

(11) Número de Publicação: **PT 125544 E**

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

(51) Classificação Internacional:

A61K 31/195 (2006.01) **A61K 31/192** (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01) **A61K 31/47** (2006.01)
A61K 31/5415 (2006.01) **A61K 31/443**
(2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) **A61P 11/06** (2006.01)
A61P 11/10 (2006.01) **A61P 11/12** (2006.01)
A61P 1/12 (2006.01)

(22) Data de pedido: **2001.01.31**

(30) Prioridade(s): **2000.01.31 US 179127 P**
2000.03.30 US 193111 P
2000.09.07 US 230783 P
2000.10.23 US 242134 P
2000.11.20 US 252052 P

(43) Data de publicação do pedido: **2002.11.13**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.03.07**
016/2007

(73) Titular(es):

GENAERA CORPORATION
5110 CAMPUS DRIVE PLYMOUTH MEETING, PA
19462 US

(72) Inventor(es):

YUHONG ZHOU US
ROY C. LEVITT US
NICHOLAS C. NICOLAIDES US
STEVE JONES US
MIKE MCLANE US

(74) Mandatário:

GONÇALO DA CUNHA FERREIRA
AV. ENG. DUARTE PACHECO, TORRE 1 - 3º 1070-101
LISBOA PT

(54) Epígrafe: **INIBIDORES DA SÍNTESE DA MUCINA.**

(57) Resumo:

INIBIDORES DA SÍNTESE DA MUCINA.

DESCRIÇÃO

INIBIDORES DA SÍNTESE DA MUCINA

Este Pedido de Patente reivindica os melhoramentos do Pedido de Patente provisória norte-americana U.S. 60/179,127, depositada em 31 de Janeiro de 2000, do Pedido de Patente provisória 60/193,111, depositada em 30 de Março de 2000, do Pedido de Patente provisória 60/230,783, depositada em 7 de Setembro de 2000, do Pedido de Patente provisória 60/ depositada em 23 de Outubro de 2000 e do Pedido de Patente provisória 60/ depositada em 20 de Novembro de 2000. Todos os Pedidos de Patente anteriormente referidos têm como título "Inibidores da Síntese da Mucina" e os inventores são Yuhong Zhou, Roy C. Levitt, Nicholas C. Nicolaidis, Steve Jones, e Mike McLane.

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se à modulação da síntese da mucina e à utilização terapêutica de compostos para controlar a produção excessiva de mucina associada a doenças como por exemplo asma, bronquite crónica, doenças inflamatórias dos pulmões, fibrose quística e doenças respiratórias infecciosas crónicas ou agudas assim como doenças pulmonares obstrutivas crónicas (DPCO).

ANTECEDENTES INVENÇÃO

É do conhecimento geral que o epitélio das vias respiratórias tem um papel importante no mecanismo de defesa da via respiratória via sistema mucociliar e via as barreiras mecânicas. Estudos recentes indicam que as células epiteliais das vias respiratórias (AEC do inglês airway epithelial cells) podem ser activadas para produzir e libertar mediadores biológicos importantes na patogénese de diversas doenças das vias respiratórias (Polito & Proud; 1998; Takizawa; 1998). A evidência tem demonstrado que o epitélio fundamentalmente

altera-se nas doenças das vias respiratórias crónicas como por exemplo a asma, a bronquite crónica, o enfisema, e a fibrose quística (Holgate et al., 1999; Jeffery PK, 1991; Salvato,1968; Glynn & Michaels, 1960). Uma das características marcantes destas doenças das vias respiratórias é a produção excessiva de muco pelas AEC. Os principais componentes macromoleculares do muco são as grandes glicoproteínas conhecidas como mucinas. Recentemente, foi determinada a estrutura molecular de pelo menos 7 mucinas de origem humana. A transcrição conhecida dos genes da mucina são heterogéneos sem homologia sequencial entre os genes (Voynow & Rose,1994), ainda que estes na sua estrutura global repetitiva sejam idênticos.

