República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0920201-3 A2

(22) Data do Depósito: 22/10/2009

(43) Data da Publicação Nacional: 29/04/2010

(54) Título: COMPOSICOES E METODOS PARA TRATAR CONDICOES MEDIADAS POR LINFOPOETINA DO ESTROMA TIMICO(TSLP)

(51) Int. Cl.: C12N 5/00; C12N 5/02.

(30) Prioridade Unionista: 22/10/2008 US 61/107.480; 22/10/2008 US 61/107.453; 24/10/2008 US 12/258.210.

(71) Depositante(es): REVALESIO CORPORATION.

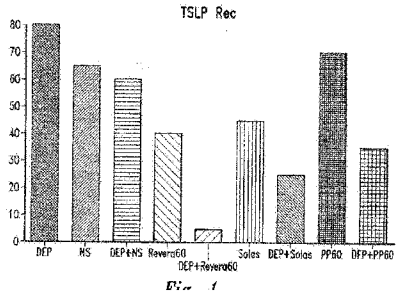
(72) Inventor(es): RICHARD L. WATSON; ANTHONY B.WOOD; GREGORY J. ARCHAMBEAU.

(86) Pedido PCT: PCT US2009061710 de 22/10/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/048425 de 29/04/2010

(85) Data da Fase Nacional: 19/04/2011

(57) Resumo: "COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA TRATAR CONDIÇÕES MEDIADAS POR LINFOPOETINA DO ESTROMA TÍMICO (TSLP)" A presente invenção provê métodos para tratar uma doença ou condição mediada por TSLP ou mediada por TSLPR, compreendendo a administração de um fluido aquoso eletrocineticamente alterado, compreendendo uma solução aquosa iônica de nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga, exibindo substancialmente diâmetro médio inferior a aproximadamente 100 nanometros e estavelmente configuradas no fluido aquoso iônico em quantidade suficiente para tratar uma doença ou condição mediada por TSLP ou media- da por TSLPR. As nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga estão, de preferência, configuradas no fluido em quantidade suficiente para permitir a modulação de potencial e/ou condutividade de membrana celular. Certas modalidades compreendendo modulação ou regulação negativa da expressão e/ou a atividade de TSLP são úteis para tratar doenças ou condições mediadas por TSLP ou mediadas por TSLPR, conforme aqui descri- tas (por exemplo, transtornos do sistema imune, inflamação alérgica, inflamação alérgica das vias aéreas, respostas inflamatórias do tipo Th2, mediadas por DC, dermatite atópica, eczema atópico, asma, doença obstrutiva das vias aéreas, doença pulmonar obstrutiva crônica e alergias alimentares, artrite inflamatória, artrite reumatoide, psoríase, transtornos mediados por IgE e rinoconjuntivite).



"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA TRATAR CONDIÇÕES MEDIADAS POR LINFOPOETINA DO ESTROMA TÍMICO (TSLP)"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se, em geral, à linfopoetina do estroma tímico (TSLP, na sigla em inglês) e a condições mediadas por TSLP e, mais especificamente, a condições mediadas por TSLP e pelo receptor de TSLP (por exemplo, transtornos do sistema imune, inflamação alérgica, inflamação alérgica das vias aéreas, respostas inflamatórias do tipo Th2 mediadas por DC, dermatite atópica, eczema atópico, asma alérgica, asma, doença obstrutiva das vias aéreas, doença pulmonar obstrutiva crônica e alergias alimentares, artrite inflamatória, artrite reumatoide, psoríase, transtornos mediados por IgE e rinoconjuntivite). Modalidades especialmente preferidas referem-se à modulação (por exemplo, tratamento) de condições mediadas por TSLP e por receptor de TSLP, administrando-se uma composição terapêutica compreendendo pelo menos um fluido gerado eletrocineticamente (incluindo fluidos gerados eletrocineticamente de gás enriquecido (por exemplo, oxigênio enriquecido)), como descritas neste pedido de patente e, adicionalmente, a modalidades referentes a terapias combinadas com a administração destes fluidos eletrocinéticos em combinação com pelo menos um agente terapêutico adicional.

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS DE PATENTE CORRELATOS

Este pedido de patente reivindica prioridade ao Pedido Provisional Serial de Patente Norte-Americana N°s 61/107.480 e 61/107.453, ambos depositados em 22 de outubro de 2008, e ao Pedido Serial de Patente Norte-Americana de Utilidade N° 12/258.210, depositado em 24 de outubro de 2008, ambos aqui incorporados, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Linfopoetina do estroma tímico (TSLP). Linfopoetina do estroma tímico (TSLP) é uma citocina do tipo IL-7 que desencadeia respostas inflamatórias do tipo Th2 mediadas por células dendríticas, sendo considerada a "chave-mestra" para inflamação alérgica. TSLP é um fator de crescimento integral para o desenvolvimento e maturação de células B e T. Especificamente, TSLP murina dá suporte a linfopoiese B e é necessária para proliferação de células B. TSLP murina participa de modo fundamental no controle do rearranjo de lócus do receptor gama de células T (TCRγ) e exibe efeito estimulador substancial sobre timócitos e células T maduras. Consultar, por exemplo, Friend *et al.*, *Exp. Hematol.*, 22:321-328, 1994; Ray *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 26:10-16, 1996; Candeias *et al.*, *Immunology Letters*, 57:9-14, 1997.

TSLP possui atividade de citocina semelhante a IL-7. Por exemplo, TSLP pode substituir IL-7 na estimulação de respostas de proliferação de células B (Friend *et al.*, *supra*). Embora façam a mediação de efeitos semelhantes sobre células-alvo, TSLP e IL-7 aparen-

temente usam vias de sinalização distintas e possivelmente variam em sua resposta biológica. Por exemplo, embora module a atividade de STAT5, TSLP não consegue ativar qualquer membro da família Janus de tirosinaquinases (Levin *et al., J. Immunol.* 162:677-683, 1999).

Efeitos da TSLP sobre células dendríticas e produção de TNF. Depois que TSLP humana e o receptor de TSLP humana foram clonados em 2001, foi descoberto que TSLP humana ativava fortemente células dendríticas mieloides imaturas CD11c+ (mDCs) (consultar, por exemplo, Reche *et al., J. Immunol.*, 167:336-343, 2001 e Soumelis *et al., Nat. Immunol.*, 3:673-680, 2002). As células Th2 são geralmente definidas em livros-texto de imunologia e na literatura como células T CD4+ produtoras de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10. E células Th1, tais como células T CD4+, produzem IFN-γ e, às vezes, TNF. Quando TSLP-DCs são utilizadas para estimular *in vitro* células T alogênicas virgens CD4+, um tipo único de célula Th2 é induzido, o qual produz as citocinas clássicas de Th2, IL-4, IL-5 e IL-13, e grandes quantidades de TNF, porém pouco ou não produzem IL-10 ou interferon-γ (Reche *et al., supra*) (consultar também, por exemplo, Soumelis *et al., Nat. Immunol.*, 3:673-680, 2002). TNF não é considerado tipicamente citocina de Th2. No entanto, a presença de TNF é proeminente em vias aéreas de asmáticos, e genótipos que se correlacionam com secreção aumentada de TNF estão associados com risco maior de asma. Consultar Shah *et al., Clin. Exp. Allergy.*, 25:1038-1044, 1995 e Moffatt, M.F. and Cookson, W.O., *Hum. Mol. Genet.*, 6:551-554, 1997.

TSLP induz mDCs humanas a expressarem a proteína OX40L da superfamília de TNF tanto em nível do mRNA como no protéico (Ito *et al., J. Exp. Med.*, 202:1213-1223). A expressão de OX40L por TSLP-DCs é importante para a elaboração de células Th2 inflamatórias. Dessa forma, DCs ativadas por TSLP criam um microambiente favorável a Th2 ao regularem positivamente OX40L sem induzirem a produção de citocinas que polarizam Th1. *Id.*

Expressão de TSLP respostas alérgenos específicas e asma. Estudos iniciais demonstraram a alta expressão de mRNA de TSLP por queratinócitos cutâneos primários humanos, células epiteliais brônquicas, células da musculatura lisa e fibroblastos pulmonares (Soumelis *et. al., Nat. Immunol.*, 3:673-680, 2002). TSLP é expressa principalmente em queratinócitos das camadas apicais da epiderme, sugerindo, portanto, que a produção de TSLP é uma característica de queratinócitos completamente diferenciados. A expressão de TSLP em pacientes com dermatite atópica foi associada com migração e ativação *in situ* de células de Langerhans, o que sugere que TSLP pode contribuir diretamente para a ativação destas células, as quais migrariam subsequentemente e penetrariam nos linfonodos do sistema linfático e dariam início a respostas específicas a alérgenos. *Id.* Em um estudo mais recente, foi demonstrado por hibridização *in situ* que a expressão de TSLP estava aumentada em vias aéreas de asmáticos e que se correlacionava não só com a expressão de quimi-

ocinas atraentes de Th2 como também com a gravidade da doença, o que reforçou a existência de um vínculo entre TSLP e asma (Ying *et al.*, *J. Immunol.*, 174:8183-8190, 2005).

Receptor de TSLP (TSLPR) e asma alérgica. O receptor de TSLP (TSLPR) é uma proteína com aproximadamente 50 kDa e que apresenta similaridade significativa com a cadeia γ comum. TSLPR é um novo tipo de receptor 1 de citocinas, o qual, combinado com IL-7Ra (CD127), forma um complexo de receptor TSLP como descrito, por exemplo, por Pandey *et al.*, *Nat. Immunol.*, 1:59-64, 2000. TSLPR contém um resíduo tirosina próximo de sua carboxila terminal, o qual pode se associar com STAT5 fosforilada e mediar múltiplas funções biológicas quando ocupado por TSLP (Isaksen *et al.*, *J. Immunol.*, 168:3288-3294, 2002).

TSLPR humano é expresso por monócitos e células dendríticas CD11c+, e quando ligado à TSLP induz a expressão das quimiocinas CCL17 e CCL22 que atraem células T_H2. Além disso, como declarado acima, a ativação de células dendríticas induzidas por TSLPR resulta indiretamente na secreção aumentada das citocinas IL-4, 5 e 13 por T_H2, o que pode ser necessário para a regulação da homeostase por células T CD4+. Em camundongos, a deficiência de TSLPR não exerce efeito sobre o número de linfócitos. No entanto, a deficiência de TSLPR e de cadeia γ comum resulta em número menor de linfócitos, quando comparado a camundongos com deficiência apenas da cadeia γ comum. Consultar Reche *et al.*, *J. Immunol.*, 167:336-343, 2001 e Soumelis *et al.*, *Nat. Immunol.*, 3:673-680, 2002.

Estudos constataram que TSLP e o TSLPR desempenham um papel fundamental na iniciação de doenças alérgicas em camundongos. Em um estudo, foi demonstrado que camundongos construídos para superpressarem TSLP na pele desenvolveram dermatite atópica, caracterizada por lesões cutâneas eczematosas contendo infiltrados inflamatórios, aumento acentuado em células Th2 circulantes e elevação de IgE sérica (Yoo *et al.*, *J. Exp. Med.*, 202:541-549, 2005). O estudo sugeriu que TSLP pode ativar diretamente DCs em camundongos. Em outro estudo, conduzido por Li *et al.*, o grupo confirmou que camundongos transgênicos superexpressando TSLP na pele desenvolveram dermatite atópica, dado que solidificou o vínculo entre TSLP e o desenvolvimento de dermatite atópico.

Outro conjunto de estudos demonstrou que TSLP é necessária para a iniciação de inflamação alérgica das vias aéreas em camundongos *in vivo*. Em um estudo, Zhou *et al.* demonstraram que a expressão específica no pulmão de um transgene de TSLP induziu inflamação alérgica das vias aéreas (asma), caracterizada por infiltração maciça de leucócitos (incluindo células Th2), hiperplasia de células caliciformes e fibrose subepitelial, além de níveis aumentados de IgE sérica (Zhou *et al.*, *Nat. Immunol.*, 6:1047-1053, 2005). No entanto, por outro lado, camundongos desprovidos do TSLPR não desenvolviam asma em resposta a antígenos inalados (Zhou *et al.*, *supra* e Al-Shami *et al.*, *J. Exp. Med.*, 202:829-839, 2005). Dessa forma, estes estudos demonstraram em conjunto que TSLP é necessária para

a iniciação de inflamação alérgica das vias aéreas em camundongos.

Adicionalmente, em um estudo conduzido por Yong-Jun *et al.*, foi demonstrado que TSLP derivada de células epiteliais desencadeia, em seres humanos, respostas inflamatórias do tipo Th2, mediadas por DC, sugerindo que TSLP representa uma "chave-mestra" para inflamação alérgica na interface célula epitelial-DC (Yong-Jun *et al.*, *J. Exp. Med.*, 203:269-273, 2006).

Em um estudo recente, foi mostrado que a modulação da função de DCs por inibição de TSLPR diminuiu a gravidade em camundongos (Liyun Shi *et al.*, *Clin. Immunol.*, 129:202-210, 2008). Em outro conjunto de estudos, foi demonstrado que TSLPR estava expresso não só em DCs, mas também em mastócitos e células T CD4+ (Rochman *et al.*, *J. Immunol.*, 178:6720-6724, 2007 e Omori M. and Ziegler S., *J. Immunol.*, 178:1396-1404, 2007). A fim de descartar os efeitos diretos da neutralização de TSLPR em células T CD4+ ou outras células efetoras em inflamação alérgica, Liyun Shi *et al.* realizaram experimentos em que DCs carregadas com OVA foram tratadas *in vitro* com anti-TSLPR antes que a transferência adotiva para as vias aéreas de camundongos virgens. Foi constatado previamente que OVA-DCs desencadeavam forte inflamação eosinofílica nas vias aéreas, acompanhada por produção maciça de citocinas de Th2, tais como IL-4 e IL-5 (Sung *et al.*, *J. Immunol.*, 166:1261-1271 e Lambrecht *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 106:551-559, 2000). Contudo, o pré-tratamento de OVA-CDs com anti-TSLPR resultou em redução significativa de infiltração por eosinófilos e linfócitos, bem como níveis de IL-4 e IL-5, esclarecendo mais ainda o papel que TSLPR desempenha em doença alérgica iniciada por CDs. Esse resultado reforça também a sugestão de que o bloqueio de TSLPR sobre DCs ajudará no controle de inflamação das vias aéreas (Liyun Shi *et al.*, *supra*).

Há um conjunto crescente de experimentos implicando a participação de TSLP/TSLPRO em vários processos fisiológicos e patológicos. A participação fisiológica de TSLP inclui modular o sistema imune, especialmente, estimulando a proliferação, desenvolvimento e maturação de células B e T. TSLP desempenha um papel vital na patobiologia de asma alérgica e na mediação de bloqueio local a anticorpos contra a função do receptor de TSLP para aliviar doenças alérgicas. Dessa forma, acredita-se que a interação entre TSLP e receptor de TSLP é importante em muitos processos fisiológicos de doença tais como: inflamação alérgica, lesões cutâneas de pacientes com dermatite atópica ou eczema atópico, asma alérgica e asma.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra que o fluido gerado eletrocineticamente da invenção (por exemplo, Revera 60 e Solas) reduziu a expressão do receptor de TSLP induzida por DEP em células epiteliais brônquicas (BEC) em aproximadamente 90% e 50%, respectivamente, enquanto que solução salina normal (NS) exerceu somente efeito marginal. Adicionalmente, o

fluido PP60 não eletrocinético de panela de pressão de controle resultou em redução de aproximadamente 50% na expressão do receptor de TSLP induzida por DEP.

A Figura 2 mostra que o fluido gerado eletrocineticamente da invenção (por exemplo, Revera 60 e Solas) inibiu os níveis de MMP9 ligada à superfície celular induzida por DEP em células epiteliàis brônquicas em aproximadamente 80% e 70%, respectivamente, enquanto que solução salina normal (NS) exerceu somente efeito marginal. Adicionalmente, o fluido PP60 não eletrocinético de panela de pressão de controle resultou em redução de aproximadamente 30% nos níveis de MMP9 presa à superfície celular induzida por DEP.

As Figuras 3 A-C demonstram os resultados de uma série de experimentos de do tipo *patch clamping* que avaliaram os efeitos do fluido gerado eletrocineticamente (por exemplo, RNS-60 e Solas) sobre polaridade da membrana de células epiteliais e atividade de canal iônico em dois momentos (15 min (painéis à esquerda) e 2 horas (painéis à direita)) e em diferentes protocolos de voltagem.

As Figuras 4 A-C mostram, em relação aos experimentos relativos às Figuras 3 A-C, os gráficos resultantes da subtração dos dados de corrente do Solas dos dados de corrente do RNS-60 em três protocolos de voltagem (A. etapas iniciando a partir zero mV; B. etapas iniciando a partir -60 mV; C. etapas iniciando a partir -120 mV) e nos dois momentos (15 minutos (círculos claros) e 2 horas (círculos escuros)).

As Figuras 5 A-D demonstram os resultados de uma série de experimentos do tipo *patch clamping* que avaliaram os efeitos do fluido gerado eletrocineticamente (por exemplo, Solas (painéis A. e B.) e RNS-60 (painéis C. e D.) sobre polaridade da membrana de células epiteliais e atividade de canal iônico, usando diferentes soluções externas de sal e em diferentes protocolos de voltagem (painéis A. e C. mostram as etapas iniciando a partir de zero mV; painéis B. e D. mostram as etapas iniciando a partir de -120 mV).

As Figuras 6 A-D mostram, em relação aos experimentos relativos às Figuras 5 A-D, os gráficos resultantes da subtração dos dados de corrente de CsCl (mostrado na Figura 5) dos dados de corrente de $CaCl_2$ 20 mM (losangos) e $CaCl_2$ 40 mM (quadrados escuros) em dois protocolos de voltagem (painéis A. e C. etapas iniciando a partir de zero mV; B. e D. etapas iniciando a partir de -120 mV) para Solas (painéis A. e B.) e Revera 60 (painéis C. e D.).

As Figuras 7A e B demonstram os resultados de um experimento do tipo *patch clamping* que avaliou os efeitos da diluição do fluido gerado eletrocineticamente (por exemplo, RNS-60) sobre polaridade da membrana de células epiteliais e atividade de canal iônico.

RESUMO DE MODALIDADES EXEMPLARES

Uma modalidade específica provê um método para tratar uma doença ou condição mediada por TSLP ou mediada por TSLPR, compreendendo administrar a um mamífero em

necessidade do mesmo uma quantidade eficaz de um fluido aquoso alterado eletrocineticamente, compreendendo uma solução iônica aquosa de nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga, com substancialmente diâmetro inferior a aproximadamente 100 nanometros e configuradas estavelmente no fluido iônico aquoso em quantidade suficiente para tratar uma doença ou condição mediada por TSLP ou mediada por TSLPR. Em certas modalidades, as nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga estão configuradas estavelmente no fluido iônico aquoso em quantidade suficiente para permitir, quando do contato com uma célula viva pelo fluido, a modulação de pelo menos um entre potencial de membrana celular e condutividade de membrana celular.

Em certas modalidades do método, as nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga representam o principal tipo de nanoestrutura contendo gás estabilizadas por carga no fluido. Em modalidades especiais, o percentual de moléculas dissolvidas de oxigênio presentes no fluido, como as nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga, é um percentual selecionado a partir do grupo constituído por acima de: 0,01%, 0,1%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% e 95%. Em modalidades especiais, o oxigênio total dissolvido está substancialmente presente nas nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga. Em certas modalidades, as nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga possuem diâmetro médio inferior a um tamanho selecionado a partir do grupo constituído por: 90 nm, 80 nm, 70 nm, 60 nm, 50 nm, 40 nm, 30 nm, 20 nm, 10 nm e menos de 5 nm.

Em modalidades especiais do método, a solução iônica aquosa compreende uma solução salina. Em certas modalidades, o fluido aquoso alterado eletrocineticamente é superoxigenado.

Em modalidades especiais do método, o fluido aquoso alterado eletrocineticamente compreende uma forma de elétrons solvatados.

Em certas modalidades, a alteração do fluido aquoso alterado eletrocineticamente compreende exposição do fluido a efeitos eletrocinéticos localizados induzidos hidrodinamicamente. Em certas modalidades, a exposição aos efeitos eletrocinéticos localizados compreende exposição a pelo menos um entre pulsos de voltagem e pulsos de corrente. Em modalidades especiais, a exposição do fluido a efeitos eletrocinéticos localizados induzidos hidrodinamicamente compreende exposição do fluido a características estruturais de um dispositivo usado para gerar o fluido, indutoras de efeito eletrocinético.

Em modalidades especiais, a doença ou condição mediada por TSLP ou mediada por TSLPR compreende uma doença ou transtorno do sistema imune, incluindo, entre outros, inflamação alérgica. Em modalidades especiais, a inflamação alérgica compreende pelo menos um entre inflamação alérgica das vias aéreas, respostas inflamatórias do tipo Th2 mediadas por DC, dermatite atópica, eczema atópico, asma, doença obstrutiva das vias

aéreas, doença pulmonar obstrutiva crônica, transtornos mediados por IgE, rinoconjuntivite e alergias alimentares. Em certas modalidades, a doença ou condição mediada por TSPL ou mediada por TSPLR compreende artrite inflamatória, por exemplo, compreendendo pelo menos um entre artrite reumatoide e psoríase.

Em certas modalidades, o método compreende ainda terapia combinada, em que pelo menos um agente terapêutico adicional é administrado ao paciente. Em modalidades especiais, o pelo menos único agente terapêutico adicional é selecionado a partir do grupo constituído por agonistas β_2 de ação curta, agonistas β_2 de ação prolongada, anticolinérgicos, corticosteroides, corticosteroides sistêmicos, estabilizantes de mastócitos, modificadores de leucotrieno, metilxantinas e combinações destes. Em certas modalidades, o pelo menos único agente terapêutico adicional é selecionado a partir do grupo constituído por: broncodilatadores consistindo de agonistas β_2, incluindo albuterol, levalbuterol, pirbuterol, artformoterol, formoterol, salmeterol, e anticolinérgicos como ipatrópio e tiotrópio; corticosteroides incluindo beclometasona, budesonida, flunisolida, fluticasona, mometasona, triancinolona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona; modificadores de leucotrieno incluindo montelukast, zafirlukast e zileuton; estabilizantes de mastócitos incluindo cromolina e nedocromil; metilxantinas incluindo teofilina, fármacos combinados incluindo ipatrópio e albuterol, flucatisona e salmeterol, budesonida e formoterol; anti-histamínicos incluindo hidroxizina, difenidramina, loratadina, cetirizina e hidrocortisona; fármacos moduladores do sistema imune incluindo tacrolimus e pimecrolimus; ciclosporina; azotioprina; micofenolato mofetil; e combinações destes. Em modalidades especiais, o pelo menos único agente terapêutico adicional é antagonista de TSLP e/ou TSLPR e, em modalidades especiais, o antagonista de TSLP e/ou TSLPR é selecionado a partir do grupo constituído por anticorpos neutralizantes específicos contra TSLP e o receptor de TSLP, moléculas solúveis do receptor de TSLP, proteínas de fusão do receptor de TSLP, incluindo moléculas de TSLPR-imunoglobulina Fc ou polipeptídeos que codificam componentes de mais de uma cadeia do receptor.

Em modalidades especiais do método, a modulação de pelo menos um entre potencial de membrana celular e condutividade de membrana celular compreende alterar pelo menos um entre a estrutura ou função da membrana celular, compreendendo alterar pelo menos um entre conformação, atividade de ligação a ligante e atividade catalítica de proteína associada à membrana ou constituinte. Em certas modalidades, a proteína associada à membrana compreende pelo menos uma selecionada a partir do grupo constituído por receptores, receptores transmembrana, proteínas de canal iônico, proteínas de ligação intracelular, proteínas de adesão celular, integrinas, etc. Em certas modalidades, o receptor transmembrana compreende Receptor Acoplado à Proteína G (GPCR). Em modalidades especiais, o Receptor Acoplado à Proteína G (GPCR) interage com uma subunidade de uma proteína G, por exemplo, em que a subunidade de uma proteína G compreende pelo menos

uma selecionada a partir do grupo constituído por Ga_s, Ga_i, Ga_q e Ga_{12} e, em certas modalidades, a pelo menos única subunidade de uma proteína G é Ga_q.

