



(11) *Número de Publicação:* PT 652768 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
A61K038/21 A

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1993.06.03	(73) <i>Titular(es):</i> MAXIM PHARMACEUTICALS, INC. 4350 EXECUTIVE DRIVE SAN DIEGO, CA 92121 US
(30) <i>Prioridade:</i> 1992.06.03 SE 9201719	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1995.05.17	(72) <i>Inventor(es):</i> KRISTOFFER HELLSTRAND SVANTE HERMODSSON SE SE
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2000.05.03	(74) <i>Mandatário(s):</i> JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO RUA DO SALITRE, 195 R/C DTO 1250 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PREPARAÇÃO PARA ACTIVAR AS CÉLULAS ANIQUILADORAS NATURAIS (CÉLULAS AN) EM QUE A REFERIDA PREPARAÇÃO CONTÉM INTERFERÃO ALFA E HISTAMINA SEROTONINA OU SUBSTÂNCIAS COM A CORRESPONDENTE ACTIVIDADE RECEPTORIAL

(57) *Resumo:*





INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA

FOLHA DO RESUMO

PAT. INV. ☒	MOD. UTI. ☐	MOD. IND. ☐	DES. IND. ☐	TOP. SEMIC. ☐	CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)
N.º 652.768 (11)		N.º Objectos ☐ N.º Desenhos ☐		DATA DO PEDIDO ____ / ____ / ____ (22)	
REQUERENTE (71) (NOME E MORADA) MAXIM PHARMACEUTICALS, INC., norte-americana, industrial, com sede em 4350 Executive Drive, San Diego, CA 92121, Estados Unidos da América CÓDIGO POSTAL					
INVENTOR(ES) / AUTOR(ES) (72) HELLSTRAND, Kristoffer e HERMODSSON, Svante					
REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE(S) (30)			FIGURA (para interpretação do resumo) 		
DATA DO PEDIDO	PAÍS DE ORIGEM	N.º DO PEDIDO			
EPÍGRAFE (54) "PREPARAÇÃO PARA ACTIVAR AS CÉLULAS ANIQUI- LADORAS NATURAIS (CÉLULAS AN), EM QUE A REFERIDA PREPARAÇÃO CONTÉM INTERFERÃO α E HISTAMINA, SEROTONINA OU SUBSTÂNCIAS COM A CORRESPONDENTE ACTIVIDADE RECEPTORIAL"					
RESUMO (max. 150 palavras) (57) Preparação farmacêutica para activar as células aniquiladoras naturais (células AN), por exemplo, para tratar tumores ou infecções virais, a qual compreende uma primeira composição que contém o interferão α , ou os seus análogos, conjuntamente com uma segunda composição que contém pelo menos uma substância que possui actividade agonista dos receptores H_2 ou $5-HT_{1A}$, por exemplo, histamina ou serotonina. A primeira e a segunda composições podem ser misturadas numa única preparação ou fornecidas em doses separadas.					

NÃO ESCREVER NAS ZONAS SOMBREADAS

Descrição

“Preparação para activar as células aniquiladoras naturais (células AN), em que a referida preparação contém interferão α e histamina, serotonina ou substâncias com a correspondente actividade receptorial”

A presente invenção diz respeito a uma preparação farmacêutica para activar as células aniquiladoras naturais (células AN) e aos processos para a sua produção.

As células aniquiladoras naturais (células AN) constituem um grupo de linfócitos espontaneamente citotóxicos que destroem as células tumorais por citólise sem nenhuma restrição ou especificidade antigénica por parte das moléculas da histocompatibilidade. Os monócitos estão implicados na regulação da função das células AN, quer através de mecanismos associados ao contacto celular quer por proporcionarem mediadores solúveis de regulação das células AN. Recentemente foi descrito um mecanismo em que intervém o contacto celular, segundo o qual os monócitos regulam as células AN. Este tipo de regulação mediada pelos monócitos é exercida pelos monócitos, que são obtidos directamente a partir do sangue periférico por elutriação centrífuga em contracorrente (ECC), e é comandada pela histamina de aminas biogénicas e pela serotonina (Hellstrand e Hermodsson, 1986, J. Immunol. 137, 656-660; Hellstrand e Hermodsson, 1987, J. Immunol. 139, 869-875; Hellstrand e Hermodsson, 1990, Scand. J. Immunol. 31, 631-645; Hellstrand e Hermodsson, 1990, Cell Immunol. 127, 199-214; Hellstrand, Kjellson e Hermodsson, 1991, Cell Immunol. 138, 44-54). Estes mecanismos reguladores das células AN, com origem nas aminas biogénicas, devem ser importantes para

criar defesas, por intermédio das células AN, contra os tumores metastáticos *in vivo* (Hellstrand, Asea e Hermodsson (1990), J. Immunology, 145, 4365-4370).

