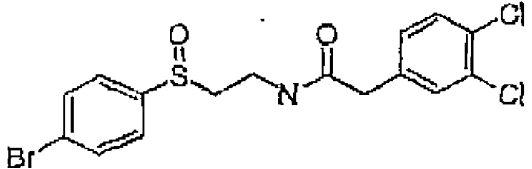
(continuação)

Nome do Composto	Estrutura
Fórmula 19	
Fórmula 20	
Fórmula 21	
Fórmula 22	
Fórmula 23	

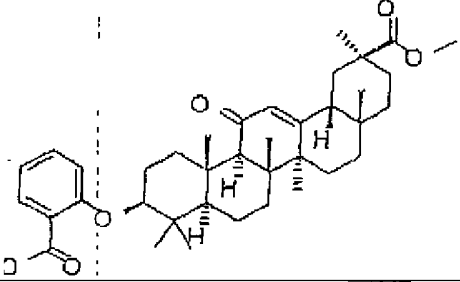
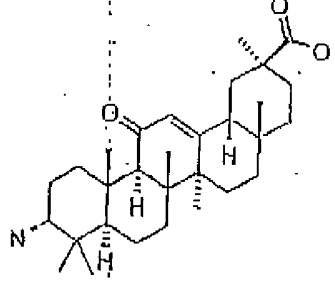
(continuação)

Nome do Composto	Estrutura
Fórmula 25	
Fórmula 26	
Fórmula 27	
Fórmula 28	
Fórmula 29	

(continuação)

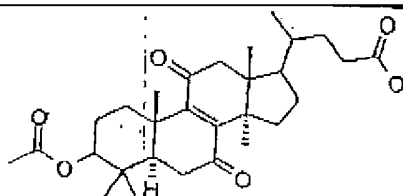
Nome do Composto	Estrutura
Fórmula 30	
Fórmula 31	

7. Utilização de acordo com a reivindicação 6, em que o inibidor de 11- β -HSD tipo 1 e tipo 2 é selecionado do grupo que consiste nas seguintes fórmulas:

Fórmula 13	
Fórmula 25	

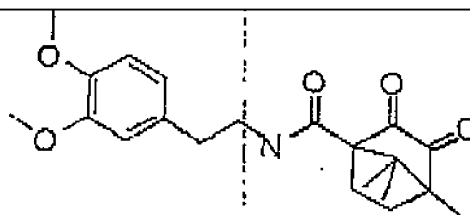
8. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o inibidor de 11- β -HSD tipo 1 e tipo 2 é:

Fórmula 16



9. Utilização de acordo com a reivindicação 6, em que o inibidor de 11- β -HSD tipo 1 e tipo 2 é:

Fórmula 7



10. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 9, em que o agente farmacêutico compreende pelo menos um inibidor de 11- β -HSD tipo 1 e tipo 2 em associação com pelo menos um ingrediente activo sendo eficaz na prevenção e/ou tratamento da perda de osso e/ou de cartilagem induzida por inflamação e/ou imunomediada.

11. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 10, em que o agente farmacêutico é administrado numa dose de 5 a 100 mg/kg de peso corporal por dia.

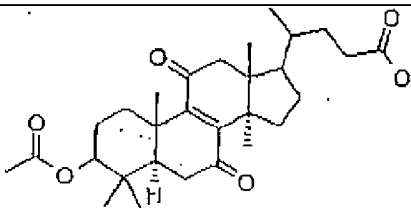
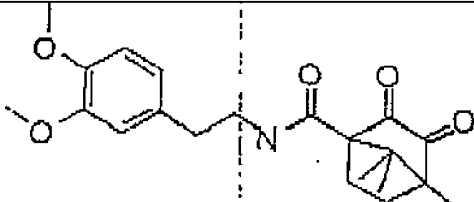
12. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 11, em que o agente farmacêutico é administrado por via oral, sublingual, intravenosa, intramus-

cular, intra-articular, intra-arterial, intramedular, intratecal, intraventricular, intraocular, intracerebral, intracranial, respiratória, intratraqueal, nasofaringeal, transdérmica, intradérmica, subcutânea, intraperitoneal, intranasal, entérica, por via rectal, por perfusão e/ou por implante.

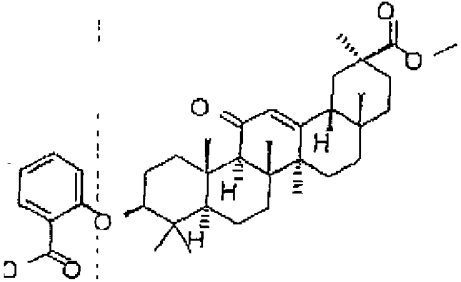
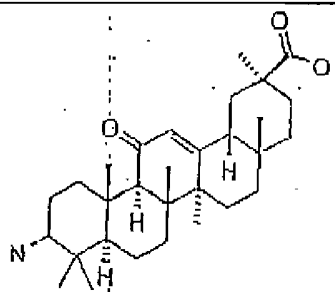
13. Utilização de acordo com a reivindicação 12, em que o agente farmacêutico é administrado por via oral.

14. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, em que o inibidor de 11- β -HSD tipo 1 e tipo 2 é a 11- α -OH-progesterona ou a 11- β -OH-progesterona.

15. Composição farmacêutica compreendendo como ingrediente activo um inibidor de 11- β -HSD tipo 1 e tipo 2 ou um seu sal, em que o referido inibidor de 11- β -HSD tipo 1 e tipo 2 é seleccionado do grupo que consiste nas seguintes fórmulas 16, 7, 13 e 25:

Fórmula 16	
Fórmula 7	

(continuação)

Fórmula 13	
Fórmula 25	

16. Utilização do ácido 18- β -glicirretínico para a prevenção e/ou tratamento de perda de osso e/ou cartilagem induzida por inflamação e/ou imunomediada em periodontite.

17. Utilização do ácido 18- β -glicirretínico para a prevenção e/ou tratamento de perda de osso e/ou cartilagem induzida por inflamação e/ou imunomediada em artrite reumatóide.

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

- DE 2050072 A
- JP 7291857 A
- WO 02076435 A
- US 3934027 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- COOPER et al. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2001, vol. 16 (6), 1037-1044
- *J. Immunol.*, January 2002, vol. 168, 51-56
- *Annu. Rev. Immunol.*, January 2002, vol. 20, 795-823
- SCHWEIZER, R.A. ; ATANASOV, A. G. ; FREY, B. M. ; ODERMATT, A. *Mol Cell Endocrinol*, 2003, vol. 212, 41-49
- CHRISTOPH FRICK ; ATANAS G. ATANASOV ; PETER ARNOLD ; JURIS OZOLS ; ALEX ODERMATT. *J Biol Chem*, 2004, vol. 279, 131-138