Em modalidades especiais do método, a modulação de pelo menos um entre potencial de membrana celular e condutividade de membrana celular compreende modular a condutância de célula inteira, por exemplo, em que modular a condutância de célula inteira compreende modulação de pelo menos um entre contribuição para dependência de voltagem linear e não linear da condutância de célula inteira.

Em certas modalidades do método, a modulação de pelo menos um entre potencial de membrana celular e condutividade de membrana celular compreende modulação de via ou sistema de mensagens celulares dependente de cálcio. Em certas modalidades do método, a modulação de pelo menos um entre potencial de membrana celular e condutividade de membrana celular compreende modulação de atividade da fosfolipase C. Em certas modalidades do método, a modulação de pelo menos um entre potencial de membrana celular e condutividade de membrana celular compreende modulação de atividade da adenilato ciclase (AC). Em certas modalidades do método, a modulação de pelo menos um entre potencial de membrana celular e condutividade de membrana celular compreende modulação de transdução de sinal intracelular associado com pelo menos uma condição ou sintoma selecionado a partir do grupo constituído por doenças ou transtornos do sistema imune, inflamação alérgica, inflamação alérgica das vias aéreas, respostas inflamatórias do tipo Th2 medidas por DC, dermatite atópica, eczema atópico, asma, doença obstrutiva das vias aéreas, doença pulmonar obstrutiva crônica, transtornos mediados por IgE, rinoconjuntivite, alergias alimentares, artrite inflamatória, artrite reumatoide e psoríase.

Modalidades especiais do método compreendem a administração do fluido eletrocinético a uma rede ou camada celular e compreendem ainda a modulação de uma junção intercelular na mesma. Em certas modalidades, a junção intracelular compreende pelo menos uma selecionada a partir do grupo constituído por junções do tipo oclusivo (*tight*), junções comunicantes (*gap*) e zona aderente e desmossomos. Em modalidades especiais, a rede ou camadas celulares compreendem pelo menos um selecionado a partir do grupo constituído por epitélio pulmonar, epitélio brônquico e epitélio intestinal.

Em certas modalidades do método, o fluido aquoso alterado eletrocineticamente é oxigenado, em que o oxigênio no fluido está presente em quantidade de pelo menos 8 ppm, pelo menos 15 ppm, pelo menos 25 ppm, pelo menos 30 ppm, pelo menos 40 ppm, pelo menos 50 ppm ou pelo menos 60 ppm de oxigênio em pressão atmosférica.

Em certas modalidades do método, o fluido aquoso alterado eletrocineticamente compreende pelo menos um entre elétrons solvatados e espécies de oxigênio eletrocineticamente modificadas ou com carga, por exemplo, em que a forma de elétrons solvatados ou espécies de oxigênio eletrocineticamente modificadas ou com carga estão presentes em

quantidade de pelo menos 0,01 ppm, pelo menos 0,1 ppm, pelo menos 0,5 ppm, pelo menos 1 ppm, pelo menos 3 ppm, pelo menos 5 ppm, pelo menos 7 ppm, pelo menos 10 ppm, pelo menos 15 ppm ou pelo menos 20 ppm. Em certas modalidades, o fluido aquoso alterado eletrocineticamente compreende uma forma de elétrons solvatados estabilizados por oxigênio molecular.

Em certas modalidades, a capacidade do fluido aquoso alterado eletrocineticamente para modular pelo menos um entre potencial de membrana celular e condutividade de membrana celular persiste por pelo menos dois, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco, pelo menos 6, pelo menos 12 meses ou por períodos mais longos em recipiente fechado estanque a gás.

Em certas modalidades, a quantidade de oxigênio presente em nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga do fluido alterado eletrocineticamente é de pelo menos 8 ppm, pelo menos 15 ppm, pelo menos 20 ppm, pelo menos 25 ppm, pelo menos 30 ppm, pelo menos 40 ppm, pelo menos 50 ppm ou pelo menos 60 ppm de oxigênio em pressão atmosférica.

Em modalidades especiais, tratar compreende a administração por pelo menos um dentre tópica, inalação, intranasal e intravenosa.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

São providos métodos para tratar uma doença ou condição mediada por TSLP ou mediada por TSLPR, compreendendo a administração de um fluido aquoso alterado eletrocineticamente, compreendendo uma solução iônica aquosa de nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga, com substancialmente diâmetro médio inferior a aproximadamente 100 nanometros e configuradas estavelmente no fluido iônico aquoso em quantidade suficiente para tratar uma doença ou condição mediada por TSLP ou mediada por TSLPR. As nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga estão, de preferência, configuradas estavelmente no fluido em quantidade suficiente para permitir a modulação de potencial e/ou condutividade de membrana celular. Certas modalidades compreendendo modulação ou regulação negativa da expressão e/ou atividade de TSLP são úteis para tratar doenças ou condições mediadas por TSLP ou mediadas por TSLPR, como aqui descritas (por exemplo, transtornos do sistema imune, inflamação alérgica, inflamação alérgica das vias aéreas, respostas inflamatórias do tipo Th2 mediadas por DC, dermatite atópica, eczema atópico, asma, doença obstrutiva das vias aéreas, doença pulmonar obstrutiva crônica e alergias alimentares, artrite inflamatória, artrite reumatoide, psoríase, transtornos mediados por IgE e rinoconjuntivite).

Fluidos gerados eletrocineticamente:

"Fluidos gerados eletrocineticamente", neste relatório descritivo, refere-se a fluidos gerados eletrocineticamente da invenção dos Requerentes, gerados, para fins dos Exem-

plos de trabalho no presente, pelo Dispositivo de Mistura exemplar descrito detalhadamente neste pedido de patente (consultar também, o documento US200802190088 e WO2008/052143, ambos aqui incorporados, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente). Os fluidos eletrocinéticos, como demonstrado pelos dados aqui descritos e apresentados, representam novos fluidos fundamentalmente distintos com relação a fluidos não eletrocinéticos do estado da técnica anterior, incluindo, relativamente ao estado da técnica anterior, fluido não eletrocinéticos oxigenados (por exemplo, fluidos oxigenados de panela de pressão e os semelhantes).

De acordo com várias modalidades da presente invenção, os fluidos gerados eletrocineticamente exibem novas e únicas propriedades físicas e biológicas, incluindo, entre outras, as seguintes:

Em modalidades especiais, o fluido aquoso alterado eletrocineticamente compreende uma solução iônica aquosa de nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga, com substancialmente diâmetro médio inferior a aproximadamente 100 nanometros e configuradas estavelmente no fluido iônico aquoso em quantidade suficiente para permitir, quando do contato com uma célula viva pelo fluido, modulação de pelo menos um entre potencial de membrana celular e/ou condutividade de membrana celular.

Em modalidades especiais, fluidos gerados eletrocineticamente referem-se a fluidos gerados na presença de efeitos eletrocinéticos (por exemplo, pulsos de voltagem/corrente) localizados (por exemplo, não uniforme no que se refere ao volume total do fluido) e induzidos hidrodinamicamente, tal como efeitos localizados por características do dispositivo como aqui descritos. Em modalidades especiais, os referidos efeitos eletrocinéticos localizados induzidos hidrodinamicamente são combinados a efeitos de fluxo de corrente e/ou camada dupla relacionada à superfície, conforme aqui descritos e discutidos.

Em modalidades especiais, os fluidos aquosos eletrocineticamente alterados são adequados para modular larguras de linha de ^{13}C-NRM de solutos repórteres (por exemplo, trealose) dissolvidos nos mesmos. Os efeitos sobre largura de linha de NRM representam um método indireto para medir, por exemplo, soluto "em rotação" em um fluido em teste, como aqui descrito, em Exemplos específicos de trabalho.

Em modalidades especiais, os fluidos aquosos eletrocineticamente alterados são caracterizados por pelo menos um de: diferenças distinguíveis de pico de voltametria de onda quadrada em qualquer voltagem entre -0,14 V, -0,47 V, -1,02 V e -1,3 V; picos polarográficos a -0,9 volts e ausência de picos polarográficos a -0,19 V e -0,3 volts, os quais são únicos aos fluídos gerados eletrocineticamente, conforme aqui descritos em Exemplos de trabalho específicos.

Em modalidades especiais, os fluidos aquosos eletrocineticamente alterados são adequados para alterar condutividade de membrana celular (por exemplo, contribuição para

dependência de voltagem da condutância de célula inteira como medida em estudos aqui descritos de *patch clamping*).

Em modalidades especiais, os fluidos aquosos eletrocineticamente alterados são oxigenados, em que o oxigênio no fluido está presente em quantidade de pelo menos 15 ppm, pelo menos 25 ppm, pelo menos 30 ppm, pelo menos 40 ppm, pelo menos 50 ppm ou pelo menos 60 ppm de oxigênio dissolvido em pressão atmosférica. Em modalidades especiais, os fluidos aquosos eletrocineticamente alterados possuem menos de 15 ppm, menos de 10 ppm de oxigênio dissolvido em pressão atmosférica, ou em níveis de oxigênio aproximadamente ambiente.

Em modalidades especiais, os fluidos aquosos eletrocineticamente alterados são oxigenados, em que o oxigênio no fluido está presente em quantidade entre aproximadamente 8 ppm e aproximadamente 15 ppm e, nesse caso, é às vezes designado neste relatório descritivo como "Solas".

Em modalidades especiais, o fluido aquoso alterado eletrocineticamente compreende pelo menos um entre elétrons solvatados (por exemplo, estabilizados por oxigênio molecular) e espécies de oxigênio eletrocineticamente modificadas e/ou com carga e em que, em certas modalidades, os elétrons solvatados e espécies de oxigênio eletrocineticamente modificadas e/ou com carga estão presentes em quantidade de pelo menos 0,01 ppm, pelo menos 0,5 ppm, pelo menos 1 ppm, pelo menos 3 ppm, pelo menos 5 ppm, pelo menos 7 ppm, pelo menos 10 ppm, pelo menos 15 ppm ou pelo menos 20 ppm.

Em modalidades especiais, os fluidos aquosos eletrocineticamente alterados são adequados para alterar estrutura ou função de membrana celular (por exemplo, alteração de conformação, atividade de ligação a ligante ou atividade catalítica de uma proteína associada à membrana), suficientemente para permitir a modulação de transdução de sinal intracelular, em que, em modalidades especiais, a proteína associada à membrana compreende pelo menos uma selecionada a partir do grupo constituído por receptores, receptores transmembrana (por exemplo, Receptor Acoplado à Proteína G (GPCR), receptor de TSLP, receptor beta adrenérgico 2, receptor de bradicinina, etc.), proteínas de canal iônico, proteínas de ligação intracelular, proteínas de adesão celular e integrinas. Em certas modalidades, o Receptor Acoplado à Proteína G (GPCR) afetado interage com uma subunidade de uma proteína G (por exemplo, Ga_s, Ga_i, Ga_q e Ga_{12}).

Em modalidades especiais, os fluidos aquosos eletrocineticamente alterados são adequados para modular transdução de sinal intracelular, compreendendo modulação de uma via ou sistema de mensagem celular dependente de cálcio (por exemplo, modulação da atividade de fosfolipase C ou modulação da atividade de adenilato ciclase (AC)).

Em modalidades especiais, os fluidos aquosos eletrocineticamente alterados são caracterizados por várias atividades biológicas (por exemplo, regulação de citocinas, recep-

tores, enzimas e outras proteínas e vias de sinalização intracelular) aqui descritas.

Em modalidades especiais, os fluidos aquosos eletrocineticamente alterados exibem sinergia com Albuterol e com Budesonida como mostrado neste relatório descritivo.

Em certas modalidades, os fluidos aquosos eletrocineticamente alterados reduzem a expressão do receptor de TSLP induzida por DEP em células epiteliais brônquicas (BEC), conforme mostrado em Exemplos de trabalho neste relatório descritivo.

Em modalidades especiais, os fluidos aquosos eletrocineticamente alterados inibem os níveis de MMP9 ligado à superfície celular, induzidos por DEP, em células epiteliais brônquicas (BEC), conforme mostrado em Exemplos de trabalho neste relatório descritivo.

Em modalidades especiais, os efeitos biológicos dos fluidos aquosos eletrocineticamente alterados são inibidos por toxina diftérica, indicando que bloqueio beta, bloqueio de GPCR e bloqueio do canal de Ca afeta a atividade dos fluidos aquosos eletrocineticamente alterados (por exemplo, sobre função reguladora de células T), conforme mostrado neste relatório descritivo.

Em modalidades especiais, os efeitos físicos e biológicos (por exemplo, a capacidade de alterar estrutura ou função de membrana celular suficiente para permitir a modulação de transdução de sinal intracelular) dos fluidos aquosos eletrocineticamente alterados persistem por pelo menos dois, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco, pelo menos 6 meses ou por períodos mais longos em recipiente fechado (por exemplo, recipiente fechado estanque a gás).

Por conseguinte, modalidades adicionais provêem as referidas soluções geradas eletrocineticamente e métodos para produzir fluido ou solução aquosa oxigenada alterados eletrocineticamente, compreendendo: prover um fluxo de material fluido entre duas superfícies afastadas em movimento relativo e definir um volume de mistura entre estas, em que o tempo de permanência de uma única passagem do fluxo de material fluido dentro e através do volume de mistura é maior do que 0,06 segundos ou maior do que 0,1 segundos; e introduzir oxigênio (O_2) no fluxo do material fluido dentro do volume de mistura sob condições adequadas para dissolver pelo menos 20 ppm, pelo menos 25 ppm, pelo menos 30 ppm, pelo menos 40 ppm, pelo menos 50 ppm ou pelo menos 60 ppm de oxigênio no material, e alterar eletrocineticamente o fluido ou a solução. Em certas modalidades, o oxigênio é infundido no material em menos de 100 milissegundos, menos de 200 milissegundos, menos de 300 milissegundos ou menos de 400 milissegundos. Em modalidades especiais, a razão da área de superfície para o volume é de pelo menos 12, pelo menos 20, pelo menos 30, pelo menos 40 ou pelo menos 50.

Ainda modalidades adicionais provêem um método para produzir um fluido ou solução aquosa oxigenada alterada eletrocineticamente, compreendendo: prover um fluxo de material fluido entre duas superfícies afastadas, definindo um volume de mistura entre estas;

e introduzir oxigênio no fluxo de material dentro do volume de mistura sob condições adequadas para infundir pelo menos 20 ppm, pelo menos 25 ppm, pelo menos 30 ppm, pelo menos 40, pelo menos 50 ou pelo menos 60 ppm de oxigênio no material em menos de 100 milissegundos, menos de 200 milissegundos, menos de 300 milissegundos ou menos de 400 milissegundos. Em certas modalidades, o tempo de permanência do fluxo de material dentro do volume de mistura é maior do que 0,06 segundos ou maior do que 0,1 segundos. Em modalidades especiais, a razão da área de superfície para o volume é de pelo menos 12, pelo menos 20, pelo menos 30, pelo menos 40 ou pelo menos 50.

Em modalidades especiais, os fluidos administrados eletrocineticamente alterados da invenção compreendem nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga em quantidade suficiente para permitir a modulação de pelo menos um entre potencial de membrana celular e condutividade de membrana celular. Em certas modalidades, os fluidos eletrocineticamente alterados são superoxigenados (por exemplo, RNS-20, RNS-40 e RNS-60, compreendendo 20 ppm, 40 ppm e 60 ppm de oxigênio dissolvido, respectivamente, em solução salina padrão). Em modalidades especiais, os fluidos eletrocineticamente alterados não são superoxigenados (por exemplo, RNS-10 ou Solas, compreendendo 10 ppm (por exemplo, aproximadamente níveis ambientais de oxigênio dissolvido em solução salina padrão). Em certas modalidades, a salinidade, a estabilidade, o pH, etc., dos fluidos eletrocineticamente alterados da invenção são estabelecidos quando da produção eletrocinética do fluido, e os fluidos estéreis são administrados por via apropriada. Alternativamente, pelo menos um entre a salinidade, a esterilidade, o pH, etc., dos fluídos é apropriadamente ajustado (por exemplo, usando solução salina estéril ou diluentes apropriados) para serem compatíveis fisiologicamente com a via de administração antes que a administração do fluido. De preferência, diluentes e/ou soluções salinas e/ou composições tampão, utilizados para ajustar pelo menos um entre a salinidade, a esterilidade, o pH, etc., dos fluidos são também fluidos eletrocinéticos ou, de contrário, compatíveis.

Em modalidades especiais, os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção compreendem solução salina (por exemplo, um ou mais sais dissolvidos; por exemplo, sais de metal alcalino (Li, Na, K, Rb, Cs, etc.), sais de metal alcalino terroso (por exemplo, Mg, Ca), etc., sais de metais de transição (por exemplo, Cr, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, etc.), juntamente com quaisquer componentes adequados aniônicos/contra-iônicos). Modalidades especiais compreendem fluidos eletrocinéticos à base de sais mistos (por exemplo, Na, K, Ca, Mg, etc., em várias combinações e concentrações). Em modalidades especiais, os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção compreendem solução salina padrão (por exemplo, NaCl aproximadamente 0,9% ou NaCl em torno de 0,15 M). Em modalidades especiais, os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção compreendem solução salina em concentração de pelo menos 0,0002 M, pelo menos 0,0003 M, pelo menos 0,001 M, pelo menos

0,005 M, pelo menos 0,01 M, pelo menos 0,015 M, pelo menos 0,1 M, pelo menos 0,15 M ou pelo menos 0,2 M. Em modalidades especiais, a condutividade dos fluidos eletrocineticamente alterados da invenção é de pelo menos 10 µS/cm, pelo menos 40 µS/cm, pelo menos 80 µS/cm, pelo menos 100 µS/cm, pelo menos 150 µS/cm, pelo menos 200 µS/cm, 300 µS/cm ou pelo menos 500 µS/cm, pelo menos 1 mS/cm, pelo menos 5 mS/cm, pelo menos 10 mS/cm, pelo menos 40 mS/cm, pelo menos 80 mS/cm, pelo menos 100 mS/cm, pelo menos 150 mS/cm, pelo menos 200 mS/cm, pelo menos 300 mS/cm ou pelo menos 500 mS/cm. Em modalidades especiais, qualquer sal pode ser utilizado para preparar os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção, desde que permitam a formação de nanoestruturas estabilizadas com sal biologicamente ativas (por exemplo, nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas com sal), conforme aqui descritas.

De acordo com modalidades especiais, os efeitos biológicos das composições de fluido da invenção, compreendendo nanoestruturas contendo gás estabilizado com carga, podem ser modulados (por exemplo, aumentados, diminuídos, ajustados, etc.), alterando-se os componentes iônicos dos fluidos como, por exemplo, descritos acima, e/ou alterando-se o componente gasoso do fluido. Em modalidades preferidas, oxigênio é utilizado para preparar os fluidos eletrocinéticos da invenção. Em modalidades adicionais, misturas de oxigênio juntamente com pelo menos outro gás selecionado a partir de nitrogênio, oxigênio, argônio, dióxido de carbono, neônio, hélio, criptônio, hidrogênio e xenônio.

Modalidades exemplares preferidas:

Uma modalidade especial provê um método para tratar uma doença ou condição mediada por TSLP ou mediada por TSLRP, compreendendo administrar, a um mamífero em necessidade deste, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um fluido aquoso alterado eletrocineticamente, compreendendo uma solução iônica aquosa de nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga, com substancialmente diâmetro médio inferior a aproximadamente 100 nanometros e configuradas estavelmente no fluido iônico aquoso em quantidade suficiente para tratar uma doença ou condição mediada por TSLP ou mediada por TSLRP. Em certas modalidades, as nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga estão configuradas estavelmente no fluido iônico aquoso em quantidade suficiente para permitir, quando do contato com uma célula viva pelo fluido, a modulação de pelo menos um entre potencial de membrana celular e condutividade de membrana celular.

Em certas modalidades do método, as nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga representam o principal tipo de nanoestrutura contendo gás estabilizadas por carga no fluido. Em concretizações especiais, o percentual de moléculas de oxigênio dissolvido presentes no fluido, na forma de nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga, é um percentual selecionado a partir do grupo constituído por acima de: 0,01%, 0,1%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%,

75%, 80%, 85%, 90% e 95%. Em modalidades especiais, o oxigênio dissolvido total está substancialmente presente nas nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga. Em certas modalidades, as nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga possuem diâmetro médio inferior a um tamanho selecionado a partir do grupo constituído por: 90 nm, 80 nm, 70 nm, 60 nm, 50 nm, 40 nm, 30 nm, 20 nm, 10 nm, e menos de 5 nm.

Em modalidades especiais do método, a solução iônica aquosa compreende uma solução salina. Em certas modalidades, o fluido aquoso alterado eletrocineticamente é superoxigenado.

Em modalidades especiais do método, o fluido aquoso alterado eletrocineticamente compreende uma forma de elétrons solvatados.

Em certas modalidades, a alteração do fluido aquoso alterado eletrocineticamente compreende exposição do fluido a efeitos eletrocinéticos localizados, induzidos hidrodinamicamente. Em certas modalidades, a exposição a efeitos eletrocinéticos localizados compreende exposição a pelo menos um entre pulsos de voltagem e pulsos de corrente. Em modalidades especiais, a exposição do fluido a efeitos eletrocinéticos localizados, induzidos hidrodinamicamente, compreende exposição do fluido a características estruturais que induzem efeito eletrocinético de um dispositivo para gerar o fluido.

Em modalidades especiais, a doença ou condição mediada por TSLP ou mediada por TSLPR compreende uma doença ou transtorno do sistema imune, incluindo, entre outros, inflamação alérgica. Em modalidades especiais, a inflamação alérgica compreende pelo menos um entre inflamação alérgica das vias aéreas, respostas inflamatórias do tipo Th2 mediadas por DC, dermatite atópica, eczema atópico, asma, doença obstrutiva das vias aéreas, doença pulmonar obstrutiva crônica, transtornos mediados por IgE, rinoconjuntivite e alergias alimentares. Em certas modalidades, a doença ou condição mediada por TSLP ou mediada por TSLPR compreende artrite inflamatória, por exemplo, compreendendo pelo menos uma entre artrite reumatoide ou psoríase.

Em certas modalidades, o método compreende ainda terapia combinada, em que pelo menos um agente terapêutico adicional é administrado ao paciente. Em concretizações especiais, o pelo menos único agente terapêutico adicional é selecionado a partir do grupo constituído por: agonistas β_2 de ação curta, agonistas β_2 de ação prolongada, anticolinérgicos, corticosteroides, corticosteroides sistêmicos, estabilizantes de mastócitos, modificadores de leucotrieno, metilxantinas e combinações destes. Em certas modalidades, o pelo menos único agente terapêutico adicional é selecionado a partir do grupo constituído por: broncodilatadores consistindo em agonistas β_2, incluindo albuterol, levalbuterol, pirbuterol, artformoterol, formoterol, salmeterol, e anticolinérgicos como ipatrópio e tiotrópio; corticosteroides incluindo beclometasona, budesonida, flunisolida, fluticasona, mometasona, triancinolona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona; modificadores de leucotrieno incluindo

montelukast, zafirlukast e zileuton; estabilizantes de mastócitos incluindo cromolina e nedocromil; metilxantinas incluindo teofilina, fármacos combinados incluindo ipatrópio e albuterol, flucatisona e salmeterol, budesonida e formoterol; anti-histamínicos incluindo hidroxizina, difenidramina, loratadina, cetirizina e hidrocortisona; fármacos moduladores do sistema imune incluindo tacrolimus e pimecrolimus; ciclosporina; azotioprina; micofenolato mofetil; e combinações destes. Em modalidades especiais, o pelo menos único agente terapêutico adicional é antagonista de TSLP e/ou TSLPR e, em modalidades particulares, o antagonista de TSLP e/ou TSLPR é selecionado a partir do grupo constituído por anticorpos neutralizantes específicos para TSLP e o receptor de TSLP, moléculas solúveis do receptor de TSLP, proteínas de fusão do receptor de TSLP, incluindo moléculas de TSLPR-imunoglobulina Fc ou polipeptídeos que codificam componentes de mais de uma cadeia do receptor.

