(11) Número de Publicação: **PT 2120919 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 31/22 (2011.01) ***A61K 31/366*** (2011.01)
A61K 31/40 (2011.01) ***A61K 31/405*** (2011.01)
A61K 31/505 (2011.01) ***A61K 31/517*** (2011.01)
A61K 45/06 (2011.01) ***A61P 9/00*** (2011.01)
A61P 29/00 (2011.01) ***A61P 37/00*** (2011.01)
A61K 31/47 (2011.01)

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

(22) Data de pedido: **2007.11.16**

(30) Prioridade(s): **2006.12.18 US 875377 P**
2007.10.29 US 743

(43) Data de publicação do pedido: **2009.11.25**

(45) Data e BPI da concessão: **2012.08.29**
217/2012

(73) Titular(es):
CARDOZ AB
KORNHAMNSTORG 53 11127 STOCKHOLM/SE **SE**

(72) Inventor(es):
JOHAN RAUD **SE**

(74) Mandatário:
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA **PT**

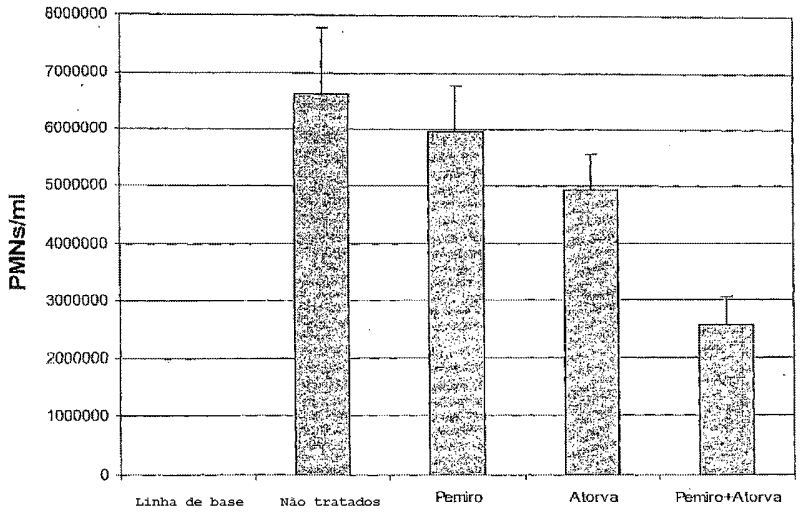
(54) Epígrafe: **NOVA COMBINAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DE PERTURBAÇÕES INFLAMATÓRIAS**

(57) Resumo:
SÃO PROPORCIONADOS PRODUTOS DE COMBINAÇÃO COMPREENDENDO (A) PEMIROLAST, OU UM SEU SAL OU SOLVATO FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL; E (B) UMA ESTATINA, OU UM SEU SAL OU SOLVATO FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL. ESTES PRODUTOS DE COMBINAÇÃO ENCONTRAM PARTICULAR UTILIDADE NO TRATAMENTO DE ATEROSCLEROSE E CONDIÇÕES RELACIONADAS.

RESUMO

"Nova combinação para utilização no tratamento de perturbações inflamatórias"

São proporcionados produtos de combinação compreendendo (a) pemirolast, ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitável; e (b) uma estatina, ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitável. Estes produtos de combinação encontram particular utilidade no tratamento de aterosclerose e condições relacionadas.



DESCRIÇÃO

"Nova combinação para utilização no tratamento de perturbações inflamatórias"

Campo do invento

Este invento refere-se a uma nova combinação farmacêutica.

Antecedentes e especialidade anterior

Doenças cardiovasculares, tais como doença cardíaca coronária e acidente vascular cerebral são causas principais de morte, incapacidade e despesas com cuidados de saúde, particularmente em países industrializados. Estas doenças são muitas vezes sequelas directas de aterosclerose, uma condição multifactorial que se desenvolve preferencialmente em sujeitos que fumam e/ou apresentam factores de risco tais como hipertensão, diabetes *mellitus*, hipercolesterolemia, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicéridos elevados no plasma.

As lesões ateroscleróticas (ou placas) desenvolvem-se muitas vezes ao longo de vários anos e por vezes décadas. Estão tipicamente envolvidos processos patológicos tais como acumulação de colesterol na parede da artéria, formação de células espumosas, inflamação e proliferação celular.

Níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDLs), LDLs, colesterol total e triglicéridos são todos indicadores na determinação do risco de desenvolvimento de aterosclerose e perturbações cardiovasculares associadas, tais doenças da artéria coronária (*e.g.* angina de peito, enfarte do miocárdio, etc.), acidente vascular cerebral (incluindo acidente cerebrovascular e ataque isquémico transiente) e doença oclusiva arterial periférica.

Pacientes com níveis elevados de colesterol total e/ou triglicéridos estão em risco significativo, independentemente de terem também ou não um nível de HDL favorável. Pacientes com níveis normais de colesterol total mas com níveis de HDL

baixos estão também em risco acrescido. Recentemente, foi também notado que o nível de risco de doença cardiovascular associado a níveis elevados de apolipoproteína B (ApoB; que transporta lípidos em lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDLs) e LDLs), e/ou níveis baixos de apolipoproteína A-I (ApoA-I; que transporta lípidos em HDL), é extremamente elevado.

Fármacos que reduzem os níveis de LDL no soro podem reduzir o risco da acumulação de placas ateroscleróticas, e podem reduzir (a longo prazo) o risco de ruptura da placa e de complicações tromboembólicas associadas. Existem vários tipos de fármacos que podem ajudar a reduzir os níveis de colesterol no sangue. Os mais habitualmente prescritos são os inibidores de hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA)-redutase (aqui depois definidos em conjunto, independentemente do seu nome genérico, como "estatinas"), incluindo sinvastatina e atorvastatina. Estes fármacos impedem directamente a formação de colesterol no fígado e assim reduzem o risco de doença cardiovascular.

Outras categorias de fármaco prescritas incluem resinas (tais como colestiramina e colestipol), que actuam por ligação de ácidos biliares, fazendo assim com que o fígado produza mais destes últimos, e utilizando colesterol no processo. Adicionalmente, a vitamina B niacina tem sido reportada em doses elevadas para reduzir os níveis de triglicéridos e LDL para além de aumentar os níveis de HDL. Os fibratos (tais como gemfibrozil e fenofibrato) são conhecidos por diminuírem os triglicéridos e podem aumentar os níveis de HDL.

A introdução de fármacos de redução do colesterol tais como as estatinas tem reduzido significativamente a mortalidade por doença cardíaca coronária e acidente vascular cerebral. No entanto, estes fármacos enfermam da desvantagem de não serem igualmente eficazes em todos os pacientes e de serem conhecidos por terem certos efeitos secundários (*e.g.* alterações na função hepática, miopatia e rabdomiólise), e a aterosclerose permanece uma causa importante de morte e incapacidade. De facto, um artigo de revisão recente (Briel *et al.*, JAMA, 295, 2046 (2006)) sugere que as estatinas não

reduzem eventos cardiovasculares graves durantes os primeiros quatro meses de tratamento em pacientes com síndromes coronárias agudas.

Existe assim uma necessidade clínica real para tratamentos mais seguros e/ou mais eficazes de aterosclerose e perturbações cardiovasculares associadas, particularmente naqueles pacientes com síndromes coronárias agudas.

O pemirolast é um fármaco antialérgico oralmente activo que é utilizado no tratamento de condições tais como asma, rinite alérgica e conjuntivite. Ver, por exemplo, Patente dos E.U.A. N.° 4 122 274, Pedidos de Patente Europeia EP 316 174 e EP 1 285 921, Yanagihara *et al.*, Japanese Journal of Pharmacology, 51, 93 (1989) e Drugs of Today, 28, 29 (1992). O fármaco é presentemente comercializado *e.g.* no Japão como o sal de potássio.

Têm sido reportados estudos que se referem à utilização potencial de pemirolast na prevenção de restenose (Miyazawa *et al.*, J. Cardiovasc. Pharmacol., 30, 157 (1997) e Ohsawa *et al.*, Am. Heart J., 136, 1081 (1998) e J. Cardiol. 42, 13 (2003)). Ver também o Pedido de Patente Europeia EP 766 693, que revela que o pemirolast exibe um efeito inibidor sobre a proliferação de células de músculo liso vascular.

O pedido de patente dos E.U.A. US 2006/0024365 revela formas de dosagem farmacêutica retardada dual compreendendo ingredientes activos de solubilidade elevada, em dose elevada, de libertação modificada, em combinação com ingredientes activos, em dose baixa, de libertação imediata. Uma ampla variedade de fármacos, incluindo alguns dos aqui mencionados, são listados como candidatos potenciais para o ingrediente activo em dose baixa.

O pedido de patente dos E.U.A. US 2007/0014733 A1 revela composições farmacêuticas para o tratamento de perturbações cardiovasculares compreendendo metabolitos de nebivolol. Vários compostos activos, incluindo alguns dos aqui mencionados, estão listados entre os muitos ingredientes activos que podem ser combinados com estes metabolitos em tais composições.

O pedido de patente dos E.U.A. US 2006/0148830 A1 revela novos antagonistas do receptor de LPA (e especialmente o receptor EDG-2) para utilização em perturbações *inter alia* do sistema urinário, inflamação etc. Certos compostos activos, incluindo alguns dos aqui mencionados, são mencionados separadamente entre os muitos ingredientes activos diferentes que podem ser combinados com estes novos compostos.

O pedido de patente dos E.U.A. US 2006/0084695 revela inibidores de MAP-quinase e/ou HMG-CoA-redutase para utilização no tratamento de condições cardiovasculares, tais como aterosclerose e outras.

Finalmente, o pedido de patente dos E.U.A. US 2005/0181023 A1 revela composições farmacêuticas compreendendo pemirolast para utilização na inibição ou prevenção de adesões entre superfícies de tecido e/ou órgãos.

A utilização de produtos de combinação compreendendo, especificamente, pemirolast e uma estatina não é especificamente revelada em qualquer dos documentos acima mencionados. Adicionalmente, a utilização destes produtos de combinação no tratamento de aterosclerose e de perturbações cardiovasculares associadas, particularmente naqueles pacientes com síndromes coronárias agudas, não é revelada em qualquer destes documentos.

Revelação do invento

De acordo com o invento, é proporcionado um produto de combinação compreendendo:

(a) pemirolast, ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitável; e

(b) uma estatina seleccionada entre rosuvastatina e atorvastatina ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitável,

produtos de combinação que são aqui depois referidos como "os produtos de combinação de acordo com o invento".

O termo "uma estatina" inclui uma ou mais estatinas. Os termos "estatina" e "inibidor de HMG-CoA-redutase" são utilizados sinonimamente no contexto do presente invento.

Assim, estatinas incluem rosuvastatina (*e.g.* Crestor®) e atorvastatina (*e.g.* Lipitor®, Torvast®). Estatinas particularmente preferidas incluem rosuvastatina e, especialmente, atorvastatina.

Sais farmaceuticamente aceitáveis que podem ser mencionados incluem sais de adição de ácido e sais de adição de base. Estes sais podem ser formados por meios convencionais, por exemplo por reacção de uma forma de ácido livre ou de base livre de um ingrediente activo com um ou mais equivalentes de um ácido ou base apropriados, opcionalmente num solvente, ou num meio no qual o sal é insolúvel, seguindo-se remoção do referido solvente, ou do referido meio, utilizando técnicas padrão (*e.g. in vacuo,* por liofilização ou por filtração). Podem também ser preparados sais por permuta de um contra-ião de um ingrediente activo na forma de um sal com outro contra-ião, por exemplo utilizando uma resina de permuta iónica adequada.

Sais preferidos de pemirolast incluem pemirolast sódico e, mais preferivelmente, pemirolast potássico.

Sais preferidos de estatinas incluem sais de sódio, potássio e cálcio, tais como rosuvastatina cálcica e atorvastatina cálcica.

Ingredientes activos que são utilizados em produtos de combinação de acordo com o invento podem ser utilizados numa forma diastereomericamente enriquecida e/ou enantiomericamente enriquecida. Por "diastereomericamente enriquecida" e "enantiomericamente enriquecida" pretende-se significar, respectivamente, qualquer mistura dos diastereoisómeros/enantiómeros de um ingrediente activo, na qual um isómero está presente numa maior proporção do que a outro. Por exemplo, podem-se utilizar enantiómeros com purezas ópticas (excesso enantiomérico; e.e.) superiores a 90%.

Produtos de combinação de acordo com o invento proporcionam a administração de pemirolast como aqui anteriormente definido em conjunto com a estatina, e podem assim ser apresentados ou como formulações separadas, onde pelo menos uma dessas formulações compreende pemirolast, e pelo menos uma compreende a estatina, ou podem ser apresentados (*i.e.* formulados) como uma preparação combinada (*i.e.* apresentada como uma única formulação incluindo pemirolast e a estatina).

Assim, é ainda proporcionada:

(1) uma formulação farmacêutica incluindo pemirolast, ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitável; uma estatina seleccionada entre rosuvastatina e atorvastatina, ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitável; e um adjuvante, diluente ou transportador farmaceuticamente aceitável (formulação que é aqui depois referida como uma "preparação combinada"); e

(2) um kit de peças compreendendo como componentes:

(A) uma formulação farmacêutica incluindo pemirolast, ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitável, em mistura com um adjuvante, diluente ou transportador farmaceuticamente aceitável; e

(B) uma formulação farmacêutica incluindo uma estatina seleccionada entre rosuvastatina e atorvastatina, ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitável, em mistura com um adjuvante, diluente ou transportador farmaceuticamente aceitável,

componentes (A) e (B) que são cada um fornecidos numa forma que é adequada para administração em conjunto com o outro.

De acordo com um aspecto adicional do invento, é proporcionado um método de fabricação de um kit de peças como definido acima, método que compreende colocar o componente (A), como definido acima, em associação com um componente (B), como definido acima, tornando assim os dois componentes adequados para administração em conjunto um com o outro.

Por colocar os componentes "em associação" um com o outro, incluímos que os componentes (A) e (B) do kit de peças podem ser:

(i) fornecidos como formulações separadas (*i.e.* independentemente um do outro), que são subsequentemente colocadas em conjunto para utilização em conjunto um com o outro em terapia de combinação; ou

(ii) embalados e apresentados em conjunto como componentes separados de uma "embalagem de combinação" para utilização em conjunto um com o outro em terapia de combinação.