É sabido que os estímulos deletérios activam as AEC. Estes estímulos podem variar de antigénios nas doenças alérgicas aos medicamentos ou contaminantes meio ambientais, fumo de tabaco, e agentes infecciosos associados a formas de doenças pulmonares obstrutivas crónicas. A activação das AEC conduz à alteração do transporte iónico, alterações no batimento ciliar e ao aumento da produção e secreção de mucinas conduzindo a um aumento de muco. Os mediadores produzidos em resposta à activação das AEC incluem quimiocinas que promovem o influxo de células inflamatórias (Takizawa, 1998). Por outro lado, estas células inflamatórias podem produzir mediadores que podem deteriorar as AEC. A deterioração das AEC estimula a proliferação celular (hiperplasia das células caliciformes e das células da glândula submucosa) que resultam numa fonte ampla e contínua de produtos pró-inflamatórios, incluindo as proteases assim como factores de crescimento que promovem a remodelação da parede das vias respiratórias o que pode levar à destruição do pulmão e à perda de função (Holgate et al., 1999).

A produção excessiva de muco e a alteração das suas características físico-químicas podem de várias formas contribuir à patologia pulmonar. A alteração da depuração fisiológica mucociliar pela produção excessiva de mucinas podem

gerar tampões de muco, aprisionamento do ar e atelectasia que muitas vezes se complica com a infecção.

A asma é uma doença pulmonar obstrutiva crónica que parece que está a aumentar em prevalência e gravidade (Gergen e Weiss, 1992). Calcula-se que 30 a 40% da população sofre de alergia atópica e 15% das crianças e 5% dos adultos da população padecem de asma (Gergen & Weiss, 1992).

Na asma, a activação do sistema imunitário por antigénios conduz à inflamação alérgica. Quando este tipo de activação imunológica se dá esta é acompanhada por uma inflamação pulmonar, hipersensibilidade bronquial, hiperplasia de células caliciformes e da glândula da submucosa, e super-produção e hipersecreção de mucina (Basle et al., 1989) (Paillasse, 1989) (Bosque et al., 1990). A super-produção e congestionamento do muco associado à hiperplasia das células caliciformes e com as células da glândula da submucosa é uma parte importante da patologia da asma e têm sido descritos nos exames das vias respiratórias de asmáticos moderados assim como de pessoas que morreram com estado asmático (Earle, 1953) (Cardell & Pearson, 1959) (Dunnill, 1960) (Dunnill et al., 1969) (Aikawa et al., 1992) (Cutz et al., 1978). Algumas células inflamatórias são importantes nesta reacção incluídas as células T, as células com antigénios, as células B que produzem IgE, os basófilos que unem a IgE e os eosinófilos. Estas células inflamatórias acumulam-se no lugar da inflamação alérgica e os produtos tóxicos que estas libertam contribuem à destruição das AEC e de outros tecidos relacionados com estas doenças.

Nos Pedidos de Patente relacionados acima mencionadas, os titulares demonstraram que a interleucina 9 (IL9), o seu receptor e as actividades efectuadas pela IL9 são os objectivos apropriados para a intervenção terapêutica numa alergia atópica, asma e doenças relacionadas. Há já muito tempo que se considera que a libertação de mediadores de mastócitos por alérgeno é a

situação inicial crítica da alergia. A IL9 foi inicialmente identificada como um factor de crescimento de mastócitos e foi demonstrado que a IL9 favorece a expressão das proteases dos mastócitos incluindo MCP-1, MCP-2, MCP-4 (Eklund *et al.*, 1993) e granzima B (Louahed *et al.*, 1995). Assim, parece que a IL9 tem um papel importante na proliferação e diferenciação dos mastócitos. Além de que, a IL9 favorece a expressão da cadeia alfa do receptor de IgE de alta afinidade (Dugas *et al.*, 1993). Além de que, estudos *in vitro* assim como *in vivo* têm mostrado que a IL9 potencia a libertação de IgE das células B iniciadas (Petit-Frere *et al.*, 1993).