Em modalidades especiais do método, a modulação de pelo menos um entre potencial de membrana celular e condutividade de membrana celular compreende alterar pelo menos um entre a estrutura ou função da membrana celular, compreendendo alterar pelo menos um entre conformação, atividade de ligação a ligante e atividade catalítica de proteína associada à membrana ou constituinte. Em certas modalidades, a proteína associada à membrana compreende pelo menos uma selecionada a partir do grupo constituído por receptores, receptores transmembrana, proteínas de canal iônico, proteínas de ligação intracelular, proteínas de adesão celular, integrinas, etc. Em certas modalidades, o receptor transmembrana compreende Receptor Acoplado à Proteína G (GPCR). Em modalidades especiais, o Receptor Acoplado à Proteína G (GPCR) interage com uma subunidade de uma proteína G, por exemplo, em que a subunidade de uma proteína G compreende pelo menos uma selecionada a partir do grupo constituído por Ga_s, Ga_i, Ga_q e Ga_{12} e, em certas modalidades, a pelo menos única subunidade de uma proteína G é Ga_q.

Em modalidades especiais do método, a modulação de pelo menos um entre potencial de membrana celular e condutividade de membrana celular compreende modular a condutância de célula inteira, por exemplo, em que modular a condutância de célula inteira compreende modulação de pelo menos um entre contribuição para dependência de voltagem linear e não linear da condutância de célula inteira.

Em certas modalidades do método, a modulação de pelo menos um entre potencial de membrana celular e condutividade de membrana celular compreende modulação de via ou sistema de mensagens celulares dependente de cálcio. Em certas modalidades do método, a modulação de pelo menos um entre potencial de membrana celular e condutividade de membrana celular compreende modulação de atividade da fosfolipase C. Em certas modalidades do método, a modulação de pelo menos um entre potencial de membrana celular e condutividade de membrana celular compreende modulação de atividade da adenilato ciclase (AC). Em certas modalidades do método, a modulação de pelo menos um entre potencial

de membrana celular e condutividade de membrana celular compreende modulação de transdução de sinal intracelular associado com pelo menos uma condição ou sintoma selecionado a partir do grupo constituído por doenças ou transtornos do sistema imune, inflamação alérgica, inflamação alérgica das vias aéreas, respostas inflamatórias do tipo Th2 medidas por DC, dermatite atópica, eczema atópico, asma, doença obstrutiva das vias aéreas, doença pulmonar obstrutiva crônica, transtornos mediados por IgE, rinoconjuntivite, alergias alimentares, artrite inflamatória, artrite reumatoide e psoríase.

Modalidades especiais do método compreendem a administração do fluido eletrocinético a uma rede ou camada celular e compreendem ainda a modulação de uma junção intercelular na mesma. Em certas modalidades, a junção intracelular compreende pelo menos uma selecionada a partir do grupo constituído por junções do tipo oclusivo (*tight*), junções comunicantes (*gap*) e zona aderente e desmossomos. Em modalidades especiais, a rede ou camadas celulares compreendem pelo menos um selecionado a partir do grupo constituído por epitélio pulmonar, epitélio brônquico e epitélio intestinal.

Em certas modalidades do método, o fluido aquoso alterado eletrocineticamente é oxigenado, em que o oxigênio no fluido está presente em quantidade de pelo menos 8 ppm, pelo menos 15 ppm, pelo menos 25 ppm, pelo menos 30 ppm, pelo menos 40 ppm, pelo menos 50 ppm ou pelo menos 60 ppm de oxigênio em pressão atmosférica.

Em certas modalidades do método, o fluido aquoso alterado eletrocineticamente compreende pelo menos um entre elétrons solvatados e espécies de oxigênio eletrocineticamente modificadas ou com carga, por exemplo, em que a forma de elétrons solvatados ou espécies de oxigênio eletrocineticamente modificadas ou com carga estão presentes em quantidade de pelo menos 0,01 ppm, pelo menos 0,1 ppm, pelo menos 0,5 ppm, pelo menos 1 ppm, pelo menos 3 ppm, pelo menos 5 ppm, pelo menos 7 ppm, pelo menos 10 ppm, pelo menos 15 ppm ou pelo menos 20 ppm. Em certas modalidades, o fluido aquoso alterado eletrocineticamente compreende uma forma de elétrons solvatados estabilizados por oxigênio molecular.

Em certas modalidades, a capacidade do fluido aquoso alterado eletrocineticamente para modular pelo menos um entre potencial de membrana celular e condutividade de membrana celular persiste por pelo menos dois, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco, pelo menos 6, pelo menos 12 meses ou por períodos mais longos em recipiente fechado estanque a gás.

Em certas modalidades, a quantidade de oxigênio presente em nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga do fluido alterado eletrocineticamente é de pelo menos 8 ppm, pelo menos 15 ppm, pelo menos 20 ppm, pelo menos 25 ppm, pelo menos 30 ppm, pelo menos 40 ppm, pelo menos 50 ppm ou pelo menos 60 ppm de oxigênio em pressão atmosférica.

Em modalidades especiais, tratar compreende a administração por pelo menos um entre tópica, inalação, intranasal e intravenosa.

Interações moleculares exemplares pertinentes:

Convencionalmente, acredita-se que propriedades quânticas pertençam a partículas elementares de menos de 10^{-10} metros, enquanto que o mundo macroscópico de nossa vida diária é referido como clássico enquanto se comporta de acordo com as leis de movimento de Newton.

Recentemente, moléculas foram descritas como *clusters* (aglomerados) em formação que aumentam de tamanho com a diluição. Estes *clusters* medem vários micrometros em diâmetro e, de acordo com o relatado, aumentam em tamanho de modo não linear com a diluição. Foi postulado que domínios com coerência quântica medindo 100 nanômetros em diâmetro surgem em água pura, e vibrações coletivas de moléculas de água no domínio coerente podem eventualmente fecharem-se em fase frente a flutuações do campo eletromagnético, fornecendo oscilações estáveis em água, criando um tipo de "memória" na forma de excitação de oscilações coerentes duradouras, específicas para substâncias dissolvidas em água que alteram a estrutura coletiva da água, o que, por sua vez, determina as oscilações coerentes específicas que se desenvolvem. Quando estas oscilações são estabilizadas por acoplamento de fase de campo magnético, a água, ao ser diluída, pode ainda carregar "sementes" de oscilações coerentes. À medida que um *cluster* de moléculas cresce em tamanho, sua assinatura eletromagnética é correspondentemente amplificada, reforçando as oscilações coerentes transmitidas pela água.

Apesar de variações no tamanho de *cluster* de moléculas dissolvidas e a estrutura microscópica detalhada da água, uma especificidade de oscilações coerentes pode ainda assim existir. Um modelo para considerar alterações em propriedades de água tem como base aspectos relativos à cristalização.

Um *cluster* simplificado de água protonada formando uma gaiola em nanoescala é mostrado no pedido de patente anterior dos Requerentes: WO 2009/055729. Um *cluster* de água protonada assume tipicamente a forma de $H^+(H_2O)_n$. Alguns *cluster* de água protonada ocorrem naturalmente, tal como na ionosfera. Sem estar preso a qualquer teoria em particular, e de acordo com modalidades especiais, outros tipos de *cluster* de água ou estruturas (*clusters*, nanogaiolas, etc.) são possíveis, incluindo estruturas compreendendo oxigênio e elétrons estabilizados transmitidos aos materiais obtidos pela invenção. Átomos de oxigênio podem ficar aprisionados nas estruturas resultantes. A química da nanogaiola semi-ligada permite ao oxigênio e/ou os elétrons estabilizados permanecerem dissolvidos por períodos prolongados de tempo. Outros átomos ou moléculas, tais como compostos medicinais, podem ficar aprisionados para fins de liberação sustentada. A química específica do material da solução e de compostos dissolvidos depende das interações destes materiais.

Fluidos processados pelo dispositivo de mistura demonstraram previamente por meio de experimentos exibirem diferentes características estruturais que são coerentes com uma análise do fluido no contexto de estrutura de *cluster*. Consultar, por exemplo, o documento WO 2009/055729.

Nanoestruturas estabilizadas por carga (por exemplo, nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga):

Como descrito previamente no documento WO 2009/055729 dos Requerentes, "efeito de camada dupla", "tempo de permanência", "taxa de infusão" e "medições de tamanho de bolha", o dispositivo de mistura eletrocinética cria, em questão de milissegundos, uma interação dinâmica fluida não linear do primeiro material e do segundo material com turbulência complexa dinâmica, fornecendo uma mistura complexa em contato com uma área de superfície efetivamente enorme (incluindo aquela do dispositivo e das bolhas de gás excepcionalmente pequenas de menos de 100 nm) que dão origem aos efeitos eletrocinéticos descritos neste pedido de patente. Adicionalmente, efeitos eletrocinéticos localizados por características (voltagem/corrente) foram demonstrados usando um dispositivo de mistura especialmente desenhado, compreendendo rotor isolado e características de estator.

Como bem reconhecido no estado da técnica, redistribuições de carga e/ou elétrons solvatados são conhecidos por serem altamente instáveis em soluções aquosa. De acordo com modalidades especiais, os efeitos eletrocinéticos dos Requerentes (por exemplo, redistribuições de carga, incluindo, em modalidades especiais, elétrons solvatados) são surpreendentemente estabilizados dentro do material obtido (por exemplo, soluções salinas, soluções iônicas). De fato, de acordo com esta descrição, a estabilidade das propriedades e atividade biológica dos fluidos eletrocinéticos da invenção (por exemplo, RNS-60 ou Solas) podem ser mantidas por meses em recipiente estanque a gás, indicando envolvimento de gás dissolvido (por exemplo, oxigênio) que ajuda a gerar e/ou manter e/ou mediar as propriedades e atividades das soluções da invenção. Significativamente, as redistribuições de carga e/ou elétrons solvatados estão configurados estavelmente nos fluidos iônicos aquosos eletrocinéticos da invenção em quantidade suficiente para permitir, quando do contato com uma célula viva (por exemplo, célula de mamífero) pelo fluido, a modulação de pelo menos um entre potencial de membrana celular e condutividade de membrana celular (consultar, por exemplo, o Exemplo 23 de trabalho de *patch clamping* celular do documento WO 2009/055729 e conforme aqui descrito).

De acordo com a descrição sob "Interações Moleculares" neste relatório, para justificar a estabilidade e a compatibilidade biológica dos fluidos eletrocinéticos da invenção (por exemplo, soluções salinas eletrocinéticas), os Requerentes propuseram que interações entre as moléculas de água e as moléculas das substâncias (por exemplo, oxigênio) dissolvidas na água trocam a estrutura coletiva da água e permitem a formação de *clusters* tipo gai-

ola em nanoescala, incluindo nanoestruturas compreendendo oxigênio e/ou elétrons estabilizados, que são transmitidos para os materiais obtidos pela invenção. Sem estar preso a mecanismo, a configuração das nanoestruturas, em modalidades especiais, é tal que estas: compreendem gás dissolvido (pelo menos para formação e/ou estabilidade e/ou atividade biológica); possibilita que os fluidos eletrocinéticos (por exemplo, RNS-60 ou fluidos Solas com solução salina) modulem (por exemplo, transmitam ou recebam) cargas e/ou efeitos sobre carga quando do contato com uma membrana celular ou com um constituinte relacionado à esta; e, em modalidades especiais, permitem a estabilização (por exemplo, carreando, abrigando, aprisionando) de elétrons solvatados em forma biologicamente pertinente.

De acordo com modalidades especiais e reforçado pelo presente relatório descritivo, em soluções iônicas ou salinas (por exemplo, salina padrão, NaCl), as nanoestruturas da invenção compreendem nanoestruturas estabilizadas por carga (por exemplo, diâmetro médio inferior a 100 nm) que podem compreender pelo menos uma molécula de gás dissolvido (por exemplo, oxigênio) dentro da esfera de hidratação estabilizada por carga. De acordo com modalidades adicionais, a esfera de hidratação estabilizada por carga pode compreender uma gaiola ou espaço abrigando a pelo menos única molécula de gás dissolvido (por exemplo, oxigênio). De acordo com outras modalidades, em virtude de estarem presentes esferas adequadas de hidratação estabilizadas por cargas, a nanoestrutura estabilizada por carga e/ou as nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga podem compreender adicionalmente um elétron solvatado (por exemplo, elétron solvatado estabilizado).

Sem estar preso a mecanismo ou teoria específica, após a presente data de prioridade, microbolhas estabilizadas por carga por íons em líquido aquoso em equilíbrio com gás ambiente (atmosférico) foram propostas (Bunkin *et al.*, *Journal of Experimental and Theoretical Physics*, 104:486-498, 2007; aqui incorporado, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente). De acordo com modalidades específicas da presente invenção, os novos fluidos eletrocinéticos dos Requerentes compreendem uma nova forma biologicamente ativa de nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga, e podem compreender ainda novos arranjos, *clusters* ou associações desse tipo de estruturas.

De acordo com o modelo de microbolha estabilizado por carga, a ordem molecular de curto alcance da estrutura da água é destruída pela presença de uma molécula de gás (por exemplo, molécula de gás dissolvida inicialmente formando complexo com íon não absortivo resulta em ordem de defeito de curto alcance), possibilitando a condensação de gotículas iônicas, em que o defeito é circundado pela primeira e a segunda esferas de coordenação de moléculas de água, as quais são alternadamente preenchidas por íons absortivo (por exemplo, aquisição de uma "*screening shell*" (esfera de blindagem) de íons Na^+ para uma camada elétrica dupla) e íons não absortivos (por exemplos, íons Cl^- ocupando a segunda esfera de coordenação), ocupando seis a 12 espaços vagos, respectivamente, nas

esferas de coordenação. Em soluções iônicas sub-saturadas (por exemplo, soluções salinas sub-saturadas), esse "núcleo" hidratado permanece estável até que a primeira e a segunda esferas sejam preenchidas com seis íons absortivos e cinco não absortivos, respectivamente, e em seguida sofre explosão de Coulomb criando um espaço interno contendo a molécula de gás, em que os íons absortivos (por exemplo, íons Na^+) são adsorvidos à superfície do espaço resultante, enquanto os íons não absortivos (ou alguma parte destes) se difundem na solução (Bunkin *et al.*, *supra*). Neste modelo, o espaço na nanoestrutura é impedido de colabar por repulsão coulombiana entre os íons (por exemplo, íons Na^+) adsorvidos à sua superfície. A estabilidade das nanoestruturas contendo espaço é postulada como decorrente da adsorção seletiva de íons dissolvidos com cargas iguais sobre a superfície do espaço/bolha e o equilíbrio de difusão entre o gás dissolvido e o gás no interior da bolha, em que a camada elétrica dupla resultante tornar possível compensar estavelmente a tensão superficial, e a pressão do gás no interior da bolha é equilibrada pela pressão ambiente. De acordo com o modelo, a formação destas microbolhas requer um componente iônico e, em certos aspectos, associações mediadas por colisão entre partículas pode permitir a formação de *clusters* (arranjos) de maior ordem (*Id*).

O modelo de microbolha estabilizada com carga sugere que as partículas podem ser microbolhas gasosas, porém cogita somente formação espontânea dessas estruturas em solução iônica em equilíbrio com o ar ambiente, não caracteriza e omite se oxigênio é capaz de formar estas estruturas, além de omitir da mesma forma se elétrons solvatados poderiam ou não estar associados e/ou ser estabilizados por estas estruturas.

De acordo com modalidades especiais, os fluidos eletrocinéticos da invenção, compreendendo nanoestruturas estabilizadas por carga e/ou nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga, são novos e fundamentalmente distintos das estruturas de microbolhas não eletrocinéticas estabilizadas por carga atmosférica postuladas de acordo com o modelo de microbolha. Significativamente, essa conclusão deriva, pelo menos em parte, do fato de que soluções salinas de controle não exibem as propriedades biológicas aqui descritas, enquanto que as nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas com carga dos Requerentes oferecem uma nova forma biologicamente ativa de nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga.

De acordo com modalidades especiais da presente invenção, o novo dispositivo eletrocinético dos Requerentes e métodos provêem novos fluidos eletrocineticamente alterados, compreendendo quantidades significativas de nanoestruturas estabilizadas por carga, excedendo qualquer quantidade que possa ou não ocorrer espontaneamente em fluidos iônicos em equilíbrio com ar, ou em qualquer fluido não gerado eletrocineticamente. Em modalidades especiais, as nanoestruturas estabilizadas por carga compreendem nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga. Em modalidades adicionais, as nanoestrutu-

ras estabilizadas por carga são todas ou substancialmente todas as nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga ou as nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga são o principal tipo de nanoestrutura contendo gás estabilizadas por carga no fluido eletrocinético.

De acordo ainda com modalidades adicionais, as nanoestruturas estabilizadas por carga e/ou as nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga podem compreender ou abrigar um elétron solvatado e com isso oferecer um novo tipo de carreador de elétron solvatado estabilizado. Em modalidades especiais, as nanoestruturas estabilizadas por carga e/ou as nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga oferecem um novo tipo de electreto (*electride*) (ou electreto invertido), o qual, em contraste aos electretos solutos convencionais contendo um único cátion organicamente coordenado, mais exatamente contém uma pluralidade de cátions em arranjo estável próximos a um espaço ou um espaço contendo um átomo de oxigênio, em que os íons de sódio no arranjo são coordenados por esferas de hidratação de água, em vez de por moléculas orgânicas. De acordo com modalidades especiais, um elétron solvatado pode ser acomodado pela esfera de hidratação de moléculas de água ou, de preferência, ser acomodado dentro do espaço da nanoestrutura, distribuído sobre todos os cátions. Em certas modalidades, as nanoestruturas da invenção oferecem uma nova estrutura de "super electreto" em solução, não só permitindo a distribuição/estabilização do elétron solvatado sobre múltiplos cátions de sódio no arranjo, mas também permitindo a associação ou associação parcial do elétron solvatado com a(s) molécula(s) aprisionada(s) de oxigênio no espaço – o elétron solvatado sendo distribuído sobre um arranjo de átomos de sódio e pelo menos um átomo de oxigênio. De acordo com modalidades especiais, portanto, "elétrons solvatados", como presentemente descrito em associação com os fluidos eletrocinéticos da invenção, podem não estar solvatados no modelo tradicional compreendendo hidratação direta por moléculas de água. Alternativamente, em analogia limitada com sais desidratados de electreto, elétrons solvatados nos fluidos eletrocinéticos da invenção podem estar distribuídos sobre múltiplas nanoestruturas estabilizadas por carga, servindo de "cola para arranjo de distribuição" para estabilizar arranjos de ordem mais alta em solução aquosa.

Em modalidades especiais, as nanoestruturas estabilizadas por carga e/ou as nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga são capazes de interagir com membranas celulares ou seus constituintes ou proteínas, etc., e mediarem atividades biológicas. Em modalidades especiais, as nanoestruturas estabilizadas por carga e/ou as nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga, abrigando elétron solvatado, são capazes de interagir com membranas celulares ou seus constituintes ou proteínas, etc., e mediarem atividades biológicas.

Em modalidades especiais, as nanoestruturas estabilizadas por carga e/ou as na-

noestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga interagem com membranas celulares ou seus constituintes ou proteínas, etc., como doador (liberação) de carga e/ou efeito de carga e/ou como receptor de carga e/ou efeito de carga para mediar atividades biológicas. Em modalidades especiais, as nanoestruturas estabilizadas por carga e/ou as nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga da invenção, abrigando elétron solvatado, interagem com membranas celulares ou seus constituintes ou proteínas, etc., como doador de carga e/ou efeito de carga e/ou como receptor de carga e/ou efeito de carga para mediar atividades biológicas.

Em modalidades especiais, as nanoestruturas estabilizadas por carga e/ou as nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga da invenção são compatíveis e responsáveis pela estabilidade e as propriedades biológicas observadas dos fluidos eletrocinéticos da invenção, e oferecem ainda um novo electreto (ou electreto invertido) que torna possível a presença de elétrons solvatados estabilizados em soluções iônicas aquosas (por exemplo, soluções salinas, NaCl, etc.).

Em modalidades especiais, as nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga substancialmente compreendem, assumem a forma ou podem dar origem a nanobolhas contendo oxigênio estabilizadas por carga. Em modalidades especiais, *clusters* contendo oxigênio estabilizados por carga possibilitam a formação de arranjos relativamente maiores de nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga e/ou nanobolhas contendo oxigênio estabilizadas por carga ou arranjos destas. Em modalidades especiais, as nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga podem possibilitar a formação de nanobolhas hidrofóbicas mediante contato com uma superfície hidrofóbica.

Em modalidades especiais, as nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga compreendem substancialmente pelo menos um molécula de oxigênio. Em certas modalidades, as nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga compreendem substancialmente pelo menos 1, pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 10, pelo menos 15, pelo menos 20, pelo menos 50, pelo menos 100 ou um número maior de moléculas de oxigênio. Em modalidades especiais, nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga compreendem ou dão origem a nanobolhas (por exemplo, nanobolhas hidrofóbicas) de aproximadamente 20 nm x 1,5 nm, compreendem em torno de 12 moléculas de oxigênio (por exemplo, com base no tamanho de molécula de oxigênio (aproximadamente 0,3 nm a 0,4 nm), supondo um gás ideal e a aplicação de $n = PV/RT$, em que $P = 1$ atm, $R = 0{,}0820571$. atm/mol.K; $T = 295$ K; $V = pr^2h = 4{,}7 \times 10^{-22}$ L, em que $r = 10 \times 10^{-9}$ m, $h = 1{,}5 \times 10^{-9}$ m e $n = 1{,}95 \times 10^{-22}$ moles).

Em certas modalidades, o percentual de moléculas de oxigênio presente no fluido que estão nestas nanoestruturas, ou arranjos destas, com configuração estabilizada por carga no fluido iônico aquoso, é um valor de percentual selecionado a partir do grupo consti-

tuído por acima de: 0,1%, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou acima de 95%. De preferência, este percentual é acima de aproximadamente 5%, acima de aproximadamente 10%, acima de aproximadamente 15% ou acima de aproximadamente 20%. Em modalidades adicionais, o tamanho substancial das nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga, ou arranjos destas, com configuração estabilizada por carga no fluido iônico aquoso, é aquele selecionado a partir do grupo constituído por inferior a: 100 nm, 90 nm, 80 nm, 70 nm, 60 nm, 50 nm, 40 nm, 30 nm, 20 nm, 10 nm, 5 nm, 4 nm, 3 nm, 2 nm e 1 nm. De preferência, este tamanho é inferior a aproximadamente 50 nm, inferior a aproximadamente 40 nm, inferior a aproximadamente 30 nm, inferior a aproximadamente 20 nm ou inferior a aproximadamente 10 nm.

Em certas modalidades, os fluidos eletrocinéticos da invenção compreendem elétrons solvatados. Em modalidades adicionais, os fluidos eletrocinéticos da invenção compreendem nanoestruturas estabilizadas por carga e/ou nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga e/ou arranjos destas, as quais compreendem pelo menos um entre: elétron(s) solvatado(s) e distribuições únicas de carga (distribuição de polar, simétrica, assimétrica). Em certas modalidades, as nanoestruturas estabilizadas por carga e/ou nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga e/ou arranjos destas exibem propriedades paramagnéticas.

Por outro lado, em relação aos fluidos eletrocinéticos da invenção, fluidos oxigenados de panela de pressão de controle (fluidos não eletrocinéticos) e os semelhantes *não* compreendem estas nanoestruturas estabilizadas por carga biologicamente ativas e/ou nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga biologicamente ativas geradas eletrocineticamente, e/ou arranjos destas, capazes de modulação de pelo menos um entre potencial de membrana celular e condutividade de membrana celular.