Assim, é adicionalmente proporcionado um kit de peças compreendendo:

(I) um dos componentes (A) e (B) como aqui definidos; em conjunto com

(II) instruções para utilizar esse componente em conjunto com o outro dos dois componentes.

Os kits de peças aqui descritos podem compreender mais do que uma formulação incluindo uma quantidade/dose apropriada de pemirolast/sal/solvato, e/ou mais do que uma formulação incluindo uma quantidade/dose apropriada de estatina/sal/solvato, de modo a proporcionar dosagem repetida. Se estiver presente mais do que uma formulação (compreendendo qualquer dos compostos activos), estas formulações podem ser a mesma, ou podem ser diferentes em termos da dose de qualquer dos compostos, composição(ões) química(s) e/ou forma(s) física(s).

Prefere-se que as estatinas utilizadas em produtos de combinação de acordo com o invento não estejam na forma das assim denominadas "lactonas de estatina". No entanto, produtos de combinação de acordo com o invento podem compreender lactona de rosuvastatina e lactona de atorvastatina.

Os produtos de combinação de acordo com o invento encontram utilidade no tratamento de condições inflamatórias. Condições inflamatórias são tipicamente caracterizadas por activação de mecanismos de defesa imunitária, resultando num efeito que é mais prejudicial do que benéfico para o hospedeiro. Estas condições estão geralmente associados com diferentes graus de vermelhidão de tecido ou hiperemia, inchaço, hipertermia, dor, prurido, morte celular e

destruição de tecido, proliferação celular, e/ou perda de função. Condições inflamatórias que podem ser mencionados incluem cistite, prostatite, complicações vasculares diabéticas, enxaqueca e, mais preferivelmente, alergia (incluindo conjuntivite alérgica e rinite alérgica), espondilite anquilosante, asma, dermatite atópica, doença pulmonar obstrutiva crónica, dermatite de contacto, artrite gotosa, doença inflamatória do intestino (como a doença de Crohn e colite ulcerosa), esclerose múltipla, osteoartrite, pancreatite, psoríase, artrite psoriática, artrite reumatóide, tendinite, bursite, síndrome de Sjogren, lúpus eritematoso sistémico, uveíte, urticária, vasculite, aterosclerose e perturbações cardiovasculares associadas. Condições que podem ser mencionadas incluem enxaqueca e, mais preferivelmente, asma, doença pulmonar obstrutiva crónica, doença de Crohn, esclerose múltipla, psoríase, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistémico, colite ulcerosa e, mais particularmente, aterosclerose e perturbações cardiovasculares associadas.

O termo "aterosclerose" será entendido pelos peritos na especialidade para incluir qualquer doença caracterizada por acumulação de colesterol num vaso sanguíneo, especialmente numa parede arterial, formação de células espumosas inflamação e proliferação celular. Perturbações cardiovasculares "associadas a" aterosclerose incluem aneurismas aórticos (incluindo aneurismas aórticos abdominais e/ou ateroscleróticos) e, mais preferivelmente, arteriosclerose, doença oclusiva arterial periférica, doenças da artéria coronária (*e.g.* angina de peito, enfarte do miocárdio, ataque cardíaco, etc.), doença coronária (incluindo doença cardíaca e doença do coração, tal como doença isquémica do coração), e podem incluir ruptura e/ou instabilidade da placa ou ateroma, doença vascular ou doença arterial, doença isquémica/isquemia e acidente vascular cerebral (incluindo acidente cerebrovascular e ataque isquémico transiente).

Grupos de pacientes preferidos incluem aqueles com síndromes coronárias agudas. O termo "síndroma(s) coronária(s) aguda(s)" será entendido pelo técnico competente para incluir qualquer estado isquémico e miocárdico anormal,

muitas vezes mas não exclusivamente associados, por exemplo, ao desenvolvimento de dor no peito (*e.g.* de uma natureza cardíaca) e/ou a um electrocardiograma (ECG) anormal. Estas síndromes são a apresentação mais comum de enfarte do miocárdio (ataque cardíaco). O técnico competente reconhecerá que o termo é grandemente sinónimo do termo "angina instável", em oposição a "angina estável" (*i.e.* angina que se desenvolve durante o esforço e resolve com o repouso). A angina de esforço que ocorre com uma taxa de agravamento ("angina em crescendo") será similarmente considerada pelo técnico competente como incluída na definição de "instável".

De acordo com um aspecto adicional do invento é proporcionado um produto de combinação de acordo com o invento para utilização num método de tratamento de uma perturbação inflamatória, e em particular aterosclerose e/ou uma perturbação cardiovascular associada, método que compreende a administração de uma tal combinação a um paciente necessitado de um tal tratamento.

Para evitar qualquer dúvida, no contexto do presente invento, os termos "tratamento", "terapia" e "método de terapia" incluem o tratamento terapêutico, ou paliativo, de pacientes com necessidade de, bem como o tratamento profiláctico e/ou de diagnóstico de pacientes que são susceptíveis a perturbações inflamatórias, tais como aterosclerose e perturbações cardiovasculares associadas.

Em relação aos kits de peças como aqui descritos, por "administração em conjunto com", incluímos que as formulações respectivas compreendendo pemirolast (ou um seu sal/solvato) e estatina (ou um seu sal/solvato) são administradas, sequencialmente, separadamente e/ou simultaneamente, durante o curso do tratamento da condição relevante.

Assim, com respeito ao produto de combinação de acordo com o invento, o termo "administração em conjunto com" inclui que os dois componentes do produto de combinação (pemirolast e estatina) são administrados (opcionalmente repetidamente), quer em conjunto, quer suficientemente próximos no tempo, para possibilitar um efeito benéfico para o paciente que, durante o curso do tratamento da condição relevante, é maior

do que se quer uma formulação compreendendo pemirolast, quer uma formulação compreendendo a estatina, forem administradas (opcionalmente repetidamente) sozinhas, na ausência do outro componente, durante o mesmo curso de tratamento. A determinação se uma combinação proporciona ou não um efeito benéfico superior em relação a, e durante o curso de tratamento de, uma condição particular dependerá da condição a ser tratada ou prevenida, mas pode ser efectuado por rotina pela pessoa competente.

Adicionalmente, no contexto de um kit de peças de acordo com o invento, o termo "em conjunto com" inclui que uma ou a outra das duas formulações pode ser administrada (opcionalmente repetidamente) antes, depois e/ou ao mesmo tempo que a administração do outro componente. Quando utilizados neste contexto, os termos "administrados simultaneamente" e "administrados ao mesmo tempo" incluem que as doses individuais de pemirolast e estatina são administradas em 48 horas (*e.g.* 24 horas) uma da outra.

"Pacientes" incluem pacientes mamíferos (incluindo humanos).

De acordo com o invento, pemirolast e estatinas são preferivelmente administrados localmente ou sistemicamente, por exemplo oralmente, intravenosamente ou intra-arterialmente (incluindo por *stent* intravascular e outras dispositivos/formas de dosagem perivasculares), intramuscularmente, cutaneamente, subcutaneamente, transmucosamente (*e.g.* sublingualmente ou bucalmente), rectalmente, transdermicamente, nasalmente, pulmonarmente (*e.g.* traquealmente ou bronquialmente), topicamente, ou qualquer outra via parentérica, na forma de uma preparação farmacêutica compreendendo o composto numa forma de dosagem farmaceuticamente aceitável. Modos de entrega preferidos incluem entrega oral (em partículas), intravenosa, cutânea ou subcutânea, nasal, intramuscular ou intraperitoneal.

Pemirolast e estatinas serão geralmente administrados em conjunto ou separadamente na forma de uma ou mais formulações farmacêuticas em mistura com um adjuvante, diluente ou transportador farmaceuticamente aceitável, que pode ser

seleccionado tendo em conta a via de administração pretendida e a prática farmacêutica padrão. Tais transportadores farmaceuticamente aceitáveis podem ser inertes quimicamente para os compostos activos e não podem ter quaisquer efeitos secundários prejudiciais ou toxicidade sob as condições de utilização. Estes transportadores farmaceuticamente aceitáveis podem também conferir uma libertação imediata, ou uma libertação modificada, de qualquer dos ingredientes activos, sejam estes administrados em conjunto numa preparação combinada ou na forma de um kit de peças.

Formulações farmacêuticas adequadas podem estar disponíveis comercialmente ou caso contrário estão descritas na literatura, por exemplo, Remington´s The Science and Practice of Pharmacy, 19.ª ed., Mack Printing Company, Easton, Pennsylvania (1995) e Martindale - The Complete Drug Reference (34.ª Edição) e nos documentos aí referidos, as revelações relevantes em todos estes documentos que são pelo presente incorporadas por referência. De outro modo, a preparação de formulações adequadas, e em particular preparações combinadas incluindo pemirolast e estatinas, pode ser conseguidas não inventivamente por uma pessoa competente utilizando técnicas de rotina.

A quantidade de ingredientes activos na(s) formulação(ões) dependerá da gravidade da condição e do paciente a ser tratado, bem como do(s) composto(s) que é/são utilizados, mas pode ser determinada não inventivamente pela pessoa competente.

Dependendo da perturbação e do paciente a ser tratado, bem como da via de administração, ingredientes activos podem ser administrados em doses variáveis terapeuticamente eficazes a um paciente necessitado do mesmo.

No entanto, a dose administrada a um mamífero, particularmente um humano, no contexto do presente invento deverá ser suficiente para efectuar uma resposta terapêutica no mamífero durante um intervalo de tempo razoável. Um perito na especialidade reconhecerá que a selecção da dose exacta e da composição e o regime de entrega mais apropriado serão também influenciados *inter alia* pelas propriedades

farmacológicas da formulação, a natureza e gravidade da condição que está a ser tratada, e a condição física e acuidade mental do recipiente, bem como a potência do composto específico, a idade, condição, peso corporal, sexo e resposta do paciente a ser tratado, e o estado/gravidade da doença, bem como diferenças genéticas entre pacientes.

A administração de ingredientes activos pode ser contínua ou intermitente (*e.g.* por injecção bólus). A dosagem pode também ser determinada pelo momento e frequência de administração.

Doses adequadas de ingredientes activos incluem as referidas na literatura médica, tais como Martindale - The Complete Drug Reference (34.ª Edição) e nos documentos aí referidos, as revelações relevantes em todos estes documentos que são pelo presente incorporadas por referência. Doses adequadas de ingredientes activos estão deste modo no intervalo de cerca de 0,01 mg/kg de peso corporal a cerca de 1000 mg/kg de peso corporal. Intervalos mais preferidos são de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 20 mg/kg numa base diária, quando administradas oralmente.

No entanto, doses adequadas de pemirolast são conhecidas dos peritos na especialidade. Por exemplo, limites inferiores adequados de intervalos de dose diária são cerca de 2 mg, por exemplo cerca de 5 mg, tal como cerca de 10 mg, e mais preferivelmente cerca de 20 mg; e limites superiores adequados de intervalos de dose diária são cerca de 200 mg, por exemplo cerca de 100 mg, tal como cerca de 80 mg, e mais preferivelmente cerca de 60 mg. Doses perorais diárias podem assim estar entre cerca de 2 mg e cerca de 50 mg, tal como cerca de 5 mg e cerca de 40 mg, e preferivelmente cerca de 10 mg e cerca de 30 mg. Doses individuais adequadas podem ser cerca de 20 mg, ou cerca de 40 mg, por dia. As doses/intervalos de dose anteriores são todas independentes de se a formulação utilizada é uma preparação combinada ou um kit de peças como aqui acima descrito.

Similarmente, doses adequadas de estatinas são conhecidas dos peritos na especialidade. Doses perorais estão por isso tipicamente no intervalo de cerca de 2 mg a cerca de

150 mg, tal como de cerca de 5 mg a cerca de 100 mg, preferivelmente cerca de 8 mg a cerca de 90 mg, por exemplo cerca de 10 mg a cerca de 80 mg, por dia, independentemente de se a formulação utilizada é uma preparação combinada ou um kit de peças como aqui acima descrito.

Em qualquer caso, o praticante médico, ou outra pessoa competente, será capaz de determinar por rotina a dosagem real que será mais adequada para um paciente individual. As dosagens acima mencionadas são exemplificativas do caso médio; podem, obviamente, existir casos individuais onde são usados intervalos de dosagem superior ou inferior, e estes estão dentro do âmbito deste invento.

Onde quer que a expressão "cerca de" é aqui utilizada, por exemplo no contexto de doses de ingredientes activos, será reconhecido que estas variáveis são aproximadas e como tal podem variar ±10%, por exemplo ±5% e preferivelmente ±2% (*e.g.* ±1%) em relação aos números aqui especificados.

O produto de combinação/métodos aqui descritos podem ter a vantagem de, no tratamento das condições aqui antes mencionadas, poderem ser mais convenientes para o médico e/ou paciente do que, serem mais eficazes do que, serem menos tóxicos do que, terem um intervalo de actividade mais largo do que, serem mais potentes do que, produzirem menos efeitos secundários do que, ou poderem ter outras propriedades farmacológicas úteis sobre, métodos similares (tratamentos) conhecidos na especialidade anterior para utilização no tratamento de perturbações inflamatórias (tais como aterosclerose e condições cardiovasculares associadas) ou outras.

O invento é ilustrado pelos exemplos seguintes por referência à Figura (Figure 1), na qual o número médio de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) por mL em fluidos de lavagem peritoneal a partir de ratinhos sem (Linha de base), e com peritonite causada por 5 horas de estimulação com zimosano A (zimosano) injectado intraperitonealmente. Mostra-se a acumulação de leucócitos PMN inflamatórios induzidos por zimosano em animais não tratados (Não tratados), e em animais tratados com pemirolast sozinho (Pemiro), atorvastatina

sozinha (Atorva) ou pemirolast em combinação com atorvastatina (Pemiro+Atorva).

