



(I O) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 90248 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)
A61K031/40 A

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1989.04.11	(73) <i>Titular(es):</i> PFIZER INC. 235 EAST 42ND STREET NEW YORK, N.Y. 10017 US
(30) <i>Prioridade:</i> 1988.04.13 US 181131	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1989.11.10	(72) <i>Inventor(es):</i> IVAN GEORGE OTTERNESS US
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 05/94 1994.05.26	(74) <i>Mandatário(s):</i> JORGE BARBOSA PEREIRA DA CRUZ RUA DE VÍTOR CORDON 10-A 3/AND. 1200 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* MÉTODO PARA A INIBIÇÃO DA INTERLEUCINA-1 NUM MAMÍFERO

(57) *Resumo:*

[Fig.]



Modalidade e n.º (11)	T D	Data do pedido: (22)	Classificação Internacional (51)
Requerente (71): PFIZER INC., norte-americana, industrial, com sede em 235 East 42nd Street, New York, N.Y., Estados Unidos da América do Norte			
Inventores (72): IVAN GEORGE OTTERNESS, residente nos Estados Unidos da América do Norte			
Reivindicação de prioridade(s) (30)			Figura (para interpretação do resumo)
Data do pedido	País de Origem	N.º de pedido	
13.04.88	E.U.A.	181,131	
Epigrafe: (54) "MÉTODO PARA A INIBIÇÃO DA BIOSÍNTESE DA INTERLEUCINA-1 NUM MAMÍFERO"			
Resumo: (máx. 150 palavras) (57) O presente invento diz respeito à utilização de certas 2-oxindole-1-carboxamidas 3-substituídas de fórmula			
e dos seus sais de adição de bases farmacologicamente aceitáveis em que X é H, Cl ou F; Y é H ou Cl; e R é benzilo ou tienilo; para inibir a biossíntese da interleucina-1, num mamífero. Este invento também diz respeito à utilização de tais compostos para o tratamento de perturbações e disfunções induzidas por interleucina-1 tal como			

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBREADAS



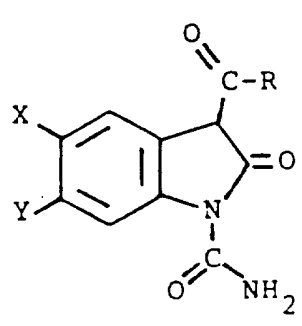
Modalidade e n.º (11)	T D	Data do pedido (22)	Classificação Internacional (51)
<p data-bbox="188 389 533 421">Resumo (continuação) (57)</p> <p data-bbox="201 439 1487 501">perturbações do metabolismo dos ossos e do tecido conjuntivo e a disfunção da imunidade num mamífero.</p> <p data-bbox="201 533 1487 658">Os métodos deste invento compreendem a administração de uma quantidade inibidora (nomeadamente de 1mg a 200mg por dia) da biossíntese da interleucina-1 dos compostos e sais deste invento, a esse mamífero.</p>			

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBREADAS

[Handwritten signature]

Este invento diz respeito ao uso de certos 3-substituído-2-oxindole-1-carboxamidas e os seus sais base farmacêuticamente aceitáveis para inibirem a biossíntese de interleucina-1 num mamífero. Este invento também diz respeito ao uso de tais compostos para o tratamento de perturbações e disfunções mediadas por interleucina-1 tal como perturbações dos ossos e do metabolismo conjuntivo do tecido e disfunção imune num mamífero. Os métodos deste invento compreendem a administração de uma quantidade efectiva dos compostos e sais deste invento a tal mamífero.

Certos 3-substituídos-2-oxindole-1-carboxamidas de fórmula



e os seus sais base farmacêuticamente aceitáveis em que, inter alia, X é H, Cl ou F; Y é H ou Cl; e R é benzilo ou tienilo são divulgados e reivindicados na U.S. 4556672 a qual é atribuída ao mesmo síndico. Aquela patente divulga que aqueles compostos, além de serem úteis como agentes anti-inflamatórios e analgésicos, são inibidores de ambas as enzimas ciclooxigenase (CO) e lipoxigenase (LO). Os seus ensinamentos são aqui incorporados para referência.