Sistemas para produzir fluidos enriquecidos com gás

O sistema e métodos presentemente descritos permitem que um gás (por exemplo, oxigênio) seja enriquecido estavelmente em alta concentração com perda passiva mínima. Este sistema e métodos podem ser efetivamente usados para enriquecer uma ampla variedade de gases em altos percentuais em uma ampla variedade de fluido. A título somente de exemplo, água deionizada em temperatura ambiente que praticamente exibe níveis em torno de 2-3 ppm (partes por milhão) de oxigênio pode atingir níveis de oxigênio dissolvido variando de pelo menos aproximadamente 5 pmm, pelo menos aproximadamente 10 pmm, pelo menos aproximadamente 15 pmm, pelo menos aproximadamente 20 pmm, pelo menos aproximadamente 25 pmm, pelo menos aproximadamente 30 pmm, pelo menos aproximadamente 35 pmm, pelo menos aproximadamente 40 pmm, 45 pmm, pelo menos aproximadamente 50 pmm, pelo menos aproximadamente 55 pmm, pelo menos aproximadamente 60

pmm, pelo menos aproximadamente 65 pmm, pelo menos aproximadamente 70 pmm, pelo menos aproximadamente 75 pmm, pelo menos aproximadamente 80 pmm, 85 pmm, pelo menos aproximadamente 90 pmm, pelo menos aproximadamente 95 pmm, pelo menos aproximadamente 100 pmm ou qualquer valor maior ou intermediário dos mesmos, usando os sistemas e/ou métodos descritos. De acordo com uma modalidade especialmente exemplar, água enriquecida com oxigênio pode ser gerada com níveis de aproximadamente 30 - 60 ppm de oxigênio dissolvido.

A Tabela 1 ilustra várias medidas de pressão parcial obtida em ferida tratada com uma solução enriquecida com oxigênio (Tabela 1) e em amostras da solução salina enriquecida com gás enriquecida com oxigênio da presente invenção.

TABELA 1

MEDIÇÕES DE OXIGÊNIO TECIDUAL	
Sonda Z082BO	
No ar: 171 mmHg (22,8 kPa) 23 °C	
Coluna	Pressão Parcial (mmHg)
B1	32 – 36
B2	169 – 200
B3	20 – 180*
B4	40 - 60
* profundidade mínima da ferida, maioria > 150, ocasional 20 s	

TSLP e condições mediadas por TSLP

Agonistas/antagonistas de TSLP e TSLPR: Agente com afinidade e que estimula atividade fisiológica em receptores celulares normalmente estimulados por substâncias naturais, desencadeando, portanto, uma resposta bioquímica. Um agonista do receptor de TSLP possui afinidade pelo receptor de TSLP e estimula uma atividade induzida pela ligação de TSLP a seu receptor. Por exemplo, um agonista de TSLP/receptor de TSLP é uma molécula que se liga ao receptor de TSLP e induz sinalização intracelular. Por outro lado, "antagonista" é um agente que inibe a atividade de um receptor celular normalmente estimulado por uma substância natural. Dessa forma, um antagonista de TSLP/Receptor de TSLP liga-se à TSLP ou ao receptor de TSLP e inibe a ligação de TSLP ao receptor de TSLP e/ou inibe uma atividade normalmente induzida pela ligação de TSLP ao seu receptor. Por exemplo, um antagonista de TSLP/receptor de TSLP pode ligar-se à TSLP ou ao receptor de TSLP e diminuir ou impedir a ligação, por exemplo, bloqueando a ligação de TSLP ao receptor de

TSLP. Alternativamente, um antagonista de TSLP/receptor de TSLP pode ligar-se ao receptor de TSLP e diminuir ou impedir a sinalização em sentido descendente que seria normalmente induzida pela ligação de TSLP ao seu receptor. Agonistas e antagonistas podem incluir uma variedade de classes de moléculas, incluindo peptídeos, tais como peptídeos do tipo ligante, anticorpos e fragmentos ou subseqüências destes. Agonistas e antagonistas podem incluir também polipeptídeos de fusão, anticorpos, peptídeos (tais como peptídeos com menos de aproximadamente 20 aminoácidos de extensão) e pequenas moléculas. Antagonistas exemplares incluem: anticorpos neutralizantes específicos para TSLP e o receptor de TSLP, moléculas solúveis do receptor de TSLP e proteínas de fusão do receptor de TSLLP tais como TSLPR-moléculas Fc de imunoglobulinas ou polipeptídeos que codificam componentes de mais de uma cadeia do receptor que mimetizam, pelo mesmo, um heterodímero do receptor fisiológico ou oligômero de ordem mais alta. Se o receptor incluir mais de uma cadeia polipeptídica, a fusão de uma única cadeia pode ser utilizada.

Anticorpo: Polipeptideo ligante compreendendo pelo menos uma região variável da cadeia leve ou cadeia pesada de imunoglobulinas, o qual reconhece especificamente e se liga a um epítopo (por exemplo, como um antígeno, tal como TSLP ou fragmento deste ou um receptor de TSLP de um fragmento deste). Estes incluem imunoglobulinas intactas e os seus variantes e partes destas, bem conhecidos no estado da técnica, tais como fragmentos Fab', fragmentos F(ab)'.sub.2, proteínas Fv de cadeia única ("scFv") e proteínas Fv estabilizadas com dissulfeto ("dsFV"). Proteína scFV é uma proteína de fusão na qual uma região variável da cadeia leve de uma imunoglobulina e uma região variável da cadeia pesada de uma imunoglobulina estão ligadas por um ligante, enquanto em dsFVs, as cadeias sofreram mutações para ser introduzida uma ligação dissulfeto de modo a estabilizar a associação das cadeias. O termo inclui também formas construídas geneticamente tais como anticorpos quiméricos (por exemplo, anticorpos murinos humanizados), anticorpos heteroconjungados (por exemplos, anticorpos biespecíficos). Consultar também, *Pierce Catalog and Handbook*, 1994 - 1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL.); Kuby, J., *Immunology*, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., New York, 1997. Tipicamente, uma imunoglobulina possui uma cadeia pesada e uma leve. Cada cadeia leve contém uma região constante e uma região variável (as regiões são conhecidas também como "domínios"). Combinadas, as regiões variáveis da cadeia pesada e da leve ligam-se especificamente ao antígeno. As regiões variáveis da cadeia leve e da pesa contêm uma região "framework" (arcabouço) interrompida por três regiões hipervariáveis, denominadas também "regiões determinantes de complementaridade" ou "CDRs". A extensão da região *framework* e de CDRs foi definida (consultar, Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, *U.S. Department of Health and Human Services*, 1991, o qual é aqui incorporado por referência neste pedido de patente). A base de dados Kabat é atualmente mantida *online*. As sequências das regiões *framework* de diferentes cadeias le-

ves ou pesadas são relativamente conservadas dentro de uma espécie. A região framework de um anticorpo, ou seja, as regiões *framework* combinadas das cadeias constituintes, leve e pesada, serve para posicionar e alinhar as CDRs tridimensionalmente. Anticorpos incluem anticorpos monoclonais, anticorpos humanizados, etc.

Antagonistas de TSLP incluem antagonistas de pequenas moléculas, anticorpos contra TSLP, anticorpos contra o receptor de TSLP e proteínas de fusão do receptor de TSLP, tais como TSLPR-moléculas Fc de imunoglobulinas ou polipeptídeos que codificam um heterodímero do receptor fisiológico ou oligômero de ordem mais alta, entre outros. TSLP demonstrou ligar-se diretamente a um membro da superfamília de receptores de citocinas tipo I (os quais são conhecidos também como membros da superfamília do receptor de hematopoeitina), TSLPR. TSLPR foi clonado. O receptor funcional de alta afinidade por TSLP demonstrou incluir dois polipeptídeos, TSLPR e a cadeia alfa do receptor de IL-7. Dessa forma, tanto TSLP como IL-7 compartilham IL-7Ralfa como componentes de seus receptores. No entanto, estes receptores são diferentes em que o receptor de TSLP contém adicionalmente TSLPR, enquanto o receptor de IL-7 contém adicionalmente a cadeia gama de receptores comuns de citocinas, a qual é um componente para transdução de sinais de vários receptores de citocinas. TSLPR (e fusões de Fc da cadeia deste receptor) está descrito, por exemplo, na Publicação do Pedido de Patente U.S. N° 2002/0160949, a qual é aqui incorporada por referência neste pedido de patente.

Anticorpos contra polipeptídeos de TSLP são conhecidos no estado da técnica. Adicionalmente, anticorpos anti-TSLPR encontram-se comercialmente disponíveis (R & D Systems, Minneapolis, Minn., cat. ref. MAB981; DNAX Research, Inc., Palo Alto, Califórnia). Anticorpos são preparados também contra o receptor de TSLP ou contra TSLP por imunização com epítopos específicos, tais como regiões de maior antigenicidade, determinadas pelo gráfico de Welling do programa Vector NTI.RTM.Suite (Informax, Inc., Bethesda, Md.). A sequência do receptor de TSLP e regiões de maior antigenicidade em receptor de TSLP humano são descritas na Publicação da Patente U.S. N° 2003/0186875. Composições farmacêuticas (vide acima) incluem geralmente uma quantidade terapeuticamente eficaz de um antagonista de TSLP, além de poderem incluir também agentes adicionais. O preparo de composições farmacêuticas está descrito acima.

Indicações

Acredita-se que TSLP e TSLPR participem em muitos tipos de condições alérgicas, incluindo, entre outras, transtornos do sistema imune, inflamação alérgica, inflamação alérgica das vias aéreas, respostas inflamatórias do tipo Th2 mediadas por DC, dermatite atópica, eczema atópico, asma alérgica, asma, doença obstrutiva das vias aéreas, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), alergias alimentares, artrite inflamatória, artrite reumatoide, psoríase, transtornos mediados por IgE e rinoconjuntivite. O envolvimento de TSLP em

respostas inflamatórias do tipo Th2 mediadas por DC foi demonstrado em várias publicações, incluindo uma revisão recente por Ziegler e Liu (Ziegler and Liu, *Nat. Immunol.*, 7:709-714, 2005, a qual é aqui incorporada, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente).

Inflamação alérgica das vias aéreas. Um estudo recente demonstrou que TSLP é necessário para o início de inflamação alérgica das vias aéreas em camundongos *in vivo* (Zhou *et al.*, *Nat. Immunol.*, 6:1047-1053, 2005). Neste estudo, Zhou *et al.* demonstraram que a expressão pulmonar específica de um transgene de TSLP induziu inflamação alérgica das vias aéreas (asma), caracterizada por infiltração maciça de leucócitos (incluindo células Th2), hiperplasia de células caliciformes e fibrose subepitelial, além de níveis aumentados de IgE sérica. Adicionalmente, um estudo recente mostrou que desafio alergênico provocou acúmulo rápido de TSLP nas vias aéreas de camundongos asmáticos (Liyun Shi *et al.*, *Clin. Immunol.*, 129:202-210, 2008). Esses resultados indicam que TSLP desempenha um importante papel na patogênese de inflamação alérgica das vias aéreas. Neste relatório descritivo, os Requerentes mostram que os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção regularam negativamente de modo significativo TSLP. De acordo com certas modalidades, os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção são consideravelmente úteis para tratar inflamação alérgica das vias aéreas e condições semelhantes.

Inflamação alérgica. Uma revisão recente resume e descreve os resultados de estudos investigando o papel de TSLP em inflamação alérgica, por exemplo, inflamação alérgica da pele (Ziegler and Liu, 2008). Em especial, estudos demonstraram que a pele normal ou pele não lesional em pacientes com dermatite atópica não apresentam proteína TSLP detectável, enquanto que a pele obtida de lesões agudas e crônicas de dermatite tópica exibe alta expressão de TSLP. Em outro estudo, camundongos desprovidos de TSLPR foram construídos e examinados quanto a efeitos sobre inflamação alérgica da pele (He *et al*, PNAS, 105:11875-11880, 2008), o qual é aqui incorporado, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente). He *et al.* descobriram que a inflamação cutânea causada por um alérgeno em camundongos desprovidos de TSLPR foi significativamente reduzida quando comparados aos do tipo selvagem. Em ainda outro estudo, foi demonstrado que camundongos construídos para superpressarem TSLP na pele desenvolveram dermatite atópica, caracterizada por lesões cutâneas eczematosas contendo infiltrados inflamatórios, aumento acentuado em células Th2 circulantes e IgE sérica elevada (Yoo *et al.*, *J. Exp. Med.*, 202:541-549, 2005). O estudo sugeriu que TSLP pode ativar diretamente DCs em camundongos. Em outro estudo, conduzido por Li *et al.*, o grupo confirmou que camundongos transgênicos superexpressando TSLP na pele desenvolveram dermatite atópica, o que solidificou o vínculo entre TSLP e o desenvolvimento de dermatite atópica. Esses resultados indicam que TSLP desempenha um importante papel na patogênese de inflamação alérgica,

por exemplo, inflamação alérgica da pele (por exemplo, dermatite e eczema atópicos). Neste relatório descritivo, os Requerentes mostram que os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção regularam negativamente de modo significativo TSLP. De acordo com certas modalidades, os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção são consideravelmente úteis para tratar inflamação alérgica, por exemplo, inflamação alérgica da pele (por exemplo, dermatite e eczema atópicos) e condições semelhantes.

Psoríase. Um estudo recente mostrou que TSLP apresentava expressão substancialmente mais alta em biopsias de pele, obtidas de pacientes com psoríase aguda (Guttman-Yassky, *et al.*, *J. Allergy and Clinical Immunology* 119:1210-1217, 2007). Esse resultado indica que TSLP desempenha um papel importante na patogênese de psoríase. Neste relatório descritivo, os Requerentes mostram que os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção regularam negativamente de modo significativo TSLP. De acordo com certas modalidades, portanto, os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção são consideravelmente úteis para tratar psoríase e condições semelhantes.

Asma alérgica. Recentemente, um estudo mostrou que desafio alergênico provocou acúmulo rápido de TSLP nas vias aéreas de camundongos asmáticos (Liyun Shi *et al.*, *Clin. Immunol.*, 129:202-210, 2008). No mesmo estudo, foi mostrado que a modulação da função de DCs por inibição de TSLPR diminui a gravidade em camundongos. Esses resultados indicam que TSLP desempenha um papel importante na patogênese de asma alérgica. Neste relatório descritivo, os Requerentes mostram que os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção regularam negativamente de modo significativo TSLP. De acordo com certas modalidades, portanto, os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção são consideravelmente úteis para tratar asma alérgica e condições semelhantes.

Doença obstrutiva das vias aéreas. Um estudo recente demonstrou que DPOC está associada com expressão elevada de TSLP na mucosa brônquica (Ying *et al.*, *J. Immunol.*, 181:2790-2798, 2008). DPOC é um tipo de doença obstrutiva das vias aéreas. Esses resultados indicam que TSLP desempenha um papel importante na patogênese de doença obstrutiva das vias aéreas, por exemplo, DPOC. Neste relatório descritivo, os Requerentes mostram que os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção regularam negativamente de modo significativo TSLP. De acordo com certas modalidades, portanto, os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção são consideravelmente úteis para tratar doença obstrutiva das vias aeras, por exemplo, DPOC.

Alergias alimentares. Células dendríticas dos intestinos demonstraram estimular células T virgens, desviando-as para uma resposta tipo TH2 em maneira OX40L-dependente (Blazquez AB, Berin MC. *Gastrointestinal dendritic cells promote Th2 skewing via OX40L. J. Immunol.*, 180:4441-4450, 2008, aqui incorporado, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente). Além disso, uma revisão recente discute a presença de TSLP nos intes-

tinos e seu papel em regular homeostase imune (Iliev ID, Matteoli G, Reseigno M. *The yin and Yan of intestinal epithelial cells in controlling dendritic cell function. J Exp Med*; 204:2253-2257, 2007, o qual é aqui incorporado, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente). Esses resultados indicam que TSLP desempenha um papel importante em alergias alimentares. Neste relatório descritivo, os Requerentes mostram que os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção regularam negativamente de modo significativo TSLP. De acordo com certas modalidades, portanto, os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção são consideravelmente úteis para tratar alergias alimentares e condições semelhantes.

Artrite inflamatória. Um estudo recente revelou níveis aumentados de TSLP em amostras de líquido sinovial derivadas de pacientes com artrite reumatoide (AR), quando comparado a líquido sinovial de pacientes com outras formas de artrite (Koyama et al., *Biochem and Biophys Res Comm.*, 357:99-104, 2007, o qual é aqui incorporado, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente). O mesmo estudo descobriu que o uso de anticorpo neutralizante anti-TSLP melhorava artrite experimental dependente de TNF-a, induzida por anticorpo anti-colágeno tipo II em camundongo. Esses resultados indicam que TSLP é um participante importante em artrite inflamatória, tal como AR. Neste relatório descritivo, os Requerentes mostram que os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção regularam negativamente de modo significativo TSLP. De acordo com certas modalidades, portanto, os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção são consideravelmente úteis para tratar artrite inflamatória e condições semelhantes, por exemplo, AR.

Rinite alérgica. Em um estudo de pesquisa recente, Mou *et al.* descobriram que TSLP estava presente tanto em nível do mRNA como no protéico na mucosa nasal de todos os pacientes testados que sofriam de rinite alérgica (RA) (Mou *et al.*, *Acta Oto-laryngologica*, 129:297-301, 2009, aqui incorporado, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente). Além disso, os níveis de TSLP se correlacionavam estritamente com a gravidade da RA. Esses resultados indicam que TSLP desempenha um papel importante na patogênese de RA e/ou rinoconjuntivite. Neste relatório descritivo, os Requerentes mostram que os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção regularam negativamente de modo significativo TSLP. De acordo com certas modalidades, portanto, os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção são consideravelmente úteis para tratar RA, rinoconjuntivite alérgica e condições semelhantes.

Métodos de tratamento

O termo "tratar" refere-se a, e inclui, reverter, aliviar, inibir a evolução ou prevenir uma doença, transtorno ou condição, ou um ou mais de seus sintomas, e "tratamento" e "terapeuticamente" referem-se ao ato de tratar, como definido neste relatório descritivo.

"Quantidade terapeuticamente eficaz" é qualquer quantidade de qualquer um dos

compostos utilizados no decorrer da prática da invenção aqui provida, suficiente para reverter, aliviar, inibir a evolução ou prevenir uma doença, transtorno ou condição, ou uma ou mais de seus sintomas.

Certas modalidades da presente invenção referem-se a composições terapêuticas e modos de tratamento para um sujeito, impedindo ou aliviando pelo menos um sintoma de inflamação associado com certas condições ou doenças. Muitas condições ou doenças com transtornos inflamatórios foram tratadas com esteroides, metotrexato, fármacos imunossupressores, incluindo ciclofosfamida, ciclosporina, azotioprina e leflunomida, agentes anti-inflamatórios não esteroidais como aspirina, acetominafeno e inibidores da COX-2, agentes com ouro e tratamentos antimaláricos.

Vias e formas de administração

Neste relatório descritivo, "sujeito" pode referir-se a qualquer criatura viva, de preferência um animal, mais preferivelmente, um mamífero e ainda mais preferivelmente um ser humano.

Em modalidades exemplares específicas, o fluido enriquecido com gás da presente invenção pode funcionar como composição terapêutica, isoladamente ou combinado a outro agente terapêutico, de modo que a composição terapêutica previna ou alivie pelo menos um sintoma de inflamação. As composições terapêuticas da invenção incluem composições capazes de serem administradas a um sujeito em necessidade do mesmo. Em certas modalidades, a formulação da composição terapêutica pode compreender também pelo menos um agente adicional, selecionado a partir do grupo constituído por: veículos, adjuvantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensão, adoçantes, agentes de sabor, perfumes e agentes de ligação.

Neste relatório descritivo, "veículo farmaceuticamente aceitável" e "veículo" referem-se geralmente a material de enchimento não tóxico, inerte, sólido, semi-sólido ou líquido, diluente, material encapsulante ou formulação auxiliar de qualquer tipo. Alguns exemplos não limitantes de materiais que podem servir de veículos farmaceuticamente aceitáveis são açúcares, tal como lactose, glicose e sacarose; amidos tais como amido de milho e amido de batata; celulose e seus derivados, tais como carbometilcelulose sódica, etilcelulose e acetato de celulose; tragacanta em pó; malte; gelatina; excipientes como manteiga de cacau e ceras para supositórios; óleos como óleo de amendoim, óleo de semente de algodão; óleo de gergelim; óleo de oliva; óleo de milho e óleo de soja; glicóis: como propilenoglicol; ésteres como etil oleato e etil laurato; agentes de tamponamento como hidróxido de magnésio e hidróxido de alumínio; ácido algínico; água livre de pirógenos; solução salina isotônica; solução de Ringer; álcool etílico e soluções de tampão fosfato, bem como outros lubrificantes compatíveis não tóxicos como lauril sulfato de sódio e estearato de magnésio, bem como agentes corantes, agentes promotores de liberação, agentes de revestimento, agentes ado-

çantes, de sabor e de perfume, conservantes e antioxidantes podem também estar presentes na composição, de acordo com o parecer do responsável pela formulação. Em modalidades especiais, estes veículos e excipientes podem ser fluidos ou soluções enriquecidas com gás da presente invenção.

Os veículos farmaceuticamente aceitáveis aqui descritos, por exemplo, veículos, adjuvantes, excipientes ou diluentes, são bem conhecidos daqueles versados no estado da técnica. Tipicamente, o veículo farmaceuticamente aceitável é quimicamente inerte aos agentes terapêuticos e sem efeitos colaterais desfavoráveis ou toxicidade sob as condições de uso. Os veículos farmaceuticamente aceitáveis podem incluir polímeros e matrizes poliméricas, nanopartículas, microbolhas, e similares.

Em adição ao fluido terapêutico enriquecido com gás da presente invenção, a composição terapêutica pode compreender ainda diluentes inertes, como água adicional não enriquecida com gás ou outros solventes, agentes solubilizantes e emulsionantes, tais como álcool etílico, álcool isopropílico, carbonato de etila, acetato de etila, álcool benzílico, benzoato de benzila, propilenoglicol, 1,3-butilenoglicol, dimetilformamida, óleos (especificamente, óleo de semente de algodão, amendoim, milho, germe, oliva, rícino e de gergelim), glicerol, álcool tetrahidrofurfurílico, polietilenoglicóis e ésteres de ácido graxo de sorbitano, e misturas destes. Como é apreciado por aqueles versados no estado da técnica, uma nova e melhor formulação de uma composição terapêutica em particular, um novo fluido terapêutico enriquecido com gás, e um novo método para liberar o novo fluido terapêutico enriquecido com gás podem ser obtidos substituindo-se um ou mais diluentes inertes por um fluido enriquecido com gás de composição idêntica, semelhante ou diferente. Por exemplo, água convencional pode ser substituída ou suplementada por um fluido enriquecido com gás, produzido pela mistura de oxigênio em água ou água deionizada para fornecer fluido enriquecido com gás.

Em certas modalidades, o fluido enriquecido com gás da invenção pode ser combinado com um ou mais agentes terapêuticos e/ou ser utilizado isoladamente. Em modalidades especiais, incorporar o fluido enriquecido com gás pode incluir substituir uma ou mais soluções conhecidas no estado da técnica, tal como água deionizada, solução salina e as semelhantes, por um ou mais fluidos enriquecidos com gás, sendo fornecida com isso uma composição terapêutica melhorada a ser liberada para o sujeito.

Certas modalidades provêem composições farmacêuticas compreendendo um fluido enriquecido com gás da presente invenção, uma composição farmacêutica ou outro agente terapêutico ou sal farmaceuticamente aceitável ou solvato deste e pelo menos um veículo ou diluente farmacêutico. Estas composições farmacêuticas podem ser utilizadas na profilaxia e no tratamento das doenças ou condições precedentes e em terapias como mencionadas acima. De preferência, o veículo deve ser farmaceuticamente aceitável e deve ser

compatível, ou seja, sem efeito nocivo sobre os outros ingredientes na composição. O veículo pode ser sólido ou líquido e é formulado, de preferência, em formulação de dose unitária, por exemplo, um comprimido que possa conter de 0,05 a 95% em peso do ingrediente ativo.

Vias possíveis de administração incluem oral, sublingual, bucal, parenteral (por exemplo, subcutânea, intramuscular, intra-arterial, intraperitoneal, intracisternal, intravesical, intratecal ou intravenosa), retal, tópica incluindo transdérmica, intravaginal, intraocular, intraóptica, inalação, e injeção ou inserção de dispositivos ou materiais implantáveis.

Vias de administração

O meio mais adequado de administração para um determinado sujeito dependerá da natureza e da gravidade da doença ou da condição sendo tratada, ou da natureza da terapia sendo utilizada, bem como da natureza da composição terapêutico ou do agente terapêutico adicional. Em certas modalidades, a administração oral ou tópica é preferida.

