



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0902242-2 A2**

(22) Data de Depósito: 30/06/2009  
(43) Data da Publicação: 09/03/2011  
(RPI 2096)



\* B R P I 0 9 0 2 2 4 2 A 2 \*

**(51) Int.Cl.:**  
A61K 31/4164  
A61K 31/381  
A61K 31/17  
A61K 31/18  
A61P 19/02  
A61P 29/00  
A61P 37/06

(54) Título: **COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO AGONISTA DO RECEPTOR MAS DA ANGIOTENSINA (1-7) E SEU USO PARA A MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E/OU ANALGÉSICA**

(73) Titular(es): Universidade Federal de Minas Gerais

(72) Inventor(es): Kátia Daniela da Silveira, Mauro Martins Teixeira, Robson Augusto Souza dos Santos

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO AGONISTA DO RECEPTOR MAS DA ANGIOTENSINA (1-7) E SEU USO PARA A MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E/OU ANALGÉSICA. A presente invenção proporciona o uso de agonistas do receptor Mas da Angiotensina (1-7), como alternativa farmacológica e terapêutica no contexto das doenças inflamatórias, como a artrite reumatóide. A invenção proporciona composições compreendendo angiotensina(1-7), seus análogos peptídicos ou não peptídicos, ou um sal, solvato e/ou hidrato farmacologicamente aceitável e seu uso na preparação de medicamentos, para a modulação da resposta inflamatória e/ou analgésica. Entre outros, os efeitos antiinflamatórios dos agonistas do receptor Mas de angiotensina (1-7), em especial do AVE 0991, inibem importantes parâmetros da resposta inflamatória no modelo de artrite induzida por mBSA. A presente invenção proporciona ainda uma nova abordagem de constituintes do SRA, como o eixo ECA2/Ang(1-7)/Mas, associados a eventos específicos da cascata da resposta inflamatória.



## COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO AGONISTA DO RECEPTOR MAS DA ANGIOTENSINA (1-7) E SEU USO PARA A MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E/OU ANALGÉSICA

### 5 Campo da Invenção

A presente invenção está no campo dos produtos e processos farmacêuticos. Em seu aspecto mais geral, se refere ao uso de agonista do receptor Mas da Angiotensina (1-7), como angiotensina(1-7), seus análogos peptídicos ou não peptídicos, ou um sal, solvato e/ou hidrato farmaceuticamente aceitável como alternativa farmacológica e terapêutica no contexto das doenças inflamatórias, como a artrite reumatóide. A invenção proporciona composições compreendendo agonistas do receptor Mas da Angiotensina (1-7), seu uso na preparação de medicamentos para modulação e diagnóstico da resposta inflamatória e/ou analgésica. Entre outros, os efeitos antiinflamatórios dos agonistas do receptor Mas de angiotensina (1-7), em especial o AVE 0991, inibem importantes parâmetros da resposta inflamatória no modelo de artrite induzida por mBSA (albumina bovina metilada). A presente invenção proporciona ainda uma nova abordagem de constituintes do SRA, como o eixo ECA2/Ang(1-7)/Mas, associados a eventos específicos da cascata da resposta inflamatória.

### Antecedentes da Invenção

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica sistêmica de base auto-imune que afeta aproximadamente 1% da população mundial e acomete com maior frequência as mulheres adultas. A AR se inicia com o processo proliferativo da membrana sinovial, causando erosão da cartilagem articular e destruição do osso subjacente, sendo caracterizada pelo infiltrado celular de neutrófilos, células T, células B e macrófagos na membrana sinovial e nos espaços peri-articulares. O acúmulo de neutrófilos na cavidade articular é uma característica marcante inflamação articular, pois estas células regulam e

compõem tanto a resposta inflamatória aguda como a crônica [ver Wipke, BT e Allen, PM. *J Immunology*, 167 (3): 1601-1608 (2001)].

As citocinas participam do recrutamento de neutrófilos em várias condições inflamatórias, incluindo a AR. A importância das citocinas e quimiocinas na fisiopatologia da AR foi demonstrada tanto em humanos como em modelos experimentais [ver Feldmann *et al.*, *Annual review of immunology*, 14, 397 (1996)].

As interleucinas 1 e 8 (IL-1, IL-8) e o Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), têm sido encontradas no líquido sinovial de pacientes com artrite. Embora os modelos experimentais não mimetizem a complexidade da AR humana, no modelo de artrite induzida por antígeno (AIA), que utiliza albumina bovina metilada (mBSA) como antígeno protéico e adjuvante completo de Freund (CFA), muitas das características histopatológicas, como o intenso influxo de neutrófilos, exsudato inflamatório articular e formação de panus, são semelhantes à doença humana.

A IL-1 e o TNF- $\alpha$  são citocinas produzidas por uma variedade de células como os monócitos e os macrófagos e tem sido atribuído a estas citocinas importantes papéis na imunomodulação e em condições fisiopatológicas como a inflamação. Uma das principais atividades biológicas da IL-1 inclui a ativação de células T, estimulação da produção de prostaglandinas, indução de febre e quimiotaxia de neutrófilos. A inapropriada produção de IL-1 pode implicar no surgimento ou na manutenção do quadro agudo ou crônico de doenças inflamatórias como a artrite reumatóide.

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória que possui papel chave em diversos processos, como inflamação, imunomodulação, crescimento, angiogênese e citotoxicidade [ver Taylor *et al.*, *Current Opinion in biotechnology*, 15(6): 557-563, (2004)]. Ela induz o aumento da expressão das moléculas de adesão tanto em PMN circulantes, quanto em células endoteliais. Estimula a síntese de outras citocinas, ativando células endoteliais, fibroblastos, osteoclastos e condrócitos. O TNF- $\alpha$  também participa na migração de neutrófilos em modelos de reação inflamatória, tais como artrite induzida por

colágeno, e em doenças inflamatórias humanas como a doença inflamatória intestinal e a AR.

A quimiocina KC (homóloga murina da IL-8 humana) tem sido demonstrada como um fator quimiotático para linfócitos T, basófilos e principalmente para neutrófilos. Ela pode ser produzida por células mononucleares, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais. A sua produção por estas últimas células é induzida por IL-1 e TNF- $\alpha$ . Doenças caracterizadas por uma significativa infiltração de neutrófilos, como a AR, têm sido associadas ao aumento da produção de KC. Visto que a capacidade de KC em aumentar a expressão de moléculas como Mac-1 sobre a superfície de neutrófilos promove o aumento da adesão desse leucócito ao endotélio vascular.

A neutralização de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, TNF- $\alpha$  e KC por receptores solúveis ou anticorpos monoclonais é uma estratégia clínica comumente empregada no tratamento de pacientes com AR. Entretanto, o envolvimento de quimiocinas no modelo de AIA ainda não está bem elucidado. Apesar da relevância clínica, o tratamento da hiperalgesia articular ainda é limitado. Mesmo com diferentes formas para induzir artrite em ratos e camundongos, como carragenina, zymosan, colágeno tipo II e mBSA, os modelos que permitem o estudo da hipernocicepção articular são limitados.

O sistema renina-angiotensina (SRA) é classicamente conceituado como uma cascata hormonal com ações voltadas para o controle das funções cardiovasculares, renais e adrenais, controlando o balanço de fluidos e eletrólitos, e também os níveis da pressão arterial. Esse controle era atribuído, exclusivamente às ações da Angiotensina II (Ang II).

A Ang II exerce muitos dos efeitos biológicos do SRA, através a ativação do receptor AT1, um receptor de sete domínios transmembrânicos acoplado à proteína G. Dentre os efeitos decorrentes dessa ativação, destacam-se: vasoconstrição, retenção de sódio (relacionada à produção de aldosterona), retenção de água (relacionada à liberação de vasopressina), hipertrofia celular, fibrose, inotropismo/contratilidade, cronotropismo/arritmia, formação de

superóxido, ativação do sistema nervoso simpático, secreção de endotelinas, etc. A Ang II também pode se ligar ao receptor AT<sub>2</sub>, que também é um receptor de membrana, os efeitos da sua ativação podem ser opostos aos da ativação de AT<sub>1</sub>: promove diferenciação celular, reparo tecidual, apoptose, vasodilatação, inibição do crescimento celular e efeitos anti-proliferativos.

Contudo, há um corpo crescente de evidências documentando o envolvimento da Ang II em doenças inflamatórias. Levando-se em conta o perfil dos principais parâmetros desencadeados nessas patologias (recrutamento de células inflamatórias associadas com a liberação de citocinas para o local da inflamação) somado aos efeitos observados até então a partir da utilização de agentes do SRA. Estudos demonstram, inclusive, a presença de constituintes do sistema renina-angiotensina em células inflamatórias [ver Owen, CA e Campbel EJ, *J Immunol*, 160, 1436 (1998)].