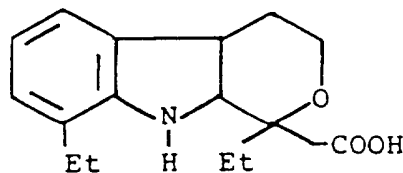
A interleucina-1 (IL-1) tem sido assinalada como estimulando a reabsorção dos ossos ambos in vitro e in vivo. Hayward, M. e Friedler-Nagy, Ch., Agents and Actions, 22, 251-254 (1987). é também aí assinalado que IL-1, inter alia, inclui a

BAD ORIGINAL

produção de prostaglandin E_2 (PGE_2). PGE_2 é um estimulador de reabsorção dos ossos e tem sido implicada em perda dos ossos. Hayward, M. A. e Caggiano, T. J., Annual Reports in Medicinal Chemistry, 22, Sect. IV, Capítulo 17, 172-177 (1987). Osteoporose é definida como uma perda debilitória de osso mineral a qual provoca velocidades de fractura superiores. Ver Hayward, M. A. e Caggiano, T. J., supra, e referencias ai citadas.

A Interleucin-1 foi referida como estando envolvida na patogenese de muitas doenças. Ver Dinarello, C. A., J. Clin. Immunol., 5, 287-297 (1985), cujos ensinamentos são aqui incorporados para referencia. Ainda mais, níveis elevados de material análogo a IL-1 foi observado estarem associados com a psorriase. Camp, R.D., J. Immunol., 137, 3469-3474 (1986).

O agente anti-inflamatório não esteroidal, etodolac, ácido 1,8-dietil-1,3,4,9,-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-acético, foi divulgado na U.S. 4677132 para baixar PGE_2 e reduzir a reabsorção do osso. Etodolac tem a fórmula



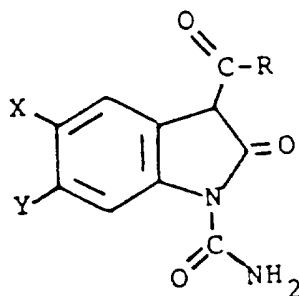
Foi assinalado que os níveis terapeuticos de agentes anti-inflamatórios não esteroidais tal como indometacina e ibuprofen não reduzem a produção de IL-1. Analogamente, a ciclosporina A não tem tal efeito. Corticosteroides, no entanto são eficazes em reduzir a produção de IL-1. Dinarello, C.A., supra. Certos inibidores lipoxigenase tal como ácido 5,8,11,14-trifluorometilfenil-2-pirazolina (BW755C) foi observado diminuir a

- 5 -

produção in vitro de leucócito pirogen (IL-1 putativo) a partir de monócitos humanos. Dinarello, C.A., et al., ibid., 43-50 (1984).

No entanto, até este invento, nunca foi assinalado o uso ou intenção de usar os compostos ou sais deste invento para inibir a biossíntese independente IL-1 de inibição de lipoxigenase e para tratar as perturbações e disfunções mediadas por IL-1 tal como certas perturbações do metabolismo do tecido conjuntivo e do osso e certas disfunções imunes com tais compostos, nem qualquer apreciação do seu papel em tais tratamentos.

Foi observado que certas 3-substituído-2-oxindole-1-carboxamidas de fórmula



e os seus sais base farmacêuticamente aceitáveis em que X é H, Cl ou F; Y é H ou Cl; e R é benzilo ou tienilo inibem a biossíntese de IL-1, independente da sua actividade inibidora da lipoxigenase, e assim são úteis no tratamento de perturbações e disfunções mediadas por IL-1 tal como certas perturbações do metabolismo do tecido do osso e conjuntivo e disfunções do sistema autoimune em mamíferos. Tais perturbações do metabolismo dos ossos incluem, mas não estão limitadas a osteoporose. A título de exemplo e não de limitação, tais perturbações do metabolismo do tecido conjuntivo incluem doença periodontal e cicatrização do tecido.

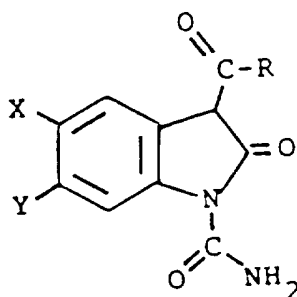
BAD ORIGINAL

[Handwritten signature]

Exemplos adicionais, de disfunções imunes mediadas por IL-1 incluem, mas não estão limitadas a, alergia e psoríase.

Os métodos de uso de compostos e seus sais base farmacologicamente aceitáveis compreendem a administração a um mamífero de uma quantidade efectiva de tais compostos. A administração pode compreender qualquer método conhecido para fornecer terapêuticamente um composto a um mamífero tal como administração oral ou parenteral como abaixo definido.