Formulações adequadas para administração oral podem ser supridas em unidades distintas, tais como comprimidos, cápsulas, sachês, xaropes, elixires, goma de mascar, formulações do tipo "pirulito", microemulsões, soluções, suspensões, losangos, ou ampolas revestidas com gel, cada uma contendo uma quantidade pré-determinada do composto ativo; em forma de pó ou grânulos; em forma de soluções ou suspensões em líquidos aquosos ou não ou em forma de emulsões óleo em água ou água em óleo.

Formulações adequadas para métodos transmucosais, como, por exemplo, administração sublingual ou bucal, incluem losangos adesivos, comprimidos e os semelhantes, compreendendo o composto ativo e tipicamente uma base com sabor, como, por exemplo, açúcar e acácia ou tragacanta, e pastilhas compreendendo o composto ativo em base inerte, tal como gelatina e glicerina ou acácia, sacarose.

Formulações adequadas para administração parenteral compreendem tipicamente soluções aquosas estéreis, contendo uma concentração pré-determinada do fluido ativo enriquecido com gás e possivelmente outro agente terapêutico; a solução é de preferência isotônica com o sangue do destinatário pretendido. Formulações adicionais adequadas para administração parenteral incluem formulações contendo co-solventes fisiologicamente adequados e/ou agentes formadores de complexo tais como surfactantes e ciclodextrinas. Emulsões óleo em água podem ser também adequadas para formulações destinadas à administração parenteral do fluido enriquecido com gás. Embora preferivelmente administradas por via intravenosa, estas soluções podem ser administradas também por injeção subcutânea ou intramuscular.

Formulações adequadas pra administração uretral, retal ou vaginal incluem géis, cremes, loções, suspensões aquosas ou oleosas, pós ou grânulos dispersíveis, emulsões, materiais sólidos dissolvíveis, duchas e os semelhantes. As formulações são providas de preferência em forma de supositórios de dose unitária, compreendendo o ingrediente ativo

em um ou mais veículos sólidos formando a base do supositório, por exemplo, manteiga de cacau. Alternativamente, soluções para lavagem colônica com os fluidos enriquecidos com gás da presente invenção podem ser formuladas para administração colônica ou retal.

Formulações adequadas para aplicação tópica, intraocular, intraóptica ou intranasal incluem pomadas, cremes, pastas, géis (tais como hidrogéis), *sprays*, pós e grânulos dispersíveis, emulsões, *sprays* ou aerossóis usando propelentes de fluxo (tais como *sprays* lipossomais, gotas nasais, *sprays* nasais e os semelhantes) e óleos. Veículos adequados para estas formulações incluem gelatina de petróleo, lanolina, polietilenoglicóis, alcoóis e combinações destes. A liberação nasal ou intranasal pode incluir inaladores dosimetrados de qualquer uma destas formulações ou outros. Da mesma forma, intraóptica ou intraocular pode incluir gotas, pomadas, soluções não irritantes e os semelhantes.

Formulações da invenção podem ser preparadas por qualquer método adequado, tipicamente por mistura uniforme e íntima do fluido enriquecido com gás, opcionalmente com um composto ativo com veículos líquidos ou sólidos finamente divididos ou ambos, nas proporções exigidas e, em seguida, se necessário, moldando a mistura resultante na forma desejada.

Por exemplo, um comprimido pode ser preparado por compressão de uma mistura uniforme compreendendo pó ou grânulos do ingrediente ativo e um ou mais ingredientes opcionais, tal como agregante, lubrificante, diluente inerte ou agente de dispersão de superfície ativa, ou moldando uma mistura uniforme de ingrediente ativo em pó e um fluido enriquecido com gás da presente invenção.

Formulações adequadas para administração por inalação incluem pós ou névoas de partículas finas, os quais podem ser gerados por meio de vários tipos de aerossóis pressurizados dosimetrados, nebulizadores ou insufladores. Em especial, pós ou outros compostos de agentes terapêuticos podem ser dissolvidos ou suspensos em um fluido enriquecido com gás da presente invenção.

Para administração pulmonar via a boca, o tamanho de partícula do pó ou gotículas é tipicamente no intervalo de 0,5 – 10 μM, de preferência, 1 – 5 μM, para assegurar a liberação na árvore brônquica. Para administração nasal, é preferido tamanho de partícula de 10 – 500 μM para assegurar a retenção na cavidade nasal.

Inaladores dosimetrados são dispensadores de aerossóis pressurizados, contendo tipicamente uma formulação em suspensão ou solução de um agente terapêutico em propelente liquefeito. Em certas modalidades, de acordo com este relatório descritivo, os fluidos enriquecidos com gás da presente invenção podem ser utilizados em acréscimo ou em vez de o propelente liquefeito padrão. Durante o uso, esses dispositivos descarregam a formulação através de uma válvula adaptada para liberar um volume dosimetrado, tipicamente 10 a 150 μL, para produzir um *spray* de partículas finas contendo o agente terapêutico e o fluido

enriquecido com gás. Propelentes adequados incluem certos compostos clorofluorcarbonetos, por exemplo, diclorodifluormetano, triclorofluormetano, diclorotetrafluoretano e misturas destes.

A formulação pode conter adicionalmente um ou mais co-solventes, por exemplo, surfactantes de etanol, como ácido oléico ou trioleato de sorbitano, antioxidantes e agentes adequados de sabor. Nebulizadores são dispositivos comercialmente disponíveis que transformam soluções ou suspensões do ingrediente ativo em nuvem aerossol terapêutica quer por meio de aceleração de um gás comprimido (tipicamente ar ou oxigênio), através de um orifício estreito por efeito venturi, ou por meio de agitação ultrassônica. Formulações adequadas para uso em nebulizadores consistem em outro agente terapêutico em um fluido enriquecido com gás e compreendendo até 40% p/p da formulação, de preferência, menos de 20% p/p. Adicionalmente, outros veículos podem ser utilizados, tais como água destilada, água estéril ou solução aquosa de álcool diluído, de preferência, tornado isotônico com líquidos corporais pela adição de sais, tais como cloreto de sódio. Aditivos opcionais incluem conservantes, especialmente se a formulação não for preparada estéril, e podem incluir metilhidroxibenzoato, antioxidantes, agentes de sabor, óleos voláteis, agentes de tamponamento e surfactantes.

Formulações adequadas para administração por insuflação incluem pós finamente divididos que podem ser liberados por meio de insuflador ou levados à cavidade nasal na maneira de aspiração. No insuflador, o pó está contido em cápsulas ou cartuchos, tipicamente feitos de gelatina ou plástico, os quais são entreabertos ou abertos *in situ*, e o pó é liberado por ar retirado através do dispositivo quando da inalação ou por meio de bomba operada manualmente. O pó empregado no insuflador consiste em exclusivamente o ingrediente ativo ou em mistura em pó compreendendo o ingrediente ativo, um diluente em pó adequado, tal como lactose, e um surfactante opcional. O ingrediente ativo compreende tipicamente de 0,1 a 100 p/p da formulação.

Além de os ingredientes especificamente citados acima, as formulações da presente invenção podem incluir outros agentes conhecidos daqueles versados no estado da técnica, levando em consideração o tipo de formulação em questão. Por exemplo, formulações adequadas para administração oral podem incluir agentes de sabor e formulações adequadas para administração intranasal podem incluir perfumes.

As composições terapêuticas da invenção podem ser administradas por qualquer modo disponível para uso em conjunto com fármacos farmacêuticos, quer na forma de agentes terapêuticos individuais ou na de agentes terapêuticos combinados.

A dose administrada variará, evidentemente, dependendo de fatores conhecidos, tais como características farmacodinâmicas do agente em particular e seu modo e via de administração; a idade, saúde e peso do receptor; a natureza e extensão dos sintomas; o

tipo de tratamento concomitante; a frequência de tratamento; e o efeito desejado. Uma dose diária de ingrediente ativo pode ser previstamente em torno de 0,001 a 1000 miligramas (mg) por quilograma (kg) de peso corporal, sendo a dose preferida de 0,1 a em torno de 30 mg/kg.

Formas de apresentação (composições adequadas para administração) contêm de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg de ingrediente ativo por unidade. Nestas composições farmacêuticas, o ingrediente ativo estará habitualmente presente em quantidade em torno de 0,5 – 95% em peso com base no peso total da composição.

Pomadas, pastas, espumas, oclusões, cremes e géis podem conter também excipientes, tais como amido, tragacanta, derivados de celulose, silicones, bentonitas, ácido de sílica e talco, ou misturas destes. Pós e *sprays* podem conter também excipientes como lactose, talco, ácido de sílica, hidróxido de alumínio e silicatos de cálcio, ou misturas destas substâncias. Soluções de metais nanocristalinos antimicrobianos podem ser convertidas em aerossóis ou *sprays* por qualquer um dos meios conhecidos rotineiramente utilizados para produzir produtos farmacêuticos em aerossol. Em geral, estes métodos compreendem pressurizar ou prover um meio para pressurização de um recipiente contendo a solução, geralmente com gás carreador inerte, e fazer com que o gás pressurizado atravesse um pequeno orifício. *Sprays* podem conter propelentes habituais, tais como nitrogênio, dióxido de carbono e outros gases inertes. Adicionalmente, microesferas ou nanopartículas podem ser empregadas com as composições terapêuticas enriquecidas com gás ou fluidos da presente invenção em qualquer uma das vias necessárias para administrar os compostos terapêuticos a um sujeito.

As formulações para uso injetável podem estar apresentadas em recipientes lacrados de dose unitária ou de doses múltiplas, tais como ampolas e frascos, e podem ser armazenadas em condição liofilizada, requerendo somente a adição do excipiente líquido estéril, ou fluido enriquecido com gás, imediatamente antes do uso. Soluções e suspensões injetáveis extemporâneas podem ser preparadas a partir de pós, grânulos ou comprimidos estéreis. Os requisitos para veículos farmacêuticos eficazes para composições injetáveis são bem conhecidos daqueles versados no estado da técnica. Consultar, por exemplo, *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J.B. Lippincott Co., Philadelphia, Pa., Banker and Chalmers, Eds., 238 - 250 (1982) e *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4th ed., 622 – 630 (1986).

Formulações adequadas para administração tópica incluem losangos compreendendo um fluido enriquecido com gás e, opcionalmente, um agente terapêutico adicional e de sabor, geralmente sacarose e acácia ou tragacanta; pastilhas compreendendo um fluido enriquecido com gás e agente terapêutico adicional opcional em base inerte, tal como gelatina e glicerina, ou sacarose e acácia; e enxaguatórios bucais ou soluções para lavagem oral

compreendendo um fluido enriquecido com gás e agente terapêutico adicional opcional em veículo líquido adequado; bem como cremes, emulsões, géis e os semelhantes.

Adicionalmente, formulações adequadas para administração retal podem estar apresentadas em forma de supositórios, misturando-se uma variedade de bases, tal como bases emulsionantes ou bases solúveis em água. Formulações adequadas para administração vaginal podem estar apresentadas em forma de pesários, tampões, cremes, géis, pastas, espumas ou fórmulas em *spray* contendo, além de o ingrediente ativo, aqueles veículos conhecidos no estado da técnica como adequados.

Veículos farmacêuticos adequados estão descritos em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, um texto de referência padrão neste campo.

A dose administrada a um sujeito, especialmente um animal, particularmente um ser humano, no contexto da presente invenção deve ser suficiente para ser obtida uma resposta terapêutica no animal sobre um cronograma razoável. Aquele versado no estado da técnica reconhecerá que a dose dependerá de uma variedade de fatores, incluindo a condição do animal, o peso corporal do animal, bem como da condição sendo tratada. Dose adequada é aquela que resultará em concentração da composição terapêutica em um sujeito, conhecida por obter a resposta desejada.

O tamanho da dose será determinado também pela via, tempo e frequência de administração, bem como a existência, natureza e extensão de quaisquer efeitos colaterais adversos que poderiam acompanhar a administração da composição terapêutica e o efeito fisiológico desejado.

Será apreciado que os compostos da combinação podem ser administrados; (1) simultaneamente por combinação dos compostos em uma co-formulação ou (2) alternadamente, ou seja, liberando os compostos em série, em sequência, em paralelo ou simultaneamente em formulações farmacêuticas separadas. Na terapia alternada, o atraso em administrar o segundo e, opcionalmente, o terceiro ingrediente ativo, não deve ser tal que provoque a perda do benefício de um efeito terapêutico sinergístico da combinação dos ingredientes ativos. De acordo com certas modalidades por qualquer método de administração (1) ou (2), idealmente a combinação deve ser administrada para se alcançar os resultados mais eficazes. Em certas modalidades por qualquer método de administração (1) ou (2), idealmente a combinação deve ser administrada para se alcançar concentrações plasmáticas máximas de cada um dos ingredientes ativos. Um regime de uma pílula uma vez ao dia, por administração de um co-formulação combinada, pode ser viável para alguns pacientes sofrendo de doenças inflamatórias neurodegenerativas. De acordo com certas modalidades, as concentrações plasmáticas máximas eficazes dos ingredientes ativos da combinação variarão no intervalo de aproximadamente 0,001 a 100 μM. Concentrações plasmáticas máximas ideais podem ser alcançadas por uma formulação e regime de administração prescri-

tos para um determinado paciente. Será também entendido que os fluidos da invenção e um esteroide glicocorticóide (por exemplo, Budesonida) ou os derivados fisiologicamente funcionais de qualquer um destes, quer apresentados simultaneamente ou em sequência, podem ser administrados individualmente, em múltiplos ou em qualquer combinação destes. Em geral, durante terapia alternada (2), uma dose eficaz de cada composto é administrada em série, em que a terapia de co-formulação (1), doses eficazes de dois ou mais compostos são administradas juntas.

As combinações da invenção podem ser convenientemente apresentadas em formulação farmacêutica em forma de dose unitária. Uma formulação conveniente de dose unitária contém ingredientes ativos em qualquer quantidade de 1 mg a 1 g cada, por exemplo, entre outros, 10 mg a 300 mg. Os efeitos sinergísticos do fluido da invenção em combinação com, por exemplo, um esteroide glicocorticoide (por exemplo, Budesonida), podem ser obtidos sobre uma ampla gama de proporções, por exemplo, 1:50 a 50:1 (fluido da invenção ; esteroide glicocorticoide (por exemplo, Budesonida)). Em uma modalidade, a proporção pode variar em torno de 1:10 a 10:1. Em outra modalidade, a proporção peso/peso do fluido da invenção para um esteroide glicocorticoide (por exemplo, Budesonida), em forma de administração de combinação co-formulada, tal como pílula, comprimido, *caplet* ou cápsula, será em torno de 1, ou seja, uma quantidade aproximadamente igual de fluido da invenção e de esteroide glicocorticoide (por exemplo, Budesonida). Em outras co-formulações exemplares, pode haver mais ou menos fluido da invenção e esteroide glicocorticoide (por exemplo, Budesonida). Em uma modalidade, cada composto será empregado na combinação em quantidade na qual exibe atividade anti-inflamatória quando utilizado isoladamente. Outras proporções e quantidades dos compostos das referidas combinações são cogitadas dentro do escopo da invenção.

Uma forma de dose unitária pode compreender ainda fluido da invenção e, por exemplo, um esteroide glicocorticoide (por exemplo, Budesonida), ou derivados fisiologicamente funcionais de qualquer um destes, além de um veículo farmaceuticamente ativo.

Será apreciado por aqueles versados no estado da técnica que a quantidade de ingredientes ativos nas combinações da invenção, necessária para uso em tratamento, variará de acordo com uma variedade de fatores, incluindo a natureza da condição sendo tratada e a idade e a condição do paciente, e será, no final, a critério do médico responsável ou profissional de saúde. Os fatores a serem considerados incluem a via de administração e a natureza da formulação, o peso corporal, idade e condição geral do animal e a natureza e a gravidade da doença a ser tratada.

É possível também combinar quaisquer dois ingredientes ativos em forma de dose unitária para administração simultânea ou em sequência com um terceiro ingrediente ativo. A combinação tríplice pode ser administrada simultaneamente ou em sequência. Quando

administrada em sequência, a combinação pode ser efetuada em duas ou três administrações. De acordo com certas modalidades, a combinação tríplice de fluido da invenção e um esteroide glicocorticoide (por exemplo, Budesonida) pode ser administrada em qualquer ordem.

De acordo com modalidades especiais, os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção são consideravelmente úteis para tratar as condições mediadas por TSLP e/ou TSLPR, incluindo, entre outras, o gênero exemplar de indicações descritas neste relatório. De acordo com modalidades especiais, os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção são úteis para tratar vários subgêneros do gênero exemplar, em que pelo menos uma indicação do gênero é excluída de cada um dos referidos subgêneros.

EXEMPLO 1

(Efeitos sinergísticos de fluidos eletrocineticamente alterados da invenção e Albutrol foram demonstrados)

Visão geral. Os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção proporcionaram efeitos sinergísticos prolongados (por exemplo, supressão de broncoconstrição) com Albuterol *in vivo* em um modelo de animal reconhecido no estado da técnica de broncoconstrição humana (modelo de asma humana) e, dessa forma, possibilita diminuir o uso de albuterol em um paciente. Os resultados descritos neste Exemplo estão descritos também no documento WO 2009/055729 dos Requerentes.

Primeiro experimento. Em um primeiro experimento, dezesseis cobaias foram avaliadas quanto aos efeitos de broncodilatadores sobre função das vias aéreas em conjunto com broncoconstrição induzida por metacolina. Após determinação da dose ideal, cada animal foi administrado com uma dose de 50 µg/mL para liberar a dose-alvo de 12,5 µg de sulfato de albuterol em 250 µL por animal. O estudo teve o desenho de blocos randomizados por peso e valores basais de PenH. Dois grupos (A e B) receberam instilação intratraqueal de 250 µL de 50 µg/ml de sulfato de albuterol em um ou dois diluentes: Grupo A: água deionizada foi passada através do dispositivo da invenção, sem a adição de oxigênio, enquanto no Grupo B, foi água enriquecida com gás da invenção. Cada grupo foi administrado com doses de soluções por via intratecal usando micropulverizador *Microsprayer* da Pen Century. Adicionalmente, os animais foram estratificados em unidades do pletismógrafo BUXCO, de modo que cada grupo de tratamento está representado igualmente nos nebulizadores alimentando os pletismógrafos e as unidades de registro. Animais que exibiram pelo menos 75% de seu valor basal de PenH em 2 horas após administração de albuterol não foram incluídos nas análises de dados. Esse critério de exclusão está fundamentado em estudos passados, em que a falha em observar broncoproteção com brondilatadores pode ser associada com erros na dose. Como resultado, um animal do grupo de controle foi descartado das análises de dados. Assim que um animal obtinha mais de 50% de broncoconstrição, o

animal era considerado não protegido. Os resultados indicam que 50% dos animais do Grupo B foram protegidos de broncoconstrição por até 10 horas (em cujo momento, o teste foi finalizado).

Segundo experimento. Um conjunto adicional de experimentos foi conduzido usando um número maior de animais para avaliar os efeitos protetores dos fluidos gerados eletrocineticamente da invenção (por exemplo, RDC1676-00, RDC1676-01, RDC1676-02 e RDC1676-03) contra broncoconstrição induzida por metacolina, quando administrados isoladamente ou como diluentes para sulfato de albuterol em machos de cobaias.

Materiais e métodos. Cobaias (*Cavia porcellus*) foram Hartley albino, Crl:(HA)BR, provenientes de Charles River Canada Inc. (St. Constant, Quebec, Canadá). Peso: Aproximadamente 325 ± 50 g no início do tratamento; número de grupos: 32 com 7 machos por grupo (mais 24 sobressalentes formam o mesmo lote de animais). Dieta: todos os animais tinham acesso livre a uma dieta comercial de laboratório em grânulos, com certificado padrão (PMI Certified Guinea Pig 5026; PMI Nutrition International Inc.), exceto durante procedimentos designados. A via de administração foi instilação intratraqueal com *Microsprayer* da Penn Century e o desafio com metacolina via inalação de corpo inteiro. A via intratraqueal foi selecionada para maximizar a exposição pulmonar ao item em teste/solução de controle. O desafio por inalação de corpo inteiro foi selecionado para desafio com metacolina a fim de provocar uma resposta de hipersensibilidade das vias aéreas superiores (ou seja, broncodonstrição). A duração do tratamento foi de um dia.

Desenho experimental. Todos os animais foram submetidos à exposição por inalação de metacolina (500 µg/mL), 2 horas após administração de TA/Controle. Todos os animais receberam volume de dose de 250 µL. Por conseguinte, sulfato de albuterol foi diluído (no item de controle e nos 4 itens em teste) para concentrações de 0, 25, 50 e 100 µg/mL. Trinta minutos após a administração, soluções de sulfato de albuterol de 4 diferentes concentrações (0. 25, 50 e 100 µg/mL) foram formadas em estoque de 1 Ox (500 µg/mL) em cada uma destas quatro soluções do item em teste (RDC1676-00, RDC1676-01, RDC1676-02 e RDC1676-03). Estas concentrações de sulfato de albuterol foram também feitas em fluido de controle não gerado eletrocineticamente (controle 1). As soluções com doses foram preparadas pela diluição apropriada de cada solução estoque. Todas as soluções, estoque e com doses, foram mantidas em gelo, uma vez preparadas. A administração foi concluída no período de uma hora após os itens em teste/controle terem sido feitos. Uma solução de metacolina (500 µg/mL) foi preparada no dia de administração da dose.

Cada animal recebeu uma instilação intratraqueal do item em teste ou de controle, usando micropulverizador da Penn Century. Os animais foram privados de alimentos durante a noite e anestesiados com isoflurano, a laringe foi visualizada com o auxílio de laringoscópio (ou alternativa adequada) e a ponta do micropulverizador foi inserida na traqueia. Foi

administrada uma dose com volume de 250 µL/animal de item em teste ou de controle. O aerossol de metacolina foi gerado na saída de ar de uma câmara de mistura, usando nebulizadores ultrassônicos aeroneb, supridos com ar proveniente de uma bomba de ar constante (*bias flow*) Buxco. Esta câmara de mistura, por sua vez, alimentava quatro pletismógrafos não vedados de corpo inteiro, cada qual operado sob leve pressão negativa mantida por meio de uma válvula reguladora situada no encanamento de escape. Uma bomba de vácuo foi utilizada para exaustão da câmara de inalação na vazão exigida.

Antes que a principal fase do estudo fosse iniciada, 12 animais sobressalentes foram designados para 3 grupos (n = 4/grupo) para determinar o período de exposição máxima no qual animais podem ser expostos à metacolina para induzir broncoconstrição aguda grave, porém não fatal. Quatro animais foram expostos à metacolina (500 ?g/mL) por 30 segundos, e parâmetros respiratórios foram medidos por até 10 minutos após o início do aerossol. A concentração de metacolina no nebulizador e/ou tempo de exposição à aerossolização foram devidamente ajustados para induzir broncoconstriuição aguda/reversível grave, porém não fatal, caracterizada por aumento transitório em penes.

Uma vez antes da administração do item em teste (Dia -1) e novamente em 2, 6, 10, 14, 18, 22 e 26 horas pós-dose, os animais foram colocados na câmara, e parâmetros ventilatórios (volume corrente, frequência respiratória, derivada de volume minuto) e a pausa aumentada (*enhanced pause*) Penh foram medidos por um período de 10 minutos, usando o sistema XA da Buxco Electronics BioSystem, seguido pelo início do desafio aerossol à metacolina. Uma vez os animais dentro das câmaras, valores basais foram registrados para 1 minuto, após o qual, metacolina, em concentração no nebulizador de 500 µg/mL, foi aerossolizada por 30 segundos, e os animais foram expostos ao aerossol por mais 10 minutos, durante os quais, parâmetros ventilatórios foram continuamente avaliados. Penh foi utilizado como o indicador de broncoconstrição; Penh é um valor derivado obtido a partir do fluxo inspiratório máximo, fluxo expiratório máximo e tempo de expiração. Penh = (Fluxo expiratório máximo/Fluxo inspiratório máximo) * (Tempo de expiração/tempo para expirar 65% do volume expiratório - 1).