Exemplos

Exemplo 1

Ensaios de libertação de mediador inflamatório em células MonoMac-6

Células MonoMac-6 (MM6) (Ziegler-Heitbrock *et al.*, *Int. J. Cancer*, **41**, 456 (1988)) são cultivadas (37°C/5% CO_2) em meio RPMI-1640 suplementado com piruvato de sódio 1 mM, aminoácidos não essenciais 1x, 1-100 µg/mL de insulina, ácido oxalacético 1 mM, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e soro fetal de bovino a 10% (v/v). Para diferenciação, adicionam-se TGFβ (2 ng/ml) e 1,25$(OH)_2$D3 (50 nM), geralmente durante cerca de 2-4 dias.

Para estimular a libertação do mediador inflamatório leucotrieno B_4 (LTB_4), incubam-se células MM6 diferenciadas ou não diferenciadas (a 1-15×10^6/mL; 0,5-1 mL) durante 5-30 minutos (a 37°C em PBS com cálcio) com ácido araquidónico 25-50 µM e ionofóro de cálcio A23187 2-10 µM (o A23187 pode também ser usado sem ácido araquidónico). As células MM6 podem também ser estimuladas com concentrações biologicamente activas documentadas de adenosina-difosfato (ADP), e/ou o análogo de tromboxano U-46619, com ou sem A23187 e/ou ácido araquidónico como acima. As incubações/estimulações de MM6 anteriores podem também ser realizadas na presença de plaquetas humanas (a partir de sangue de dadores saudáveis) com uma proporção de MM6:plaquetas de 1:10 a 1:10000. As incubações/estimulações são interrompidas com dois volumes de metanol frio e prostaglandina B_2 (PGB_2) adicionada como padrão interno. Centrifugam-se as amostras e diluem-se os sobrenadantes com água para atingir uma concentração final de metanol de 30% e ajusta-se o pH a 3-4. Os metabolitos de ácido araquidónico no sobrenadante são extraídos sobre colunas de fase sólida C18 (Sorbent Technology, U.K.) pré-condicionadas (1 mL de metanol seguido por 1 mL de H_2O). Eluem-se os metabolitos com metanol, após o que se adiciona um volume de água ao eluato. Para HPLC de fase reversa,

misturam-se 76 µL de cada amostra com 39 µL de H_2O (podem-se também utilizar outras proporções em volume). Elui-se uma coluna Waters RCM 8×10 com metanol/acetonitrilo/H_2O/ácido acético (30:35:35:0,01 v/v) a 1,2 mL/min. A absorvância do eluato é monitorizada a 270 nm para detecção e quantificação de PGB_2 e LTB_4. Podem-se também utilizar kits de imunoensaios enzimáticos disponíveis comercialmente (kits EIA/ELISA) para medição de LTB_4 de acordo com as instruções do(s) fabricante(s) dos kits. Utilizando kits de imunoensaios enzimáticos (kits EIA/ELISA) disponíveis comercialmente de acordo com as instruções do(s) fabricante(s), os sobrenadantes das incubações/estimulações de MM6 anteriores podem também ser analisados no que se refere ao teor dos mediadores inflamatórios prostaglandina E_2 (PGE_2) e/ou tromboxano B_2 (TXM_2).

Preparam-se soluções de reserva de pemirolast e estatinas (rosuvastatina ou atorvastatina) em etanol, DMSO, N-metil-2-pirrolidona, PEG 400, propilenoglicol e/ou água desionizada ou solução salina fisiológica, com sonicação, aquecimento e ajustamento do pH conforme necessário (podem-se usar também outros veículos). Incubam-se as células (a 37°C/5% de CO_2 em PBS sem cálcio ou em RPMI-1640 com 1-10% de soro fetal de bovino, com ou sem suplementos) com fármaco(s) de teste (pemirolast em combinação com estatina, pemirolast sozinho e estatina sozinha) durante 1 minuto a 24 horas antes da estimulação de MM6 para libertação de mediador inflamatório (o(s) fármaco(s) de teste pode(m) também ser adicionado(s) simultaneamente com a estimulação de MM6). Adicionam-se os fármacos para atingir concentrações finais de 1 nM a 100 µM (para comparação, algumas experiências são realizadas sem os fármacos).

Para estimular a libertação de citoquinas e quimoquinas inflamatórias tais como IL-1β, IL-6, TNF, IL-8, IL-10, IL-12p70, MCP-1, incubam-se células MM6 diferenciadas ou não diferenciadas (com 1-10×10^6/mL) (37°C/5% de CO_2) durante 4-24 horas (em RPMI-1640 com 1-10% de soro fetal de bovino, com ou sem suplementos) com lipopolissacárido (LPS, concentração final 1-100 ng/mL), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, concentração final 1-100 ng/mL) ou uma mistura de LPS/PMA. As células MM6 podem também ser estimuladas com concentrações

biologicamente activas documentadas de adenosina-difosfato (ADP), ácido araquidónico, ionofóro de cálcio A23187 e/ou o análogo de tromboxano U-46619, com ou sem PMA e/ou LPS como acima. As incubações/estimulações de células MM6 podem também ser realizadas na presença de plaquetas humanas (a partir de sangue de dadores saudáveis) com uma proporção de MM6:plaquetas de 1:10 a 1:10000. Incubam-se as células (a 37°C/5% de CO_2 em RPMI-1640 com 1-10% de soro fetal de bovino, com ou sem suplementos) com fármaco(s) de teste (pemirolast em combinação com estatina, pemirolast sozinho e estatina sozinha; como acima no que se refere às soluções de reserva e concentrações) durante 1 minuto a 24 horas antes da estimulação com MM6 (para comparação, algumas experiências são realizadas sem os fármacos; o(s) fármaco(s) de teste pode(m) também ser adicionado(s) simultaneamente com a estimulação de MM6). Depois de centrifugar as células após as incubações/estimulações, as concentrações de quimoquinas e citoquinas humanas nos sobrenadantes são quantificadas utilizando um Cytometric Bead Array (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Podem-se também utilizar kits de imunoensaios enzimáticos disponíveis comercialmente (kits EIA/ELISA) para medição de citoquinas e quimoquinas de acordo com as instruções do(s) fabricante(s). Os sedimentos celulares são armazenados congelados (-80°C) em tampão RLT (QIAGEN, Valencia, CA) até processamento posterior para experiências de microarranjo (ver Exemplo 12 abaixo).

Exemplo 2

Ensaios de libertação de mediador inflamatório em células de sangue periférico humano

Células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) ou células polimorfonucleares (PMN) são isoladas por separação Lymphoprep ou Ficoll-Paque (com ou sem separação Polymorphoprep e/ou sedimentação em dextrano) a partir de sangue de dadores saudáveis utilizando protocolos estabelecidos.

Para estimular a libertação do mediador inflamatório leucotrieno B_4 (LTB_4), incubam-se PBMC ou PMN (com 1-

15×10^6/mL; 0,5-1 mL) durante 5-30 minutos (a 37°C em PBS com cálcio) com ácido araquidónico 25-50 µM e ionofóro de cálcio A23187 2-10 µM (o A23187 pode também ser usado sem ácido araquidónico). As PBMC/PMN podem também ser estimuladas com concentrações biologicamente activas documentadas de adenosina-difosfato (ADP), e/ou o análogo de tromboxano U-46619, com ou sem A23187 e/ou ácido araquidónico como acima. As incubações/estimulações PBMC/PMN anteriores podem também ser realizadas na presença de plaquetas humanas (a partir de sangue de dadores saudáveis) com uma proporção de PBMC/PMN:plaquetas de 1:10 a 1:10000. As incubações/estimulações são interrompidas com dois volumes de metanol frio e prostaglandina B_2 adicionada como padrão interno. Centrifugam-se as amostras e diluem-se os sobrenadantes com água para atingir uma concentração final de metanol de 30% e ajusta-se o pH a 3-4. Os metabolitos de ácido araquidónico no sobrenadante são extraídos sobre colunas de fase sólida C18 (Sorbent Technology, U.K.) pré-condicionadas (1 mL de metanol seguido por 1 mL de H_2O). Eluem-se os metabolitos com metanol, após o que se adiciona um volume de água ao eluato. Para HPLC de fase reversa, misturam-se 76 µL de cada amostra com 39 µL de H_2O (podem-se também utilizar outras proporções em volume). Elui-se uma coluna Waters RCM 8×10 com metanol/acetonitrilo/H_2O/ácido acético 30:35:35:0,01 v/v) a 1,2 mL/minuto. A absorvância do eluato é monitorizada a 270 nm para detecção e quantificação de PGB_2 e LTB_4. Podem-se também utilizar kits de imunoensaios enzimáticos disponíveis comercialmente (kits EIA/ELISA) para medição de LTB_4 de acordo com as instruções do(s) fabricantes(s). Utilizando kits de imunoensaios enzimáticos (kits EIA/ELISA) disponíveis comercialmente de acordo com as instruções do(s) fabricante(s), os sobrenadantes das incubações/estimulações de PBMC/PMN anteriores podem também ser analisados no que se refere ao teor dos mediadores inflamatórios prostaglandina E_2 (PGE_2) e/ou tromboxano B_2 (TXB_2). Incubam-se as células (a 37°C em PBS sem cálcio ou em RPMI-1640 com 0-10% de soro fetal de bovino) com fármaco(s) de teste (pemirolast em combinação com estatina (rosuvastatina ou atorvastatina), pemirolast sozinho e estatina sozinha) durante 1 minuto a 24 horas antes da estimulação de PBMC/PMN para libertação de mediador inflamatório (ver Exemplo 1 acima para detalhes no que se

refere às soluções de reserva de fármaco e concentrações; o(s) fármaco(s) de teste pode(m) também ser adicionado(s) simultaneamente com a estimulação de PBMC/PMN). Para comparação, algumas experiências são realizadas sem os fármacos.

Para estimular a libertação de citoquinas e quimoquinas inflamatórias tais como IL-1β, IL-6, TNF, IL-8, IL-10, IL-12p70, MCP-1, incubam-se PBMC/PMN (com 1-10×10^6/mL) (37°C/5% de CO_2) durante 4-24 horas (em RPMI-1640 com 1-10% de soro fetal de bovino) com lipopolissacárido (LPS, concentração final 1-100 ng/mL), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, concentração final 1-100 ng/mL) ou uma mistura de LPS/PMA. As células PBMC/PMN podem também ser estimuladas com concentrações biologicamente activas documentadas de adenosina-difosfato (ADP), ácido araquidónico, ionofóro de cálcio A23187 e/ou o análogo de tromboxano U-46619, com ou sem PMA e/ou LPS como acima. As incubações/estimulações de PBMC/PMN podem também ser realizadas na presença de plaquetas humanas (a partir de sangue de dadores saudáveis) com uma proporção de PBMC/PMN:plaquetas 1:10 a 1:10000. Incubam-se as células (a 37°C/5% de CO_2 em RPMI-1640 com 1-10% de soro fetal de bovino) com fármaco(s) de teste (pemirolast em combinação com estatina, pemirolast sozinho e estatina sozinha, como acima) durante 1 minuto a 24 horas antes da estimulação de PBMC/PMN para libertação de citoquina/quimoquina (para comparação, algumas experiências são realizadas sem os fármacos; o(s) fármaco(s) de teste pode(m) também ser adicionado(s) simultaneamente com a estimulação de PBMC/PMN). Depois de centrifugar as células após as incubações/estimulações, as concentrações de quimoquinas e citoquinas humanas nos sobrenadantes são quantificadas utilizando um Cytometric Bead Array (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Podem-se também utilizar kits de imunoensaios enzimáticos disponíveis comercialmente (kits EIA/ELISA) para medição de citoquinas e quimoquinas de acordo com as instruções do(s) fabricante(s). Os sedimentos celulares são armazenados congelados (-80°C) em tampão RLT (QIAGEN, Valencia, CA) até processamento posterior para experiências de microarranjo (ver Exemplo 12 abaixo).

Exemplo 3

Ensaios de libertação de mediador inflamatório em mastócitos de ratinho

Mastócitos de ratinho (mMCs) cultivados derivados de medula óssea são obtidos cultivando células de medula óssea a partir de ratinhos C57BL/6. Cultivam-se as células de medula óssea (a partir de fémures de ratinho lavados com PBS) (37°C/5% de CO_2) em RPMI 1640 condicionado enriquecido com 10% de WEHI-3 ou X-63, suplementado com 10% de soro fetal de bovino inactivado por calor, L-glutamina 4 mM, 2-mercaptoetanol 50 µM, piruvato de sódio 1 mM, aminoácidos não essenciais 0,1 mM, Hepes 10 mM e 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina. O desenvolvimento de mastócitos (que crescem em suspensão) é confirmado por expressão de Kit (por citometria de fluxo) sobre a superfície celular e/ou por coloração com azul de toluidina (geralmente após pelo menos 3-5 semanas de cultura).

Mastócitos de ratinho cultivados derivados de medula óssea do tipo tecido conjuntivo (tipo CT) são obtidos cultivando células de medula óssea a partir de ratinhos C57BL/6. Cultivam-se as células de medula óssea (37°C/5% de CO_2) em meio RPMI-1640 contendo 10% de FCS filtrado, L-glutamina 4 mM, piruvato de sódio 1 mM, 100 IU/mL de penicilina G, 100 µg/mL de estreptomicina, MEM aminoácidos não essenciais 0,1 mM e 2-ME 50 µM, suplementado com 50 ng/mL de factor de células estaminais murino recombinante e 1 ng/mL de IL-4 murino recombinante. O desenvolvimento de mastócitos é confirmado por expressão de Kit (por citometria de fluxo) sobre a superfície celular e/ou por coloração com azul de toluidina (geralmente após pelo menos 3-5 semanas de cultura).

Podem-se também utilizar linhas de células de mastócitos de ratinho MC/9 (obtida na ATCC, produto n.° CRL-8306) e C1.MC/C57.1 (Young *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9175 (1987)). As células MC/9 são cultivadas de acordo com as instruções da ATCC (http://www.atcc.org), e as células C1.MC/C57.1 são cultivadas como descrito em Rumsaeng *et al.* (J. Immunol. 158, 1353 (1997)).