Outras enzimas também têm a habilidade de formar a Ang II a partir de Ang I. Ambas, Ang I e Ang II são susceptíveis à ação de peptidases. A ação dessas peptidases produz fragmentos menores de angiotensinas como a Ang III, 2-8 peptídeos; Ang IV, 3-8 peptídeos; Ang 1-7, etc, encontrados na circulação ou no tecido.

A angiotensina-(1-7) é um desses “fragmentos” de angiotensina, que por muito tempo foi descrito como um produto inativo do sistema renina-angiotensina. O significado biológico desses novos peptídeos tem sido investigado há pouco tempo por vários grupos de pesquisa. Isso porque os recentes avanços na biologia celular e molecular, bem como as novas estratégias farmacológicas e fisiológicas têm produzido novos conceitos sobre as ações do SRA.

Dentre as recentes descobertas que produziram alterações conceituais de fundamental importância para relacionadas à Ang-(1-7), destaca-se a identificação da ECA<sub>2</sub> (enzima conversora da angiotensina I 2) como uma importante enzima formadora de Ang-(1-7) [ver Donoghue *et al.*, *Circ Res*, 87, E1–E9 (2000)] e a identificação do receptor acoplado a proteína G, Mas, como

um receptor de Ang-(1-7) (ver Santos *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 8258 (2003)].

A ativação do receptor Mas pela Ang-(1-7) têm efeitos antagônicos àqueles promovidos pela Ang II via ativação de receptor AT1, dentre estes efeitos pode-se destacar: vasodilatação, anti-arritmogênico, redução de fibrose, redução da proliferação celular, redução da hipertrofia entre outros. Levando-se em conta tais efeitos da Ang-(1-7), pode-se afirmar que ela também é um importante mediador do sistema renina-angiotensina. De maneira geral esta invenção é dirigida justamente para esta nova abordagem do SRA e de seus constituintes, mediando outras condições fisiopatológicas do organismo, como a inflamação e às doenças associados a processos inflamatórios. Deixando para o passado a visão clássica de um sistema unidirecional e promovendo uma visão, ainda panorâmica, de um sistema mais complexo que funciona embasado em dois eixos opostos: o principal, responsável pela maioria das ações deste sistema – o eixo ECA - Ang II - AT1, e o segundo, um eixo contra-regulatório – ECA2 - Ang - (1-7) – Mas.

AVE 0991, 5-formyl-4-methoxy-2-phenyl-1[[4-[2-ethylaminocarbonylsulfonamido)-5-isobutyl-3-thienyl]-phenyl]-methyl]-imidazole, é um derivado imidazol substituído e análogo da Ang (1-7). AVE 0991 mimetiza os efeitos da Ang - (1-7) em vários órgãos, e a sua identificação como um agonista do receptor Mas viabilizou estudos e possibilidades terapêuticas no tratamento de doenças cardiovasculares (Wiemer, G. *et al* "AVE 0991, a Nonpeptide Mimic of the Effects of Angiotensin-(1-7) on the endothelium" *Hypertension*, Dec. 2002; Santos RAS & Ferreira, AJ. "Pharmacological Effects of AVE 0991, a Nonpeptide Angiotensin-(1-7) Receptor Agonist" *Cardiovascular Drug Reviews*, Vol. 24, No. 3-4, pp. 239-246, 2006; Lemos, V. *et al* "The Endothelium-Dependent Vasodilator Effect of the Nonpeptide Ang(1-7) Mimic AVE 0991 Is Abolished in the Aorta of Mas-Knockout Mice" *J Cardiovasc Pharmacol*. Volume 46, Number 3, September 2005; Ferreira, AJ *et al* "The nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist AVE-0991 attenuates heart failure induced by myocardial infarction", *Am J Physiol Heart*

*Circ Physiol* 292: H1113–H1119, 2007; Toda, N. *et al* “Interaction of Endothelial Nitric Oxide and Angiotensin in the Circulation” *Pharmacological Reviews*, Vol. 59, No. 1, 2007). Entretanto, ao conhecimento dos presentes inventores, era até então inédita sua aplicabilidade no contexto das doenças inflamatórias, e especificamente nesta invenção na AIA.

A literatura patentária contempla alguns documentos relacionados ao uso de AVE0991, porém sem antecipar ou sequer sugerir os objetos da presente invenção.

O pedido internacional de patente WO 2008/089532, depositado pela Universidade Federal de Minas Gerais, Biolab Sanus, União Química e Farmacêutica Nacional e Biosintética Farmacêutica, revela o uso de Ang (1-7), um agonista de receptor Ang (1-7) e/ou um análogo de Ang (1-7) no tratamento da disfunção erétil. Apesar de citar o uso de AVE 0991, a invenção do referido documento é destinada a resolver outro problema técnico.

O pedido internacional de patente WO 2007/000036, depositado pela Universidade Federal de Minas Gerais, revela o uso de agonistas e antagonistas de receptor Mas acoplado à proteína G como moduladores da atividade apoptótica, sendo, portanto, útil no estudo prevenção e tratamento de doenças. Um dos exemplos citados é uso de Ang (1-7) ou análogos, agonistas ou antagonistas. Além de ser destinada a resolver outro problema técnico, a invenção do referido documento não cita o uso de AVE 0991.

O pedido internacional de patente WO 2002/080910, depositado pela Universidade Federal de Minas Gerais, revela formulações compreendendo antagonistas de receptor Angiotensina II AT1 em combinação com ciclodextrinas e derivados, visando o tratamento de hipertensão arterial. Além de ser destinada a resolver outro problema técnico, a invenção do referido documento não cita o uso de AVE 0991.

### **Sumário da Invenção**

A presente invenção tem como conceito inventivo o uso de agonista do receptor Mas da Angiotensina (1-7), como angiotensina(1-7), seus análogos

peptídicos ou não peptídicos, ou um sal, solvato e/ou hidrato farmacêuticamente aceitável como modulador da resposta inflamatória e/ou analgésica em vertebrados.

5 Em um aspecto, sendo, portanto, um dos objetos da invenção, são reveladas composições compreendendo agonistas do receptor Mas da Angiotensina (1-7), como alternativa farmacológica e terapêutica no contexto das doenças inflamatórias. Em um aspecto preferencial, as composições da presente invenção são potencialmente úteis no tratamento prevenção ou diagnóstico da artrite reumatóide.

10 Em outro aspecto, sendo, portanto, outro dos objetos da invenção, é revelado o uso de agonista do receptor Mas da Angiotensina (1-7), como angiotensina(1-7), seus análogos peptídicos ou não peptídicos, ou um sal, solvato e/ou hidrato farmacêuticamente aceitável na preparação de medicamentos úteis para a modulação da resposta inflamatória e/ou  
15 analgésica. Em um aspecto preferencial, os efeitos antiinflamatórios dos agonistas do receptor Mas de angiotensina (1-7), em especial o AVE 0991 inibem importantes parâmetros da resposta inflamatória no modelo de artrite induzida por mBSA. Em um aspecto preferencial, o uso do AVE 0991 proporciona influência sobre a interação *in vivo* de leucócitos circulantes ao  
20 endotélio sinovial da microvasculatura do joelho durante os processos de rolamento e adesão celular no modelo de artrite induzida por mBSA. Em um outro aspecto preferencial, o uso de AVE 0991 proporciona influência sobre a percepção do estímulo de hipernocicepção e sobre a pressão arterial sistólica no modelo de artrite induzida por mBSA.

25 Estes e outros objetos da presente invenção serão valorizados a partir da descrição detalhada a seguir.

### **Breve Descrição das Figuras**

A figura 1 representa a fórmula estrutural do **AVE 0991** (podendo também ser referida simplesmente como AVE): 5-formil-4-metoxi-2-fenil-1[[4-[2-  
30 etilaminocarbonilsulfonamido)-5-isobutil-3-tienil]-fenil]-metil]-imidazol.