O interferão α (IFN- α) é um factor importante para a regulação as células AN. Aumenta eficazmente a citotoxicidade das células AN (CCAN), tanto *in vivo* como *in vitro* (Trinchieri, 1989, Adv. Immunol. 47:187-376; Einhorn, Blomgren e Strander, 1978, Int. J. Cancer 22, 405-412; Friedman e Vogel, 1984, Adv. Immunol., 34, 97-140). A histamina de aminas biogénicas e o IFN- α humano fazem aumentar de modo aditivo a actividade das células AN (Hekllstrand e Hermodsson, 1986, J. Immunol. 137, 656-660).

Devido à elevada taxa de incidência do cancro e tendo em conta os métodos de tratamento apenas parcialmente auspiciosos conhecidos na actualidade, há uma procura permanente de outros métodos aperfeiçoados para o tratamento de tumores. Há também uma grande procura de métodos aperfeiçoados para o tratamento de infecções virais.

A presente invenção tem por objecto proporcionar uma preparação farmacêutica para a estimulação sinérgica eficaz de células AN na presença de monócitos, v.g. com a finalidade de permitir tratar tumores, essencialmente mielomas, cancro renal, leucémias e melanomas, ou para permitir tratar infecções virais, fundamentalmente a hepatite B e a hepatite C crónicas. A preparação de acordo com a invenção compreende uma primeira composição que contém o interferão α e uma segunda composição que contém pelo menos um agonista do receptor H_2 da histamina ou do receptor $5-HT_{1A}$ da serotonina, em que a primeira e a segunda composições referidas podem ser misturadas numa única preparação ou então podem ser fornecidas em doses separadas numa quantidade suficiente para o tratamento pretendido. A invenção compreende também um processo para a produção de uma preparação farmacêutica para activação sinérgica das células AN na presença de monócitos, mediante a aplicação de uma primeira

composição que contém o interferão α conjuntamente com uma segunda composição que contém pelo menos um agonista dos receptores H_2 ou $5-HT_{1A}$, podendo as referidas primeira e segunda composições ser quer misturadas numa única preparação ou fornecidas em doses separadas. A presente invenção também compreende a utilização do interferão α e de um agonista dos receptores H_2 ou $5-HT_{1A}$ para a preparação de uma composição farmacêutica sinérgica para o tratamento de uma doença viral ou neoplásica, em que o tratamento compreende o passo que consiste em co-administrar a um animal, incluindo um ser humano, uma quantidade eficaz de interferão α e de um agonista do receptor H_2 da histamina ou de um agonista do receptor $5-HT_{1A}$ da serotonina. Além do mais, a invenção compreende a utilização de um agonista do receptor H_2 da histamina ou de um agonista do receptor $5-HT_{1A}$ para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma doença viral ou neoplásica por co-administração com o interferão α , e também a utilização do interferão α para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma doença neoplásica ou viral por co-administração com um agonista do receptor H_2 da histamina ou com um agonista do receptor $5-HT_{1A}$ da serotonina.

Seguidamente descrever-se-á a presente invenção mais minuciosamente tomando como referência as experiências efectuadas *in vitro* e aqui descritas.

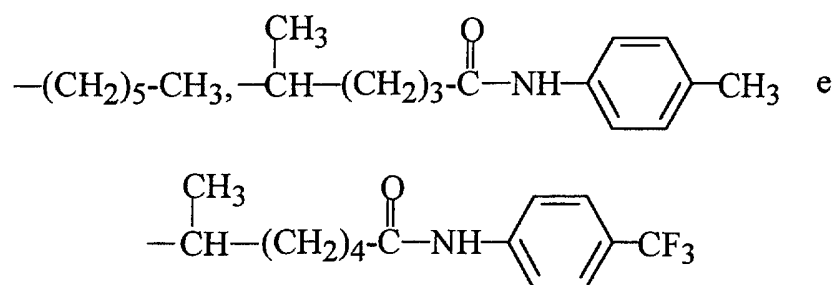
A figura 1 ilustra, sob a forma de um gráfico, a activação sinérgica das células AN contra células destinatárias criadas em cultura, produzida pelo IFN- α e pela histamina ou serotonina, para diversas concentrações do IFN- α (0-100 U/mL).

A figura 2 ilustra, sob a forma de um gráfico, a activação sinérgica das células AN contra células leucémicas humanas recém-colhidas, produzida pelo IFN- α e pela histamina, para diversas concentrações do IFN- α (0-100 U/mL).

A invenção baseia-se na descoberta inesperada, efectuada *in vitro*, de que o IFN- α e a histamina de aminas biogénicas e/ou a serotonina produzem uma activação sinérgica das células AN.

As experiências adiante descritas comprovam que os monócitos eluídos suprimem eficazmente a activação das células AN induzida pelo IFN- α . Além disso, demonstra-se que a histamina ou a serotonina, que actuam através de receptores bioaminérgicos definidos, fazem desaparecer a supressão induzida pelos monócitos e consequentemente restabelecem a capacidade das células AN para responderem ao IFN- α .