Animais que não exibiam broncoconstrição aguda grave durante o desafio pré-dose com metacolina foram substituídos. Qualquer animal que exibisse pelo menos 75% de seu valor basal de PenhPenes em 2 horas após a dose não foram incluídos na análise de dados. Os parâmetros respiratórios foram registrados em médias de 20 segundos. Dados considerados não fisiológicos foram excluídos de análise posterior. Alterações em Penh foram inseridas em um traçado sobre um período de 15 minutos, e o valor de Penh expresso em área sob a curva. Dados numéricos foram submetidos a calculo de valores médios e desvios padrão do grupo (conforme aplicável).

Resultados. Os resultados deste experimento revelaram que na ausência de Albu-

terol, a administração de fluidos gerados eletrocineticamente da invenção não exerceu efeito aparente sobre os valores percentuais médios basais de PenH, quando medidos sobre um período de 24 horas. Surpreendentemente, no entanto, a administração de albuterol (dados representativos para os grupos de 25 µg de albuterol/animal são mostrados) formulado nos fluidos gerados eletrocineticamente da invenção (em todos valores de nível de oxigênio testados; ambiente, 20 ppm, 40 ppm e 60 ppm) resultou em prolongamento acentuado de efeitos broncoconstritores de albuterol, comparado ao fluido de controle. Ou seja, os resultados de metacolina revelaram prolongamento da broncodilatação de albuterol até pelo menos 26 horas. Os Requerentes mostraram também que houve diferenças constantes em todos os níveis de oxigênio entre RDC1676 e o controle de solução salina normal. Combinando todos os 4 fluidos RDC1676, o valor p para a diferença global de tratamento em comparação à solução salina foi de 0,03.

De acordo com modalidades especiais, as soluções geradas eletrocineticamente da invenção proporcionam efeitos sinergísticos de prolongamento com Albuterol, permitindo, dessa forma, diminuir o uso de albuterol em um paciente, possibilitando uso mais compensador e eficiente do fármaco, a ocorrência de menor número de efeitos colaterais e aumentando o período sobre o qual um paciente pode ser tratado e responder ao tratamento com albuterol.

EXEMPLO 2

(Efeitos de fluidos eletrocineticamente alterados da invenção sobre expressão de citocinas foram determinados)

Visão geral. Os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção diminuíram a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1?, TNF-a, IL-6 e GM-CSF), quimiocinas (IL-8, MIP-1a, RANTES e eotaxina), enzimas inflamatórias (iNOS, COX-2 e MMP-9), respostas a alérgenos (MHC Classe II, CD23, B7-1 e B7-2) e citocinas Th2 (IL-4, IL-13 e IL-5), quando comparados ao fluido de controle. Os resultados descritos neste Exemplo estão descritos também no documento WO 2009/055729 dos Requerentes.

Em modalidades especiais, linfócitos mistos humanos foram estimulados com antígeno T3 ou PHA em fluido Revalesio enriquecido com oxigênio, ou fluido de controle, e alterações em IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p40), IL-13, IL-17, Eotaxina, IFN-γ, GM-CSF, MIP-1β, MCP-1, G-CSF, FGFb, VEGF, TNF-a, RANTES, Leptina, TNF-β, TFG-β e NFG foram avaliadas. Como mostrado, citocinas pró-inflamatórias (IL-1?, TNF-a, IL-6 e GM-CSF), quimiocinas (IL-8, MIP-1a, RANTES e Eotaxina), enzimas inflamatórias (iNOS, COX-2 e MMP-9), respostas a alérgenos (MHC Classe II, CD23, B7-1 e B7-2) e citocinas Th2 (IL-4, IL-13 e IL-5) testadas foram reduzidas no fluido em teste em comparação ao de controle. Por outro lado, citocinas anti-inflamatórias (por exemplo, IL1R-a, TIMPs) testadas foram aumentadas no fluido em teste em comparação ao de controle.

Adicionalmente, os Requerentes fizeram uso de um sistema de modelo reconhecido no estado da técnica, envolvendo sensibilização com ovalbumina, para avaliar reações alérgicas de hipersensibilidade. Os desfechos estudados foram componentes citológicos e celulares específicos da reação, bem como medições sorológicas de proteína e LDH. Foi realizada análise de citocinas, incluindo análise de Eotaxina, IL-1A, IL-1b, KC, MCP-1, MCP-3, MIP-1A, RANTES e VCAM.

Resumidamente, machos de ratos marrons da Noruega foram injetados por via intraperitoneal com 0,5 mL de Ovalbumina (OVA) Grau V (A5503-1G, Sigma) em solução (2,0 mg/mL) contendo hidróxido de alumínio ($Al(OH)_3$) (200 mg/mL), uma vez cada nos Dias 1, 2 e 3. O estudo adotou arranjo fatorial 2 x 2 randomizado de tratamentos (4 grupos). Após um período de espera de duas semanas para permitir que reação imune ocorresse, os ratos foram expostos ou tratados por uma semana com RDC1676-00 (solução salina estéril processada através do dispositivo Revalesio de propriedade exclusiva) e RDC1676-01 (solução salina estéril processada através do dispositivo Revalesio de propriedade exclusiva com oxigênio extra adicionado); ao final da 1ª semana de tratamento uma vez ao dia, os 2 grupos foram divididos na metade e 50% dos ratos em cada grupo foram submetidos a desafio com Solução Salina ou OVA por inalação.

Especificamente, quatorze dias após a serialização inicial, 12 ratos foram expostos a RDC 1676-00 por inalação por 30 minutos, todo dia por 7 dias consecutivos. A vazão de ar através do sistema foi definida em 10 litros/minuto. No total, 12 ratos foram alinhados na câmara setorial, com uma única porta para a entrada de material nebulizado e uniformemente distribuídos às 12 subcâmaras do Aeroneb.

Quinze dias depois da sensibilização inicial, 12 ratos foram expostos a RDC 1676-01 por nebulização ultrassônica por 30 minutos todo dia por 7 dias consecutivos. O fluxo de ar foi definido também para 10 litros/minuto, usando o mesmo nebulizador e câmara. O RDC 1676-00 foi nebulizado primeiramente, e a câmara Aeroneb foi cuidadosamente seca antes que RDC 1676-01 fosse nebulizado.

Aproximadamente 2 horas após o último tratamento de nebulização, 6 ratos do grupo de RDC 1676-00 foram novamente submetidos ao desafio com OVA (1% em solução salina), liberada por instilação intratraqueal usando *Microsprayer* da Penn Century (Modelo 1A-1B). Os outros 6 ratos do grupo de RDC 1676-00 foram desafiados com solução salina como o grupo de controle, liberada por instilação intratraqueal. No dia seguinte, o procedimento foi repetido com o grupo de 1676-01.

Vinte e quatro horas após o novo desafio, todos os ratos em cada grupo foram sacrificados por superdosagem com pentobarbital sódico. Amostras de sangue total foram coletadas da veia cava inferior e colocadas em dois tubos diferentes para coleta de sangue: Tubo Qiagen PAXgene™ Blood RNA e Tubo Qiagen PAXgene™ Blood DNA. Os órgãos

pulmonares foram processados para se obter o líquido de lavado broncoalveolar (BAL) e tecido pulmonar para RT-PCR para se avaliar alterações em marcadores de expressão de citocinas conhecidas por serem associadas com inflamação pulmonar neste modelo. Uma técnica para lavado unilateral foi empregada para preservar a integridade dos 4 lobos no lado direito do pulmão. O "grande" lobo esquerdo foi lavado, enquanto os 4 lobos direitos foram amarrados e retirados e imediatamente colocados em TRI-zol™, homogeneizados e enviados para o laboratório para processamento posterior.

Análise de BAL. O lavado pulmonar foi coletado e centrifugado por 10 minutos a 4 °C e 600 – 800 g para se obter grânulos celulares. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e congelados a -80 °C. O líquido do lavado brônquico ("BAL") foi separado em duas alíquotas. A primeira alíquota foi precipitada por rotação, e o sobrenadante foi imediatamente congelado sobre gelo seco triturado, colocado em – 80 °C e enviado para o laboratório para processamento adicional. A quantidade de proteína e de LDH presente indica o nível de proteína sérica do sangue (a proteína é um componente sérico que vaza pelas membranas quando é provocada como neste experimento) e morte celular, respectivamente. O lado testado revelou ligeiramente menos proteínas do que o controle.

A segunda alíquota do líquido de lavado brônquico foi avaliada quanto à proteína total e teor de LDH, bem como submetida a exame citológico. O grupo tratado revelou a presença de número maior de células totais em comparação ao grupo de controle com solução salina. Adicionalmente, apresentam aumento em eosinófilos no grupo tratado, comparado ao controle. As células polimorfonucleares foram também ligeiramente diferentes para o lado tratado comparado ao de controle.

Análise de sangue. Sangue total foi analisado, transferindo-se 1,2 – 2,0 mL de sangue para um tubo e permitindo a sua coagulação por pelo menos 30 minutos. O resto da amostra de sangue (aproximadamente 3,5 – 5,0 mL) foi reservado para extração de RNA usando Tri-zol™ ou PAXgene™. Em seguida, a amostra com sangue coagulado foi centrifugada por 10 minutos a 1200 g em temperatura ambiente. O soro (sobrenadante) foi removido e colocado em dois novos tubos, e armazenado a -80 °C.

Para extração de RNA utilizando Tri-Reagent (TB-126, Molecular Research Center, Inc.), 0,2 mL de sangue total ou plasma foram adicionados a 0,75 mL de TRI Reagent BD, suplementado com 20 µL de ácido acético 5 N por 0,2 mL de sangue total ou plasma. Os tubos foram agitados e armazenados a -80 °C. Utilizando PAXgene™, os tubos foram incubados por aproximadamente duas horas em temperatura ambiente. Foram, em seguida, colocados em posição lateral e armazenados no congelador a -20 °C por 24 horas e, então, transferidos para -80 °C para armazenamento prolongado.

Análise Luminex. Com a plataforma Luminex, uma análise de microesferas foi utilizada como substrato para reação de ligação a anticorpo relacionado, a qual é lida em uni-

dades de luminosidade e pode ser comparada com padrões quantificados. Cada amostra de sangue foi testada em 2 amostras simultaneamente. As unidades de mensuração são unidades de luminosidade, e os grupos são divididos em controles desafiados com OVA, tratamento desafiado com Ova e tratamento desafiado com solução salina com fluido proprietário.

Para geração de dados de arranjo gênico Agilant, tecido pulmonar foi isolado e submerso em TRI Reagent (TR118, Molecular Research Center, Inc.). Resumidamente, em torno de 1 mL de TRI Reagent foi adicionado a 50 – 100 mg de tecido em cada tubo. As amostras foram homogeneizadas em TRI Reagent, usando homogeneizador de vidro Teflon™ ou Polytron™. As amostras foram armazenadas a 80 °C.

Resultados de amostras de sangue. Cada amostra de sangue foi dividida em 2 amostras que foram testadas simultaneamente. As unidades de medida são unidades de luminosidade, e os grupos da esquerda para a direita são: controles desafiados com OVA, tratamento com Revalesio desafiado com OVA; seguidos por tratamento com solução salina desafiado com solução salina, ambos os grupos de RDC1676-01 estão destacados com telas de fundo sombreadas em cinza, enquanto que nos grupos de tratamento com solução salina de controle, as telas de fundo não são sombreadas.

Geralmente, ao serem comparados os dois grupos à esquerda, embora a distribuição de dados do grupo RDC1676-01 seja um pouco maior, níveis de citocinas específicas no grupo de RDC1676-01, como um todo, são menores do que os das amostras no grupo tratado de controle. Em geral, ao serem comparados os dois grupos à direita, o grupo de RDC1676-01 apresenta valor numérico ligeiramente mais alto do que o grupo de RDC1676-00.

Os Requerentes determinaram que o nível de RANTES (superfamília de IL-8), produzido após tratamento com os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção, foi menor do que aquele produzido pelos grupos expostos somente à solução salina. Os Requerentes determinaram que os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção fizeram com que MCP-1 fosse produzida em níveis mais baixos quando comparados com aqueles produzidos pelos grupos expostos somente à solução salina. Os Requerentes determinaram que o nível de TNF alfa produzido após tratamento com os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção foi menos do que aquele produzido pelos grupos expostos somente à solução salina.

Além disso, os Requerentes demonstraram que o nível de MIP-1 alfa produzido após tratamento com os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção foi menos do que aquele produzido pelos grupos expostos somente à solução salina. Os Requerentes demonstraram que os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção fizeram com que IL-1 fosse produzida em níveis mais baixos quando comparados àqueles produzidos pelos gru-

pos expostos somente à solução salina. Os Requerentes observaram que o nível de Vcam produzido após tratamento com os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção era menor do que aquele produzido pelos grupos expostos somente à solução salina. Os Requerentes demonstraram que os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção fizeram com que Eotaxina e MCP-3 fossem produzidas em níveis mais baixos quando comparados àqueles produzidos pelos grupos expostos somente à solução salina.

Em suma, este ensaio padrão de reação inflamatória a uma sensibilização conhecida produziu, pelo menos nas amostras de sangue, um efeito clínico e sorológico acentuado. Adicionalmente, enquanto números significativos de animais de controle ficaram fisiologicamente estressados e quase morreram no processo, nenhum grupo tratado com RDC176-01 exibiu tais efeitos de estresse clínico. Isso foi refletido, então, nos níveis circulantes de citocinas, com aproximadamente diferenças de 30% entre o grupo tratado com RDC1767-01 e os grupos tratados com RDC1767-01 nos grupos desafiados com OVA. Por outro lado, houve pequenas e quase insignificantes alterações em perfis celulares e sorológicos de citocinas entre o grupo tratado com RDC1767-01 e os grupos tratados com RDC1767-01 nos grupos não desafiados com OVA, o que possivelmente representa apenas alterações basais mínimas do próprio fluido.

EXEMPLO 3

(Efeitos dos fluidos eletrocineticamente alterados da invenção para modular proliferação de células T foram determinados)

Visão geral. Os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção melhoraram a função reguladora de células T. Os resultados descritos neste Exemplo estão descritos também no documento WO 2009/055729 dos Requerentes.

A capacidade de modalidades específicas descritas neste relatório para regular células T foi estudada irradiando-se células apresentadoras de antígeno, e introduzindo antígeno e células T. Tipicamente, estas células T estimuladas se proliferam. No entanto, quando da introdução de células T reguladoras, a proliferação habitual de células T é suprimida.

Métodos. Resumidamente, anticorpo anti-CD25 (ACT-1) conjugado com FITC, utilizado em seleção, foi adquirido da DakoCytomation (Chicago, IL). Os outros anticorpos utilizados foram os seguintes: anticorpos contra CD3 (HIT3a para condições solúveis), GITR (conjugado com PE), CD4 (conjugado com Cy-5 e FITC), CD25 (conjugado com APC), CD28 (clone CD28.2), CD127-APC, Granzima A (conjugado com PE), FoxP3 (BioLegend), IgG1 de camundongo (controle de isotipo) e XCl1. Todos os anticorpos foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante.

Células T CD4+ foram isoladas a partir de sangue total periférico com Kit CD4+ Rosette (Stemcell Technologies). As células T CD4+ foram incubadas com os anticorpos anti-CD127-APC, anti-CD25-PE e anti-CD4-FITC. As células foram classificadas por citofluxome-

tria, usando FACS Aria em células T respondedoras CD4+CD25hiCD127lo/nTreg e CD4+CD25-.

Ensaios de supressão foram realizados em placas de microtitulação com 96 cavidades de fundo redondo. 3,75 x 103 células T respondedoras CD4+CD25neg, 3,75 x 103 células T reg. autólogas, 3,75 x 104 PBMC alogênica irradiada CD3-depletada foram adicionadas como indicado. Todas as cavidades foram suplementadas com anti-CD3 (clone HIT3a em 5 ?g/mL). Células T foram cultivadas por 7 dias a 37 °C em meio RPMI 1640, suplementado com soro bovino fetal 10%. Dezesseis horas antes do final da incubação, 1,0 mCi de ^{3}H-timidina foi adicionado a cada cavidade. As placas foram colhidas usando ceifeira de células Tomtec, e a incorporação de ^{3}H-timidina determinada com contador de cintilação da Perkin Elmer. Células apresentadoras de antígeno (APC) consistiam em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) cujas células T haviam sido depletadas com célula T CD3+ humana StemSep (StemCell Technologies), seguido por 40 Gy de irradiação.

Células T reguladoras foram estimuladas sob condições com anti-CD3 e anti-CD28 e, em seguida, coradas com corante de viabilidade Live/Dead Red (Invitrogen), e marcadores de superfície CD4, CD28 e CD127 marcadores de superfície. As células foram fixadas no tampão Lyse/Fix PhosFlow™ e permeabilizadas em Permbuffer III® desnaturante. As células foram então coradas com anticorpos contra cada molécula especificamente selecionada.

Foi realizada análise estatística com o *software* GraphPad Prism. Comparações entre dois grupos foram feitas com o teste T bilateral não pareado de Student. Comparações entre três grupos foram feitas com ANOVA análise de variância de um fator único. Valores P inferiores a 0,05 foram considerados significantes (bilaterais). A correlação entre dois grupos foi determinada estatisticamente significativa pelo coeficiente de Spearman se o valor r fosse maior do que 0,7 ou menor do que -0,7 (bilateral).

Resultados. A proliferação de células T reguladoras foi estudada estimulando-se células com material reticulado resultante da queima de diesel (PM, da EPA). Os Requerentes determinaram que as células estimuladas com PM (sem Rev, sem Solas) resultando em diminuição em IL-10 secretado, enquanto células expostas a PM na presença dos fluidos da presente invenção ("PM + Rev") resultaram em produção mantida ou ligeiramente diminuída de IL-10 em relação aos controles de Solução Salina e Meios (sem PM). Além disso, toxina diftérica (DT390, molécula truncada de toxina diftérica; 1:50 diluição de concentração comercial padrão) foi titulada em amostras de fluidos da invenção e bloqueou o efeito mediado por REV de aumento em IL-10. Observar que o tratamento apenas com Rev resultou em níveis mais altos de IL-10 em relação aos controles de Solução Salina e Meios. Resultados semelhantes foram obtidos com GITR, Granzima A, XCL1, pStat5 e Foxp3, respectivamente.

Os Requerentes obtiveram também dados sobre PBMC de AA, obtidos de um perfil de asma alérgica (AA) de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) avaliando triptase. Os dados de PBMC de AA foram compatíveis com os dados acima sobre células T reguladoras, uma vez que células estimuladas com matéria particulada (PM) exibiram altos níveis de triptase, enquanto células tratadas com PM na presença dos fluidos da presente invenção ("PM + Rev") resultaram em níveis significativamente mais baixos de triptase, semelhantes àqueles dos controles de Solução Salina e Meios. Em acordo com os dados de células T reguladoras, a exposição a DT390 bloqueou o efeito mediado por Rev sobre níveis de triptase, resultando em nível elevado de triptase nas células, como foi visto para apenas PM (menos Rev, sem Rev, sem Solas). O tratamento com apenas Rev resultou em níveis mais baixos de triptase em relação aos controles de Solução Salina e Meios.

Em suma, os Requerentes observaram menor proliferação na presença de PM e Rev, relativamente a PM em fluido de controle (sem Rev, sem Solas), indicando que o fluido eletrocineticamente gerado da invenção Rev, melhorou a função de células T reguladoras, como mostrado pela proliferação relativamente diminuída no ensaio. Ademais, a evidência indica que o bloqueio beta, bloqueio de GPCR e bloqueio do canal de cálcio afeta a atividade de Rev sobre a função T reguladora.

EXEMPLO 4

(Efeitos sinergísticos entre os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção e Budesonida foram determinados)

Visão geral. Os fluidos eletrocineticamente alterados da invenção possibilitaram a existência de efeitos sinergísticos anti-inflamatórios com Budesonida *in vivo* em um modelo de animal reconhecido no estado da técnica de asma alérgica. Os resultados descritos neste Exemplo estão descritos também no documento WO 2009/055729.

Os Requerentes realizaram inicialmente experimentos para avaliar as propriedades anti-inflamatórias nas vias aéreas dos fluidos eletrocineticamente gerados da invenção (por exemplo, RDC1676-03) em modelo de sensibilização com ovalbumina de rato marrom da Noruega. O rato marrom da Noruega é um modelo reconhecido no estado da técnica para determinar os efeitos de um material em teste sobre função das vias aéreas, e essa linhagem tem sido amplamente utilizada, por exemplo, como modelo de asma alérgica. A patologia das vias aéreas e as alterações bioquímicas induzidas por sensibilização com ovalbumina neste modelo assemelham-se com aquelas observadas no homem (Elwood *et al.*, *J. Allergy Clin Immuno* 88:951-60, 1991); Sirois & Bissonnette, *Clin Exp Immunol* 126:9-15, 2001). A via inalada foi selecionada para maximizar a exposição pulmonar ao material em teste ou a solução de controle. Os animais sensibilizados com ovalbumina foram tratados com budesonida somente ou combinada com o material em teste RDC 1676-03 por 7 dias, antes do desafio com ovalbumina, 6 e 24 horas após o desafio, e contagem de sangue total

e níveis de várias citocinas pró e anti-inflamatórias, bem como vários parâmetros respiratórios foram medidos para estimar qualquer efeito benéfico de se administrar o material em teste sobre vários parâmetros inflamatórios.

Materiais e métodos:

Ratos marrons da Noruega da linhagem Bn/Crl foram obtidos da Charles River Kingston, pesando aproximadamente 257 ± 50 g no início do experimento. Todos os estudos com animais foram conduzidos com a aprovação do comitê *PCS-MTL Institutional Animal Care and Use Committee*. Durante o estudo, o uso e os cuidados com animais foram conduzidos de acordo com as diretrizes do *National Research Council* dos Estados Unidos, bem como do *Council of Animal Care* do Canadá.

Sensibilização. No Dia 1 do experimento, animais (14 animais em cada grupo de tratamento) foram sensibilizados por administração de 1 mL de injeção intraperitoneal de uma solução recentemente preparada de 2 mg de ovalbumina/100 mg de hidróxido de alumínio por 1 mL de cloreto de sódio 0,9%, sendo a injeção repetida no Dia 3.

Tratamento. Quinze dias após a sensibilização inicial, os animais foram submetidos à exposição nebulizada a soluções de controle (solução salina normal) e de teste (fluidos eletrocineticamente gerados, RDC1676-00, RDC1676-02 e RDC-1676-03), administradas isoladamente ou combinadas com Budesonida, uma vez ao dia por 15 minutos por 7 dias consecutivos. Os animais receberam as doses em câmara de corpo inteiro de aproximadamente 20 Litros, e atmosfera de teste foi gerada na entrada de ar da câmara, usando nebulizadores ultrassônicos aeroneb, supridos com ar por uma bomba de fluxo constante Buxco. A vazão de ar foi definida em 10 litros/min.

Desafio com ovalbumina. No Dia 21, 2 horas após tratamento com soluções em teste, todos os animais foram desafiados com solução nebulizada de ovalbumina 1% por 15 minutos (em câmara de corpo inteiro em vazão de ar de 2 L/min).

Coleta de amostras. Nos momentos de 6 e 24 horas após o desafio com ovalbumina, amostras de sangue foram coletadas para contagens, total e diferencial, de células do sangue, bem como para medir níveis de várias citocinas pró e anti-inflamatórias. Adicionalmente, imediatamente após e depois de 6 e 24 horas do desafio com ovalbumina, a pausa aumentada Penh e volume corrente foram medidos por um período de 10 minutos usando o sistema XA da Buxco Electronics System.

Resultados:

Contagem de eosinófilos: Como previsto, o tratamento com Budesonida ("NS + Budesonida 750 µg/Kg"; gráfico de barras densamente cruzado) reduziu a contagem de eosinófilos totais nos animais desafiados em relação ao tratamento apenas com a solução salina normal "NS" de controle. Adicionalmente, embora o tratamento com o fluido da invenção "RDC1676-03" apenas não tenha reduzido significativamente a contagem de eosinófilos,

este exibiu, não obstante, sinergia considerável com Budesonida em reduzir a contagem de eosinófilos ("RDC1673-03 + Budesonida 750 µg/Kg"). Igualmente, o % de eosinófilos também refletiu a mesma tendência. Embora RDC1676-03 ou Budesonida, isoladamente, não tenham exercido efeito significativo sobre a contagem % de eosinófilos nos animais desafiados, os dois em combinação reduziram o % de eosinófilos significativamente.