A figura 2 representa o efeito do tratamento com o agonista do receptor de angiotensina (1-7), AVE 0991, na migração de células totais (A), e de neutrófilos para o espaço articular (B) e na migração de neutrófilos para os tecidos peri-articulares (C). Os animais foram imunizados com mBSA+adjuvante de Freund e 14 dias depois, desafiados e tratados. O grupo controle não foi desafiado nem recebeu qualquer tratamento, o grupo veículo foi desafiado e recebeu NaCl 0,9% e os grupos AVE 0991 receberam diferentes concentrações do composto: 0,6mg/kg, 3,0 mg/kg e 15mg/kg (i.p.), duas vezes: 30 minutos antes e 6 horas após o desafio (10µL de mBSA). As análises foram realizadas 24 horas após o desafio. Os resultados foram expressos como média ± EPM. (\*): médias diferem do grupo veículo e (#): médias diferem do grupo controle. Para ambas as comparações, foi considerado o critério estatístico  $p < 0,05$ . A análise utilizada foi ANOVA, seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls.

A figura 3 representa o efeito do tratamento com o agonista do receptor de Angiotensina (1-7), AVE 0991, sobre os níveis de  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$  e KC nos tecidos peri-articulares de animais submetidos a um modelo de artrite induzida por mBSA. As concentrações das citocinas  $TNF\alpha$  (A),  $IL-1\beta$  (B) e KC (C) foram avaliadas por ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Os animais do grupo controle foram imunizados com mBSA e desafiados com PBS e os animais do grupo tratado foram desafiados e imunizados com mBSA seguido por tratamento com AVE 0991 3mg/kg. Uma dose de 3mg/kg de AVE 0991 foi administrada (i.p.) 30 minutos antes do desafio e outra dose 6 horas após. Os resultados foram expressos como média ± EPM. (\*): médias diferem do grupo veículo e (#): médias diferem do grupo controle. Para ambas as comparações, foi considerado o critério estatístico  $p < 0,05$ . A análise utilizada foi ANOVA, seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls.

A figura 4 representa o efeito do tratamento com o agonista do receptor de Angiotensina (1-7), AVE 0991, sobre a interação dos leucócitos com o endotélio sinovial de animais submetidos a um modelo de artrite induzida por mBSA. AVE 0991 (3mg/kg, i.p.) ou NaCl (0,9% i.p.) foram administrados 30

minutos antes da avaliação do fluxo sanguíneo sinovial pela técnica de microscopia intravital. O rolamento (A) e a adesão (B) dos leucócitos ao longo do endotélio sinovial foram avaliados 24 horas após o desafio dos animais previamente imunizados com mBSA. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. (\*): médias diferem do grupo veículo (#): médias diferem do grupo controle. Para ambas as comparações, foi considerado o critério estatístico  $p < 0,05$ . A análise utilizada foi ANOVA, seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls.

A figura 5 representa o efeito do tratamento com o agonista do receptor de Angiotensina (1-7), AVE 0991, sobre  $\Delta$  do limiar do estímulo de hipernocicepção, sobre o  $\Delta$  da pressão arterial sistólica e o índice de acometimento histológico em um modelo de artrite induzida por mBSA. A intensidade de hipernocicepção foi quantificada a partir da utilização do teste de pressão, utilizando-se um anesthesiômetro, onde concentrações crescentes de AVE 0991 foram avaliadas: 0,6mg/kg, 3,0mg/kg e 15mg/kg (A). O gráfico B representa a diferença de pressão arterial sistólica resultante da subtração da pressão pré-tratamento (avaliada anteriormente ao desafio) da pressão pós-tratamento (24 horas após o desafio). O método utilizado foi de pletismografia de cauda. O grau de lesão articular foi quantificado a partir da utilização de um índice (C). As articulações foram obtidas 24 horas após o desafio, processadas e coradas com Hematoxilina & Eosina para avaliação microscópica. Uma dose de 3mg/kg de AVE 0991 foi administrada (i.p.) 30 minutos antes do desafio e outra dose 6 horas após. Os animais do grupo controle foram imunizados com mBSA e desafiados com PBS e, os animais do grupo veículo e do grupo tratado com AVE 3mg/kg foram imunizados e desafiados com mBSA. As análises foram realizadas 24 horas após o desafio. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. (\*): médias diferem do grupo veículo (#): médias diferem do grupo controle. Para ambas as comparações, foi considerado o critério estatístico  $p < 0,05$ . A análise utilizada foi o teste t de Student ou ANOVA, seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

A presente invenção tem como conceito inventivo o uso do AVE 0991 como modulador da resposta inflamatória e/ou analgésica em vertebrados.

São reveladas composições compreendendo AVE 0991, um agonista do receptor Mas da Angiotensina (1-7), como alternativa farmacológica e terapêutica no contexto das doenças inflamatórias. Em um aspecto preferencial, as composições da presente invenção são potencialmente úteis no tratamento curativo ou profilático da artrite reumatóide.

É também revelado o uso de pelo menos um agonista do receptor Mas da Angiotensina (1-7) compreendendo angiotensina(1-7), seus análogos peptídicos ou não peptídicos, ou um sal, solvato e/ou hidrato farmacologicamente aceitável do mesmo na preparação de medicamentos úteis para a modulação da resposta inflamatória e/ou analgésica. Em um aspecto preferencial, os efeitos antiinflamatórios do análogo não peptídico, AVE 0991 inibem importantes parâmetros da resposta inflamatória no modelo de artrite induzida por mBSA. Em um aspecto preferencial, o uso do AVE 0991 proporciona influência sobre a interação *in vivo* de leucócitos circulantes ao endotélio sinovial da microvasculatura do joelho durante os processos de rolamento e adesão celular no modelo de artrite induzida por mBSA. Em um outro aspecto preferencial, o uso de AVE 0991 proporciona influência sobre a percepção do estímulo de hipernocicepção e sobre a pressão arterial sistólica no modelo de artrite induzida por mBSA.

Os exemplos a seguir ilustram, mas não limitam, as formas preferenciais de concretizar a invenção.

Revedo os trabalhos que estudam a implicação do sistema renina-angiotensina com o processo inflamatório local, pôde-se verificar uma expressiva participação desse sistema na regulação da migração de células inflamatórias, na produção e liberação de citocinas e na modulação direta de importantes vias de sinalização intracelular que culminam nas respostas inflamatórias. Estas respostas foram observadas *in vivo*, nos tecidos renal, cardíaco, pulmonar e vascular, e *in vitro*, em algumas culturas de células;

outros poucos estudos em humanos. São raros os trabalhos avaliando a participação da Ang-(1-7), menos ainda do agonista do seu receptor, o AVE 0991, nos processos inflamatórios. Indiscutivelmente, o papel da Ang II tem sido mais bem explorado e mais bem compreendido. Pode-se dizer, resumidamente, que Ang II tem um efeito pró-inflamatório quando ligada ao seu receptor AT1. Por outro lado, alguns estudos têm avaliado o papel de uma importante enzima envolvida na formação das angiotensinas: ECA 2. Estes estudos demonstram um papel protetor dessa enzima na inflamação. ECA 2 é a principal enzima formadora de Ang-(1-7), logo a melhora dos parâmetros inflamatórios pode ser um efeito indireto da ECA2, possivelmente diretamente relacionado ao aumento da concentração local da Ang-(1-7).

Considerando-se que ECA2-Ang-(1-7)-Mas é o eixo contra-regulatório do SRA, podemos concluir que existem evidências suficientes que sustentem a hipótese de que a ativação do receptor Mas, quer pela Ang-(1-7) quer pelo AVE 0991, seja capaz de exercer efeitos anti-inflamatórios potentes.

O alvo de interesse desta invenção é a artrite reumatóide, doença inflamatória crônica, que acomete uma grande parcela da população, na qual os sintomas evoluem muitas vezes para incapacitação funcional do paciente gerando gastos financeiros altíssimos aos governos. Além disto, os tratamentos disponíveis até a atualidade são bastante limitados e pouco eficientes.

Levando-se em conta o perfil das principais respostas inflamatórias desencadeadas nessa patologia (recrutamento de células inflamatórias associada com a liberação de citocinas para o local da inflamação) somado aos efeitos observados até então a partir da utilização de agentes do SRA, verificamos que há uma coincidência de alvos: migração celular e liberação de citocinas. Há um potencial terapêutico à vista para artrite reumatóide envolvendo o SRA, como verificado recentemente por alguns poucos pesquisadores avaliando modelos animais e também dados em humanos.