Para activação/estimulação através de ligação cruzada do receptor de IgE, os mastócitos cultivados são inicialmente sensibilizados durante 90 minutos a 37°C (5% de CO_2) com um anticorpo IgE monoclonal anti-TNP de ratinho (IgEI-b4, ATCC, Rockville, MD, USA), utilizado como um sobrenadante de hibridoma a 15%. As células a utilizar nos ensaios de N-acetil-beta-D-hexosaminidase (ou histamina) ou libertação de citoquina/quimoquina (ver abaixo) são depois submetidas a duas lavagens com PBS e ressuspendem-se em meio RPMI-1640 suplementado com 0,2% de albumina de soro de bovino (BSA) (Sigma) antes de as células (a 0,5-10x10^6/mL) serem activadas por adição de 100 ng/mL de TNP-BSA (Biosearch Technologies, San Francisco, CA) com uma razão de acoplamento de 9/1. A incubação (37°C/5% de CO_2) com TNP-BSA é de 30 minutos para a análise de libertação de beta-hexosaminidase (ou histamina) e de 6-24 horas para análise da libertação de citoquina e quimoquina. Incubam-se as células (37°C/5% de CO_2) com fármaco(s) de teste (pemirolast em combinação com estatina (rosuvastatina ou atorvastatina), pemirolast sozinho e estatina sozinha) durante 1 minuto a 24 horas antes da adição de TNP-BSA (ver Exemplo 1 acima para detalhe no que se refere às soluções de reserva de fármaco e concentrações; o(s) fármaco(s) de teste pode(m) também ser adicionado(s) simultaneamente com a estimulação de TNP-BSA). Para comparação, algumas experiências são realizadas sem os fármacos. Após as incubações/estimulações, centrifugam-se as amostras e analisam-se os sobrenadantes em relação ao teor de beta-hexosaminidase (ou histamina) e/ou citoquinas/quimoquinas como descrito abaixo. Os sedimentos celulares são armazenados congelados (-80°C) em tampão RLT (QIAGEN, Valencia, CA) até processamento posterior para experiências de microarranjo (ver Exemplo 12 abaixo).

Para detecção da libertação dependente de IgE da enzima granular de mastócitos beta-hexosaminidase, utiliza-se um ensaio colorimétrico enzimático. Transferem-se 60 µL do sobrenadante de cada poço para uma placa de 96 poços e misturam-se com um volume igual de solução de substrato (p-nitrofenil-N-acetil-b-D-glucosamida 7,5 mM dissolvida em ácido cítrico 80 mM, pH 4,5). Incuba-se a mistura sobre uma plataforma oscilante durante 2 horas a 37°C. Após incubação,

adicionam-se 120 µL de glicina (0,2 M, pH 10,7) a cada poço e mede-se a absorvância a 405 e 490 nm utilizando um leitor de microplacas de precisão Emax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A libertação de beta-hexosaminidase é expressa como uma percentagem da beta-hexosaminidase total determinada após lise celular. Para detecção da libertação dependente de IgE de histamina de mastócitos granulares, utilizam-se kits de imunoensaios enzimáticos disponíveis comercialmente (kits EIA/ELISA) para medição de histamina de acordo com as instruções do(s) fabricante(s).

Para detecção de libertação dependente de IgE de citoquinas e quimoquinas de mastócitos de ratinho, tais como IL-6, IL-4, TNF, IL-1β, KC, MCP-1, IL-10, IL-12p70, IFNγ, utiliza-se um Cytometric Bead Array (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Podem-se também utilizar kits de imunoensaios enzimáticos disponíveis comercialmente (kits EIA/ELISA) para medição de citoquinas e quimoquinas de acordo com as instruções do(s) fabricante(s).

Para além das experiências com mastócitos anteriores, os efeitos de inibição de mastócitos do(s) fármaco(s) de teste (como acima) podem também ser estudados utilizando abordagens experimentais e ensaios bem estabelecidos e documentados para analisar a libertação induzida (com *e.g.* anti-IgE (com ou sem pré-tratamento das células com IgE de rato ou ratinho), concanavalina A, proteína L, composto 48/80, ionofóro A23187, PMA) de histamina, beta-hexosaminidase ou triptase a partir de mastócitos peritoneais de ratinho ou rato isolados de fresco.

Exemplo 4

Ensaios de libertação de mediador inflamatório em células RAW 264.7

Cultivam-se as células RAW 264.7 (37°C/5% de CO_2) em DMEM, suplementado com 100 unidade/mL de penicilina, e 100 µg/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal de bovino.

Para estimular a libertação de citoquinas e quimoquinas inflamatórias tais como IL-6, TNF, It-1β, KC, MCP-1, IL-10, IL-12p70, IFNγ, incubam-se as células RAW 264.7 (com 1-10×10^6/mL) (37°C/5% de CO_2) durante 4-24 horas (em DMEM com 1-10% de soro fetal de bovino, com ou sem suplementos) com lipopolissacárido (LPS, concentração final 1-100 ng/mL), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, concentração final 1-100 ng/mL) ou uma mistura de LPS/PMA. As células RAW 264.7 podem também ser estimuladas com concentrações biologicamente activas documentadas de adenosina-difosfato (ADP), ácido araquidónico, ionofóro de cálcio A23187 e/ou o análogo de tromboxano U-46619, com ou sem PMA e/ou LPS como acima. As incubações/estimulações de RAW 264.7 podem também ser realizadas na presença de plaquetas de ratinho ou humano (a partir de sangue de dadores saudáveis) com uma proporção de RAW 264.7:plaquetas de 1:10 a 1:10000. Incubam-se as células (a 37°C/5% de CO_2 em DMEM com 1-10% de soro fetal de bovino, com ou sem suplementos) com fármaco(s) de teste pemirolast em combinação com estatina (rosuvastatina ou atorvastatina), pemirolast sozinho e estatina sozinha) durante 1 minuto a 24 horas antes da estimulação de RAW 264.7 para libertação de citoquina/quimoquina (ver Exemplo 1 acima para detalhes no que se refere às soluções de reserva de fármaco e concentrações; o(s) fármaco(s) de teste pode(m) também ser adicionado(s) simultaneamente com a estimulação de RAW 264.7). Para comparação, algumas experiências são realizadas sem os fármacos. Depois de centrifugar as células após as incubações/estimulações, as concentrações de citoquina e quimoquina de ratinho nos sobrenadantes são quantificadas utilizando um Cytometric Bead Array (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Podem-se também utilizar kits de imunoensaios enzimáticos disponíveis comercialmente (kits EIA/ELISA) para medição de citoquinas e quimoquinas de acordo com as instruções do(s) fabricante(s). Os sedimentos celulares são armazenados congelados (-80°C) em tampão RLT (QIAGEN, Valencia, CA) até processamento posterior para experiências de microarranjo (ver Exemplo 12 abaixo).

Exemplo 5

Inflamação das patas de rato induzida por carragenano

Este ensaio é realizado essencialmente de acordo com o descrito por Winter *et al.* (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 111, 544 (1962)). Administra(m)-se o(s) fármaco(s) de teste (pemirolast em combinação com estatina rosuvastatina ou atorvastatina), pemirolast sozinho e estatina sozinha) em doses de 0,03 a 50 mg/kg subcutaneamente, intravenosamente, intraperitonealmente ou oralmente a cada 2-24 horas a ratos machos Sprague-Dawley ou Wistar pesando aproximadamente 150-400 g (para comparação, algumas experiências são realizadas sem os fármacos). Antes da administração, soluções de reserva de fármacos (ver Exemplo 1 acima) são diluídas conforme necessário *e.g.* metilcelulose a 0,5% ou 1% em água (para tratamento oral) ou solução salina (para administração parentérica). Podem-se também utilizar outros veículos. De 1 minuto a 24 horas após a primeira dose de fármaco, injecta-se uma solução de carragenano a 0,5, 1,0 ou 2,0% (Tipo IV Lambda, Sigma Chemical Co.) em solução salina a 0,9% na região subplantar de uma pata traseira de ratos anestesiados. Antes, e aos intervalos indicados 3-24 horas após a injecção de carragenano, mede-se o volume da pata injectada com um pletismómetro de deslocamento ligado a um transdutor de pressão com um mostrador digital. O grau de inchaço indica o grau de edema inflamatório. 3-24 horas após a injecção de carragenano, os ratos são sacrificados e perfundidos com solução salina ou PBS (podem-se também utilizar outros meios de perfusão). Colhem-se biópsias de tecido mole plantar a partir das patas inflamadas, pesam-se, armazenam-se congeladas (as amostras para análise de microarranjo são congeladas a -80°C em TRIzol, Invitrogen, Carlsbad, CA), e, como descrito abaixo (Exemplo 10 e 12), analisam-se subsequentemente em relação a 1) acumulação de mieloperoxidase (MPO), reflectindo a acumulação de leucócitos neutrófilos inflamatórios; e/ou 2) expressão génica de tecido utilizando tecnologia de microarranjo. O tecido das patas não inflamadas a partir de ratos não tratados proporciona níveis de linha de base de MPO e expressão génica. A inflamação de tecido pode também ser estudada utilizando técnicas histológicas e imuno-histoquímicas convencionais. A

inflamação da pata pode também ser induzida por injecção subplantar de composto 48/80 (48/80, 1-5 µg em 50-100 µl de PBS ou solução salina) (em vez de carragenano), seguindo-se medição da inchação inflamatória da pata e colheita de biópsias de tecido para análise de microarranjo e/ou MPO (como acima) 30 min a 8 horas após injecção de 48/80.

Exemplo 6

Inflamação do ouvido de ratinho induzida por óleo de cróton

Este ensaio é realizado essencialmente de acordo com o descrito por Tonelli *et al.* (Endocrinology 77, 625 (1965)) (podem-se também utilizar outras estirpes de ratinhos). Administra(m)-se o(s) fármaco(s) de teste (pemirolast em combinação com estatina (rosuvastatina ou atorvastatina), pemirolast sozinho e estatina sozinha) em doses de 0,03 a 50 mg/kg subcutaneamente, intravenosamente, intraperitonealmente ou oralmente a cada 2-24 horas (para comparação, algumas experiências são realizadas sem os fármacos). Antes da administração, soluções de reserva de fármacos (ver Exemplo 1 acima) são diluídas conforme necessário *e.g.* metilcelulose a 0,5% ou 1% em água (para tratamento oral) ou solução salina (para administração parentérica). Podem-se também utilizar outros veículos. De 1 minuto a 24 horas após a primeira dose de fármaco, aplicam-se topicamente 10-30 µL de uma solução a 2,0 ou 4,0% de óleo de cróton em acetona ou etanol a um ou a ambos os ouvidos. Aos intervalos indicados 4-12 horas após aplicação do óleo de cróton, sacrificam-se os animais, e pesam-se biópsias de punções dos ouvidos para determinar a inchação inflamatória dos ouvidos (a espessura do ouvido pode também ser medida para determinar a inchação). Colhem-se as biópsias a partir dos ouvidos inflamados, armazenam-se congeladas (as amostras para análise de microarranjo são congeladas a -80°C em TRIzol), e, como descrito abaixo (Exemplo 10 e 12), analisam-se subsequentemente em relação a 1) acumulação de mieloperoxidase (MPO), reflectindo a acumulação de leucócitos neutrófilos inflamatórios; e/ou 2) expressão génica de tecido utilizando tecnologia de microarranjo. Biópsias de ouvidos não inflamados a partir de ratinhos não tratados proporcionam níveis de linha de base de inchação, MPO e expressão génica. A inflamação de tecido pode

também ser estudada utilizando técnicas histológicas e imuno-histoquímicas convencionais.

Exemplo 7

Inflamação do ouvido de ratinho induzida por éster de forbol ou ácido araquidónico

Estes ensaios são realizados essencialmente de acordo com os descritos por Chang *et al.* (Eur. J. Pharmacol. 142, 197 (1987)) (embora se possam utilizar também outras estirpes de ratinho). Administra(m)-se o(s) fármaco(s) de teste (pemirolast em combinação com estatina (rosuvastatina ou atorvastatina), pemirolast sozinho e estatina sozinha) em doses de 0,03 a 50 mg/kg subcutaneamente, intravenosamente, intraperitonealmente ou oralmente a cada 2-24 horas a ratinhos machos ou fêmeas (para comparação, algumas experiências são realizadas sem os fármacos). Antes da administração, soluções de reserva de fármacos (ver Exemplo 1 acima) são diluídas conforme necessário *e.g.* metilcelulose a 0,5% ou 1% em água (para tratamento oral) ou solução salina (para administração parentérica). Podem-se também utilizar outros veículos. De 1 minuto a 24 horas após a primeira dose de fármaco, aplicam-se 1-10 µg de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), tetradecanoil-forbol-acetato (TPA), ou 1-5 mg de ácido araquidónico em 10-30 µl de acetona ou etanol topicamente a um ou a ambos os ouvidos. 4-12 horas após aplicação de PMA ou TPA, e 30 min a 6 horas após aplicação de ácido araquidónico, sacrificam-se os animais, e pesam-se biópsias de punções dos ouvidos para determinar a inchação inflamatória dos ouvidos (a espessura do ouvido pode também ser medida para determinar a inchação). Colhem-se as biópsias a partir dos ouvidos inflamados, armazenam-se congeladas (as amostras para análise de microarranjo são congeladas a -80°C in TRIzol), e, como descrito abaixo (Exemplo 10 e 12), analisam-se subsequentemente em relação a 1) acumulação de mieloperoxidase (MPO), reflectindo a acumulação de leucócitos neutrófilos inflamatórios; e/ou 2) expressão génica de tecido utilizando tecnologia de microarranjo. Biópsias de ouvidos não inflamados a partir de ratinhos não tratados proporcionam níveis de linha de base de inchação, MPO e expressão génica.

A inflamação de tecido pode também ser estudada utilizando técnicas histológicas e imuno-histoquímicas convencionais.