Os compostos deste invento que tem fórmula



e os seus sais base farmacologicamente aceitáveis em que X é H, Cl ou F; Y é H ou Cl; e R é benzilo ou tienilo e a sua preparação são divulgadas na U.S. 4556672, cujos ensinamentos são aqui incorporados para referência. Este invento diz respeito a novos usos para tais compostos os quais compreendem métodos para a inibição da biossíntese de interleucina-1 (IL-1) num mamífero independente da inibição de lipoxigenase. Também dentro do âmbito deste invento estão os métodos de tratamento de perturbações e disfunções mediadas por interleucina-1 tal como perturbações do metabolismo do tecido conjuntivo e do osso e disfunção imune.

BAD ORIGINAL

- 7 -

Dos métodos acima descritos, os preferidos são aqueles onde o composto empregado é da fórmula acima em que X é Cl, Y é H e R é tienilo; aqueles em que no referido composto X é F, Y é Cl e R é tienilo; aqueles em que no referido composto X é F, Y é Cl e R é 2-tienilo; e aqueles em que no referido composto X é H, Y é Cl e R é benzilo. Particularmente preferidos são os métodos em que no referido composto X é Cl, Y é H e R é 2-tienilo.

Como divulgado na U.S. 4556672, os compostos deste invento acima descrito são acidicos e formam sais base. Todos estes sais base estão dentro do ambito deste invento e podem ser produzidos como ensinado por aquela patente. Tais sais apropriados, dentro do ambito deste invento, incluem ambos os tipos organico e inorganico e incluem, mas não estão limitados a, os sais formados com amônia, aminas organicas, hidróxidos de metal alcalino, carbonatos de metal alcalino, bicarbonatos de metal alcalino, hidretos de metal alcalino, alcóxidos de metal alcalino, hidróxidos de metal alcalino terroso, carbonatos de metal alcalino terroso, hidretos de metal alcalino terroso e alcóxidos de metal alcalino terroso. Exemplos representativos de bases que formam tais sais base incluem amônia, aminas primárias, tal como n-propilamina, n-butilamina, anilina, ciclohexilamina, benzilamina, p-toluidina, etanolamina e glucamina; aminas secundárias, tal como dietilamina, dietanolamina, N-metilglucamina, N-metilaniлина, morfina, pirrolidina e piperidina; aminas terciárias, tal como trietilamina, trietanolamina, N,N-dimetilanilina, N-etilpiperidina e N-metilmorfina; hidróxidos, tal como hidróxido de sódio; alcóxidos tal como etóxido de sódio e metóxido de potássio; hidretos tal como hidreto de cálcio e hidreto de sódio; e carbonatos tal como carbonato de potássio e carbonato de sódio. Sais preferidos são os de sódio, potássio, amônio, etanolamina, dietanolamina e trietanolamina. Particularmente preferidos são os sais de sódio.

BAD ORIGINAL

Também dentro do âmbito deste invento estão os solvatos tal como os monohidratos e os semihidratos dos compostos acima descritos.

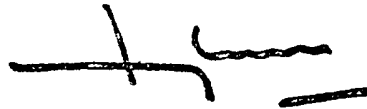
Interleucina-1 é conhecida pelos especialistas da arte como existindo em pelo menos duas formas que são referidas como as formas α e β . Dinarello, C.A., FASEB J., 2, 108-115 (1988). Como usado ao longo desta especificação e reivindicações em anexo, o termo interleucina-1 (IL-1) a todas tais formas de IL-1 incluindo IL-1 α , IL-1 β e IL-1 α e IL-1 β colectivamente.

Os métodos deste invento compreendem a administração dos compostos do invento e seus sais base farmacologicamente aceitáveis a um mamífero. Tais compostos e seus sais podem ser administrados ao referido mamífero ou só, ou preferivelmente, em combinação com suportes ou diluentes farmacologicamente aceitáveis numa composição farmacológica, de acordo com a prática farmacológica padrão. Tal administração pode ser oral ou parenteral. A administração parenteral como aqui usada inclui, mas não é limitada a, administração intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutânea, transdérmica incluindo tópica, mas não limitada a lavagem oral. No entanto, prefere-se geralmente administrar tais compostos e seus sais oralmente.