O primeiro passo neste sentido foi demonstrar a existência de componentes do SRA no tecido sinovial humano. [ver Walsh *et al.*, *J Pharmacol*, 112, 435 (1994)] demonstraram aumentos dos níveis de enzima

conversora da angiotensina (ECA) e do receptor AT1 em amostras de sinóvia de pacientes com artrite reumatóide. Posteriormente, em um modelo murino de artrite induzido por colágeno, a utilização de inibidores da ECA promoveu benefícios terapêuticos para os animais, diminuindo a inflamação articular [ver Dalbeth *et al.*, *Rheumatology*, 44(1), 24 (2005)]. Em um estudo mais recente, Price *et al.*, *Arthritis & Rheumatism*, 56(2),441 (2007), demonstraram que o bloqueio do receptor de Ang II com o antagonista seletivo do receptor AT1, Losartan, atenuou a inflamação de forma dose-dependente em humanos e em modelo animal, ocorrendo diminuição de edema articular e da quantidade de TNF $\alpha$  local. Não foram encontrados relatos de estudos, em modelos animais ou em humanos, avaliando a participação do eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas na artrite reumatóide. Desta forma, será abordado abaixo o efeito da ativação do receptor Mas através da utilização do agonista não-peptídico, AVE 0991, em um modelo de artrite induzido por mBSA em camundongos, mas sem limitação do escopo de proteção.

### **Exemplos de testes biológicos**

Para avaliação dos efeitos do tratamento *in vivo* com o AVE 0991 foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 com idade entre 8-10 semanas. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo respectivo Comitê de Ética.

#### **Exemplo 1**

##### **Procedimento de imunização e desafio com mBSA- (Modelo de artrite induzida por antígeno)**

Camundongos C57BL/6 foram imunizados, através de injeção por via subcutânea (s.c.), com uma emulsão contendo 200 $\mu$ L de volumes iguais de PBS e adjuvante completo de Freund (CFA), na qual foi dissolvida 500  $\mu$ g de mBSA. No 14<sup>o</sup> dia após a imunização com mBSA/CFA, os animais foram desafiados com mBSA (10  $\mu$ g/cavidade) através de injeção intra-articular (articulação fêmur-tibial).

**Avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade articular**

Após 24h do desafio, os camundongos foram anestesiados com uma mistura de cetamina, 150 mg/Kg e xilazina, 10 mg/ Kg e sacrificados. Para avaliar a migração de neutrófilos para a cavidade articular, foi realizado um lavado intra-articular. Este procedimento consistiu em injetar 20µL de uma solução de albumina bovina 3% na cavidade articular, lavando-a três vezes para que uma amostra das células presentes no interior da cavidade fosse coletada juntamente com a solução de albumina recapturada com uma pipeta. Este lavado de células da articular foi diluído em 180 µL de albumina bovina 3% para a posterior contagem total e diferencial dos leucócitos.

**Contagem total dos leucócitos**

Alíquotas de 30µL do lavado articular foram diluídas em 60µL de solução Turk, sendo a contagem total dos leucócitos realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 100x) e contador manual. O número total de leucócitos foi utilizado para cálculo da percentagem dos diferentes leucócitos após a contagem em lâminas preparadas por citocentrifugação.

**Contagem diferencial dos leucócitos**

As lâminas para contagem diferencial foram preparadas por citocentrifugação de uma alíquota de 70µL do lavado articular (citospin; Shandon Lipshaw Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA). As lâminas foram coradas segundo a técnica de coloração de May-Grumwald e giemsa. As células foram examinadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1.000x) usando os critérios morfológicos padrões para diferenciar os tipos celulares. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos x 10<sup>4</sup>/ cavidade articular.

**Atividade da mieloperoxidase (MPO)**

Para avaliar o acúmulo de neutrófilos no tecido periarticular do joelho, foi utilizado o método de quantificação da atividade de MPO como descrito

previamente (DE MATOS e col., 2001). Em suma, o componente residual (pellet) foi ressuspensionado em 5% salina EDTA (Buffer 1) submetido à homogeneização e centrifugação (10.000g, 10 minutos). O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspensionado em 1,5 mL de NaCl 0.2% gelado e 1,5  
5 mL de NaCl 1.6% com glicose 5% gelada para cada 100 mg de tecido. Realizou-se nova centrifugação 10.000g por 10 minutos. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em tampão fosfato com HETAB (Buffer 2) e re-homogeneizado por 30 segundos. As amostras foram congeladas e descongeladas seguidamente (3 vezes) em nitrogênio líquido,  
10 submetidas novamente a centrifugação (10.000g, 15 minutos) e o sobrenadante coletado para ensaio de MPO. As amostras do tecido periarticular foram diluídas três vezes antes do ensaio. Em seguida foram adicionadas as amostras (25µl/poço). Foi adicionado 25µl/poço de tetrametilbenzeno (TMB) a 1,6 mM e incubado a 37°C por 5 minutos, em  
15 seguida foi adicionado 100µl/poço de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,002%) e a reação foi parada com ácido sulfúrico 1M. A atividade da MPO das amostras foi detectada por colorimetria em um leitor de ELISA (450 nm). Os resultados foram expressos como número total de neutrófilos (Unidades Relativas) por comparação da O.D. do sobrenadante do tecido com neutrófilos do pulmão de camundongos  
20 processados da mesma maneira.

A Tabela 1 representa os resultados do exemplo 1 que se refere ao efeito do tratamento com o agonista do receptor de Ang-(1-7), AVE 0991 na migração de células para a cavidade e para o tecido peri-articular no modelo de artrite induzida por mBSA.

**Tabela 1. Efeito do AVE 0991 na migração de células totais para a cavidade articular e, neutrófilos para a cavidade e tecido peri-articular no modelo de artrite induzida por mBSA.**

	Controle	Veículo	AVE 0,6mg/kg	AVE 3mg/kg	AVE 15mg/kg
N <sup>o</sup> células totais x 10 <sup>4</sup> cav. articular	3,0±1,7	76,5±23,4	42,6±12,7	56,4±7,2	39,0±6,4
N <sup>o</sup> neutrófilos x 10 <sup>4</sup> / cav. articular	0,60±0,27	21,65±4,61	9,53±3,22	11,35±0,70	10,25±1,75
Neutrófilos (Unidades Relativas)	0,03±0,01	0,67±0,07	0,59±0,08	0,47±0,07	0,18±0,04

Os resultados foram expressos como média ± EPM. (\*): médias diferem do grupo veículo e (#): médias diferem do grupo controle. Para ambas as comparações, foi considerado estatístico  $p < 0,05$ . A análise utilizada foi ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

Nos experimentos em questão, os animais imunizados e desafiados com mBSA (10µg/cavidade) apresentaram um expressivo aumento no número total de células inflamatórias para a cavidade articular afetada. Tal aumento não foi alterado pelo tratamento com o agonista do receptor da Ang (1-7), AVE 0991, conforme observado na figura 2A. Entretanto, quando se avaliou especificamente a migração de neutrófilos para a cavidade, verificou-se que o AVE 0991 reduziu, significativamente, o influxo de neutrófilos para o sítio inflamatório nas três concentrações avaliadas, 0,6 mg/kg, 3,0mg/Kg e 15mg/kg (fig. 2B). O mesmo efeito de redução da migração de neutrófilos foi verificado nos tecidos adjacentes à articulação, ocorrendo, no entanto, um efeito dose-dependente em resposta ao uso do AVE 0991 (fig.2C). Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média e estão reunidos na tabela 1.

## Exemplo 2

### Análise histopatológica

A região da articulação fêmur-tibial foi removida cirurgicamente e dissecada mantendo-se o invólucro muscular. Os espécimes obtidos foram  
5 fixados em formol 10% tamponado durante 24 horas. Inicialmente, as amostras foram lavadas em água corrente e desmineralizadas em solução de EDTA 10%, ph 7.2, em temperatura ambiente, por um período de três semanas. Em seguida, as peças foram novamente lavadas em água corrente, desidratadas em banhos de álcool 70%, 80%, 90% e álcool absoluto; diafanizadas em xilol e  
10 incluídas em parafina. O material foi seccionado em micrótomo RM2125RT (Leica, Heerbrugg, St. Gallen, Switzerland) obtendo-se cortes consecutivos de 5 µm, que foram corados pela técnica da Hematoxilina & Eosina (HE).

A avaliação histopatológica da articulação dos animais permitiu quantificar o grau de acometimento da articulação a partir da utilização de  
15 *score* que levava em consideração a ocorrência de hiperplasia sinovial, presença de exudado celular, comprometimento da cartilagem ou de estruturas ósseas e da intensidade do infiltrado sinovial. Através de um índice, pôde-se determinar claramente que as estruturas articulares dos animais tratados com o AVE 0991 na dose de 3 mg/kg apresentaram melhora em relação ao grupo não  
20 tratado (Fig. 5A). Intenso infiltrado peri-articular e desorganização e hiperplasia sinovial foram observados nas articulações dos animais do grupo veículo quando comparado com os controles. Por outro lado, os animais tratados com 3mg/kg de AVE 0991, apresentaram uma significativa redução do infiltrado inflamatório, bem como uma preservação da sinóvia, apresentando apenas  
25 pequenas áreas de hiperplasia focal.