Exemplo 8

Reacção e inflamação aguda de tecido em resposta a lesão em ratinho e rato

Utilizam-se ratinhos CBA ou NMRI machos pesando aproximadamente 15-30 g, ou ratos Wistar ou Sprague-Dawley machos pesando aproximadamente 150-450 g (podem-se também utilizar outras estirpes de ratinhos e ratos). A lesão aguda e a inflamação aguda do tecido são conseguidas na parte distal da cauda ou num dos ouvidos utilizando um bisturi sob condições assépticas. São efectuadas uma, duas ou três incisões longitudinais paralelas, com aproximadamente 5-15 mm de comprimento, através de todas as camadas da pele. Administra(m)-se o(s) fármaco(s) de teste (pemirolast em combinação com estatina (rosuvastatina ou atorvastatina), pemirolast sozinho e estatina sozinha) em doses de 0,03 a 50 mg/kg subcutaneamente, intravenosamente, intraperitonealmente ou oralmente a cada 2-24 horas, com a primeira dose dada 1 minuto a 24 horas antes da lesão do tecido (para comparação, algumas experiências são realizadas sem os fármacos). Antes da administração, soluções de reserva de fármacos (ver Exemplo 1 acima) são diluídas conforme necessário *e.g.* metilcelulose a 0,5% ou 1% em água (para tratamento oral) ou solução salina (para administração parentérica). Podem-se também utilizar outros veículos. 2-48 horas após a lesão, matam-se os animais e removem-se os segmentos lesionados dos tecidos, pesam-se e armazenam-se congelados (as amostras para análise de microarranjo são congeladas a -80°C em TRIzol), e, como descrito abaixo (Exemplo 10 e 12), analisam-se subsequentemente em relação a 1) acumulação de mieloperoxidase (MPO), reflectindo a acumulação de leucócitos neutrófilos inflamatórios; e/ou 2) expressão génica de tecido utilizando tecnologia de microarranjo. Tecidos não lesionados/não inflamados correspondentes a partir de animais não tratados proporcionam níveis de linha de base de MPO e expressão génica. As reacções e inflamação de tecidos em resposta a lesão podem também ser estudadas utilizando técnicas histológicas e imuno-histoquímicas convencionais.

Exemplo 9

Reacção e inflamação aguda de tecido em resposta a lesão em rato

Utilizam-se ratos Sprague-Dawley machos pesando 350-500 g (embora se possam utilizar também outras estirpes de rato). Anestesiam-se os animais com isoflurano em oxigénio e a lesão aguda e a inflamação aguda do tecido são conseguidas na artéria carótida comum esquerda como se segue: Após exposição cirúrgica das artérias carótidas externas e internas esquerdas comuns e cessação temporária do fluxo de sangue local com laqueações temporárias, faz-se passar um cateter de balão (2 French Fogarty) através da carótida externa para a aorta. Em seguida, o balão é inflado com água suficiente para distender a artéria carótida comum e depois puxado para a carótida externa. Repete-se este procedimento três vezes, e depois remove-se o cateter, laqueia-se a carótida externa e fecha-se a ferida. Administra(m)-se o(s) fármaco(s) de teste (pemirolast em combinação com estatina (rosuvastatina ou atorvastatina), pemirolast sozinho e estatina sozinha) em doses de 0,03 a 50 mg/kg subcutaneamente, intravenosamente, intraperitonealmente ou oralmente a cada 2-24 horas, com a primeira dose dada 1 minuto a 24 horas antes da lesão do tecido (para comparação, algumas experiências são realizadas sem os fármacos). Antes da administração, soluções de reserva de fármacos (ver Exemplo 1 acima) são diluídas conforme necessário *e.g.* metilcelulose a 0,5% ou 1% em água (para tratamento oral) ou solução salina (para administração parentérica). Pode-se também utilizar outro veículo. 2-48 horas após a lesão, anestesiam-se os animais com isoflurano em oxigénio e expõem-se as suas artérias carótidas esquerdas. Colocam-se clamps na zona mais proximal das artérias carótidas comuns e internas, respectivamente, e depois lava-se gentilmente o vaso entre os clamps com solução salina e/ou TRIzol, removem-se, pesam-se e armazenam-se congeladas (as amostras para análise de microarranjo são congeladas a -80°C em TRIzol), e, como descrito abaixo (Exemplo 10 e 12), analisam-se subsequentemente em relação a 1) acumulação de mieloperoxidase (MPO), reflectindo a acumulação de leucócitos neutrófilos inflamatórios; e/ou 2) expressão génica de tecido

utilizando tecnologia de microarranjo. Vasos não lesionados/inflamados correspondentes a partir de ratos não tratados proporcionam níveis de linha de base de MPO e expressão génica. As reacções e inflamação de tecido em resposta a lesão podem também ser estudadas utilizando técnicas histológicas e imuno-histoquímicas convencionais.

Exemplo 10

Acumulação inflamatória de mieloperoxidase em tecido

A enzima mieloperoxidase (MPO) é abundante em leucócitos neutrófilos e é frequentemente utilizada como um marcador para a detecção da acumulação de neutrófilos em tecido inflamado. Para determinar a acumulação de mieloperoxidase inflamatória em tecidos inflamados de ratinho e rato (como descrito nas Exemplos 5-9 acima), homogeneizam-se os tecidos em brometo de hexadeciltrimetil-amónio a 0,5%, e liofilizam-se. A actividade de MPO do sobrenadante é determinada espectrofotometricamente como a alteração em absorvância a 650 nm (25°C) que ocorre na reacção redox de H_2O_2-tetrametilbenzidina catalisada por MPO. Os valores são expressos como unidades de MPO/mg de tecido.

Exemplo 11

Ensaios em células de músculo liso

Células de músculo liso aórtico de rato (RASMCs) são isoladas como anteriormente descrito (Hedin *et al.*, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 17, 1977 (1997)). Cultivam-se as células (37°C/5% de CO_2) em meio F-12 de Ham suplementado com 10% de soro fetal de bovino, 50 µg/mL de ácido L-ascórbico, 50 µg/mL de estreptomicina, 50 IU/mL de penicilina (F-12/10% de soro fetal de bovino), desenvolvem-se até à confluência, submetem-se a séries de passagens por tripsinização, e utilizaram-se em experiências após 2-6 passagens. Semeiam-se as RASMCs em placas de 24 poços com uma densidade de aproximadamente $4x10^4$ células por poço em F-12/10% de soro fetal de bovino (podem-se também utilizar placas com maiores números de poços por placa e números inferiores apropriados de células por poço). Após 24 horas,

sincronizam-se as células na fase G0/G1 por inanição em meio F-12 de Ham suplementado com 0,1% de albumina de soro de bovino (BSA), 50 µg/mL de ácido L-ascórbico, 50 µg/mL de estreptomicina e 50 IU/mL de penicilina (F-12/0,1% de BSA) durante 24-48 horas. Para estimar a síntese de ADN, estimulam-se as RASMCs inanidas quer com 10 ng/ml de IGF-1 quer com 10% de soro fetal de bovino durante 12-48 horas (podem-se também utilizar outros mitogénios bem estabelecidos tais como PDGF). Adicionam-se o(s) fármaco(s) de teste (pemirolast em combinação com estatina (rosuvastatina ou atorvastatina), pemirolast sozinho e estatina sozinha) 1 minuto a 24 horas antes da estimulação (ver Exemplo 1 acima para detalhes no que se refere às soluções de reserva de fármaco e concentrações; o(s) fármaco(s) de teste pode(m) também ser adicionado(s) simultaneamente com a estimulação). Para comparação, algumas experiências são realizadas sem os fármacos. As células são marcadas com 1 µCi [3H]-timidina durante 8 horas antes do fim do período de estimulação. Lavam-se depois as placas com PBS arrefecido em gelo, incubam-se de um dia para o outro com ácido tricloroacético a 10% (p/v) arrefecido em gelo, lisam-se com hidróxido de sódio 0,2 M, e mede-se a radioactividade num contador de cintilação de líquido. A proliferação de RASMC estimuladas pode também ser analisada utilizando ensaios de proliferação celular de bromodesoxiuridina (BrdU) disponíveis comercialmente (por exemplo ELISA de proliferação celular, BrdU, da Roche Applied Science); o reagente de proliferação celular WST-1 (Roche Diagnostics Scandinavia AB, Bromma, Suécia) (ambos de acordo com as instruções do fabricante), ou por contagem celular. Em experiências separadas (para estudar a expressão génica), maiores números de RASMCs inanidas (1-5 x 10^6 células por poço) são estimuladas com 10 ng/ml de IGF-1 ou 10% de soro fetal de bovino (ou PDGF) como acima, ou com LPS (1-100 ng/mL), com 1-10% de soro fetal de bovino durante 4-48 horas (todos os estímulos e sem fármaco(s) de teste como acima). Colhem-se depois as células e armazenam-se congeladas (-80°C) em tampão RLT (QIAGEN, Valencia, CA) até processamento posterior para experiências de microarranjo (ver Exemplo 12 abaixo).

As células de músculo liso bronquial de humano (HBSMCs, Promocell; Heidelberg, Alemanha) são cultivadas em DMEM

suplementado com 10% de FIBS, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 0,12 IU/mL de insulina, e com ou sem 2 µg/mL de anfotericina B. Antes das experiências, as células podem ser cultivadas sem crescimento (*arrested*) durante 24 horas em meio isento de insulina, de FBS baixo (0,3-5%). Para estimular a formação e libertação de citoquinas e quimoquinas inflamatórias tais como IL-8 e eotaxina, incubam-se HBSMCs (a 80% de confluência, correspondendo a aproximadamente 8×10^5/ balão de 25 cm^2) (37°C/5% de CO_2) durante 24-48 horas (em DMEM com 1-10% de soro fetal de bovino, com ou sem suplementos) com diferentes combinações de IL-1β e TNF-α (ambos 1-50 ng/mL). Incubam-se as células (a 37°C/5% de CO_2 em DMEM com 0,3-10% de soro fetal de bovino, com ou sem suplementos) com fármaco(s) de teste (pemirolast em combinação com estatina, pemirolast sozinho e estatina sozinha, como acima) durante 1 minuto a 24 horas antes da estimulação de HBSMC (ver Exemplo 1 acima para detalhes no que se refere às soluções de reserva de fármaco e concentrações; o(s) fármaco(s) de teste pode(m) também ser adicionado(s) simultaneamente com estimulação de HBSMC). Para comparação, algumas experiências são realizadas sem os fármacos. Após as incubações/estimulações, concentrações de quimoquinas e citoquinas humanas nos sobrenadantes são quantificadas usando kits de imunoensaios enzimáticos disponíveis comercialmente (kits EIA/ELISA) de acordo com as instruções do(s) fabricante(s). Colhem-se depois as células e armazenam-se congeladas (-80°C) em tampão RLT (QIAGEN, Valencia, CA) até processamento posterior para experiências de microarranjo (ver Exemplo 12 abaixo).

Exemplo 12

Análise de expressão génica

O ARN total a partir de tecidos de ratinho e rato (ver Exemplos 5 a 9, 15 e 16) é isolado utilizando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguindo-se RNeasy cleanup (QIAGEN, Valencia, CA) de acordo com os protocolos dos fabricantes. O ARN total a partir das incubações/estimulações de células descritas nos exemplos acima e abaixo (mastócitos de ratinho, MonoMac-6, PBMC, PMN, RAW 264.7, RASMC, HBSMC, NB4, HL-60) é isolado utilizando o RNeasy Mini Kit (QIAGEN),

com ou sem o conjunto de DNase isenta de RNase (QIAGEN), de acordo com o(s) protocolo(s) do fabricante. Dependendo das espécies a partir das quais os diferentes tecidos e células têm origem, a análise de microarranjo utiliza GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array, GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array ou GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array, ou a versão mais recente correspondente destes chips (todos os arranjos Affymetrix, Santa Clara, CA) de acordo com os protocolos do fabricante. Os dados de expressão do microarranjo são analisados usando *e.g.* GeneChip Operating Software (Affymetrix) e Bioconductor/R (www.bioconductor.org). Podem-se também utilizar softwares relevantes.

A expressão génica a partir das diferentes espécies pode também ser analisada utilizando Human Genome Survey Microarray V2.0, Mouse Genome Survey Microarray V2.0 ou Rat Genome Survey Microarray (a versão mais recente correspondente destes arranjos) de acordo com protocolos do fabricante Applied Biosystems (Foster City, CA). Estes dados de expressão de microarranjo são analisados utilizando *e.g.* 1700 Chemiluminescent Microarray Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) fornecido com uma base de dados Oracle® de anotações, GeneSpring 7.2 (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA) e o software Microarray Suite versão 5.0 (MAS 5.0, Affymetrix). Podem-se também utilizar outros softwares relevantes.

A expressão génica (níveis de ARNm) pode também ser analisada utilizando PCR quantitativa ou semiquantitativa. A análise de expressão génica ao nível da proteína pode ser analisada utilizando kits de imunoensaios enzimáticos disponíveis comercialmente (kits EIA/ELISA) (de acordo com as instruções do(s) fabricante(s)), ou abordagens Western blot e/ou imuno-histoquímicas convencionais.

Exemplo 13

Ensaios de proliferação celular

A proliferação de mastócitos de ratinho, células MonoMac-6, células RAW 264.7, células NB4, células HL-60 e HBSMC estimulados e não estimulados descrita nos exemplos

acima e abaixo (com ou sem paragem de crescimento durante 24-48 horas em 0,1-5% de soro fetal de bovino antes da adição dos fármacos de teste respectivos e/ou estímulos descritos nos Exemplos acima e abaixo durante 24-72 horas) é medida utilizando o reagente de proliferação celular WST-1 (Roche Diagnostics Scandinavia AB, Bromma, Suécia) ou ensaios de proliferação celular de bromodesoxiuridina (BrdU) disponíveis comercialmente (por exemplo ELISA de proliferação celular, BrdU, da Roche Applied Science) de acordo com as instruções dos fabricantes. Podem-se também utilizar outros ensaios de proliferação celular convencionais.

Exemplo 14

Testes de agregação de plaquetas

A agregação de plaquetas humanas ou de coelho (em plasma rico em plaquetas ou sangue inteiro) induzida por adenosina-difosfato (ADP), ácido araquidónico, colagénio ou o análogo de tromboxano U-46619 é analisada utilizando agregometria, por exemplo como descrito por Bertele *et al.* (Eur. J. Pharmacol. 85, 331 (1982)). A agregação de plaquetas induzida (como acima) pode também ser analisada utilizando plaquetas de humano ou de coelho lavadas e/ou com outros métodos de agregometria estabelecidos ou outros métodos correspondentes para medição da agregação de plaquetas. Adicionam-se o(s) fármaco(s) de teste (pemirolast em combinação com estatina (rosuvastatina ou atorvastatina), pemirolast sozinho e estatina sozinha) 1-120 minutos prior da indução da agregação de plaquetas (ver Exemplo 1 acima para detalhes no que se refere às soluções de reserva de fármaco e concentrações; o(s) fármaco(s) de teste pode(m) também ser adicionado(s) simultaneamente com indução da agregação de plaquetas). Para comparação, algumas experiências são realizadas sem os fármacos.