Recentemente foi demonstrado que a IL9 estimula a síntese da mucina e pode ainda determinar 50 a 60% da actividade estimulante da mucina dos fluidos pulmonares nas doenças alérgicas das vias respiratórias (Longpre *et al.*, 1999). Uma síntese da mucina e uma super-produção do muco exageradas se dá em ratos transgénicos que expressam IL9 quando comparados com ratos que expressam a cepa do antecedente genético. A IL9 expressa especificamente os genes e proteínas MUC2 e MUC5AC *in vitro* e *in vivo* (Louahed *et al.*, 2000). Além de que, o anticorpo que neutraliza a IL9 inibe completamente a expressão de mucinas em resposta ao desafio do antigénio nos modelos dos animais com asma (McLane *et al.*, 2000)

Os actuais tratamentos da asma têm várias desvantagens. Os principais agentes terapêuticos, agonistas beta-receptores, reduzem transitoriamente os sintomas melhorando a função pulmonar, mas não agem sobre a inflamação subjacente nem suprimem a produção de mucina. Além de que, a utilização constante de agonistas beta-receptores produzem uma dessensibilização, reduzindo a sua eficácia e a sua segurança (Molinoff *et al.*, 1995). Os agentes que podem diminuir a inflamação subjacente, e deste modo reduzir a produção de mucina, como por exemplo os esteróides anti-inflamatórios, têm a

seu própria lista de desvantagens que varia desde a imunossupressão até à perda óssea (Molinoff *et al.*, 1995).

A bronquite crónica é outra forma de doença pulmonar obstrutiva crónica. Quase 5% dos adultos sofrem desta doença pulmonar. A bronquite crónica é definida como a super-produção crónica de muco. Habitualmente a super-produção de muco está associada à inflamação das vias respiratórias condutoras. Os mediadores das células inflamatórias incluindo os neutrófilos e macrófagos podem nesta doença estar associados a um aumento da expressão genética da mucina (Voynow *et al.*, 1999; Borchers *et al.*, 1999). O aumento da produção de muco está associado à obstrução das vias respiratórias, que é uma das características principais desta doença pulmonar.

O tratamento é largamente sintomático e orientado para controlar a infecção e impedir uma maior perda da função pulmonar. Pensamos que os descongestionantes, expectorantes e combinações destes agentes, que são muitas vezes utilizados para tratar os sintomas da bronquite, não alteram a produção da mucina. Os mucolíticos podem estimular a depuração mucociliar e proporcionarem um alívio sintomático ao reduzir a viscosidade e/ou a elasticidade das secreções das vias respiratórias mas não inibem a síntese da mucina ou a super-produção do muco. (Takahashi *et al.*, 1998)

A fibrose quística (FQ) é ainda outra doença que afecta os pulmões e está associada às secreções espessas que produzem a obstrução das vias respiratórias e a colonização e infecção posterior por microrganismos patogénicos inalados (Eng *et al.*, 1996). Os níveis de ADN aumentam significativamente nos pulmões com a fibrose quística e podem aumentar a viscosidade do muco. Ainda que a ADNsa recombinante em aerossol é útil nestes doentes, não há nenhum tratamento eficaz para a super-produção patológica do muco. Assim, na técnica há uma necessidade insatisfeita específica de identificar agentes capazes de inibir

a super-produção de mucina pelas células epiteliais das vias respiratórias na fibrose quística. Adicionalmente à obstrução das vias respiratórias provocada pelas secreções de mucina, os doentes com fibrose quística sofrem também de obstrução do muco nos canais pancreáticos que impedem a administração de enzimas digestivas ao tracto GI. O resultado é a síndrome de má absorção, a esteatorreia e a diarreia.

Ainda que a super-produção do muco é uma das características que distingue as diversas doenças pulmonares obstrutivas crónicas, a técnica carece de qualquer método para bloquear a síntese ou super-produção de mucinas associadas a estas doenças pulmonares. Portanto, na técnica há uma necessidade específica de inibir a super-produção de mucinas e dissolver as secreções destes doentes para facilitar a depuração mucociliar e preservar a função pulmonar.

RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao descobrimento de agentes que inibem a síntese e a super-produção de glicoproteínas mucinas e à utilização destas moléculas no fabrico de um medicamento para tratar a super-produção patológica do muco nas doenças pulmonares obstrutivas crónicas e outras doenças.

Num aspecto, a presente invenção provê a utilização de um composto para o fabrico de um medicamento para tratar um indivíduo com uma doença respiratória caracterizada pela produção de mucina, compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de uma composição que compreende pelo menos um composto de acordo com a reivindicação 1 que reduz a síntese ou os níveis da mucina nos pulmões ou no tracto GI. Nalgumas formas de realização, a síntese da mucina pode ser dependente do canal de cloreto. Nalgumas formas de realização, o composto reduz a síntese da mucina nas células que expressam um canal de cloreto ICACC. As composições da presente invenção

compreendem talniflumato ou um seu sal aceite na Indústria farmacêutica.

Noutro aspecto da presente invenção os compostos de acordo com a reivindicação 1 que reduzem a síntese da mucina são também inibidores da enzima ciclooxigenase. Numa forma mais preferida de realizar a invenção os compostos são inibidores específicos da enzima ciclooxigenase 2.

Noutra forma de realização, a presente invenção provê medicamentos para tratar um indivíduo com uma doença respiratória caracterizada pela produção da mucina administrando as composições da invenção por inalação. Nalgumas formas de realização, a composição está em forma de líquido ou em forma de pó. Nalgumas formas de realização, a composição está em aerossol. Noutras formas de realização, a composição ainda compreende pelo menos um agente expectorante, anti-histamínico, mucolítico, antibiótico ou descongestionante. Nalgumas formas de realização, o expectorante é a guaifenesina. As composições da invenção podem ainda compreender pelo menos um agente estabilizante, um agente potenciador da absorção ou um agente aromatizante. Nalgumas formas de realização preferidas, o agente estabilizante é o ciclodextrano e/ou o agente potenciador da absorção é o quitosano.

Nalgumas formas preferidas de realizar a invenção, as composições da presente invenção podem ser utilizadas para tratar uma doença respiratória seleccionada do seguinte grupo de doenças: doença pulmonar obstrutiva crónica (EPOC), doença pulmonar inflamatória, fibrose quística e de uma doença infecciosa aguda ou crónica. O tratamento de qualquer uma destas doenças pode ser efectuado com a administração de uma ou mais composições da invenção por inalação. Nalgumas formas de realização, a composição é administrada via inalação aos pulmões. Nas formas preferidas de realizar, a presente invenção

provê materiais para tratar uma EPOC seleccionada do seguinte grupo de doenças: enfisema, bronquite crónica e asma.

Noutra forma preferida de realizar a invenção, as composições da presente invenção podem ser utilizadas para tratar as complicações GI da fibrose quística como por exemplo o síndrome de má absorção, a esteatorreia e a diarreia. O tratamento desta doença pode ser por administração de uma ou mais das composições da invenção por via oral.

Noutra forma de realização, a presente invenção provê uma composição terapêutica formulada para ser administrada por inalação compreendendo uma quantidade eficaz para reduzir a produção ou os níveis da mucina ou de pelo menos um composto seleccionado do grupo composto por talniflumato, e seus sais aceites na Indústria Farmacêutica. Nalgumas formas de realização, a composição está em forma de líquido ou em forma de pó. Nalgumas formas de realização, a composição ainda compreende pelo menos um agente expectorante, mucolítico, antibiótico, anti-histamínico ou descongestionante. Nalgumas formas de realização, o expectorante é a guaifenesina.

Além de que os agentes anteriormente descritos, as composições farmacêuticas da presente invenção formuladas para a inalação podem ainda compreender pelo menos um agente estabilizante, um agente potenciador da absorção ou um agente aromatizante. Nalgumas formas de realização, o agente estabilizante é um ciclodextrano e/ou o agente potenciador da absorção é o quitosano.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1 mostra o efeito do ácido niflúmico NFA (do inglês niflumic acid) na produção da mucina. O inibidor da NFA bloqueia a super-produção da mucina *in vitro*.