A figura 5 representa os resultados obtidos do exemplo 2 que se refere a análise histopatológica da articulação fêmur-tibial de animais submetidos ao modelo de artrite induzida por mBSA.

### Determinação de citocinas por ELISA

O tecido periarticular do joelho foi retirado para realização do ensaio de ELISA e da atividade da mieloperoxidase (MPO). O tecido foi pesado, e em seguida foi colocada a solução de extração de citocinas (1mL da para cada 100mg de tecido). Após homogeneização e centrifugação (10.000g, 10 minutos, 4°C). Foi retirado o sobrenadante para o ensaio de ELISA e usado a fração residual decantada para o ensaio de MPO. Os kits para ELISA de camundongo para TNF- $\alpha$ , KC e IL1- $\beta$  foram obtidos da R&D Systems (DuoSet) e utilizados de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante. Brevemente, as concentrações das citocina e quimiocinas (TNF- $\alpha$ , KC e MIP-2) foram avaliadas no sobrenadante de tecido peri-articular diluídas 1:3 em PBS:BSA1%. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100  $\mu$ l/poço de uma solução contendo concentração adequada do anticorpo captura específico. Essa solução permaneceu em contato com a placa durante 18 h a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas (4 vezes) com tampão de lavagem (PBS/Tween 0,1%) em um lavador de placas automático. Logo após, foram adicionados 200  $\mu$ l/poço da solução de bloqueio contendo 1% de albumina de soro bovino em PBS. O tempo de bloqueio foi de no mínimo 1 hora. Em seguida, foram adicionados aos padrões de citocinas em concentração conhecida e as amostras (50 $\mu$ l/ poço). Dezoito horas após a incubação a 4°C, as placas foram lavadas, sendo adicionados 100  $\mu$ l de uma solução de anticorpo de detecção, seguida de incubação de 1 h. Transcorrido esse período e após lavagem, foi adicionado à placa uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase R&D Systems (DuoSet). Após 30 min, a placa foi novamente lavada, sendo adicionado o tampão substrato contendo o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck). A reação foi parada com ácido sulfúrico 1M. O produto de oxidação do OPD foi detectado por colorimetria em um leitor de placas de ELISA no comprimento de onda de 492 nm.

Às 24 horas subseqüentes ao desafio, os tecidos periarticulares continham elevados níveis de citocinas inflamatórias quando comparados aos animais controle. TNF $\alpha$  aumentou de 75,50 $\pm$ 30,2 pg/100mg de tecido, nos animais controle, para 206,25 $\pm$ 25,7 pg/100mg de tecido, no grupo veículo

(fig.3A). A quimiocina KC aumentou de  $547,70 \pm 62,9$  pg/100mg de tecido, no grupo controle, para  $1836,24 \pm 204,6$  pg/100mg de tecido, no grupo veículo (fig.3C). Além destas, o nível de IL-1 também foi regulado, aumentou de *n.i* pg/100mg de tecido, no grupo controle, para  $1204 \pm 97,7$  pg/100mg de tecido, no grupo veículo (fig 3B).

O tratamento com o agonista da Ang-(1-7) foi eficaz em reduziu os níveis das três citocinas avaliadas nos tecidos periarticulares. Os animais tratados com AVE 3mg/kg apresentaram níveis de TNF $\alpha$ , KC e IL-1 $\beta$  iguais a  $49,15 \pm 28,5$ pg/100mg de tecido,  $770,08 \pm 134,7$  pg/100mg de tecido e  $591,5 \pm 132,2$  pg/100mg de tecido, respectivamente.

Um aumento do recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular e para os tecidos adjacentes foi verificado, associados a um aumento nos níveis de TNF $\alpha$ , KC e IL-1 $\beta$  em decorrência da artrite. Além disso, ocorreu uma significativa redução da migração celular e dos níveis destas citocinas após o tratamento com o agonista do receptor de Ang-(1-7), AVE 0991. Estes dados sugerem que as interações dos leucócitos com endotélio vascular sinovial podem estar sendo reguladas.

A figura 3 representa os resultados do exemplo 2 e se refere ao efeito do tratamento com o agonista do receptor de Ang (1-7), AVE 0991, sobre os níveis de TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e KC nos tecidos peri-articulares de animas submetidos ao modelo de artrite induzida por mBSA.

### Exemplo 3

#### Microscopia intravital na microvasculatura do joelho

A técnica de microscopia intravital foi utilizada com o intuito de visualizar o recrutamento de leucócitos através do endotélio da microvasculatura do joelho de camundongos. Os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (10mg/kg, Rompun<sup>®</sup>, Bayer) e Ketamina S+ (200mg/kg, Cristália, SP) e PBS injetada via intraperitoneal (i.p.). A veia da cauda foi canulada para administração de substância fluorescente, Rodamina 6G, reagentes experimentais e volume adicional de anestésico. Para a visualização dos vasos

sanguíneos na região do joelho, foi realizada uma ressecção do tendão patelar. Para a avaliação do processo de recrutamento de leucócitos nos vasos do joelho, os animais receberam, inicialmente, uma injeção por via intravenosa de Rodamina 6G (0,3 mg/kg) para marcação dos leucócitos. A Rodamina 6G foi utilizada por sua capacidade de marcar leucócitos, permitindo a visualização destes numa elevada velocidade de fluxo sanguíneo. Um microscópio (Olympus BX40) com objetiva de 20X, foi utilizado para observar os eventos de rolamento e adesão celular na parede dos vasos. Uma câmera de vídeo (Optronics) instalada ao microscópio projetava a imagem em um monitor e as imagens eram, então, gravadas em vídeo-cassete (VHS, Semp Toshiba, modelo x685) para posterior contagem do número de leucócitos em rolamento e aderidos ao longo da parede dos vasos. Foram considerados aderidos os leucócitos que permaneceram estacionados no endotélio vascular por um período mínimo de 30 segundos, e esta adesão foi quantificada pelo número total de células aderentes em 100 $\mu$ m de comprimento da vênula. O rolamento foi considerado para os leucócitos que migravam da região central para a margem do vaso e se moviam a uma velocidade menor que a velocidade dos eritrócitos. Foram avaliados três a quatro vasos sanguíneos por animal e os resultados de rolamento e adesão foram expressos como número de células/min e número de células/100 $\mu$ m, respectivamente.

Experimentos de microscopia intravital permitiram avaliar *in vivo* o processo de rolamento e de adesão leucocitária, demonstrando que os camundongos imunizados e desafiados com mBSA (veículos) apresentaram aumentos tanto no número de leucócitos em rolamento quanto no número de leucócitos aderidos ao longo das paredes dos vasos, quando comparado com os camundongos imunizados com mBSA e desafiados com PBS (controles). A utilização do agonista do receptor de Ang-(1-7), AVE 0991, provocou uma expressiva alteração no perfil de interação leucócito-endotélio: ocorreu uma queda de 38% na taxa de rolamento (Fig. 4A) e uma queda de 53% na adesão (Fig. 4B) leucocitária ao longo dos vasos sinoviais, 24 horas após o desafio dos animais previamente imunizados com mBSA

A figura 4 representa os resultados do exemplo 3, relacionando o feito do tratamento com o agonista do receptor de Ang-(1-7), AVE 0991, sobre interação dos leucócitos com o endotélio sinovial de animais submetidos a um modelo de artrite induzida por mBSA.

## 5 Exemplo 4

### Teste de pressão crescente na pata de camundongo

Os experimentos foram realizados utilizando o teste de pressão com um anestesímetro eletrônico, que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). A precisão do aparelho é de 0,1 g. O aparelho é calibrado para registrar uma força máxima de 150 g, mantendo a precisão de 0,1 g até a força de 80 g. O contato do transdutor de pressão à pata é realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno com 0.5 ou 4,15 mm<sup>2</sup> de diâmetro adaptada a esse. Os animais são colocados em caixas de acrílico, medindo 12 x 10 x 17 cm cujo assoalho é uma rede de malha igual a 5 mm<sup>2</sup> constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. Espelhos são posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização das plantas das patas dos animais. O experimentador deve aplicar, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo até que o animal produza uma resposta caracterizada como sacudida (“flinch”) da pata estimulada. Os estímulos são repetidos por até seis vezes, em geral até o animal apresentar 3 medidas similares com uma clara resposta de “flinch” após a retirada da pata. A intensidade de hipernocicepção foi quantificada como a variação na pressão ( $\Delta$  de reação em gramas) obtida subtraindo-se a média de três valores expressos em gramas (força) observados antes do procedimento experimental (0 hora) da média de três valores em gramas (força) após a administração dos estímulos que variaram conforme o protocolo experimental. Os testes nociceptivos foram realizados entre 08:00 e 16:00 h. Todos os

experimentos seguiram as normas e éticas estabelecidas para experimentação com animais conscientes, recomendadas pelo IASP (ZIMMERMANN, 1983).