Os análogos de histamina com actividade agonista do receptor H_2 , ou outros compostos com actividade agonista do receptor H_2 , e os análogos de serotonina com actividade agonista do receptor $5-HT_{1A}$, ou outros compostos com actividade agonista do receptor $5-HT_{1A}$, considerados adequados para os fins da presente invenção, são conhecidos na especialidade e como tal não serão aqui descritos mais minuciosamente. Por exemplo, tais análogos podem ter uma estrutura química semelhante à da histamina ou à da serotonina, sendo contudo modificados por adição de grupos que não negativamente as actividades dos receptores H_2 ou $5-HT_{1A}$. Os agonistas do receptor H_2 , já conhecidos, compreendem os seleccionados entre histamina, demaprite, clonidina, tolazolina, impromadina, 4-metil-histamina, betazol e derivados congéneres da histamina, tais como os compostos de fórmulas estruturais



descritos como sendo os compostos 1,6 e 9 por Khan *et al.* em J. Immunol., Vol. 137, págs. 308-315. Os agonistas do receptor 5-HT_{1A} da serotonina, já conhecidos, compreendem os compostos 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)-tetralina (8-OH-DPAT), cis-8-hidroxi-1-metil-2-(di-n-propilamino)-tetralina (ALK-3), 8-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]-etil]-8-azaspirol[4,5]-decano-7,9-diona (BMY 7378), 1-(2-metoxifenil)-4-[4-(2-ftalamido)-butil]-piperazina HBr (NAN 190), lisurida, d-LSD, flesoxinan, di-hidroergotamina (DHE), 8-[4-(1,4-benzodioxano-2-il-metil-amino)-butil]-8-azaspirol[4,5]decano-7,9-diona (MDL 72832), 5-carboxamido-triptamina (5-CT), N,N-dipropil-5-carboxamido-triptamina (DP-5-CT), ipsapirona, 2-[[[2-(2,6-dimetoxifenoxi)-etil]-amino]-metil]-1,4-benzodioxano (WB 4101), ergotamina, buspirona, metergolina, espiroxatrina, 1-[2-(4-aminofenil)-etil]-4-(3-trifluorometilfenil)-piperazina (PAPP), éster isopropílico do ácido 4-(3-terc-butil-amino-2-hidroxi-propoxi)-indol-2-carbónico (SDZ(-)21009) e butotenina.

O IFN- α e as substâncias histamina/serotonina podem ser utilizados para administração em preparações independentes ou na mesma preparação. O método de administração pode ser por injeção local ou sistémica ou por infusão. Os outros métodos de administração também podem ser convenientes.

Os compostos podem mesmo ser utilizados para administração por via intraperitoneal ou segundo qualquer outro método de administração parentérica. É possível administrar soluções aquosas dos compostos activos, sob a forma dos seus ácidos livres ou dos seus sais farmacêuticamente aceitáveis, na presença ou na ausência de um agente tensioactivo, tal como a hidroxi-propil-celulose. Também é possível utilizar dispersões que contenham glicerol, polietileno-glicóis no estado líquido ou as suas misturas com óleos. Também é possível acrescentar à preparação compostos antimicrobianos.

As preparações injectáveis podem ser soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós que possam ser dissolvidos ou colocados em suspensão num meio estéril antes da sua utilização. Também é possível acrescentar veículos, tais como solventes ou dispersantes, que contenham v.g. água, etanol, polióis, óleos vegetais e outros que tais. É possível utilizar agentes de revestimento, tais como a lecitina, e agentes tensioactivos para manter a preparação com uma fluidez adequada. Também é possível acrescentar substâncias isotónicas, tais como o açúcar e o cloreto de sódio, e também os produtos destinados a retardar a absorção dos ingredientes activos, tais como o monoestearato de alumínio e a gelatina. As soluções estéreis injectáveis são preparadas pelos processos habituais e são filtradas antes da sua armazenagem e/ou administração. É possível obter pós estéreis por secagem hipobárica ou por liofilização de uma solução ou suspensão.

Todas as substâncias acrescentadas à preparação devem ser aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico e praticamente não tóxicas nas quantidades utilizadas. Também fazem parte da presente invenção as preparações e as formulações que proporcionem uma libertação retardada.

A preparação da presente invenção é fornecida em unidades de dosagem que permitem um doseamento uniforme e facilitam a administração. Cada unidade de dosagem contém uma quantidade predeterminada de componentes activos para produzir o efeito terapêutico desejado, conjuntamente com a quantidade necessária de veículos farmacêuticos.

O IFN- α pode ser utilizado, para efeitos de administração, numa quantidade compreendida sensivelmente entre 1000 e 300 000 U/kg/dia, de preferência compreendida entre 3000 e 100 000 U/kg/dia e mais preferencialmente entre 10 000 e 50 000 U/kg/dia.