Em geral, estes compostos e seus sais são mais desejavelmente administrados em doses que variam de cerca de 40 mg a cerca de 200 mg por dia para administração oral e de cerca de 1 mg a cerca de 200 mg por dia para administração parenteral, embora ainda ocorram necessariamente variações dependendo do peso do indivíduo a ser tratado. A dose apropriada para inibição de biossíntese IL-1 num mamífero e para o tratamento de perturbação do metabolismo do osso mediada por IL-1, perturbação do

metabolismo do tecido conjuntivo mediada por IL-1 ou disfunção imune mediada por IL-1 com os compostos esseus saís deste invento será prontamente determinada pelos especialistas na arte de prescrição de prescrição e/ou administração de tais compostos. No entanto, deverá apreciar-se que outras variações podem ocorrer a este respeito, dependendo das espécies de mamíferos a serem tratados e a sua resposta individual ao referido medicamento, bem como do tipo particular de formulação farmaceutica escolhida e do periodo e intervalo de tempo em que tal administração é efectuada. Nalguns casos, niveis de dosagem menores que o limite inferior da gama acima mencionada pode ser mais do que adequada, enquanto noutros casos podem empregar-se doses ainda maiores sem causar a ocorrencia de efeitos secundários prejudiciais ou perniciosos, desde que tais niveis de dosagem superiores sejam primeiro divididas em várias doses mais pequenas que são admnistradas ao longo do dia.

Para fins de administração oral, pastilhas contendo excipientes tal como citrato de sódio, carbonato de cálcio e fosfato dicálcico podem ser empregadas juntamente com vários desintegrantes tal como amido e preferivelmente amido de batata ou tapioca, ácido alginico e certos silicatos complexos, em conjunto com agentes ligantes tal como polivinilpirrolidona, sacarose, gelatina e acácia. Adicionalmente, agentes lubrificantes tal como, mas não limitados a, estearato de magnésio, lauril sulfato de sódio e talco são muitas vezes muito úteis para formação de pastilhas. As composições sólidas de um tipo análogo podem também ser usadas como agentes de enchimento em cápsulas de gelatina elástica mole e dura; os materiais preferidos a este respeito também incluem, a titulo de exemplo e não de limitação, lactose ou açúcar do leite bem como polietileno glicóis de alto peso molecular. Quando desejamos suspensões aquosas e/ou elixires para administração oral, o ingrediente activo essencial pode



- 10 -

combinar-se com vários agentes de adoçamento ou aromáticos, matéria corante ou corantes e, se o desejarmos, agentes emulsionantes e/ou de suspensão, em conjunto com diluentes tal como água, etanol, propileno glicol, glicerina e várias combinações análogas.

Embora o modo de administração preferido dos compostos deste invento ou seus sais base farmacêuticamente aceitáveis seja oral, eles podem também ser administrados parenteralmente.

Para fins de administração parenteral, soluções destas compostos particulares em óleo de sezamo ou de amendoim ou em propileno glicol aquoso podem ser empregadas, bem como soluções aquosas estéreis dos sais base correspondentes solúveis em água previamente enumerados. Tais soluções aquosas serão apropriadamente tamponadas se necessário, e o diluente líquido tornado isotônico com solução salina ou glicose suficiente. Estas soluções aquosas particulares são especialmente apropriadas para fins de injeção intravenosa, intramuscular e subcutânea. A este respeito os meios aquosos estéreis empregados são prontamente obtidos por técnicas padrão bem conhecidas dos especialistas na arte. Por exemplo, água destilada é normalmente usada como o líquido diluente e a preparação final é passada através de um filtro bacteriano apropriado tal como um filtro de vidro sintetizado ou um filtro de terra de diatomáceas ou de porcelana não vidrada. Filtros preferidos deste tipo incluem o filtro Berkefeld, o Chamberland e o Asbestos Disk-Metal Seitz, em que o fluido é aspirado para um contentor estéril com a ajuda de uma bomba de aspiração. É desnecessário dizer que, as etapas necessárias devem ser realizadas ao longo da preparação destas soluções injectáveis para assegurar que os produtos finais são obtidos numa condição estéril. Para fins de administração transdermal, a forma de dosagem do composto particular pode incluir, a título de

BAD ORIGINAL

exemplo, soluções, loções, untimentos, cremes, gels, supositórios, formulações com velocidade de libertação limite sustida e meios para esse fim. Tais formas de dosagem compreendem o composto particular e podem incluir etanol, água, melhorador de penetração e suportes inertes tal como materiais de produção de gel, óleo mineral, agentes emulsionantes, álcool benzílico e análogos. Composições específicas melhoradoras do fluxo transdermal são divulgadas na Aplicação da Patente U.S. pendente Série No.925541, arquivada em 31 de Outubro, 1986, a qual é atribuída ao síndico deste invento, os ensinamentos da qual são aqui incorporados para referencia. Com a finalidade de administração tópica, a forma de dosagem do composto particular pode incluir, a título de exemplo e não de limitação, soluções, loções, untimentos, cremes e geles.