Para este ensaio em questão os animais foram imunizados e, 14 dias depois, foram desafiados. Antes da imunização, a intensidade da hipernocicepção foi avaliada. Os animais foram tratados com veículo (NaCl 0,9%) ou com AVE 0991(i.p.), na dose de 3,0mg/kg. Após 30 minutos, foram desafiados com mBSA. Receberam uma nova dose de AVE 0991 3,0 mg/kg 6 horas após o desafio. A intensidade de hipernocicepção dos animais foi novamente avaliada 24 horas do desafio.

A intensidade de hipernocicepção foi quantificada como a variação da pressão ( $\Delta$  de reação em gramas) obtida a partir da subtração da média de três valores expressos em gramas (força) observados antes do procedimento experimental (0 hora) da média de três valores em gramas (força) 24 horas após o desafio com mBSA.

#### **Avaliação da pressão arterial sistólica por pletismografia de cauda.**

A avaliação da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada a partir da adaptação de um método não-invasivo muito utilizado (Fuji e cols, 2006; Whitesall e cols, 2004; Krege e cols, 1995). Os camundongos, acordados, foram condicionados a ocuparem um contensor acrílico com temperatura interna constante (37°C) por um período máximo de 5 minutos para cada medida de PAS. Sobre a cauda dos animais, foi acoplado um manguito e um sensor de frequência cardíaca, interligados a um programa de aquisição de dados (XBP1000 Series Rat Blood Pressure System – Kent Scientific, Torrington, CT – USA) onde era possível visualizar a PAS a cada tomada em um monitor. Foram realizadas 3 a 5 tomadas, da PAS, no mínimo, respeitando um intervalo mínimo de 60 segundos entre as tomadas. Para minimizar o estresse causado pela contenção e manipulação do animal durante o procedimento, cada animal era submetido ao procedimento acima pelo menos 5 vezes nos 2 dias que antecederam o início do experimento em questão. Esse período era chamado período de adaptação ao pletismógrafo. Para este ensaio em questão os

animais foram imunizados com mBSA, 12 dias após iniciou-se a adaptação dos animais ao plestismógrafo. No 14<sup>o</sup> dia, realizou-se a medida da PAS dos animais momentos antes do tratamento e desafio. Uma nova medida de PAS foi realizada no dia seguinte, 24h após o desafio. Os dados apresentados foram as variações da pressão arterial sistólica ( $\Delta$ PAS= PAS final - PAS inicial) e a unidade utilizada foi milímetros de mercúrio (mmHg).

A figura 5 representa os resultados do exemplo 4 que se refere ao efeito do agonista de Ang-(1-7), AVE 0991, sobre a hipernocicepção, sobre a pressão arterial sistólica e índice de acometimento articular no modelo de artrite induzida por mBSA.

Neste ensaio em questão foram associados os elevados níveis de citocinas à conseqüente migração de neutrófilos para a articulação, e verificou-se a ocorrência de um aumento da variação do limiar do estímulo hipernociceptivo nos animais imunizados e desafiados com mBSA (veículo) quando comparados aos animais imunizados com mBSA e desafiados com PBS (controle):  $1,99 \pm 0,5$  g vs  $7,23 \pm 0,7$  g. Após o tratamento com o agonista do receptor de Ang-(1-7), AVE 0991, houve uma diminuição da hipernocicepção nas três concentrações avaliadas: AVE 0,6 mg/kg, AVE 3 mg/kg e AVE15 mg/kg ( $4,91 \pm 0,6$  g,  $2,89 \pm 0,6$ g e  $2,30 \pm 0,5$  g, respectivamente) (Fig. 5A).

A pressão arterial sistólica dos animais foi verificada para excluir possíveis ocorrências de uma queda da pressão arterial pós-tratamento que pudesse comprometer a avaliação do limiar de hipernocicepção articular dos animais tratados. Conforme observado na figura 5B, a pressão arterial sistólica dos animais tratados com AVE 3mg/kg no apresentou variação significativa, ou seja, os valores pré-tratamento foram muito semelhantes ao pós-tratamento, gerando uma  $\Delta$ PAS de  $-1,75 \pm 7,18$  mmHg. Nenhuma diferença foi observada em relação ao grupo controle ( $\Delta$ PAS= $6,71 \pm 7,9$  mmHg). Este dado foi importante para demonstrar que os efeitos apresentados pelo agonista do receptor de Ang-(1-7), AVE 0991, na concentração de 3mg/kg não alterou a hemodinâmica dos animais no modelo de artrite induzida por BSA.

### **Análises estatísticas**

Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de pelo menos 6 animais por grupo. O teste t de Student ou a análise de variância (ANOVA) foram realizados para comparar, respectivamente, dois ou  
5 mais grupos experimentais. No caso de observação de significância estatística na ANOVA, foi realizado pós-teste Student-Newman-Keuls. A significância estatística foi ajustada em  $p < 0,05$ .

### **Composições contendo AVE 0991 e uso na preparação de medicamento**

Para efeitos desta invenção, por "composições farmacêuticas" entende-  
10 se toda e qualquer composição que contenha um princípio ativo, com fins profiláticos, paliativos e/ou curativos, e um veículo farmacêuticamente aceitável, dita composição atuando de forma a manter e/ou restaurar a homeostase, podendo ser administrada de forma oral, tópica, parenteral, enteral e/ou intratecal. Os compostos da presente invenção podem ser  
15 administrados em forma de dosagem oral, como comprimidos, cápsulas (cada qual inclui a liberação sustentada ou formulações com tempo de liberação), pílulas, pós, granulados, elixires, tinturas, suspensões, xaropes, e emulsões. Eles podem também ser opcionalmente administrados em infusão, intraperitoneal, subcutânea, ou em formas intramusculares, todas utilizando  
20 dosagens conhecidas para aqueles com habilidade ordinária que praticam a arte farmacêutica. Eles podem ser administrados sozinhos, mas geralmente serão administrados com um veículo farmacêuticamente aceitável selecionado na base de rota de administração escolhida e da prática farmacêutica padrão. O regime de dosagens para os compostos da presente invenção, naturalmente,  
25 variará dependendo de fatores já conhecidos, como as características farmacodinâmicas de um agente particular e modalidade e rota de administração, as espécies, idade, sexo, saúde, condição médica, e peso do receptor, a natureza e extensão dos sintomas; o tipo de tratamento simultâneo; a frequência do tratamento; a rota de administração, a função hepática e renal  
30 do paciente/usuário, e o efeito desejado. Por exemplo, as formas orais sólidas

preferencialmente contêm, adicionalmente ao princípio ativo, um veículo farmacologicamente aceitável compreendendo um ou mais diluentes, como por exemplo, lactose, dextrose, sacarose, celulose, amido de milho ou amido de batata; um ou mais lubrificantes, como por exemplo, sílica, talco, ácido esteárico, estearato de magnésio ou de cálcio, ou glicóis de polietileno; um ou mais agentes de ligação (aglutinantes), como, por exemplo, amidos, goma arábica, gelatina, metilcelulose, carboximetilcelulose ou polivinil pirrolidona; um ou mais agentes desagregantes, como, por exemplo, amido, ácido algínico, alginatos ou glicolato de amido de sódio; misturas efervescentes; corantes; açucarados; um ou mais agentes umectantes, como por exemplo, lecitina, polisorbatos, laurilsulfatos; e substâncias inativas farmacologicamente e não-tóxicas usadas comumente em formulações farmacêuticas e amplamente conhecidas dos técnicos em farmacotecnologia. As composições da invenção podem ser manufaturadas de forma conhecida, como, por exemplo, por meios de mistura, granulação, prensagem em pastilha, cobertura de açúcar, ou processos de revestimento de filme. As formas líquidas para administração oral podem ser, por exemplo, xaropes, emulsões ou suspensões. Os xaropes podem conter um carreador ou veículo farmacologicamente aceitável, como por exemplo, sacarose ou sacarose com glicerina e/ou manita (manitol) e/ou sorbitol. As suspensões e as emulsões podem conter um carreador ou veículo farmacologicamente aceitável, como, por exemplo, uma goma natural, ágar, alginato de sódio, pectina, metilcelulose, carboximetilcelulose ou álcool polivinílico. As formas destinadas a injeções intramusculares podem conter, adicionalmente ao princípio ativo AVE 0991, um carreador ou veículo farmacologicamente aceitável, como por exemplo, água estéril, óleo de oliva, oleato de etila, glicol de propileno e, uma quantidade apropriada de hidrocloreto de lidocaína. Na presente invenção, as formas orais são preferidas.