Portanto, os Requerentes determinaram, de acordo com modalidades especiais, que os fluidos eletrocineticamente gerados da invenção (por exemplo, RDC1676-03) encontram utilidade sinergística considerável em combinação com Budesonida para reduzir significativamente a contagem de eosinófilos ("% de eosinófilos" e contagem total) em um modelo de rato reconhecido no estado da técnica de asma alérgica.

Parâmetros respiratórios:

Os Requerentes demonstraram também o efeito observado dos fluidos em teste sobre Penh e volume corrente, medidos imediatamente e depois de 6 e 24 horas do desafio com ovalbumina. Penh é um valor derivado obtido a partir do fluxo inspiratório máximo, fluxo expiratório máximo e tempo de expiração, e a diminuição de valor penh reflete um resultado favorável para função pulmonar.

Penh = (Fluxo expiratório máximo/Fluxo inspiratório máximo) * (Tempo de expiração/tempo para expirar 65% do volume expiratório – 1).

O tratamento com Budesonida (em doses de 500 e 750 µg/kg), isoladamente ou em combinação com qualquer um dos fluidos em teste não conseguiu afetar significativamente os valores de Penh imediatamente após o desafio. No entanto, 6 horas após o desafio, animais tratados com RDC1676-03, isoladamente ou combinado com Budesonida 500 e 750 µg/kg demonstrou uma queda significativa em valores de Penh. Embora a extensão desta queda tivesse diminuído em 24 horas após o desafio, a tendência de um efeito sinergístico de Budesonida e o fluido RDC foi ainda observada neste momento.

Volume corrente é o volume de ar aspirado para os pulmões durante a inspiração a partir do ponto expiratório final, que sai dos pulmões passivamente durante a expiração no decorrer de uma respiração tranquila. Animais tratados apenas com Budesonida não mostraram alteração em volumes correntes imediatamente após o desafio. No entanto, RDC1676-03 isoladamente exerceu um efeito estimulador significativo sobre volume corrente, já mesmo neste momento inicial. E novamente, RDC1673-03 em combinação com Budesonida (em doses de 500 e 750 µg/kg) tiveram um efeito ainda mais acentuado sobre mensurações de volume corrente neste momento. Seis horas após o desafio, RDC1676-03 isoladamente foi suficiente para causar aumento significativo em volume corrente e a adição de Budesonida ao regime de tratamento, quer isoladamente ou em combinação, não exerceu efeito aditivo sobre volume corrente. Qualquer efeito observado nestes momentos mais precoces foi, no entanto, perdido no momento de 24 horas.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um fluido aquoso eletrocineticamente alterado **CARACTERIZADO** por ser para a produção de um medicamento para o tratamento de uma doença ou condição mediada por TSLP ou mediada por TSLPR, onde o medicamento compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um fluido aquoso eletrocineticamente alterado, compreendendo uma solução aquosa iônica de nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga tendo substancialmente um diâmetro médio inferior a aproximadamente 100 nanômetros e estavelmente configurado no fluido iônico aquoso para uso na produção do medicamento para tratar uma doença ou condição mediada por TSLP ou mediada por TSLPR do sistema imune.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato das nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga estarem estavelmente configuradas no fluido iônico aquoso em uma quantidade suficiente para possibilitar, quando do contato com uma célula viva pelo fluido, modulação de pelo menos um dentre potencial de membrana celular e condutividade de membrana celular.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato das nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga serem o principal tipo de nanoestruturas contendo gás estabilizadas por carga no fluido, preferencialmente quando o percentual das moléculas de oxigênio dissolvido presentes no fluido em forma de nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga é maior do que 0,01%, preferencialmente quando o oxigênio total dissolvido está substancialmente presente nas nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato da alteração do fluido aquoso eletrocineticamente alterado compreender exposição do fluido a efeitos hidrodinamicamente induzidos, eletrocinéticos localizados, preferencialmente quando a exposição aos efeitos eletrocinéticos localizados compreende exposição a pelo menos um dentre pulsos de voltagem e pulsos de corrente, ou quando a exposição do fluido a efeitos hidrodinamicamente induzidos, eletrocinéticos localizados compreende exposição do fluido a características estruturais indutoras de efeitos eletrocinéticos de um dispositivo utilizado para gerar o fluido.

5. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato da solução iônica aquosa compreender uma solução salina.

6. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato do fluido ser superoxigenado.

7. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato da doença ou distúrbio do sistema imune compreender inflamação alérgica, preferencialmente quando a inflamação alérgica compreende pelo menos

uma dentre inflamação alérgica das vias aéreas, respostas inflamatórias do tipo Th2 mediadas por DC, dermatite atópica, eczema atópico, asma, doença obstrutiva das vias aéreas, distúrbio pulmonar obstrutivo crônico, transtornos mediados por IgE, rinoconjuntivite e alergias alimentares, preferencialmente quando a doença ou distúrbio mediado por TSLP ou mediada por TSLPR compreende artrite inflamatória, preferencialmente quando tal artrite inflamatória compreende pelo menos uma dentre artrite reumatóide e psoríase.

8. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, **CARACTERIZADO** por compreender ainda uma terapia combinada, em que pelo menos um agente terapêutico adicional é administrado ao paciente, preferencialmente onde pelo menos um agente terapêutico adicional é selecionado a partir do grupo constituído por agonistas β_2 de curta ação, agonistas β_2 de ação prolongada, anticolinérgicos, corticosteroides, corticosteroides sistêmicos, estabilizadores de mastócitos, modificadores de leucotrieno, metilxantinas, agonistas β_2, incluindo albuterol, levalbuterol, pirbuterol, artformoterol, formoterol, salmeterol, e anticolinérgicos tais como ipatrópio e tiotrópio; corticosteroides incluindo beclometasona, budesonida, flunisolida, fluticasona, mometasona, triancinolona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona; modificadores de leucotrieno incluindo montelukast, zafirlukast e zileuton; estabilizadores de mastócitos incluindo cromolina e nedocromil; metilxantinas incluindo teofilina, fármacos combinados incluindo ipatrópio e albuterol, fluticasona e salmeterol, budesonida e formoterol; anti-histamínicos incluindo hidroxizina, difenidramina, loratadina, cetirizina e hidrocortisona; fármacos moduladores do sistema imune incluindo tacrolimus e pimecrolimus; ciclosporina; azotioprina; micofenolato mofetil; e combinações destes, ou onde pelo menos um agente terapêutico adicional é um antagonista de TSLP e/ou de TSLPR, em que tal antagonista de TSLP e/ou de TSLPR é selecionado a partir do grupo constituído por anticorpos neutralizantes específicos contra TSLP e o receptor de TSLP, moléculas receptoras solúveis de TSLP e proteínas de fusão de TSLP, incluindo moléculas Fc de imunoglobulinas TSLPR ou polipeptídeos que codificam componentes de mais de uma cadeia do receptor.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato da modulação de pelo menos um dentre potencial de membrana celular e condutividade de membrana celular compreender alterar pelo menos um dentre estrutura ou função da membrana celular, compreendendo alterar pelo menos um dentre conformação, atividade de ligação a ligante, e atividade catalítica de uma proteína associada com a membrana,

preferencialmente quando a proteína associada com a membrana compreende pelo menos um selecionado a partir do grupo constituído por receptores, receptores transmembrana, proteínas de canais iônicos, proteínas de fixação intracelular, proteínas de adesão celular, integrinas,

preferencialmente quando o receptor transmembrana compreende Receptor Aco-

plado à Proteína G (GPCR),

preferencialmente quando o Receptor Acoplado à Proteína G (GPCR) interage com uma subunidade α da proteína G,

preferencialmente quando a subunidade α da proteína G compreende pelo menos um selecionado a partir do grupo constituído por $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ e $G\alpha_{12}$,

preferencialmente quando pelo menos uma subunidade α da proteína G é $G\alpha_q$,

ou onde a modulação de pelo menos um dentre potencial de membrana celular e condutividade de membrana celular compreende modular condutância de célula inteira,

preferencialmente quando a modulação da condutância de célula inteira compreende modular pelo menos um dentre contribuição linear ou não linear dependente de voltagem da condutância de célula inteira,

ou quando a modulação de pelo menos um dentre potencial de membrana celular e condutividade de membrana celular compreende modulação de uma via ou sistema de mensagens celulares dependente de cálcio, ou modulação da atividade da fosfolipase C, ou a modulação da atividade da adenilato ciclase (AC),

ou modulação de transdução de sinal intracelular associado com pelo menos uma condição ou sintoma selecionado a partir do grupo constituído por doenças ou distúrbios do sistema imune, inflamação alérgica, inflação alérgica das vias aéreas, respostas inflamatórias do tipo Th2 mediadas por DC, dermatite atópica, eczema atópico, asma, doença obstrutiva das vias aéreas, doença pulmonar obstrutiva crônica, distúrbios mediados por IgE, rinoconjuntivite, alergias alimentares, artrite inflamatória, artrite reumatóide e psoríase.

10. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, **CARACTERIZADO** por compreender a administração do fluido eletrocinético a uma rede ou camada celular e por compreender ainda modulação de uma junção intercelular na mesma, preferencialmente quando a junção intracelular compreende pelo menos um selecionado a partir do grupo constituído por junções oclusivas, junções comunicantes, zona aderente e desmossomos.

11. Uso, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato da rede ou camadas celulares compreenderem pelo menos um selecionado a partir do grupo constituído por epitélio pulmonar, epitélio brônquico e epitélio intestinal.

12. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato do fluido aquoso eletrocineticamente alterado ser oxigenado e do oxigênio no fluido estar presente em uma quantidade de pelo menos 8 ppm a pressão atmosférica,

ou do fluido aquoso eletrocineticamente alterado compreender pelo menos um dentre elétrons solvatados e espécies de oxigênio eletrocineticamente modificadas ou carregadas,

preferencialmente quando os elétrons solvatados ou espécies de oxigênio eletrocineticamente modificadas ou carregadas estão presentes em uma quantidade de pelo menos 0,01 ppm,

e/ou onde o fluido aquoso eletrocineticamente alterado compreende uma forma de elétrons solvatados estabilizados pelo oxigênio molecular.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato da capacidade para modular pelo menos um dentre o potencial de membrana celular e condutividade de membrana celular persistir por pelo menos dois, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco, pelo menos 6, pelo menos 12 meses ou por períodos mais longos em recipiente fechado estanque a gás.

14. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato da quantidade de oxigênio presente em nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga do fluido eletrocineticamente alterado ser de pelo menos 8 ppm a pressão atmosférica.

15. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato do tratamento da doença ou condição mediada por TSLP ou mediada por TSLPR do sistema imune compreender administração via, pelo menos uma dentre, tópica, inalação, intranasal e intravenosa.

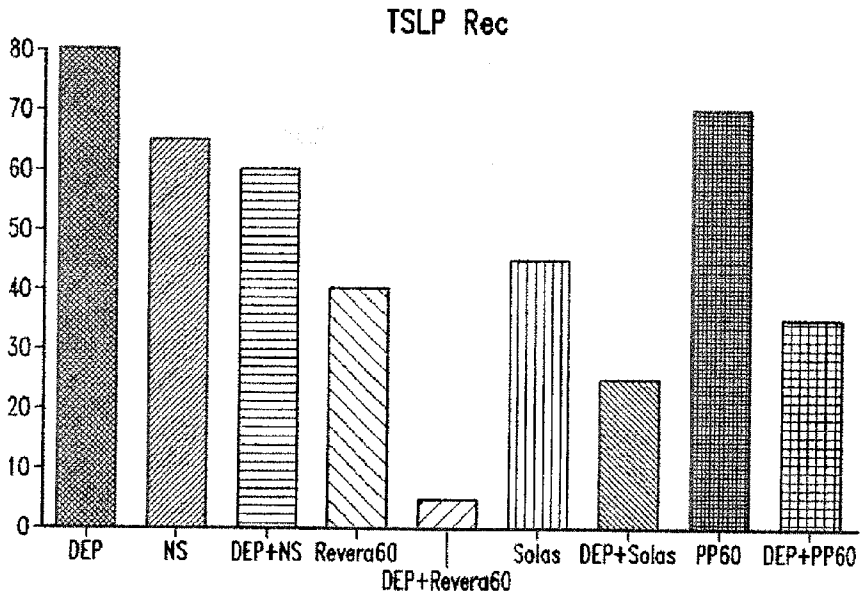

TSLP Rec
80
70
60
50
40
30
20
10
0
DEP
NS
DEP+NS
Revera60
DEP+Revera60
Solas
DEP+Solas
PP60
DEP+PP60

Fig. 1

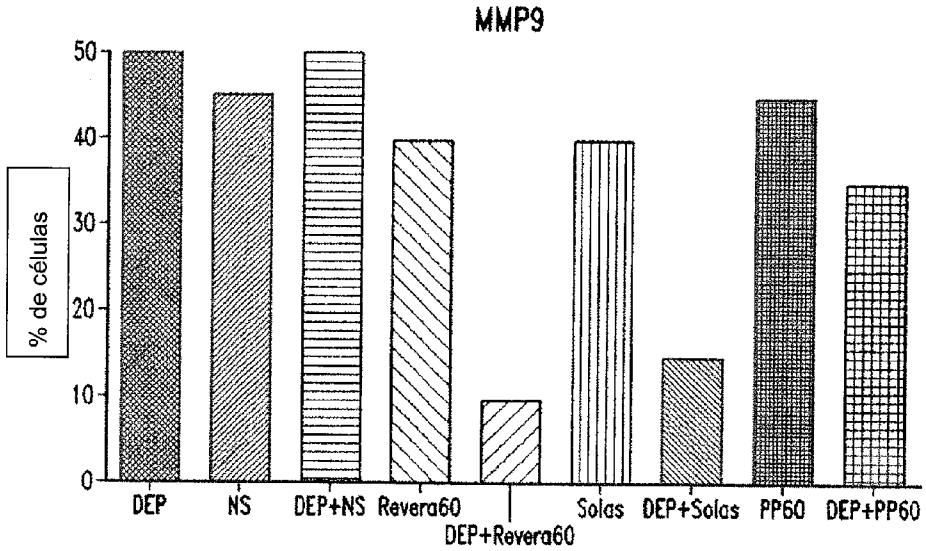

MMP9
% de células
50
40
30
20
10
0
DEP
NS
DEP+NS
Revera60
DEP+Revera60
Solas
DEP+Solas
PP60
DEP+PP60

Fig. 2

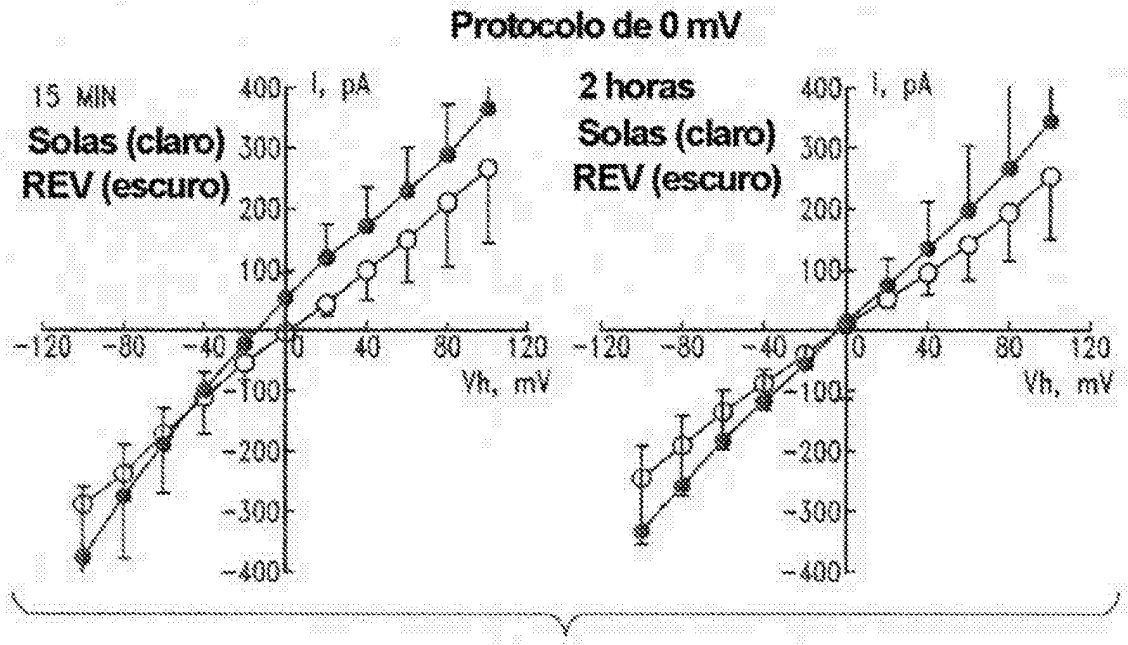

Protocolo de 0 mV
15 MIN
Solas (claro)
REV (escuro)
I, pA
Vh, mV
2 horas
Solas (claro)
REV (escuro)
I, pA
Vh, mV

Fig. 3A

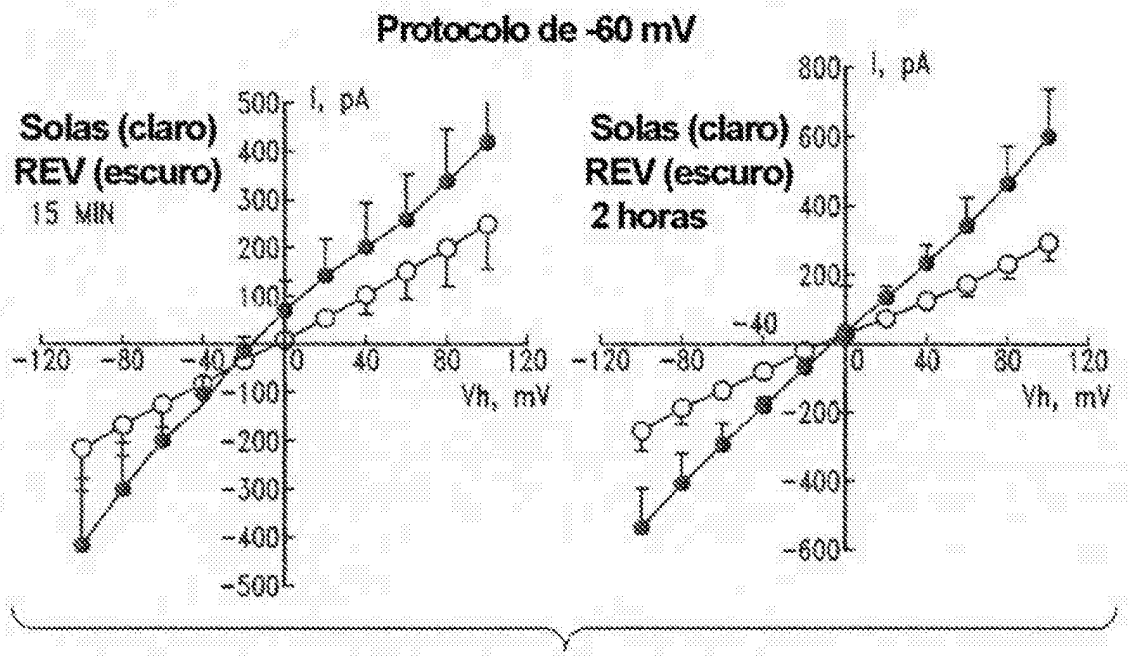

Protocolo de -60 mV
Solas (claro)
REV (escuro)
15 MIN
I, pA
Vh, mV
Solas (claro)
REV (escuro)
2 horas
I, pA
Vh, mV

Fig. 3B

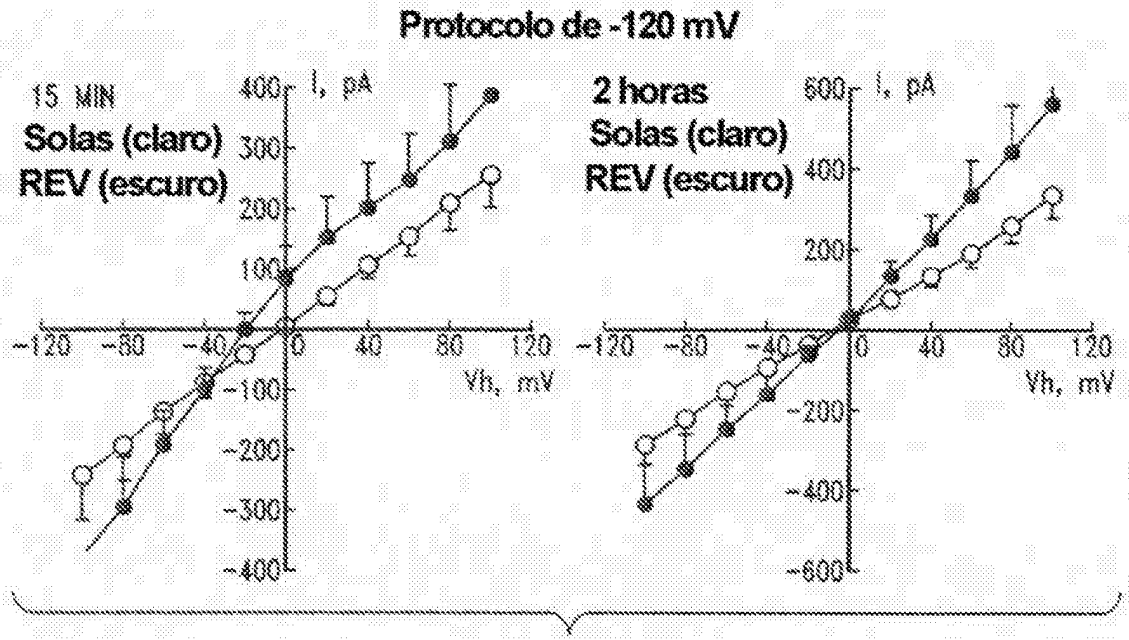

Protocolo de -120 mV
15 MIN
Solas (claro)
REV (escuro)
I, pA
Vh, mV
2 horas
Solas (claro)
REV (escuro)
I, pA
Vh, mV