A capacidade dos compostos deste invento para inibir a biossíntese de interleucina-1 é demonstrada pelos processos de ensaio a seguir descritos.

Ratos C3H/HeN (Charles River, Wilmington, Massachusetts) são sacrificados por deslocamento cervical e os seus abdomens atomizados com 70% de etanol para evitar a contaminação bacteriana da preparação celular subsequente. No peritoneu de cada rato injectamos 8 ml de RPMI¹ contendo 5% de FCS², penicilina-estreptomicina (100 unidades/ml - 100 µg/ml) e glutamina (2mM). O peritoneu é batido para ajudar a libertar as células. A seguir faz-se uma incisão através da pele do abdomen para expor a camada por baixo do musculo. O fluido peritoneal é removido com uma agulha de grau 20 por inserção da agulha, chanfrando, através da camada exposta de musculo logo por baixo do externo. O fluido peritoneal de seis ratos é misturado num

¹ Meio RPMI-1640 (Hazelton Research Products, Inc., Lenexa, Kansas)

² Soro de feto de vitela o qual foi triado para a boa resposta a IL-1 no ensaio timócito (Hyclone Laboratories, Logan, Utah) e para proliferação espontanea baixa na ausencia de IL-1.

tubo cônico de plástico e microscopicamente examinado para contaminação bacteriana. O fluido não contaminado é centrifugado a cerca de 600xg durante seis minutos e a parte sobrenadante decantada. As células peletizadas de cinco a seis tubos juntam-se e voltam-se a suspender num total de 20 ml de RPMI-FCS³. O numero de células é a seguir determinado usando um medidor hemacyto e a viabilidade celular determinada com corante Trypan Blue usando também um medidor hemacyto. As células são a seguir diluidas a 3×10^5 células/ml usando RPMI-FCS. Aos buracos de um prato com buracos de 35 mm juntamos 1 ml da suspensão celular anterior. As células são incubadas durante duas horas a 37 °C numa atmosfera de 5% CO₂ para causar aderencia dos macrofagos às paredes dos buracos. A parte sobrenadante é removida por turbilhão vigoroso dos buracos e decantação. As células aderentes (i.e., macrofagos) são lavadas duas vezes com RPMI-SF⁴. Aos buracos contendo células aderentes juntamos 1 ml do composto em estudo a concentrações que variam de 0,1 a 100 µg/ml em RPMI-SF ou 1 ml de RPMI-SF como control. A seguir, juntamos 100 µl LPS⁵ em RPMI-SF (1 mg/5 ml) a cada buraco. Os pratos são incubados a 37°C numa atmosfera de 5% CO₂ durante 24 horas. As

3 Meio RPMI-1640 contendo 5% de soro de feto de vitela.

4 RPMI contendo penicilina -estreptomicina (100 unidades/ml-100 µg/ml) e glutamina (2mM).

5 Lipopolissacarideo refinado purificado aparti de Salmonella minnesota o qual foi verificado para determinar que o rato C3H/HeJ não é sensível a isso.

partes sobrenadantes são ou removidas ou ensaiadas para IL-1 imediatamente ou por outro lado refrigeradas ou geladas para ensaio subsequente.

Para ensaiar para IL-1, 6-8 ratos C3H/HeJ (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) são sacrificados por deslocação cervical e os seus timos removidos asepticamente. Os timos são lavados com quatro mudanças de meio ⁵. Os timos são a seguir cardados à parte para obtermos uma suspensão celular única e a suspensão filtrada através de 12 camadas de gaze estéril Johnson & Johnson (Johnson & Johnson Products, Inc., New Brunswick, New Jersey). Após filtração, a suspensão celular é centrifugada a 600xg durante seis minutos, a parte sobrenadante decantada e os granulos celulares resuspenso em 25 ml de meio ⁵. A densidade celular é determinada usando um medidor hemacito e a viabilidade celular determinada usando corante Trypan Blue seguida por uma contagem celular usando um medidor hemacyto. As células são a seguir diluídas a 2×10^7 células/ml. As diluições duplas em série