A figura 2 mostra a capacidade do NFA e de vários compostos para suprimir a super-produção da mucina por células Caco2 activadas. Esta figura mostra a inibição da produção da mucina nas células Caco2 activadas por fenamatos.

A figura 3 mostra que o tratamento da linha celular Caco2 activado com NFA não afectou a sua viabilidade. Esta figura mostra que o NFA não afecta a proliferação das células epiteliais.

A figura 4 mostra a inibição da produção das células epiteliais da quimiocina eotaxina. Esta figura mostra que o NFA bloqueia a activação epitelial incluindo a produção da quimiocina.

A figura 5 mostra que a administração intratraqueal do NFA suprime a hipersensibilidade da via respiratória induzida por antigénios (Af + NFA) em comparação com o tampão de fosfato salino (PBS). Esta figura mostra que o NFA bloqueia as respostas ao antigénio epitelial incluindo a hipersensibilidade da via respiratória.

A figura 6 mostra os resultados da administração intratraqueal do NFA. Esta figura mostra que o NFA reduz *in vivo* a eosinofilia pulmonar induzida por antigénios. Isto é observado comparando a eosinofilia após a activação com *Aspergillus* na presença do NFA (Af + NFA) com a eosinofilia após a activação em ausência de NFA com tampão de fosfato salino (Af + PBS).

A figura 7 mostra os resultados da administração intratraqueal do NFA em aumentos de muco induzidos por antigénios (glicoconjugados de mucina) (Af + NFA) em comparação com tampão de fosfato (PBS). Esta figura mostra que o NFA bloqueia a expressão aumentada da mucina por antigénios nos pulmões do rato exposto.

A figura 8 mostra que os ratos transgênicos que expressam IL9 constitutivamente produzem excessivamente mucina nas vias respiratórias em contraste com os ratos de controlo que expressam FVB.

A figura 9 mostra que a super-produção constitutiva da mucina no pulmão dos ratos transgênicos que expressam IL9 está associada à expressão específica das transcrições estacionárias MUC2 e MUC5AC em comparação com os ratos que expressam a cepa do antecedente genético (FVB/NJ). Esta figura mostra que os genes específicos da mucina são expressos nos pulmões dos ratos transgênicos que expressam IL-9.

A figura 10 mostra o efeito do anticorpo anti-IL-9 na produção excessiva de mucina no pulmão dos ratos expostos a antigénios. Esta figura mostra que a neutralização do anticorpo IL-9 impede a produção excessiva da mucina nos ratos expostos a antigénios.

A figura 11 mostra uma fórmula genérica para análogos do ácido fenilntranílico que bloqueiam a produção de mucina em que:

X_1 a X_9 = cada um independentemente dos outros pode ser C, S, O ou N,

R_1 a R_{11} = cada um independentemente dos outros pode ser hidrogénio, alquilo, arilo, alquilo substituído, arilo substituído, halogéneo, alquilo substituído por halogéneo, arilo substituído por halogéneo, alquilo ou arilo formando um anel, alquilo ou arilo substituído formando um anel, hidróxilo, éter de alquilo ou arilo, amina, amina de alquilo ou arilo, éster de alquilo ou arilo, sulfonamida de alquilo ou arilo, tiol, tioéter de alquilo ou arilo, sulfona de alquilo ou arilo, sulfóxido ou sulfonamida de alquilo ou arilo,

Y= carboxilato, carboxilato de alquilo, sulfato, sulfonato, fosfato, fosfonato, amidas de ácidos carboxílicos, ésteres de ácidos carboxílicos, amidas de ácidos fosfóricos, ésteres de ácidos fosfóricos, amidas de ácidos sulfónicos, ésteres de ácidos sulfónicos, amidas de ácidos fosfónicos, ésteres de ácidos fosfónicos, sulfonamida, fosfonamida, tetrazol, ácido hidroxámico o outro isóstero ácido,

Z =O, NR₁₀ , S, CR₁₀ R₁₁, sulfóxido ou sulfona,

m= 0 ou 1,

n= 1 ou 2.