Os versados na arte valorizarão os ensinamentos da presente invenção e entenderão que podem ser feitas diferentes formas de concretizar o conceito inventivo, se comparadas com as aqui reveladas exemplificativamente, devendo ser consideradas como dentro do escopo das reivindicações anexas.

## **REIVINDICAÇÕES**

- 1 - **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA A MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E/OU ANALGÉSICA**, caracterizada por compreender um veículo farmacêuticamente aceitável e pelo menos um agonista do receptor Mas da Angiotensina (1-7).
- 5
- 2 - **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA A MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E/OU ANALGÉSICA**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo agonista do receptor Mas da Angiotensina (1-7) compreender angiotensina(1-7), seus análogos peptídicos ou não peptídicos, ou um sal, solvato e/ou hidrato farmacêuticamente aceitável do mesmo.
- 10
- 3 - **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA A MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E/OU ANALGÉSICA**, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo agonista do receptor Mas da Angiotensina (1-7) compreender preferencialmente o análogo não peptídico AVE 0991.
- 15
- 4 - **USO DE AGONISTA DO RECEPTOR Mas DA ANGIOTENSINA (1-7)**, caracterizado por ser para a preparação de um medicamento modulador da resposta imune em vertebrados, conforme definido nas reivindicações 1 a 3.
- 5 - **USO DE AGONISTA DO RECEPTOR Mas DA ANGIOTENSINA (1-7)**, caracterizado por ser para a preparação de um medicamento para a modulação da resposta analgésica em vertebrados, conforme definido nas reivindicações 1 a 3.
- 20
- 6 - **USO DE AGONISTA DO RECEPTOR Mas DA ANGIOTENSINA (1-7)**, caracterizado por ser para a preparação de um medicamento para a modulação da resposta inflamatória em vertebrados, conforme definido nas reivindicações 1 a 3.
- 25

**7 - USO DE AGONISTA DO RECEPTOR Mas DA ANGIOTENSINA (1-7), de acordo com as reivindicações 4, 5 ou 6, caracterizado por ser para a preparação de um medicamento para o diagnóstico, tratamento ou prevenção da artrite reumatóide.**