BAD ORIGINAL

da parte sobrenadante LPS-estimulada obtida como acima descrito são preparadas em pratos de microtitulação de 96-buracos usando meio ⁶ como diluente (50 μ l de parte sobrenadante; 50 μ l de meio por buraco). A cada buraco juntamos 50 μ l de 2-mercaptoetanol 14×10^{-5} M. Juntamos phytohemagglutinin P (Sigma Chemical, L-9132) (PHA) de uma solução stock em meio ⁶ tal que juntamos 50 μ l e a concentração resultante de PHA é 12 mg/ml. A seguir, 50 μ l da suspensão thymocyte preparada como

⁶ Mínimo essencial de meio Eagle com sais Earle contendo 5% de soro de feto de vitela, 100 unidades/ml-100 μ g/ml penicilina-estreptomicina, glutamina 2mM, amino ácidos não essenciais 0,1 mM (M.A. Bioproducts, Rockville, Maryland) e piruvato de sódio 1mM.

acima descrito é adicionada de modo a haver uma concentração celular final de 5×10^6 células/ml. Os pratos são incubados a 37°C numa atmosfera 5% CO₂ durante 54 horas. A seguir, juntamos timidina triciada (0,4 μ Ci em 10 μ l de meio ⁶) a cada buraco e os pratos incubados como acima descrito durante mais 18 horas. Após incubação, as células são colhidas com um ceifador de células (Otto Hiller, Madison, Wisconsin) onde os granulos são recolhidos sobre tiras de filtros de fibra de vidro Whatman (Whatman, Clifton, New Jersey) e secos. Os granulos são a seguir contados usando um contador de cintilações beta num fluido de cintilação tolueno/omnifluor. A quantidade de IL-1 presente é proporcional a quantidade de timidina triciada nos granulos.

Além do ensaio tímócito anterior, as partes sobrenadantes são ensaiadas quantitativamente para IL-1 de acordo com o ensaio de ligação receptor descrito a seguir. Geramos uma curva

BAD ORIGINAL

- 15 -

padrão como se segue. Juntamos células EL4-6.1 murina timona [$10-15 \times 10^6$ células em 0,4 ml de tampão ligante (RFMI 1640, 5% FCS, HEPES 25 mM, NaN_3 0,01%, pH 7,3)] a quantidades variáveis de murina não etiquetada rIL-1 α [IL-1 α recombinante produzida em Escherichia coli a partir da sequencia publicada de aminoácidos 115-270 para IL-1 α , Lomedico, P.M., et al., Nature, 312, 458-462 (1984)] (40 pg a 40 ng em 0,5 ml de tampão) e incubada durante 1 hr a 4°C com agitação contínua, após o que juntamos 0,8 ng (0,1 ml) de ^{125}I -rIL-1 β humano (New England Nuclear, Boston, Massachusetts) e a agitação continuou durante mais 3 horas. As amostras são filtradas com um aparelho Yeda (Linca Co., Tel-Aviv, Israel) através de filtros de fibra de vidro Whatman GF/C2,4 cm (bloqueados com 0,5% de leite em pó durante 2 hrs a 37°C) e lavadas uma vez com 3 ml de tampão arrefecido por gelo. Os filtros são contados num contador gama Searle e a ligação não específica é tomada como a ligação cpm na presença de 200 ng de rIL-1 α não etiquetada. Construimos uma curva de calibração Hill num gráfico de $\log(Y/100-Y)$ vs. $\log C$ onde Y representa a percentagem de control do ligante ^{125}I -rIL-1 β e C é a concentração de rIL-1 α não etiquetada. Uma linha curva de mínimos quadrados é adaptada através de valores Y entre 20 a 80%. A seguir, para quantificar os níveis IL-1 nas partes sobrenadantes obtidas como acima descrito, as partes sobrenadantes diluídas substituem rIL-1 α no protocolo anterior e a percentagem de valores de ligação medidos é usada para determinar as concentrações IL-1 a partir de um gráfico padrão Hill. Cada diluição é ensaiada em duplicado e geralmente usamos somente diluições com valores 20 a 80% para calcular os níveis médios IL-1.