Os compostos com actividade agonista dos receptores H_2 e $5-HT_{1A}$ podem ser utilizados, para efeitos de administração, numa quantidade compreendida sensivelmente entre 0,1 e

10 mg/dia, de preferência entre 0,5 e 8 mg/dia e mais preferencialmente entre 1 e 5 mg/dia. No entanto, é possível utilizar outras quantidades para efeitos de administração conjuntamente com o IFN- α , ao abrigo da competência do médico assistente. No caso das substâncias diferentes das aminas biogénicas, com a correspondente actividade receptorial, devem ser utilizadas doses que produzam um efeito farmacológico equivalente. Embora se especifique nos exemplos que a administração foi realizada numa dose única, é evidente que os compostos podem ser distribuídos ao longo de períodos maiores para o tratamento de infecções virais ou de tumores.

Uma dose diária pode ser administrada sob a forma de uma dose única ou pode ser dividida em várias doses, se ocorrerem efeitos negativos.

Estudos *in vitro* respeitantes ao IFN- α e às substâncias histamina/serotonina

O exemplo descrito ilustra o efeito do IFN- α recombinante humano e de histamina/serotonina, separadamente e em combinação, sobre citotoxicidade das células AN (CCAN) para as células mononucleares humanas (CMN).

As CMN são obtidas a partir do sangue venoso periférico de dadores de sangue humanos saudáveis, pelo método de centrifugação com 'Ficoll-Hypaque', seguindo-se um fraccionamento por gradiente de densidade de 'Percoll' (Timonen e Saksela, 1980, J. Immunol. Methods 36, 285-291; Hellstrand e Hermodsson, 1990, Scand. J. Immunol. 31, 631-645).

Nas respectivas fracções de Percoll, as CMN de alta densidade (fracções 1 a 4 de Percoll) foram os linfócitos pequenos com uma citotoxicidade referencial de baixo nível contra as células destinatárias K562. Após a remoção dos monócitos, as fracções 6 a 10 de baixa densidade revelaram uma forte CCAN, facto este que é consistente com estudos anteriores (Timonen e Saksela, 1980, J. Immunol. Methods 36, 285-291).

As células utilizadas nestas experiências foram as células K562, uma linhagem celular eritroleucêmica sensível às células AN, ou foram células de Daudi, que são uma linhagem celular linfoblastóide de células B transformadas pelo EBV relativamente insensível às células AN.

Determinou-se a CCAN seis vezes, definida como sendo a libertação específica de ^{51}Cr para proporções entre CMN : células destinatárias compreendidas entre 30:1 e 3,8:1 em gradientes de diluição para metade (razão 2). As suspensões de CMN/células destinatárias foram incubadas em microplacas a 37°C durante 6 horas (Daudi) ou durante 16 horas (K562). Depois recolheu-se a solução do sobrenadante e examinou-se para pesquisa da sua radioactividade num contador de radiação γ . Mediu-se a libertação máxima de ^{51}Cr nas culturas de células destinatárias tratadas com 'Triton X-100'. Calculou-se a CCAN em termos de percentagem (%) da citólise, em conformidade com a expressão de cálculo $100 \times (\text{libertação experimental} - \text{libertação espontânea}) / (\text{libertação máxima} - \text{libertação espontânea}) = \% \text{ de citólise}$.

Separou-se a fracção de Percoll de baixa densidade por eluição centrífuga em contracorrente (ECC) por forma a obter-se uma fracção monocítica e uma fracção linfocítica. Concentrou-se a fracção monocítica até se alcançar uma pureza superior a 90%, sendo então as células contaminantes constituídas por linfócitos grandes. As fracções linfocíticas obtidas por ECC continham menos de 3% de monócitos, conforme determinado pela morfologia e pela expressão do antígeno Leu-M3 (CD14). Os linfócitos eram as células T $\text{CD3}^+/\text{16}^-/\text{56}^+$ (45-50%), as células AN $\text{CD3}^+/\text{16}^-/\text{56}^-$ (35-40%), as células T $\text{CD3}^+/\text{16}^-/\text{56}^-$ (45-50%) e as células $\text{CD3}^+/\text{16}^+/\text{56}^+$ (1-5%), conforme determinado por citometria de fluxo.

Os monócitos eluídos e/ou as células AN-linfócitos de baixa densidade concentrados foram tratados com $\text{IFN-}\alpha$ e histamina/serotonina. Acrescentou-se então os compostos, separadamente ou em combinação, às misturas de CMN e de células destinatárias K562 no início

da experiência de libertação de ^{51}Cr durante 16 horas. A citotoxicidade contra as células K562 na fracção de células AN-linfócitos concentrados aumentou por acção do IFN- α , mas não foi afectada nem pela histamina nem pela serotonina. A fracção de monócitos eluídos exibiu uma citotoxicidade referencial de baixo nível e foi ligeiramente induzida pelos complexos de histamina/IFN- α ou de serotonina/IFN- α ; esta citotoxicidade proveio da fracção exígua de linfócitos contaminantes (dados não apresentados). A adição dos monócitos eluídos ao complexo de células AN-linfócitos concentrados suprimiu o nível de citotoxicidade referencial para as células K562. Além do mais, os monócitos eluídos inibiram quase totalmente a activação da citotoxicidade do complexo de células AN-linfócitos concentrados por acção do IFN- α (Quadro 1).