**FIGURAS**

FIGURA 1

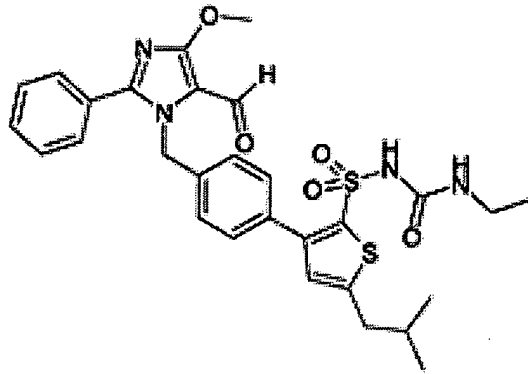


FIGURA 2

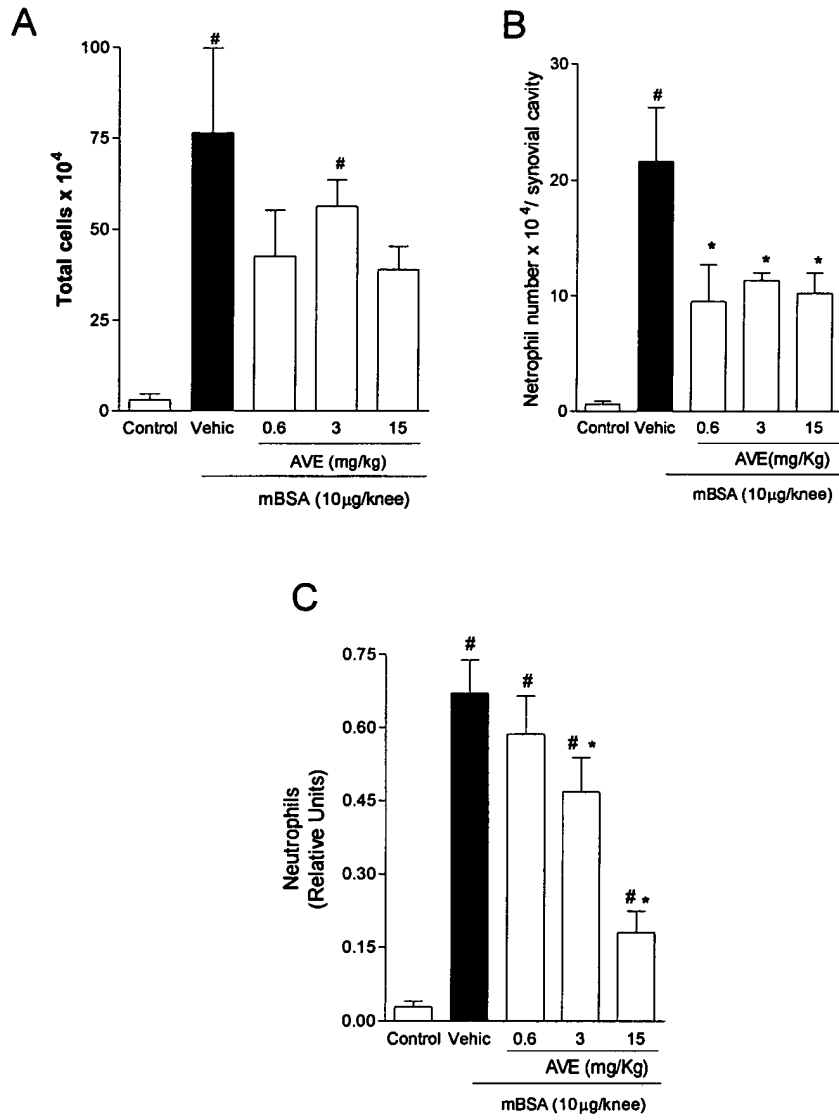


FIGURA 3

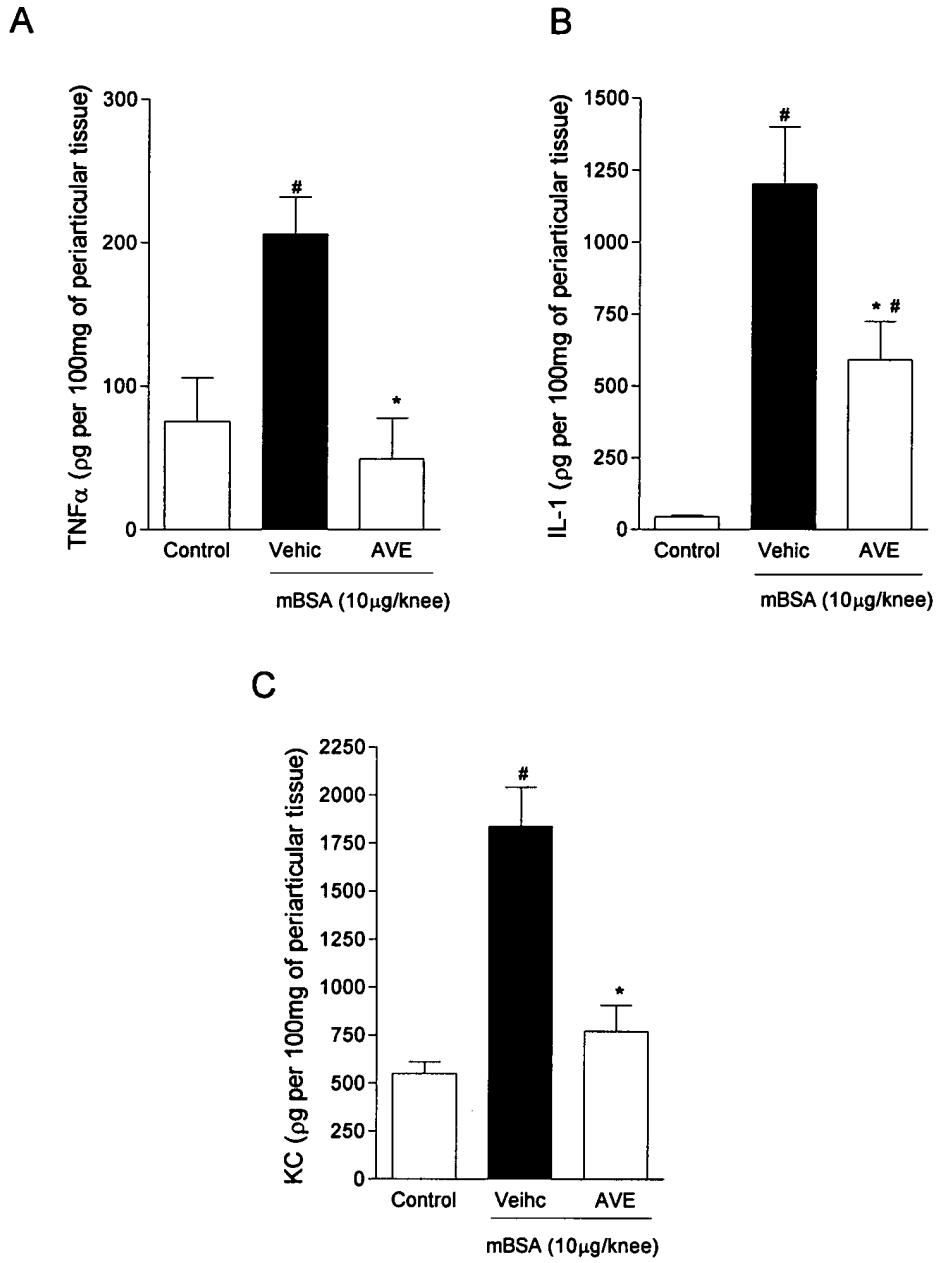


FIGURA 4

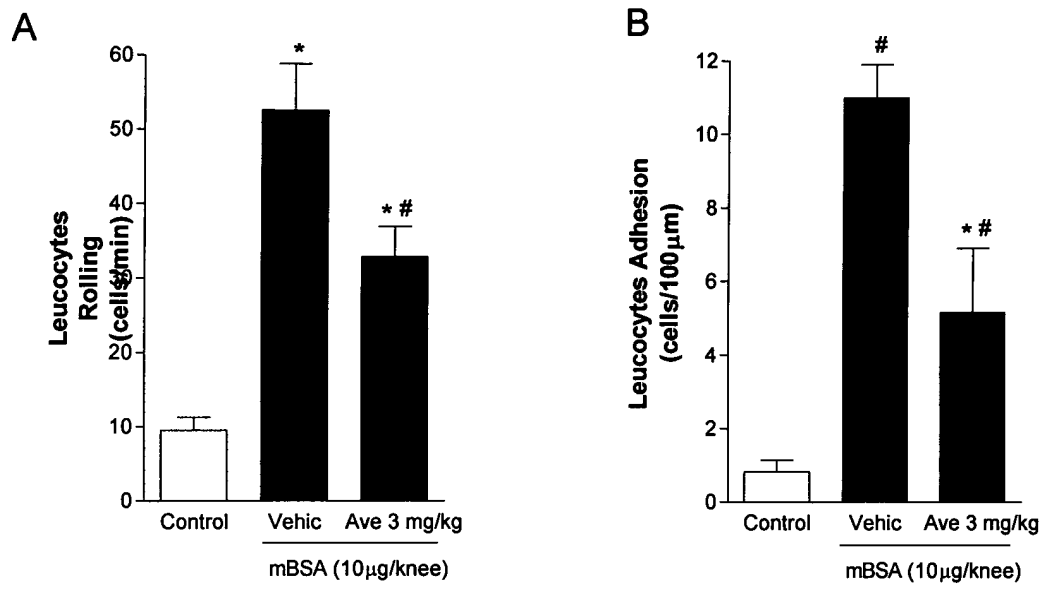
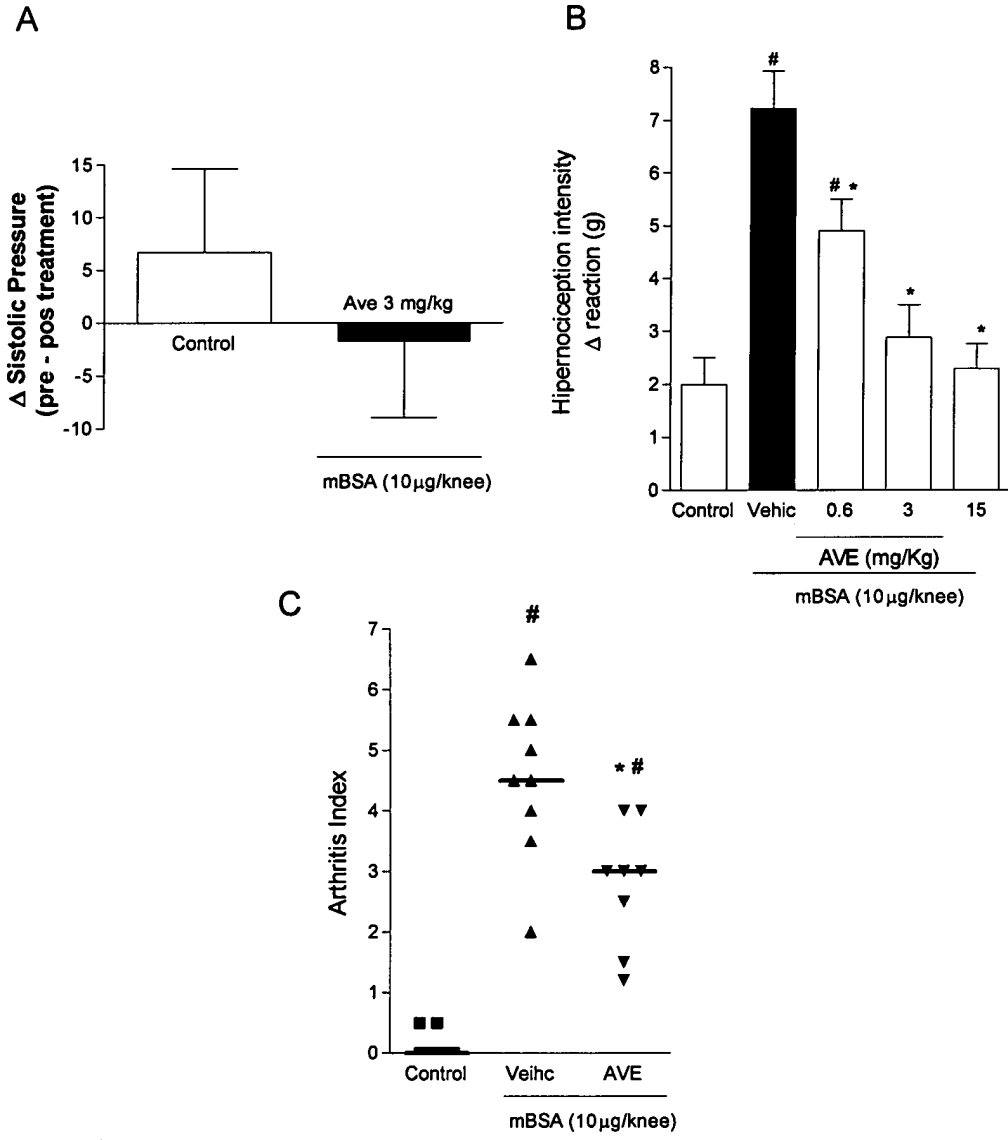


FIGURA 5



**RESUMO****COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO AGONISTA DO RECEPTOR  
MAS DA ANGIOTENSINA (1-7) E SEU USO PARA A  
MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E/OU  
5 ANALGÉSICA**

A presente invenção proporciona o uso de agonistas do receptor Mas da Angiotensina (1-7), como alternativa farmacológica e terapêutica no contexto das doenças inflamatórias, como a artrite reumatóide. A invenção proporciona composições compreendendo angiotensina(1-7), seus análogos peptídicos ou  
10 não peptídicos, ou um sal, solvato e/ou hidrato farmacologicamente aceitável e seu uso na preparação de medicamentos, para a modulação da resposta inflamatória e/ou analgésica. Entre outros, os efeitos antiinflamatórios dos agonistas do receptor Mas de angiotensina (1-7), em especial do AVE 0991, inibem importantes parâmetros da resposta inflamatória no modelo de artrite  
15 induzida por mBSA. A presente invenção proporciona ainda uma nova abordagem de constituintes do SRA, como o eixo ECA2/Ang(1-7)/Mas, associados a eventos específicos da cascata da resposta inflamatória.