Além disso, os macrofagos aderentes tratados como acima descritos são ensaiados para IL-1 α intracelular de acordo com a análise de mancha Ocidental bem conhecida dos especialistas da arte como a seguir descrito. Os macrofagos aderentes, tratados

BAD ORIGINAL

como acima descrito, são raspados dos buracos do prato com um raspador de células. As células de cada grupo de tratamento são lavadas tres vezes com sal fosfato tamponado (PBS), a seguir lisado com NP-40 a 0,5% em tampão fosfato (KCl 50mM, NaCl 10mM, KH_2PO_4 50 mM, EDTA 1,0 mM, pH 7,5) contendo fluorofosfato di-isopropilico 10 mM (DFP) (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin). Os nucleos intactos são granulados e as partes sobrenadantes removidas em tubos microfugos limpos. Dissolvemos quinze microlitros (aproximadamente 2×10^5 equivalentes celulares) de cada parte sobrenante em amostra tampão Laemmli [Laemmli, U.K., Nature (Lond), 227, 680-685 (1970)] e aplicamos a um gradiente 10-20% de poliacrilamina-gel SDS e electroforado a uma corrente constante de 35 mA durante 3-4 horas. A seguir, as proteínas são manchadas electricamente a partir do gel em papel de nitrocelulose (NC) (Micron Separations, Inc., Westboro, Massachusetts) por transferencia durante a noite a 220 mA em glicina 192 mM, Tris 25mM, SDS 0,1%, tampão metanol 25%. Os duplicados das manchas de papel NC são sobrepostas com diluições 1/250 de antisoro de cabra em murina rIL-1 α e anti-murina de cabra rIL-1 β [recombinante IL-1 α (rIL-1 α) produzido em Escherichia coli a partir da sequencia publicada de aminoácidos 115-270 para IL-1 α , Lomedico, P.M., et al., Nature, 312, 458-462 (1984) e recombinante IL-1 β (rIL-1 β) produzido em E. coli a partir da sequencia de aminoácidos publicada 118-269 para IL-1 β , Grey, P.W., et al., J. Immunol., 137, 3644-3649 (1986)]. Após lavagem com Tween 20 0,5% em PBS, as manchas são examinadas com uma diluição 1/1000 de peroxidase de rébano bravo conjugada antisoro de porco em IgG de cabra (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, Indiana) e desenvolvidas com o substracto precipitante 4-cloro-1-naftol. Usamos um densimetro laser LKB (model 2220, LKB, Paramus, New Jersey) para verner as faixas. Os dados do varrimento são quantificados usando software LKB GelScan XL Evaluation num computador AT&T PC 6800.

BAD ORIGINAL

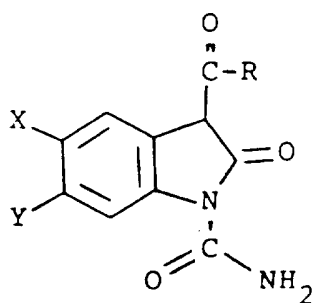
- 17 -

Quando os macrófagos acima descritos foram tratados com o composto deste invento em que X é Cl, Y é H e R é 2-tienilo na presença de soro de feto de vitela a 3,3%, o composto não inibe a lipoxigenase como se mostra pela ausência de inibição de produção de leucotrieno (LTC_4) como mostrado por ensaio de radioimunidade com um kit LTC_4 [3H]RIA (New England Nuclear, Boston, Massachusetts) mas inibe a produção de IL-1. O ensaio de radioimunidade foi efectuado em tubos de polipropileno com todos os reagentes diluídos em fosfato tampão 10mM, pH 7,4, contendo 0,1% de gelatina, EDTA 0,01 M, e NaN_3 0,1%. Juntamos cinquenta microlitros cada de sobrenadante, pesquisador triciado em ensaio tampão 4000 cpm e antisoro diluído e incubamos durante a noite a 4°C. O pesquisador radiocetiquetado não ligado foi removido pela adição de 250 μ l de uma suspensão de carvão Norit A 0,5% com Dextran T-70 0,5%. Após centrifugação, 250 μ l de parte sobrenadante foram contados em 1,0 ml de Atomlight (New England Nuclear, Boston, Massachusetts) em microtubos de polipropileno de 1,5 ml com um contador de cintilação Beckman LS-250. As amostras foram quantificadas por extrapolação a partir de uma curva padrão log-logit (operação padrão em ensaio tampão).