A histamina e a serotonina restituíram a citotoxicidade basal dos linfócitos em misturas de monócitos e linfócitos. Além disso, tanto a histamina como a serotonina eliminaram a inibição, induzida pelos monócitos, da resposta das células AN ao IFN- α . Assim sendo, o IFN- α mais a histamina ou mais a serotonina aumentam de forma sinérgica a citotoxicidade em misturas de monócitos e de linfócitos enriquecidos com células AN (Quadro 1).

Nas experiências a que corresponde o quadro 1, os linfócitos eluídos foram misturados com monócitos, conforme se observa no quadro, num volume total de 150 μL . Os dados são os correspondentes à CCAN (percentagem de citólise; média $\pm$ D.P. para seis determinações). Acrescentou-se serotonina 10^{-4} molar e/ou IFN- α (25 U/mL) no início da experiência de 16 horas sobre a microcitotoxicidade contra 10^4 células K562 destinatárias.

**Quadro 1: supressão da citotoxicidade das células AN por acção dos monócitos e
eliminação deste efeito com a serotonina**

CITOTOXICIDADE DAS CÉLULAS AN APÓS O TRATAMENTO COM					
Monócitos (x 10 ⁻⁴)	Linfócitos (x 10 ⁻⁴)	Contraprova	Serotonina	IFN	Serotonina + IFN
0	12	34±1	34±3	58±3	60±2
6	12	10±2	31±2	17±1	52±2
12	12	9±1	31±2	10±1	52±2

O quadro 2 ilustra a activação sinérgica das células AN por tratamento combinado com o IFN- α e a histamina. Os monócitos foram recuperados conjuntamente com as células AN nas fracções de baixa densidade de 'Percoll'. Na experiência traduzida no quadro 2, acrescentou-se o IFN- α e/ou a histamina às CMN obtidas a partir destas fracções de 'Percoll' que continham os monócitos. Tal como sucedia no caso em que foram utilizadas as misturas de monócitos eluídos e de linfócitos de baixa densidade, também o IFN- α foi relativamente ineficaz nestas fracções celulares, ao passo que a histamina aumentou a citotoxicidade. O tratamento das células que continham os monócitos com histamina (10^{-4} - 10^{-6} M) e com o IFN- α (25 U/mL) produziu uma resposta sinérgica na estimulação das células AN contra as células K562 e contra as células de Daudi destinatárias. Obteve-se um resultado semelhante quando se substituiu a histamina pela serotonina.

Os resultados ilustrados no quadro 2 correspondem às CMN retiradas de cinco doadores diferentes. Todos os compostos foram acrescentados às misturas de CMN e de células

destinatárias no início de uma incubação de 6 horas (Daudi) ou de 16 horas (K562) de células efectoras e de células destinatárias. As células efectoras foram obtidas a partir das fracções 7 e 8 de 'Percoll' que continham entre 33 e 55% de monócitos.

A figura 1 ilustra a activação sinérgica das células AN por acção do IFN- α e de histamina/serotonina para diferentes concentrações do IFN- α (0-100 U/mL). As células retiradas da fracção 8 de 'Percoll', que continham monócitos, foram incubadas conjuntamente com o meio de cultura, histamina (10^{-4} M) ou serotonina (10^{-4} M) na presença de IFN- α (0-100 U/mL). Os dados representados são de CCAN (% de citólise; media $\pm$ D.P. para seis determinações). Os compostos foram acrescentados no início de uma experiência de 16 horas sobre a microcitotoxicidade contra as células K562 destinatárias.

Quadro 2: activação sinérgica das células AN por acção da histamina e do IFN- α

Exp.	Células destinatárias	Razão entre CMN/ células destinatárias	Tratamento	CCAN (% da citólise $\pm$ D.P.)			
				Concentração da histamina			
				0	10^{-4} M	10^{-5} M	10^{-6} M
1	K 562	15:1	Meio	33,1 $\pm$ 0,5	55,5 $\pm$ 1	54,7 $\pm$ 1	39,2 $\pm$ 1
			IFN 25 U/mL	33,1 $\pm$ 1	76,4 $\pm$ 3	74,1 $\pm$ 1	66,0 $\pm$ 2
2	K 562	15:1	Meio	20,7 $\pm$ 0,4	32,4 $\pm$ 1	27,4 $\pm$ 1	23,2 $\pm$ 2
			IFN 25 U/mL	27,4 $\pm$ 1	67,9 $\pm$ 2	66,2 $\pm$ 1	55,4 $\pm$ 1
3	K 562	15:1	Meio	31,4 $\pm$ 1	43,3 $\pm$ 1	38,6 $\pm$ 1	29,4 $\pm$ 1
			IFN 25 U/mL	32,5 $\pm$ 1	71,9 $\pm$ 1	66,5 $\pm$ 2	56,3 $\pm$ 2
4	Daudi	30:1	Meio	1,0 $\pm$ 0,4	4,4 $\pm$ 1	3,5 $\pm$ 1	1,1 $\pm$ 0,3
			IFN 25 U/mL	1,1 $\pm$ 0,5	31,7 $\pm$ 1	28,3 $\pm$ 1	14,1 $\pm$ 1
5	Daudi	30:1	Meio	2,2 $\pm$ 1	13,5 $\pm$ 1	9,7 $\pm$ 1	2,5 $\pm$ 1
			IFN 25 U/mL	2,7 $\pm$ 1	61,3 $\pm$ 3	52,3 $\pm$ 2	31,7 $\pm$ 1