Fig. 3C

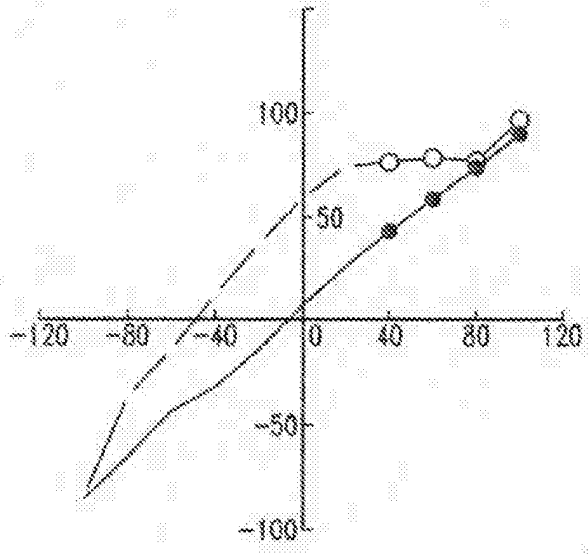


Fig. 4A

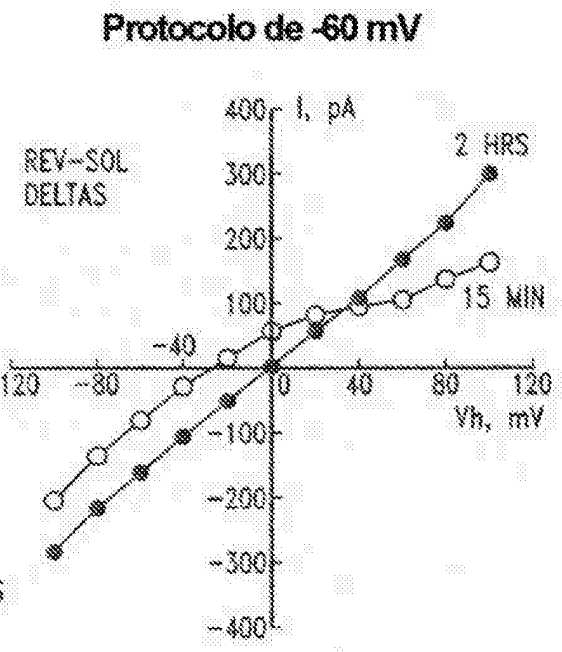


Fig. 4B

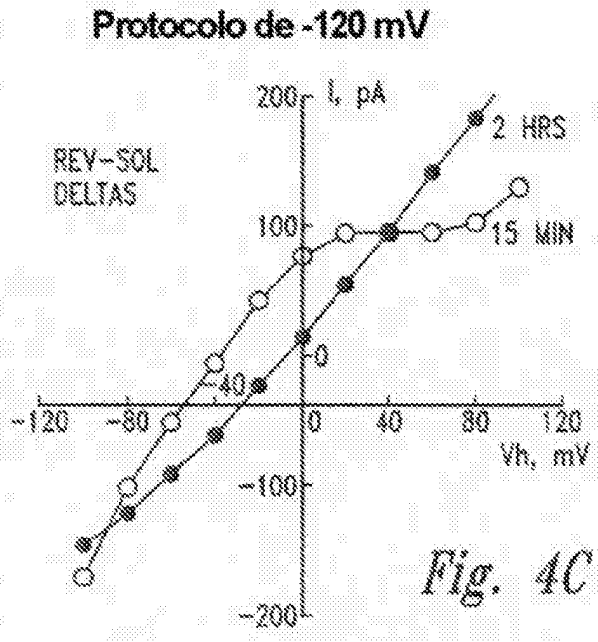


Fig. 4C

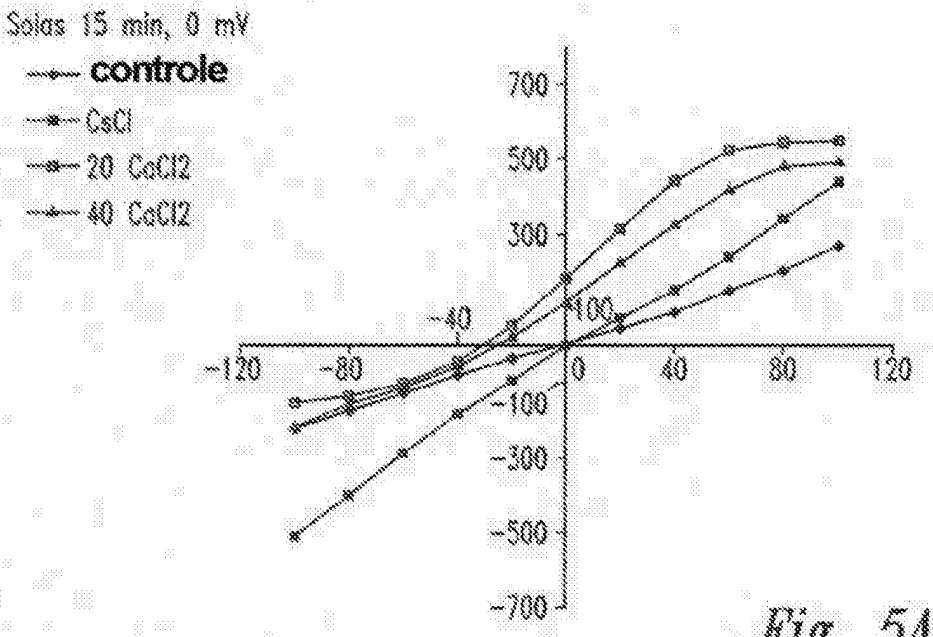

Solas 15 min, 0 mV
controle
CsCl
20 CaCl2
40 CaCl2
700
500
300
100
-40
-120
-80
0
40
80
120
-100
-300
-500
-700

Fig. 5A

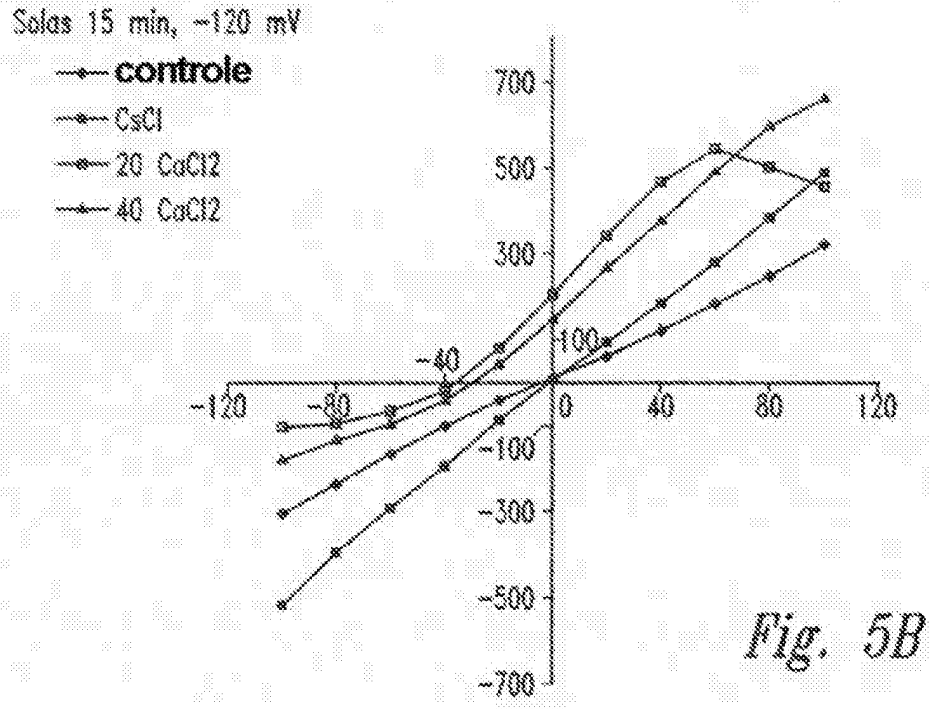

Solas 15 min, -120 mV
controle
CsCl
20 CaCl2
40 CaCl2
700
500
300
100
-40
-120
-80
0
40
80
120
-100
-300
-500
-700

Fig. 5B

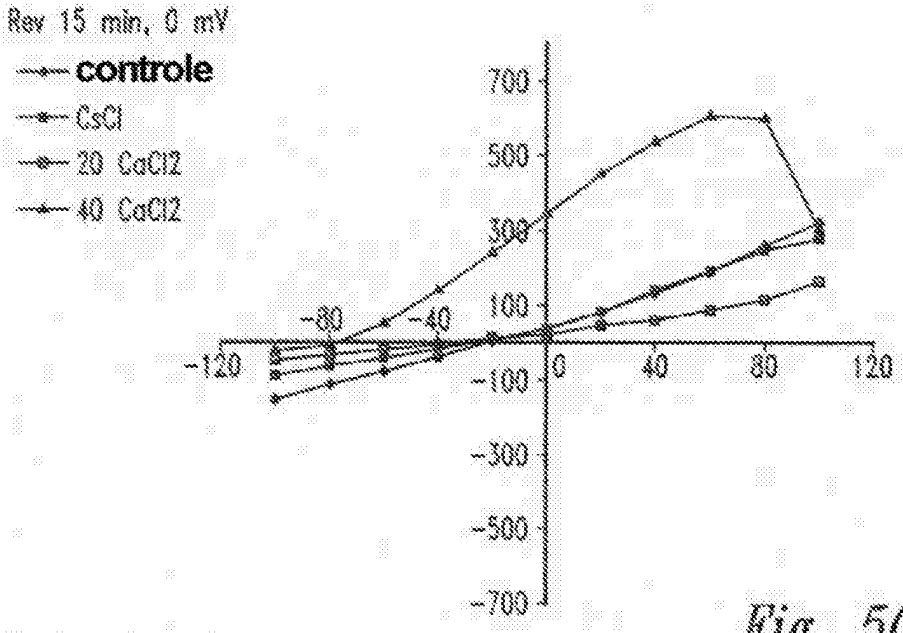

Rev 15 min, 0 mV
controle
CsCl
20 CaCl2
40 CaCl2
700
500
300
100
-100
-300
-500
-700
-120
-80
-40
0
40
80
120

Fig. 5C

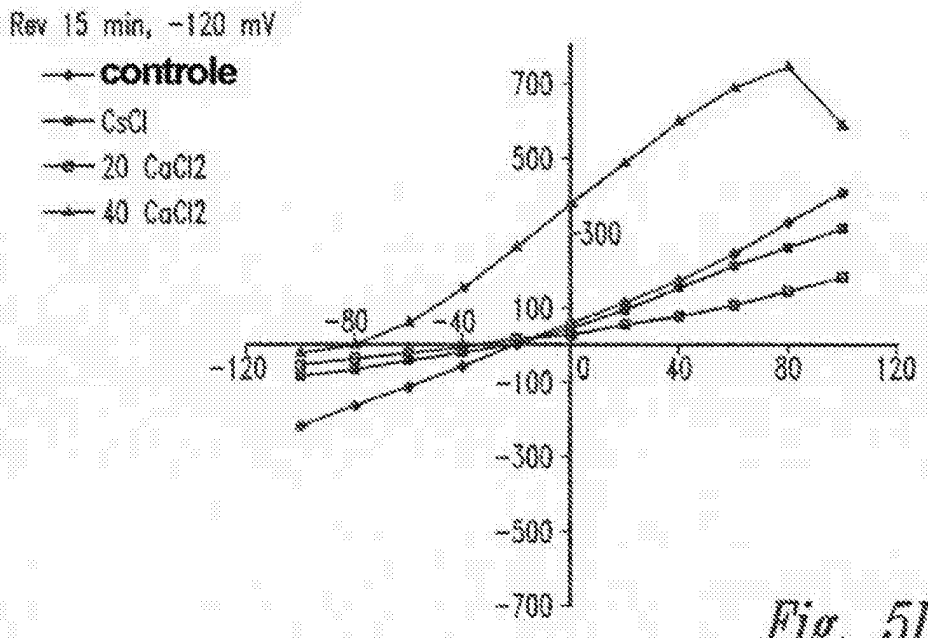

Rev 15 min, -120 mV
controle
CsCl
20 CaCl2
40 CaCl2
700
500
300
100
-100
-300
-500
-700
-120
-80
-40
0
40
80
120

Fig. 5D

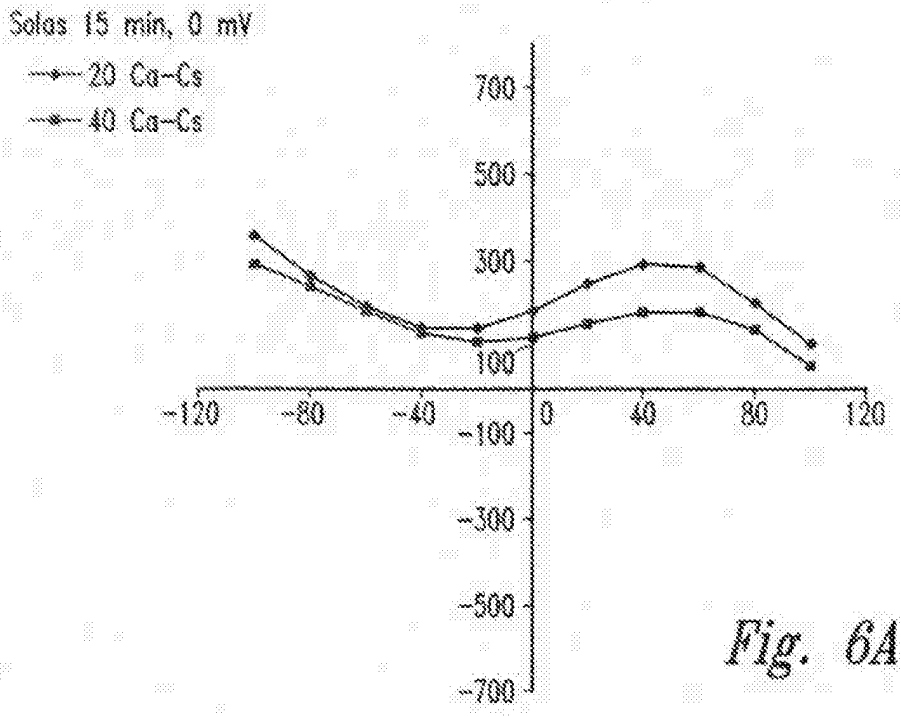

Solos 15 min, 0 mV
20 Ca-Cs
40 Ca-Cs
700
500
300
100
-100
-300
-500
-700
-120
-80
-40
0
40
80
120

Fig. 6A

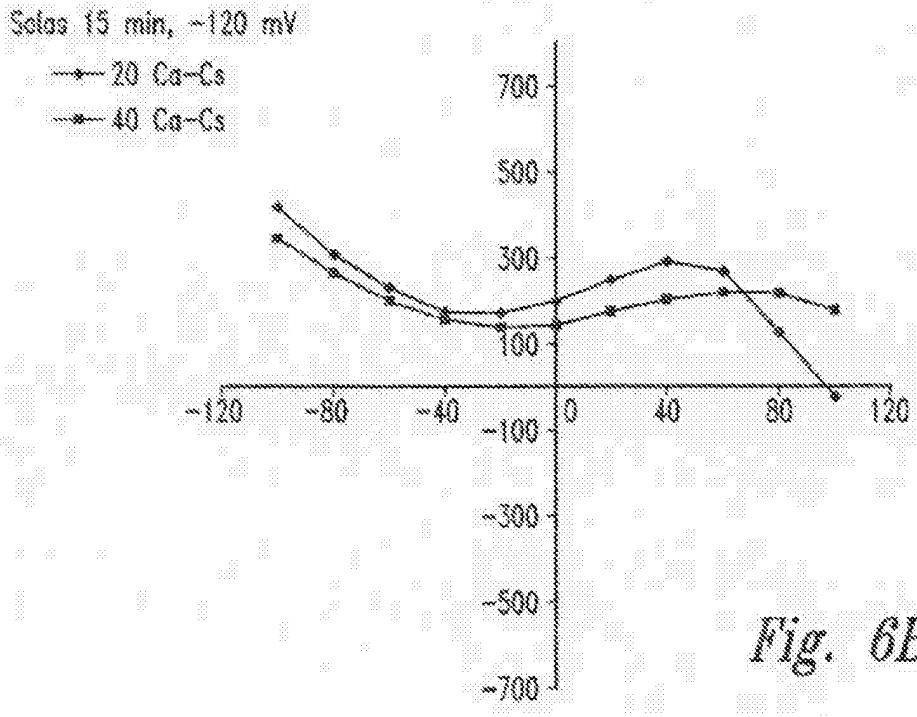

Solos 15 min, -120 mV
20 Ca-Cs
40 Ca-Cs
700
500
300
100
-100
-300
-500
-700
-120
-80
-40
0
40
80
120

Fig. 6B

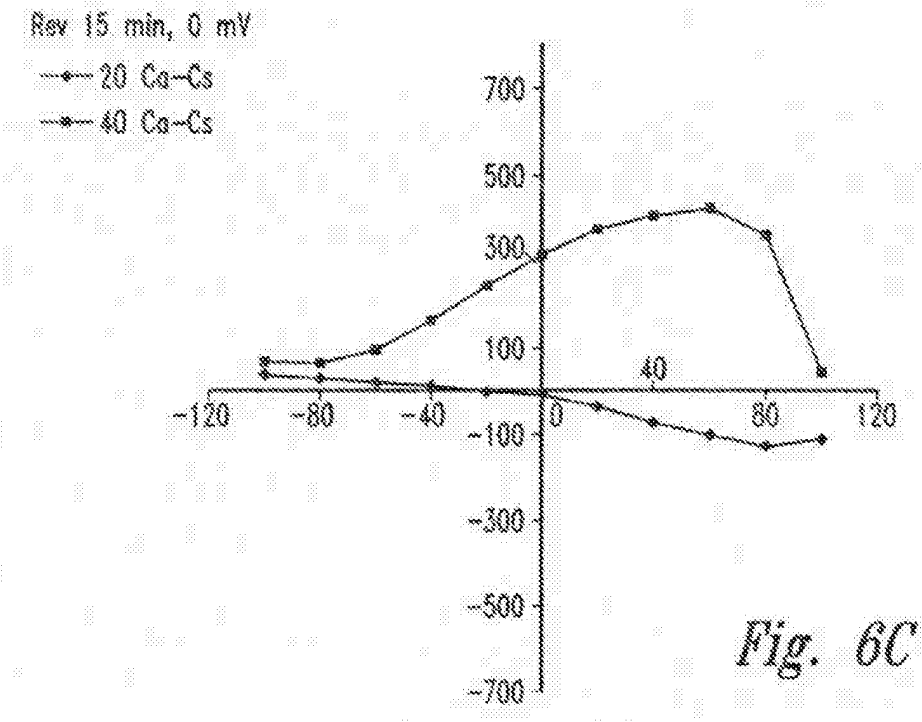

Rev 15 min, 0 mV
20 Ca-Cs
40 Ca-Cs
700
500
300
100
40
-120
-80
-40
0
80
120
-100
-300
-500
-700

Fig. 6C

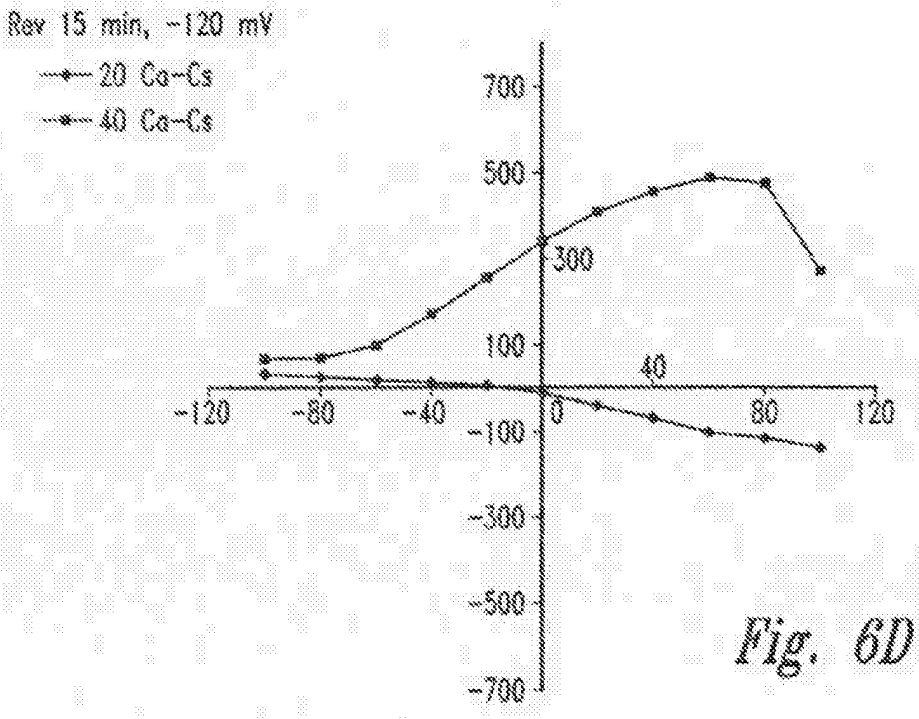

Rev 15 min, -120 mV
20 Ca-Cs
40 Ca-Cs
700
500
300
100
40
-120
-80
-40
0
80
120
-100
-300
-500
-700

Fig. 6D

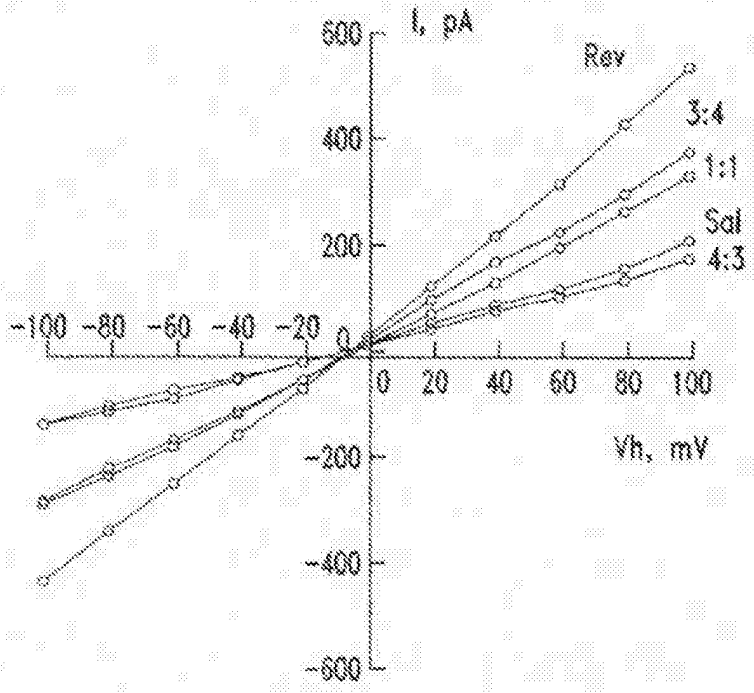

I, pA
600
400
200
-200
-400
-600
-100 -80 -60 -40 -20
0 20 40 60 80 100
Vh, mV
Rev
3:4
1:1
Sal
4:3

Fig. 7A

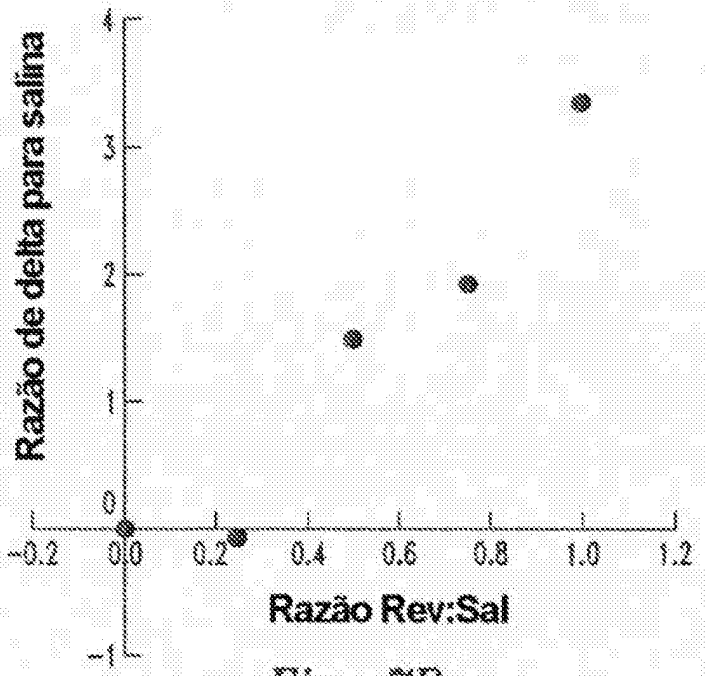

Razão de delta para salina
Razão Rev:Sal
4
3
2
1
0
-1
-0.2
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2

Fig. 7B

RESUMO

"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA TRATAR CONDIÇÕES MEDIADAS POR LINFOPOETINA DO ESTROMA TÍMICO (TSLP)"

A presente invenção provê métodos para tratar uma doença ou condição mediada por TSLP ou mediada por TSLPR, compreendendo a administração de um fluido aquoso eletrocineticamente alterado, compreendendo uma solução aquosa iônica de nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga, exibindo substancialmente diâmetro médio inferior a aproximadamente 100 nanômetros e estavelmente configuradas no fluido aquoso iônico em quantidade suficiente para tratar uma doença ou condição mediada por TSLP ou mediada por TSLPR. As nanoestruturas contendo oxigênio estabilizadas por carga estão, de preferência, estavelmente configuradas no fluido em quantidade suficiente para permitir a modulação de potencial e/ou condutividade de membrana celular. Certas modalidades compreendendo modulação ou regulação negativa da expressão e/ou a atividade de TSLP são úteis para tratar doenças ou condições mediadas por TSLP ou mediadas por TSLPR, conforme aqui descritas (por exemplo, transtornos do sistema imune, inflamação alérgica, inflamação alérgica das vias aéreas, respostas inflamatórias do tipo Th2 mediadas por DC, dermatite atópica, eczema atópico, asma, doença obstrutiva das vias aéreas, doença pulmonar obstrutiva crônica e alergias alimentares, artrite inflamatória, artrite reumatoide, psoríase, transtornos mediados por IgE e rinoconjuntivite).