BAD ORIGINAL

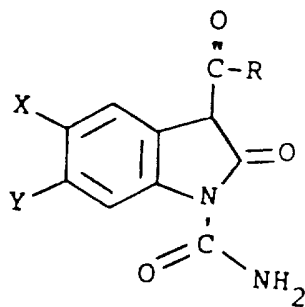
REIVINDICAÇÕES:

18. - Método para a inibição da biossíntese de interleucina-1 num mamífero, caracterizado por compreender a administração ao referido mamífero de uma quantidade inibidora de biossíntese de interleucina-1 de um composto de fórmula



ou de um seu sal de adição de bases farmacologicamente aceitável, em que X é H, Cl ou F; Y é H ou Cl; e R é benzilo ou tienilo, sendo a gama de dosagem de composto activo 1 mg a 200 mg por dia.

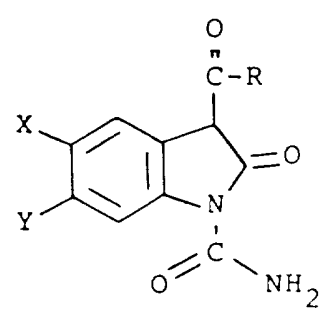
28. - Método para o tratamento de perturbações do metabolismo do osso mediadas por interleucina-1 num mamífero, caracterizado por compreender a administração ao referido mamífero de uma quantidade para tratamento de perturbações do metabolismo dos ossos induzidas por interleucina-1 de um composto de fórmula



ou de um seu sal de adição de bases farmacologicamente aceitável, em que X é H, Cl ou F; Y é H ou Cl; e R é benzilo ou tienilo, sendo a gama de dosagem de composto activo 1mg a 200mg por dia.

3a. - Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por a perturbação do metabolismo do osso ser osteoporose.

4a. - Método para o tratamento de perturbações do metabolismo do tecido conjuntivo induzidas por interleucina-1 num mamífero, caracterizado por compreender a administração ao referido mamífero de uma quantidade para tratamento de perturbações do metabolismo do tecido conjuntivo induzidas por interleucina-1 de um composto de fórmula



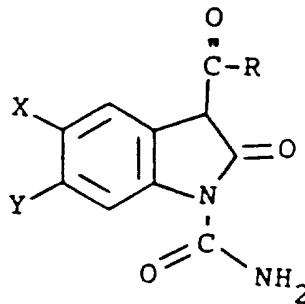
ou de um seu sal de adição de bases farmacologicamente aceitável, em que X é H, Cl ou F; Y é H ou Cl; e R é benzilo ou tienilo, sendo a gama de dosagem de composto activo 1mg a 200mg por dia.

5a. - Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por a perturbação do metabolismo do tecido conjuntivo ser doença periodontal ou cicatrização do tecido.

6a. - Método para o tratamento da disfunção da imunidade induzida por interleucina-1 num mamífero, caracterizado por compreender a administração ao referido mamífero de uma

[Handwritten signature]

quantidade para tratamento da disfunção da imunidade induzida por interleucina-1 de um composto de fórmula



ou de um seu sal de adição de bases farmacologicamente aceitável, em que X é H, Cl ou F; Y é H ou Cl; e R é benzilo ou tienilo, sendo a gama de dosagem de composto activo 1mg a 200mg por dia.

7a. - Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por a disfunção da imunidade ser alergia ou psoríase.

8a. - Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado por X ser Cl; Y ser H; e R ser 2-tienilo.

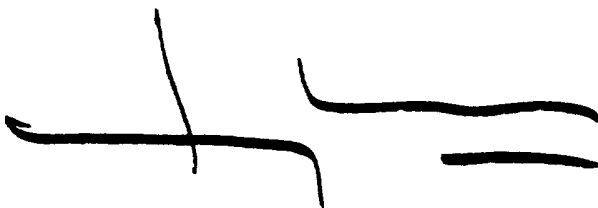
9a. - Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado por X ser F; Y ser Cl; e R ser 2-tienilo.

10a. - Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado por X ser H; Y ser Cl; e R ser benzilo.

11a. - Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado por o composto ou um seu sal de

adição de bases farmacêuticamente aceitável ser administrado oralmente ou parentericamente.

Lisboa, 11 de Abril de 1989



I. BERTINA DA CRUZ
Avenida CRUZ - Companhia Industrial
RUA VICTOR CORDEIRO, 10-A, 1.º
1200 LISBOA

BAD ORIGINAL