Exemplo 15

Inflamação peritoneal de ratinho induzida por zimosano e outros estímulos

Este ensaio é realizado essencialmente de acordo com Rao *et al.* (J. Pharmacol. Exp. Ther. 269, 917 (1994)) (podem-se também utilizar outras estirpes de ratinho). Administra(m)-se o(s) fármaco(s) de teste (pemirolast em combinação com estatina (rosuvastatina ou atorvastatina), pemirolast sozinho e estatina sozinha) em doses de 0,03 a 50 mg/kg subcutaneamente, intravenosamente, intraperitonealmente ou oralmente a cada 2-24 horas aos animais (para comparação, algumas experiências são realizadas sem os fármacos). Antes da administração, soluções de reserva de fármacos (ver Exemplo 1 acima) são diluídas conforme necessário *e.g.* metilcelulose a 0,5% ou 1% em água (para tratamento oral) ou solução salina (para administração parentérica). Podem-se também utilizar outros veículos. De 1 minuto a 24 horas após a primeira dose de fármaco, Injectam-se intraperitonealmente 0,5-2 mg de zimosano A (Sigma, cat. n.º Z4250) em 0,5-1 mL de PBS estéril (sonicado e bem misturado) (em vez de se utilizar zimosano A, a inflamação peritoneal pode também ser induzida por injecção intraperitoneal de concentrações pró-inflamatórias de outros estímulos pró-inflamatórios bem estabelecidos tais como anti-IgE de ratinho (com ou sem pré-tratamento intraperitoneal com IgE de ratinho durante 1-3 dias), concanavalina A, carragenano, proteose peptona, LPS, PMA, tioglicolato, ácido araquidónico, fMLP, TNF, IL-1β) (o(s) fármaco(s) de teste pode(m) também ser administrado(s) simultaneamente com injecção intraperitoneal de zimosano ou de outros estímulos pró-inflamatórios). 2-24 horas após injecção de zimosano (ou de um ou mais dos outros estímulos pró-inflamatórios), sacrificam-se os animais. Lava-se depois a cavidade peritoneal com 1-3 mL de tampão de lavagem (PBS arrefecido em gelo com ou sem EDTA 3-5 mM ou 5-10 unidades/ml de heparina). As contagens de leucócitos totais e diferenciais no fluido de lavagem são efectuadas com um hemocitómetro após coloração com solução de Türk e/ou em preparações de Cytospin coradas com May-Grunwald Giemsa ou um corante de Wright modificado (Diff-Quik), respectivamente, por microscopia óptica utilizando critérios morfológicos

padrão. Podem-se também utilizar outros métodos estabelecidos para determinação das contagens de leucócitos totais e diferenciais. Centrifuga-se o fluido de lavagem restante (300-3000 x g, 4°C, 3-10 min), e o sobrenadante de fluido de lavagem isento de células é armazenado congelado (-20°C a -80°) até ser analisado quanto ao conteúdo de mediadores inflamatórios LTB_4, PGE_2, TXB_2 e/ou citoquinas/quimoquinas de ratinho (*e.g.* IL-4, IL-6, TNF, IL-1β, KC, MCP-1, IL-10, IL-12p70, IFNγ) como descrito no Exemplo 1 e 4 acima. Determina-se o teor em histamina no sobrenadante do fluido de lavagem utilizando kits de imunoensaio enzimático de histamina disponíveis comercialmente (kits EIA/ELISA) de acordo com as instruções do(s) fabricante(s). A activação de células peritoneais inflamatórias pode também ser estudada por medição da actividade de beta-hexosaminidase no fluido de lavagem utilizando o ensaio de beta-hexosaminidase descrito no Exemplo 3. Ressuspendem-se os sedimentos celulares do fluido de lavagem em 0,1-1,0 mL $KHPO_4$ 0,05 M pH 6,0 com HTAB a 0,5% armazenam-se congelados (-20°C a -80°) até à análise do teor em mieloperoxidase (MPO) como descrito por Rao *et al.* (J. Pharmacol. Exp. Ther. 269, 917-25 (1994)). Sedimentos celulares idênticos a partir de animais separados são armazenados congelados (-80°C) em tampão RLT (QIAGEN, Valencia, CA) até processamento posterior para experiências de microarranjo (ver Exemplo 12). No momento da lavagem da cavidade peritoneal com tampão de lavagem, colhem-se biopsias de tecido (parede peritoneal, intestinos e/ou outros órgãos/tecidos intra- ou retroperitoneais) a partir da cavidade peritoneal inflamada, pesam-se, armazenam-se congeladas (as amostras para análise de microarranjo são congeladas a -80°C em TRIzol, Invitrogen, Carlsbad, CA), e, como descrito no Exemplo 12, analisam-se subsequentemente em relação a expressão génica de tecido utilizando tecnologia de microarranjo. Cavidades peritoneais não inflamadas a partir de animais não tratados proporcionam níveis de linha de base de MPO, mediadores inflamatórios, citoquinas/quimoquinas e expressão génica. A inflamação de tecido pode também ser estudada utilizando técnicas histológicas e imuno-histoquímicas convencionais.

Exemplo 16

Inflamação peritoneal de rato induzida por zimosano e outros estímulos

Utilizam-se ratos Wistar ou Sprague-Dawley machos pesando aproximadamente 150-450 g. Administra(m)-se o(s) fármaco(s) de teste (pemirolast em combinação com estatina (rosuvastatina ou atorvastatina), pemirolast sozinho e estatina sozinha) em doses de 0,03 a 50 mg/kg subcutaneamente, intravenosamente, intraperitonealmente ou oralmente a cada 2-24 horas aos animais (para comparação, algumas experiências são realizadas sem os fármacos). Antes da administração, soluções de reserva de fármacos (ver Exemplo 1 acima) são diluídas conforme necessário *e.g.* metilcelulose a 0,5% ou 1% em água (para tratamento oral) ou solução salina (para administração parentérica). Podem-se também utilizar outros veículos. De 1 minuto a 24 horas após a primeira dose de fármaco, injectam-se 1-100 mg de zimosano A (Sigma, cat. no. Z4250) em 1-10 mL de PBS estéril (sonicado e bem misturado) intraperitonealmente (em vez de se utilizar zimosano A, a peritoneal inflamação pode também ser induzida por injecção intraperitoneal de concentrações pró-inflamatórias de outros estímulos pró-inflamatórios bem estabelecidos tais como anti-IgE de rato (com ou sem pré-tratamento intraperitoneal com IgE de rato durante 1-3 dias), concanavalina A, proteína L, composto 48/80, carragenano, proteose peptona, LPS, PMA, tioglicolato, ácido araquidónico, fMLP, TNF, IL-1β. Os fármaco(s) de teste podem também ser administrados simultaneamente com injecção intraperitoneal de zimosano ou de outros estímulos pró-inflamatórios). 2-24 horas após injecção de zimosano (ou um ou mais dos outros estímulos), sacrificam-se os animais. Lava-se depois a cavidade peritoneal com 10-20 ml de um tampão de lavagem (*e.g.* PBS arrefecido em gelo com ou sem EDTA 3-5 mM ou 5-10 unidades/ml de heparina). As contagens de leucócitos totais e diferenciais no fluido de lavagem são efectuadas com um hemocitómetro após coloração com solução de Türk e/ou em preparações de Cytospin coradas com May-Grunwald Giemsa ou um corante de Wright modificado (Diff-Quik), respectivamente, por microscopia óptica utilizando critérios morfológicos padrão. Podem-se também utilizar outros métodos estabelecidos

para determinação das contagens de leucócitos totais e diferenciais. Centrifuga-se o fluido de lavagem restante (300-3000 x g, 4°C, 3-10 min), e o sobrenadante de fluido de lavagem isento de células é armazenado congelado (-20°C a -80°) até ser analisado quanto ao conteúdo de mediadores inflamatórios LTB_4, PGE_2, TXB_2 e/ou citoquinas/quimoquinas de rato (*e.g.* IL-4, IL-6, TNF, IL-1β, KC, MCP-1, IL-10, IL-12p70, IFNγ) essencialmente como descrito no Exemplo 1 e 4 acima. Determina-se o teor em histamina no sobrenadante do fluido de lavagem utilizando kits de imunoensaio enzimático de histamina disponíveis comercialmente (kits EIA/ELISA) de acordo com as instruções do(s) fabricante(s). A activação de células peritoneais inflamatórias pode também ser estudada por medição da actividade de beta-hexosaminidase no fluido de lavagem utilizando o ensaio de beta-hexosaminidase descrito no Exemplo 3. Ressuspendem-se os sedimentos celulares do fluido de lavagem em 0,1-1,0 mL $KHPO_4$ 0,05 M pH 6,0 com HTAB a 0,5% armazenam-se congelados (-20°C a -80°) até à análise do teor em mieloperoxidase (MPO) basicamente como descrito por Rao *et al.* (J. Pharmacol. Exp. Ther., 269, 917-25 (1994)). Sedimentos celulares idênticos a partir de animais separados são armazenados congelados (-80°C) em tampão RLT (QIAGEN, Valencia, CA) até processamento posterior para experiências de microarranjo (ver Exemplo 12). No momento da lavagem da cavidade peritoneal com tampão de lavagem, colhem-se biopsias de tecido (parede peritoneal, intestinos e/ou outros órgãos/tecidos intra- ou retroperitoneais) a partir da cavidade peritoneal inflamada, pesam-se, armazenam-se congeladas (as amostras para análise de microarranjo são congeladas a -80°C em TRIzol, Invitrogen, Carlsbad, CA), e, como descrito no Exemplo 12, analisam-se subsequentemente em relação a expressão génica de tecido utilizando tecnologia de microarranjo. Cavidades peritoneais não inflamadas a partir de animais não tratados proporcionam níveis de linha de base de MPO, mediadores inflamatórios, citoquinas/quimoquinas e expressão génica. A inflamação de tecido pode também ser estudada utilizando técnicas histológicas e imuno-histoquímicas convencionais.

Exemplo 17

Ensaios de libertação de mediador inflamatório em células NB4 e HL-60

Cultivam-se as células NB4 de humano (Lanotte *et al.*, Blood, 77, 1080 (1991)) (37°C/5% de CO2) em meio RPMI-1640 suplementado com 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e soro fetal de bovino a 10% (v/v). Para diferenciação, adicionam-se 1-5 µM ácido todo-*trans*-retinóico (ATRA), geralmente a cada três dias.

Cultivam-se as células HL-60 humanas (Steinhilber *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1178, 1 (1993)) (37°C/5% de CO_2) em meio RPMI-1640 suplementado com 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10-20% (v/v) de soro fetal de bovino. Para diferenciação adicionam-se ATRA (1-5 µM), DMSO (1-2%), PMA (100-500 ng/mL) ou vitamina D3 (1-15 µM) durante 5 dias.

Para estimular a formação e libertação do mediador inflamatório leucotrieno B_4 (LTB_4), incubam-se as células NB4 ou HL-60 diferenciadas ou não diferenciadas (a $1\text{-}15\times10^6$/mL) durante 5-30 minutos (a 37°C em PBS com cálcio) com ácido araquidónico 10-40 µM e/ou ionofóro de cálcio A23187 2-10 µM. As células NB4 e HL-60 podem também ser estimuladas com concentrações biologicamente activas documentadas de adenosina-difosfato (ADP), fMLP, e/ou o análogo de tromboxano U-46619, com ou sem A23187 e/ou ácido araquidónico como acima. As incubações/estimulações de NB4 e HL-60 acima podem também ser realizadas na presença de plaquetas humanas (a partir de sangue de dadores saudáveis) com uma proporção de NB4/HL-60:plaquetas de 1:10 a 1:10000. As incubações/estimulações são interrompidas com 1 mL de metanol frio e prostaglandina B_2 (PGB_2) adicionada como padrão interno. Centrifugam-se as amostras e diluem-se os sobrenadantes com água para atingir uma concentração final de metanol de 30% e ajusta-se o pH a 3-4. Os metabolitos de ácido araquidónico no sobrenadante são extraídos sobre colunas de fase sólida C18 (Sorbent Technology, U.K.) pré-condicionadas (1 mL de metanol seguido por 1 mL de H_2O). Eluem-se os metabolitos com metanol, após o que se adiciona

um volume de água ao eluato. Para HPLC de fase reversa, misturam-se 76 µL de cada amostra com 39 µL de H_2O (podem-se também utilizar outras proporções em volume). Elui-se uma coluna Waters RCM 8×10 com metanol/acetonitrilo/H_2O/ácido acético (30:35:35:0,01 v/v) a 1,2 mL/min. A absorvância do eluato é monitorizada a 270 nm para detecção e quantificação de PGB_2 e LTB_4. Podem-se também utilizar kits de imunoensaios enzimáticos disponíveis comercialmente (kits EIA/ELISA) para medição de LTB_4 de acordo com as instruções do(s) fabricante(s) dos kits. Utilizando kits de imunoensaios enzimáticos (kits EIA/ELISA) disponíveis comercialmente de acordo com as instruções do(s) fabricante(s), os sobrenadantes das incubações/estimulações de NB4/HL-60 anteriores podem também ser analisados no que se refere ao teor dos mediadores inflamatórios prostaglandina E_2 (PGE_2) e/ou tromboxano B_2 (TXB_2). Incubam-se as células (a 37°C em PBS sem cálcio ou em RPMI-1640 com 1-20% de soro fetal de bovino, com ou sem suplementos) com fármaco(s) de teste (pemirolast em combinação com estatina (rosuvastatina ou atorvastatina), pemirolast sozinho e estatina sozinha) durante 1 minuto a 24 horas antes da estimulação de NB4 ou HL-60 para libertação de mediador inflamatório (ver Exemplo 1 acima para detalhes no que se refere às soluções de reserva de fármaco e concentrações) (o(s) fármaco(s) de teste pode(m) também ser adicionado(s) simultaneamente com a estimulação de NB4/HL-60). Para comparação, algumas experiências são realizadas sem os fármacos.