O efeito da histamina sobre a supressão, induzida pelos monócitos, das células AN em repouso e das activadas pelo IFN- α foi completamente bloqueado pelo tratamento simultâneo com o composto ranitidina, que é um antagonista específico do RH₂ (o mesmo que H₂R), e imitada pelo composto dimaprite, que é um agonista de RH₂, conforme ilustrado no quadro 3. Significa isto que o efeito da histamina sobre a resposta das células AN ao IFN- α é específica de RH₂.

Quadro 3: efeitos da histamina e do composto de dimaprite, agonista do RH₂, e do composto ranitidina, antagonista do RH₂, sobre as células AN

Tratamento	CCAN (% de citólise $\pm$ D.P.) após o tratamento com			
	Contraprova	Ran.	IFN	Ran. + IFN
Contraprova	0,1 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,1
Histamina	9,4 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,3	31,7 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,2
Dimaprite	6,4 $\pm$ 1	0,4 $\pm$ 0,4	32,6 $\pm$ 1	0,5 $\pm$ 0,5

Na experiência a que corresponde o quadro 3 acrescentou-se o meio de cultura (contraprova), histamina (10^{-4} M), dimaprite (10^{-4} M), ranitidina (ran.) (10^{-4} M) e/ou IFN- α (25 U/mL) no início de um ensaio de 6 horas, efectuado com células de Daudi destinatárias, para verificação da libertação de ^{51}Cr . Os dados obtidos são representativos de três experiências idênticas. O valor da CCAN está apresentado em termos da percentagem média de citólise $\pm$ D.P. para seis determinações. As células efectoras foram recuperadas a partir da fracção 8 de 'Percoll' de baixa densidade que continha cerca de 40% de monócitos.

A serotonina actuou de forma sinérgica com o IFN- α e teve um efeito correspondente ao da histamina. A ranitidina (10^{-4} M) não alterou o efeito da serotonina. Os agonistas 8-OH-DPAT e (+) - ALK-3 sintéticos, específicos do receptor 5-HT_{1a} (R5-HT_{1a} (o mesmo que 5-

-HT_{1A}R)), que não têm actividade em presença dos R5-HT₁₈, R5-HT₁₀, R5-HT₂ ou R5-HT₃, intensificaram o valor da CCAN referencial e restituíram a resposta das células AN ao IFN- α com uma potência e com um efeito comparáveis aos da serotonina. Isto está ilustrado no quadro 4. Os compostos cetanserina e ondansetrona, que são antagonistas respectivamente de R5-HT₂ e R5-HT₃, não influenciaram o efeito da serotonina em concentrações equimolares.

Quadro 4. O efeito da serotonina e dos agonistas do R5-HT_{1A} sobre as células AN

Tratamento	CCAN após o tratamento com	
	Meio	IFN
Meio	1,1 $\pm$ 1	0,5 $\pm$ 0,3
Serotonina 10 ⁻⁴ M	10,4 $\pm$ 1	44,3 $\pm$ 1
Serotonina 10 ⁻⁵ M	4,5 $\pm$ 0,3	33,2 $\pm$ 1
Serotonina 10 ⁻⁶ M	2,2 $\pm$ 0,4	12,3 $\pm$ 1
8-OH-DPAT 10 ⁻⁴ M	8,8 $\pm$ 1	43,3 $\pm$ 1
(+) -ALK-3 10 ⁻⁴ M	9,1 $\pm$ 1	40,4 $\pm$ 1

Na experiência a que corresponde o quadro 4 acrescentou-se o meio de cultura (contra-prova), serotonina, 8-OH-DPAT, (+) -ALK-3 e/ou IFN- α (25 U/mL) no início do ensaio de 6 horas efectuado com células de Daudi destinatárias para verificação da libertação de ⁵¹Cr. O valor da CCAN é dado pela percentagem de citólise $\pm$ D.P. para seis determinações. As células efectoras foram recuperadas a partir da fracção 7 de 'Percoll' de baixa densidade que continha cerca de 36% de monócitos.

Foram então realizadas experiências idênticas, utilizando como células destinatárias células tumorais humanas recém-obtidas, em vez das linhagens de células tumorais criadas em cultura utilizadas como células destinatárias nas experiências descritas *supra*.

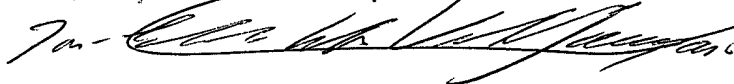
As CMN foram obtidas a partir do sangue venoso periférico por centrifugação em 'Ficoll-Hypaque', e tais células mononucleares foram separadas em monócitos e linfócitos enriquecidos em células AN (Hellstrand *et al.*, J. Interferon Res., 12, 199-206, 1992). Foram utilizados 70 000 linfócitos enriquecidos com células AN, os quais foram misturados com 70 000 monócitos e 20 000 células leucémicas destinatárias marcadas com ^{51}Cr (células leucémicas de mielogenia aguda com uma pureza de 97%) num volume total de 150 μL . Efectuou-se o tratamento das células com o meio de cultura (contraprova) ou com dicloridrato de histamina com uma concentração final de 10^{-4} M, durante um ensaio de 16 horas de verificação da libertação de ^{51}Cr , para se determinar as células destinatárias aniquiladas.

Os resultados estão agrupados na figura 2. Os dados indicados correspondem ao valor médio percentual da citólise $\pm$ D.P. para seis determinações. A citotoxicidade anotada ficou completamente esgotada após a remoção das células AN, utilizando o produto 'Dynabeads' recoberto com anti-CD56, mas não por remoção de células T, utilizando esférulas recobertas com anti-CD3 (em conformidade com o método descrito por Hellstrand *et al.*, Scand. J. Immunol., 37:7-18 (1993)). Conforme se observa na figura 2, o tratamento com o interferão por si só não induz a aniquilação das células leucémicas destinatárias, salvo quando se encontra presente a histamina. Além disso, demonstrou-se que os efeitos citotóxicos obtidos com a histamina e o interferão α são observáveis não só nas células tumorais criadas em cultura mas também nas células leucémicas humanas recém-obtidas. Posto isto, e em conclusão, é possível afirmar que as experiências efectuadas *in vitro*, anteriormente descritas, demonstram que a histamina de aminas biogénicas, através dos receptores de tipo H_2 , e a serotonina, através dos receptores de tipo 5-HT_{1A} , eliminam a supressão, induzida pelos monócitos, das células AN em repouso e das activadas pelo IFN- α . Assim, o tratamento com o IFN- α e com os compostos com

actividade agonista dos receptores H_2 ou HT_{1A} produz uma activação sinérgica das células AN, o que pode ser utilizado para efeitos de tratamento de tumores ou de tratamento de infecções virais.

Lisboa, 5 de Julho de 2000

O Agente Oficial da Propriedade Industrial



JOSÉ DE SAMPAIO
A.O.P.I.
Rua do Salitre, 195, r/c-Drt.
1250 LISBOA

Reivindicações

1. Preparação farmacêutica para a activação sinérgica das células aniquiladoras naturais (células AN) na presença de monócitos, a qual compreende uma primeira composição que contém o interferão α (IFN- α) conjuntamente com uma segunda composição que contém pelo menos um agonista dos receptores H_2 ou $5-HT_{1A}$, sendo a primeira e a segunda composições misturadas numa única preparação ou administradas em doses separadas.
2. Processo para a produção de uma preparação farmacêutica para a activação sinérgica das células AN na presença de monócitos, mediante a aplicação de uma primeira composição que contém o interferão α em conjunto com uma segunda composição que contém pelo menos um agonista dos receptores H_2 ou $5-HT_{1A}$, em que as referidas primeira e segunda composições são misturadas numa preparação única ou então são administradas em doses separadas.
3. Preparação farmacêutica de acordo com a reivindicação 1 ou processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizados pelo facto de o interferão α se encontrar presente numa quantidade compreendida entre 1000 e 300 000 U/kg para efeitos de utilização numa dose diária.
4. Preparação farmacêutica ou processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizados pelo facto de o interferão α se encontrar presente numa quantidade compreendida entre 3 000 e 100 000 U/kg para efeitos de utilização numa dose diária.

5. Preparação farmacêutica ou processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizados pelo facto de o interferão α se encontrar presente numa quantidade compreendida entre 10 000 e 50 000 U/kg para efeitos de utilização numa dose diária.
6. Preparação farmacêutica de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 ou 3 a 5 ou processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 2 a 5, caracterizados pelo facto de a segunda composição se encontrar presente numa quantidade compreendida entre 0,1 e 10 mg para efeitos de utilização numa dose diária.
7. Preparação farmacêutica ou processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizados pelo facto de a segunda composição se encontrar presente numa quantidade compreendida entre 0,5 e 8 mg para efeitos de utilização numa dose diária.
8. Preparação farmacêutica ou processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizados pelo facto de a segunda composição se encontrar presente numa quantidade compreendida entre 1 e 5 mg para efeitos de utilização numa dose diária.
9. Preparação farmacêutica de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 ou 3 a 8 ou processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 2 a 8, caracterizados pelo facto de a segunda composição ser seleccionada entre o conjunto constituído por histamina, serotonina, demaprite, clonidina, tolazolina, impromadina, 4-metil-histamina, betazol, derivados congéneres da histamina, 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)-tetralina (8-OH-DPAT), cis-8-hidroxi-1-metil-2-(di-n-propilamino)-tetralina (ALK-3), 8-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-