Para estimular a formação e libertação de citoquinas, quimoquinas e mediadores inflamatórios tais como IL-1β, IL-6, TNF, IL-8, IL-10, IL-12p70, MCP-1, PAF, C5a, incubam-se células NB4 ou HL-60 diferenciadas ou não diferenciadas (a 1-10×10^6/mL) (37°C, 5% de CO_2) durante 4-24 horas (em RPMI-1640 com 1-10% de soro fetal de bovino, com ou sem suplementos) com lipopolissacárido (LPS 1-100 ng/mL), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA 1-100 ng/mL) ou ionofóro de cálcio A23187 (1-10 µM), ou combinações destes estímulos. As células NB4 e HL-60 podem também ser estimuladas com concentrações biologicamente activas documentadas de adenosina-difosfato (ADP) e/ou o análogo de tromboxano U-46619, com ou sem LPS, PMA e/ou A23187 como acima. As incubações/estimulações de NB4 e HL-60 podem também ser realizadas na presença de plaquetas

humanas (a partir de sangue de dadores saudáveis) com uma proporção de NB4/HL-60:plaquetas de 1:10 a 1:10000. Incubam-se as células (a 37°C, 5% de CO_2 em RPMI-1640 com 1-10% de soro fetal de bovino, com ou sem suplementos) com fármaco(s) de teste (pemirolast em combinação com estatina, pemirolast sozinho e estatina sozinha, como acima) durante 1 minuto a 24 horas antes da estimulação de NB4 ou HL-60 para libertação de citoquina/quimoquina/mediador (para comparação, algumas experiências são realizadas sem os fármacos; o(s) fármaco(s) de teste pode(m) também ser adicionado(s) simultaneamente com a estimulação de NB4/HL-60). Depois de centrifugar as células, as concentrações de citoquinas/quimoquinas e mediadores humanos nos sobrenadantes são quantificadas utilizando um Cytometric Bead Array (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Podem-se também utilizar kits de imunoensaios enzimáticos disponíveis comercialmente (kits EIA/ELISA) para medição das citoquinas/quimoquinas e mediadores de acordo com as instruções do(s) fabricante(s). Os sedimentos celulares são armazenados congelados (-80°C) em tampão RLT (QIAGEN, Valencia, CA) até processamento posterior para experiências de microarranjo (ver Exemplo 12 acima).

Para além do estudo dos efeitos dos fármacos acima na libertação de mediadores e quimoquinas/citoquinas a partir das células HL-60 e NB4 semelhantes a neutrófilos, podem-se também analisar os efeitos dos fármacos na adesão e/ou migração espontânea ou estimulada destas células (podem-se também utilizar células polimorfonucleares (PMN) de sangue humano isoladas de fresco isoladas de acordo com protocolos padrão). A adesão espontânea ou estimulada (com fMLP, IL-8, PAF, LTB_4 ou outros factores relevantes de activação de PMN) das células PMN ou semelhantes a neutrófilos *e.g.* a células endoteliais cultivadas ou a superfícies artificiais revestidas a proteína é estudada utilizando abordagens experimentais e ensaios bem estabelecidos e documentados. A migração (estimulada com fMLP, IL-8, PAF, LTB_4 ou outros factores quimiotácticos de PMN relevantes) das células PMN ou semelhantes a neutrófilos é estudada utilizando abordagens experimentais e ensaios bem estabelecidos e documentados, *e.g.* migração através de membranas revestidas a proteína disponíveis comercialmente para estes estudos de migração.

Exemplo 18

Activação de plaquetas e leucócitos em sangue inteiro de humano

Colhe-se sangue venoso por venipunctura sem estase, utilizando tubos Vacutainer siliconizados contendo 1/10 do volume de citrato trissódico 129 mM (Becton Dickinson, Meylan, França). Medem-se a expressão de P-selectina em plaquetas de sangue inteiro (reflectindo a actividade de plaquetas), a expressão de leucócitos CD11b (reflectindo a actividade de leucócitos), a contagem de plaquetas e de microagregados de plaqueta-plaqueta e de agregados de plaqueta-leucócito (PLAs), utilizando ensaios de citometria de fluxo, essencialmente como anteriormente descrito (ver *e.g.* Li *et al.* Circulation 100, 1374 (1999) para referência). Resumidamente, adicionam-se alíquotas de 5 µL de sangue inteiro a 45 µL de solução salina tamponada com Hepes (NaCl 150 mM, KCl 5 mM, $MgSO_4$ 1 mM, Hepes 10 mM, pH 7,4) contendo anticorpos apropriadamente diluídos (ver abaixo) na ausência ou presença de estímulos de activação de plaquetas tais como adenosina-difosfato (ADP), U-46619, U-44069, factor de activação de plaquetas (PAF), ácido araquidónico, colagénio ou trombina, e/ou estímulos de activação de leucócitos tais como N-formil-metionil-leucilfenilalanina (fMLP), ácido araquidónico, PAF, LPS, A23187 ou LTB_4. Antes da exposição do sangue aos estímulos de activação de plaquetas e/ou de leucócitos + os anticorpos, incubam-se amostras de sangue (0,1-1 ml) com fármaco(s) de teste (pemirolast em combinação com estatina (rosuvastatina ou atorvastatina), pemirolast sozinho e estatina sozinha) durante 1-60 minutos (o(s) fármaco(s) de teste pode(m) também ser adicionado(s) simultaneamente com os estímulos acima). Para comparação, estimulam-se algumas amostras de sangue como acima sem exposição ao(s) fármaco(s). A expressão de P-selectina em plaquetas é determinada por R-ficoeritrina (RPE)-anticorpo monoclonal (MAb) de CD62P AC1.2 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). A expressão de CD11b em leucócitos é determinada por MAb BEAR 1 conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Immunotech, Marseille, França). Utilizam-se MAbs isotípicos conjugados com FITC e RPE como controlos

negativos. As pérolas fluorescentes (partículas SPHERO™ Rainbow, 1,8-2,2 µm) utilizadas para contagem de plaquetas são da PharMingen (San Diego, CA, USA). As plaquetas são identificadas com MAb Beb 1 anti-CD42a (GPIX) (Becton Dickinson) conjugado com FITC e os leucócitos são identificados com MAb J33 anti-CD45 conjugado com RPE (Immunotech). Incubam-se as amostras (sangue tratado com fármaco ou não tratado + anticorpos com ou sem os estímulos, como acima) à temperatura ambiente no escuro durante 20 min. Depois, diluem-se as amostras e fixam-se moderadamente com formaldeído a 0,5% (v/v) - solução salina, e analisam-se quanto aos vários parâmetros de plaquetas e leucócitos com um citómetro de fluxo Beckman-Coulter EPICS XL-MCL (Beckman-Coulter Corp., Hialeah, FL). Os dados de expressão de P-selectina de plaquetas são reportados como as percentagens de células positivas em P-selectina na população de plaquetas e como contagens absolutas de plaquetas positivas em P-selectina. A expressão de CD11b de leucócitos é reportada como a intensidade de fluorescência média (MFI) da população de leucócitos totais e das subpopulações de leucócitos. Os agregados de plaqueta-leucócito (PLAs) são apresentados não só como contagens absolutas mas também como percentagens de leucócitos conjugados com plaquetas na população de leucócitos totais e entre linfócitos, monócitos e neutrófilos. Podem-se também utilizar outros reagentes, condições/abordagens experimentais, equipamento e modos de análise relevantes para medir a activação de plaqueta e leucócitos correspondente em sangue inteiro de humano.

Exemplo 19

Inibição da formação de interferão-γ em mastócitos por pemirolast e rosuvastatina

Mastócitos de ratinho cultivados derivados de medula óssea (mMC) foram obtidos cultivando células de medula óssea a partir de ratinhos C57BL/6 fêmeas. Cultivaram-se as células de medula óssea (a partir de fémures de ratinho lavados com PBS) (37°C/5% de CO_2) em RPMI 1640 condicionado enriquecido com 10% de X-63, suplementado com 10% de soro fetal de bovino inactivado por calor, L-glutamina 4 mM, 2-mercaptoetanol 50 µM, piruvato de sódio 1 mM, aminoácidos não essenciais 0,1

mM, Hepes 10 mM, 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. O desenvolvimento de mastócitos foi confirmado por coloração com azul de toluidina. As experiências foram realizadas após 6 a 8 semanas de cultura. Para activar os mMC através da ligação cruzada de receptores de IgE na superfície celular, os mMC cultivados foram inicialmente sensibilizados durante 90 minutos a 37°C (5% de CO_2) com um anticorpo monoclonal de ratinho IgE anti-TNP (IgE1-b4, ATCC, Rockville, MD, USA), utilizado como um sobrenadante de hibridoma a 15%. Submeteram-se depois as células a duas lavagens com PBS e ressuspenderam-se em meio RPMI-1640 suplementado com 0,2% de albumina de soro de bovino (BSA) antes de as células (0,5 mL de meio com $1x10^6$ células por mL) serem activadas por adição de TNP-BSA (Biosearch Technologies, San Francisco, CA) com uma relação de acoplamento de 9/1 (a concentração TNP-BSA final foi 100 ng/mL). A incubação (37°C/5% de CO_2) com TNP-BSA foi durante 24 horas. Antes da incubação com TNP-BSA, algumas células foram tratadas/incubadas (37°C/5% de CO_2) com os fármacos de teste pemirolast (sal de potássio comprado na American Custom Chemicals Corporation, San Diego, CA, USA) e/ou rosuvastatina (extraída e purificada a partir de comprimidos Crestor® disponíveis comercialmente e isolada como sal de cálcio conforme descrito em Bioorganic & Medicinal Chemistry, Vol. 5, N.° 5, págs. 437-444, 1997 por adição de $CaCl_2$) 30 minutos antes da adição de TNP-BSA (as soluções de reserva dos fármacos foram preparadas em solução salina). Para comparação, algumas experiências foram realizadas sem os tratamentos com fármaco. Após as incubações com TNP-BSA, centrifugaram-se as amostras a 4°C para sedimentar as células e analisaram-se os sobrenadantes em relação ao teor de IFN-γ de ratinho utilizando o BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit da BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA (o kit foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante).

A concentração de IFN-γ em sobrenadantes a partir de mMC não tratados estimulados com TNP-BSA durante 24 horas (como acima) foi 1,80 ± 0,24 pg/mL (média ± erro padrão, n=8). Os valores de IFN-γ médios correspondentes para células tratadas com pemirolast 3 µM, pemirolast 30 µM, rosuvastatina 3 µM ou rosuvastatina 30 µM (n=2 para cada tratamento) foram 2,00

pg/mL, 1,74 pg/mL, 2,26 pg/mL e 1,88 pg/mL, respectivamente. Assim, o tratamento com estas concentrações de pemirolast ou rosuvastatina sozinhos não inibiram os níveis de IFN-γ (*i.e.*, em comparação com as células não tratadas, pemirolast 30 µM reduziu IFN-γ em cerca de 3% enquanto os outros três tratamentos aumentaram ligeiramente o IFN-γ). A combinação de pemirolast + rosuvastatina reduziu os níveis de IFN-γ de um modo dependente da dose e sinergicamente. Assim, as concentrações médias de IFN-γ para mMC tratados com combinações de pemirolast 3 µM + rosuvastatina 3 µM ou pemirolast 30 µM + rosuvastatina 30 µM (n=2 para cada tratamento) foram 1,58 pg/mL e 0,55 pg/mL, respectivamente (*i.e.* 12,3% e 69,4% de inibição, respectivamente, em comparação com os controlos não tratados).

Exemplo 20

Inibição da proliferação de macrófagos por pemirolast e rosuvastatina

Células a partir da linha de células de macrófagos de humano MonoMac-6 (MM6) (Ziegler-Heitbrock *et al.*, Int. J. Cancer, 41, 456 (1988)) foram cultivadas (37°C/5% de CO_2) em meio RPMI-1640 suplementado com piruvato de sódio 1 mM, 1× aminoácidos não essenciais, 1-100 µg/mL de insulina, ácido oxalacético 1 mM, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10% (v/v) de soro fetal de bovino. No início da experiência, semearam-se as células MM6 em placas de 96 poços com uma densidade de $1x10^5$ células/mL (100 µl por poço). A proliferação das células MM6 foi medida utilizando o reagente de proliferação celular WST-1 (Roche Diagnostics Scandinavia AB, Bromma, Suécia) ou por contagem de células utilizando um microscópio. O reagente WST-1 está concebido para ser utilizado para quantificação espectrofotométrica *e.g.* do crescimento celular em ensaios de proliferação e foi utilizado de acordo com as instruções dos fabricantes. O comprimento de onda para medição de absorvância foi 450 nm e a absorvância de todas as células de controlo não tratadas expostas ao reagente WST-1 estava entre 1,0 e 2,5. As soluções de reserva de pemirolast (sal de potássio; ver Exemplo 19 acima) e rosuvastatina (sal de sódio; ver Exemplo 19 acima) foram preparadas em solução salina.

As células MM6 não tratadas aumentaram de $1x10^5$ células/mL no início da experiência para $1,4x10^5 \pm 0,06x10^5$ células/mL e $2,3x10^5 \pm 0,10x10^5$ células/mL após 24 e 48 horas, respectivamente (valores médios ± erro padrão, n=4 para cada um dos três instantes de tempo). Estudaram-se os efeitos de pemirolast e/ou rosuvastatina (adicionados no início das experiências) na proliferação celular de MM6 48 horas após início das experiências utilizando o reagente WST-1 acima descrito.

O tratamento das células MM6 com rosuvastatina numa concentração final de 10 µM, 30 µM ou 100 µM resultou, respectivamente, em 16,6%, 22,7% e 66,9% de inibição, dependente da dose, da proliferação de MM6 (valores médios, n=5 para cada concentração). Em contraste, o tratamento das células MM6 com pemirolast numa concentração final de 100 µM resultou numa inibição média negligenciável de 9,4% de proliferação (n=5) (pemirolast 10 µM teve um efeito muito similar ao de pemirolast 100 µM, n=5, dados não mostrados). Quando as células MM6 foram tratadas com pemirolast 100 µM na presença de rosuvastatina 10 µM, 30 µM ou 100 µM, o pemirolast 100 µM causou uma inibição sinérgica de 17,4%, 26,3% e 44,9%, respectivamente, da proliferação de MM6 em comparação com o tratamento com rosuvastatina sozinha, 10 µM, 30 µM e 100 µM, respectivamente (valores médios, n=5 para cada uma das três combinações).