-piperazinil]-etil]-8-azaspiro[4,5]-decano-7,9-diona (BMY 7378), 1-(2-metoxifenil)-4-[4-(2-ftalamido)-butil]-piperazina HBr (NAN 190), lisurida, d-LSD, lesoxinan, di-hidro-ergotamina (DHE), 8-[4-(1,4-benzodioxano-2-il-metil-amino)-butil]-8-azaspirol[4,5]decano-7,9-diona (MDL 72832), 5-carboxamido-triptamina (5-CT), N,N-dipropil-5-carboxamido-triptamina (DP-5-CT), ipsapirona, 2-[[[2-(2,6-dimetoxifenoxi)-etil]-amino]-metil]-1,4-benzodioxano (WB 4101), ergotamina, buspirona, metergolina, espiroxatrina, 1-[2-(4-aminofenil)-etil]-4-(3-trifluorometilfenil)-piperazina (PAPP), éster isopropílico do ácido 4-(3-terc-butil-amino-2-hidroxipropoxi)-indol-2-carbónico (SDZ(-)21009) e butotenina.

10. Preparação farmacêutica de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 ou 3 a 9, caracterizada pelo facto de conter um ou vários veículos aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico.
11. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 2 a 9, caracterizado pelo facto de se combinar com a primeira e a segunda composições um ou vários veículos aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico.
12. Utilização do interferão α e de um agonista dos receptores H_2 ou $5-HT_{1A}$ para a preparação de uma composição farmacêutica sinérgica para o tratamento de uma doença neoplásica ou de uma infecção

Lisboa, 5 de Julho de 2000

O Agente Oficial da Propriedade Industrial



JOSÉ DE SAMPAIO

A.O.P.I.

Rua do Salitre, 195, r/c-Drt.
1250 LISBOA

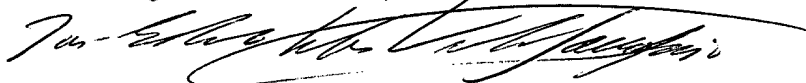
Resumo

“Preparação para activar as células aniquiladoras naturais (células AN), em que a referida preparação contém interferão α e histamina, serotonina ou substâncias com a correspondente actividade receptorial”

Preparação farmacêutica para activar as células aniquiladoras naturais (células AN), por exemplo, para tratar tumores ou infecções virais, a qual compreende uma primeira composição que contém o interferão α , ou os seus análogos, conjuntamente com uma segunda composição que contém pelo menos uma substância que possui actividade agonista dos receptores H_2 ou $5-HT_{1A}$, por exemplo, histamina ou serotonina. A primeira e a segunda composições podem ser misturadas numa única preparação ou fornecidas em doses separadas.

Lisboa, 5 de Julho de 2000

O Agente Oficial da Propriedade Industrial



JOSÉ DE SAMPAIO

A.G.P.I.

Rua do Salitre, 195, r/c-Drt.
1250 LISBOA

FIG. 1

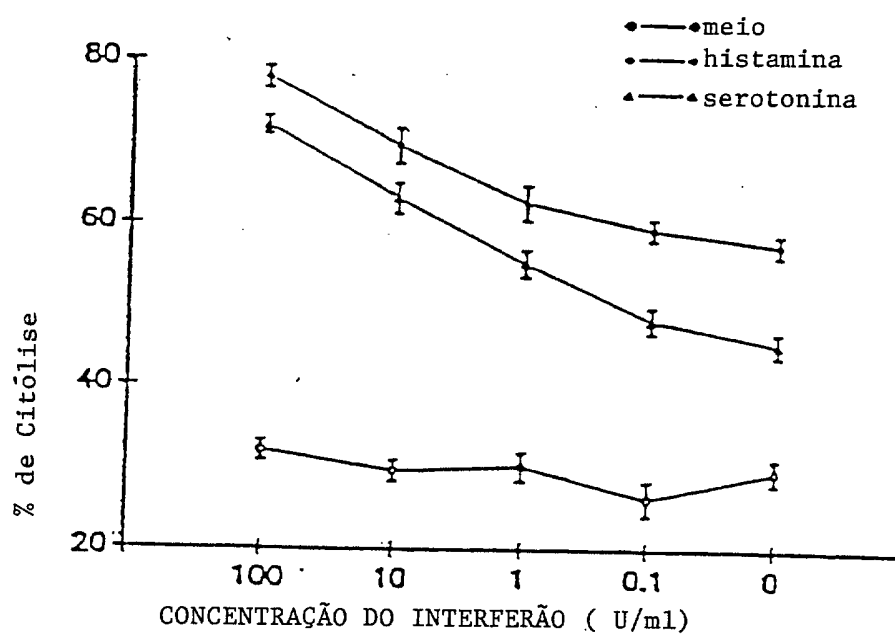


FIG. 2