Exemplo 21

Inibição da proliferação de macrófagos por pemirolast e atorvastatina

Repetiu-se o procedimento descrito no Exemplo 20 para atorvastatina (sal de sódio; recebido como atorvastatina cálcio como uma dádiva da Biocon, Ltd., Bangalore, India e converteu-se no sal de sódio convertendo primeiro o sal de cálcio no ácido livre por adição de ácido clorídrico aquoso e depois, após isolamento via extracção, por adição de um equivalente de NaOH aquoso).

O tratamento das células MM6 com atorvastatina numa concentração final de 10 µM, 30 µM ou 100 µM resultou, respectivamente, em 19,9%, 27,0% e 54,4% de inibição, dependente da dose, da proliferação de MM6 (valores médios, n=5 para cada concentração). Em contraste, o tratamento das células MM6 com pemirolast (sal de potássio) numa concentração final de 100 µM resultou numa inibição média negligenciável de 9,4% de proliferação (n=5) (pemirolast 10 µM teve um efeito muito similar ao de pemirolast 100 µM, n=5, dados não mostrados). Quando as células MM6 foram tratadas com pemirolast 100 µM na presença de atorvastatina 100 µM, o pemirolast 100 µM causou uma inibição sinérgica de 30,2% (valor médio, n=5) da proliferação de MM6 em comparação com o tratamento com atorvastatina 100 µM sozinha. Na presença de atorvastatina 30 µM, o pemirolast 100 µM inibiu a proliferação em 7,6% (valor médio, n=5), e na presença de atorvastatina10 µM, o pemirolast 100 µM não inibiu a proliferação (n=5, dados não mostrados).

Exemplo 22

Inibição de peritonite induzida por zimosano no ratinho por pemirolast e atorvastatina

Utilizaram-se cinco grupos de 5-7 ratinhos NMRI machos não consanguíneos (Scanbur AB, Sollentuna, Suécia) pesando 32-37 g para estudar a inflamação peritoneal (peritonite) causada por injecção intraperitoneal (i.p.) de 1 mg de zimosano A (zimosano, Sigma-Aldrich) em 0,5 mL de PBS estéril (sonicado e bem misturado). 24 horas antes e 90 minutos antes da injecção i.p. de zimosano, trataram-se dois grupos de animais com 0,35 mg de atorvastatina sódica (ver Exemplo 21 acima). A administração da injecção de atorvastatina foi dada 24 horas antes de se administrar o zimosano i.p. e a injecção de atorvastatina foi dada 90 minutos antes de se administrar o zimosano subcutaneamente. Antes da injecção, dissolveu-se a atorvastatina a 1 mg/mL em PBS estéril usando sonicação e aquecimento conforme necessário. Trataram-se dois grupos dos animais (um dos quais tinha sido pré-tratado com atorvastatina como acima) com 0,5 mg de pemirolast (sal de potássio comprado na American Custom Chemicals Corporation, San Diego, CA, USA) administrados i.p. em conjunto com o

zimosano (*i.e.* dissolveu-se o pemirolast a 1 mg/mL na solução de zimosano em PBS 2 mg/mL). 5 horas após injecção de zimosano, sacrificaram-se os animais e lavaram-se as cavidades peritoneais inflamadas com 1,5 mL de PBS arrefecido em gelo com EDTA 3 mM (após injecção i.p. do fluido de lavagem, massajou-se gentilmente o abdómen durante 30 segundos antes da abertura da cavidade abdominal e colheita de cerca de 1 mL do fluido). Contou-se o número de leucócitos polimorfonucleares (PMN) por mL de fluido de lavagem por microscopia óptica (utilizando critérios morfológicos padrão) após coloração dos núcleos com solução de Türk. Fluido de lavagem a partir de cavidades peritoneais não inflamadas a partir de animais não tratados proporcionou os níveis da linha de base de leucócitos PMN.

Como se mostra na Figura 1 (valores médios ± erro padrão), não existiam quase nenhuns leucócitos PMN peritoneais nos animais que não foram estimulados i.p. com zimosano (linha de base, n=5). 5 horas após injecção de zimosano i.p., por outro lado, existia uma acumulação inflamatória pronunciada de leucócitos PMN na cavidade peritoneal de animais que não tinham sido tratados com pemirolast ou atorvastatina (não tratados, n=7).

Nos animais tratados com pemirolast sozinho (Pemiro, n=6), a acumulação de leucócitos PMN induzida por zimosano foi ligeiramente reduzida (em 10,1%; NB neste grupo, um animal foi considerado como um não respondente e retirado da análise. Neste animal, a acumulação de leucócitos PMN 5 horas após a injecção de zimosano foi apenas 8,4% da acumulação de leucócitos PMN média dos outros 6 animais tratados com pemirolast estimulados i.p. com zimosano. A inclusão ou exclusão deste animal não respondente na análise não altera a conclusão abaixo).

Nos animais tratados com atorvastatina sozinha (Atorva, n=5), a acumulação de leucócitos PMN foi também reduzida em algum grau (por 25,9 %).

No entanto, nos animais tratados com pemirolast e atorvastatina em conjunto (Pemiro+Atorva, n=5), a acumulação de leucócitos PMN induzida por zimosano foi reduzida

sinergicamente 61,5%. Assim, embora o tratamento com pemirolast sozinho apenas reduzisse a acumulação de leucócitos PMN induzida por zimosano em 10,1% em comparação com animais não tratados, a acumulação de leucócitos PMN induzida por zimosano em animais tratados com pemirolast na presença de tratamento com atorvastatina foi reduzida em 48,0% em comparação com tratamento com atorvastatina sozinha.

Um ou mais dos exemplos acima descritos demonstram um efeito sinérgico claro para a combinação de pemirolast e da estatina relevante (rosuvastatina ou atorvastatina). Estas combinações são assim potencialmente úteis no tratamento de perturbações inflamatórias, incluindo aterosclerose e condições relacionadas.

Lisboa, 2012-10-30

REIVINDICAÇÕES

1. Produto de combinação compreendendo:
(a) pemirolast, ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitável; e
(b) uma estatina seleccionada entre rosuvastatina, ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitável, e atorvastatina, ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitável.

2. Produto de combinação como reivindicado na Reivindicação 1 que compreende uma formulação farmacêutica incluindo pemirolast, ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitável; uma estatina seleccionada entre rosuvastatina, ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitável, e atorvastatina, ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitável; e um adjuvante, diluente ou transportador farmaceuticamente aceitável.

3. Produto de combinação como reivindicado na Reivindicação 1, que compreende um kit de peças compreendendo como componentes:
(A) uma formulação farmacêutica incluindo pemirolast, ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitável, em mistura com um adjuvante, diluente ou transportador farmaceuticamente aceitável; e
(B) uma formulação farmacêutica incluindo uma estatina seleccionada entre rosuvastatina, ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitável, e atorvastatina, ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitável, em mistura com um adjuvante, diluente ou transportador farmaceuticamente aceitável,
componentes (A) e (B) que são cada um fornecidos numa forma que é adequada para administração em conjunto com o outro.

4. Método para fabricação de um kit de peças como definido na Reivindicação 3, método que compreende colocar o componente (A) em associação com um componente (B), tornando assim os dois componentes adequados para administração em conjunto um com o outro.

5. Kit de peças compreendendo:
(I) um dos componentes (A) e (B) como definido na Reivindicação 3; em conjunto com
(II) instruções para utilizar esse componente em conjunto com o outro dos dois componentes.

6. Produto de combinação como reivindicado em qualquer uma das Reivindicações 1 a 3 ou 5, onde a estatina não é utilizada na forma de uma lactona de estatina.

7. Kit de peças como reivindicado na Reivindicação 3 ou Reivindicação 5 (quando dependente da Reivindicação 3), onde os componentes (A) e (B) são adequados para utilização sequencial, separada e/ou simultânea no tratamento de uma perturbação inflamatória.

8. Utilização de um produto de combinação como definido em qualquer uma das Reivindicações 1 a 3, 5 ou 6, para o fabrico de um medicamento para o tratamento de uma perturbação inflamatória.

9. Produto de combinação como definido em qualquer uma das Reivindicações 1 a 3, 5 ou 6, para utilização no tratamento de uma perturbação inflamatória.

10. Utilização de componentes (A) e (B) como definidos na Reivindicação 3, ou Reivindicação 7 (quando dependente da Reivindicação 3), para o fabrico de um medicamento para o tratamento de uma perturbação inflamatória, método que compreende administrar os referidos componentes (A) e (B) a um paciente em conjunto um com o outro em terapia de combinação para tratar a perturbação inflamatória.

11. Componentes (A) e (B) como definidos na Reivindicação 3, ou Reivindicação 7 (quando dependente da Reivindicação 3) para utilização no tratamento de uma perturbação inflamatória, tratamento que compreende administrar os referidos componentes (A) e (B) a um paciente em conjunto um com o outro em terapia de combinação para tratar a perturbação inflamatória.

12. Kit de peças como reivindicado na Reivindicação 7, ou uma utilização como reivindicada em qualquer uma das Reivindicações 8 a 11, onde a perturbação é seleccionada entre enxaqueca, asma, doença pulmonar obstrutiva crónica, doença de Crohn, esclerose múltipla, psoríase, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistémico ou colite ulcerosa.

13. Kit de peças como reivindicado na Reivindicação 7, ou uma utilização como reivindicada em qualquer uma das Reivindicações 8 a 11, onde a perturbação é aterosclerose ou uma perturbação cardiovascular associada.

14. Kit de peças ou utilização como reivindicados na Reivindicação 13, onde a perturbação é aterosclerose.

15. Kit de peças ou utilização como reivindicados na Reivindicação 13, onde a perturbação cardiovascular associada a aterosclerose é seleccionada entre um aneurisma aórtico, arteriosclerose, doença oclusiva arterial periférica, uma doença da artéria coronária, uma doença coronária, ruptura de placa, ruptura e/ou instabilidade de ateroma, uma doença vascular, uma doença arterial, uma doença isquémica, isquemia e acidente vascular cerebral.

16. Kit de peças ou utilização como reivindicados na Reivindicação 15, onde a perturbação cardiovascular é um aneurisma aórtico.

17. Kit de peças ou utilização como reivindicados na Reivindicação 15, onde a doença da artéria coronária é seleccionada entre angina de peito, enfarte do miocárdio e ataque cardíaco; a doença coronária é seleccionada entre uma doença cardíaca e uma doença do coração; e/ou o acidente vascular cerebral é seleccionado entre acidente cerebrovascular e ataque isquémico transiente.

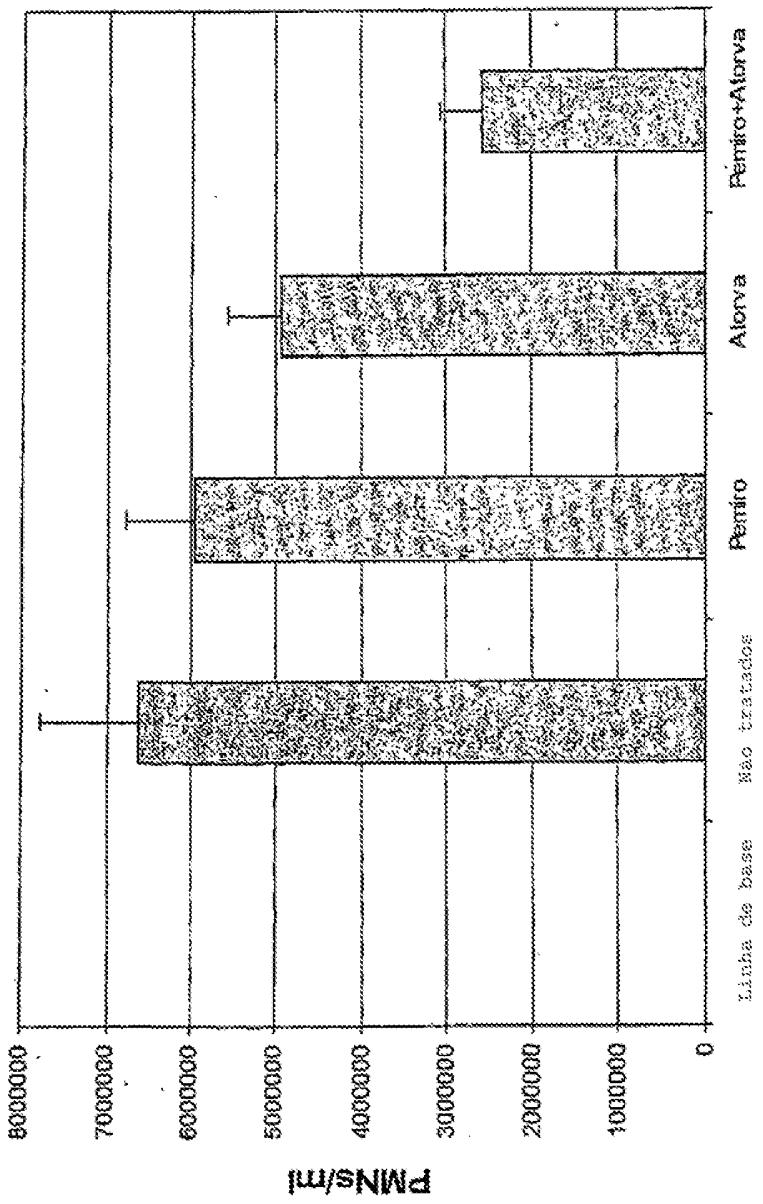
18. Kit de peças ou utilização como reivindicados em qualquer uma das Reivindicações 7 a 17, onde o paciente tem uma síndrome coronária aguda.

19. Produto de combinação como reivindicado em qualquer uma das Reivindicações 1 a 3, 5 a 7, ou 11 a 18, um método

como reivindicado na Reivindicação 4, ou uma utilização como reivindicada em qualquer uma das Reivindicações 8 a 18, onde a estatina é rosuvastatina, ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitável.

20. Produto de combinação como reivindicado em qualquer uma das Reivindicações 1 a 3, 5 a 7, ou 11 a 18, um método como reivindicado na Reivindicação 4, ou uma utilização como reivindicada em qualquer uma das Reivindicações 8 a 18, onde a estatina é atorvastatina, ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitável.

Lisboa, 2012-10-30


PMNs/ml
8000000
7000000
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
Linha de base
Não tratados
Pemiro
Atorva
Pemiro+Atorva