A figura 12 mostra a expressão da mucina induzida por hICACC-1 nas células NCl-H292.

A figura 13 mostra a produção excessiva de muco nas células NCl-H292 de super-expressas de hICACC-1.

A figura 14 mostra a inibição da produção de mucina por talniflumato.

As figuras 15 A e 15B mostram a inibição da produção excessiva de mucina nos ratos pela administração oral de talniflumato. A figura 15A mostra uma secção de pulmão (corada com H&E) de um rato sensibilizado ao *Aspergillus fumigatus* e o qual tinha acesso regular à comida para ratos mouse chow. A figura 15B mostra uma secção de pulmão (corada com H&E) de um rato sensibilizado com *Aspergillus fumigatus* e o qual tinha acesso à comida para ratos mouse chow que continha talniflumato.

A figura 16 mostra a inibição da eosinofilia pulmonar nos ratos por administração oral de talniflumato. Esta figura mostra AHR373: o efeito da comida para ratos mouse chow com

talniflumato na lavagem broncoalveolar LBA de ratos machos B6D2F1/J sensibilizados com *Aspergillus fumigatus*.

A figura 17 mostra a inibição da secreção MUC5A/C por Nimesulida (referência).

A figura 18 mostra a inibição da secreção MUC5A/C por MSI-2079 (referência).

A figura 19 mostra a estrutura de MSI-2079 (referência).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção é, em parte, derivada da descoberta de que a produção excessiva do muco resultante da activação das células epiteliais não ciliadas do pulmão é provocada pela indução de genes da mucina incluindo MUC2 e MUC5AC. Assim, um aspecto da invenção é a inibição da activação das células epiteliais. Esta inibição da activação das AEC reduz a produção da quimiocina, a sensibilidade bronquial e a expressão genética da mucina.

Agentes que Reduzem a Síntese ou Níveis da mucina

Como o descrito na presente invenção, as formulações e composições da invenção incluem agentes que reduzem a síntese ou níveis de mucina, ou reduzem de alguma forma a produção excessiva de mucina. Como é utilizada neste caso, "reduzir" é definido como uma redução no nível, activação, função, estabilidade, ou síntese da mucina. Os agentes preferidos reduzem o nível dependente do canal de cloreto, activação, função, estabilidade, ou síntese da mucina. Como é utilizado aqui, "canal de cloreto" refere-se, mas sem se limitar ao canal de cloreto ICACC e os canais relacionados como os referidos no Pedido de Patente WO 99/44620.

A molécula que reduz a síntese ou níveis de mucina é o talniflumato.

Utilização de Agentes que Modulam a Produção de Mucina

Como o provido nos exemplos, os agentes que modulam, diminuem ou reduzem a expressão da mucina podem ser utilizados para modular processos patológicos e biológicos associados à produção da mucina.

Os Titulares têm observado que a IL9 induz selectivamente a expressão dos produtos genéticos da mucina. Assim, o efeito pleiotrópico da IL9, que é importante para um número de respostas induzidas por antigénios, depende em parte, da expressão da mucina nas AEC. Quando as funções da IL9 são reduzidas por um tratamento de anticorpos neutralizantes, os animais podem ser completamente protegidos das respostas induzidas por antigénios no pulmão. Estas respostas incluem: hipersensibilidade bronquial, eosinofilia e contagens elevadas de células na lavagem bronquial, IgE elevado no soro, alterações histológicas no pulmão associadas à inflamação, e hiperplasia das células caliciformes e das células da glândula submucosa associada à produção excessiva de muco. A redução das respostas por IL9 e do tipo asmático está associada à expressão reduzida da mucina (figura 10). Assim, o fabrico de um medicamento para o tratamento destas respostas, que provocam a patogénese da asma e que caracteriza a inflamação alérgica associada a esta perturbação, que reduza a produção da mucina, está dentro do âmbito desta invenção.

A análise histológica das vias respiratórias dos ratos transgénicos que expressam IL9 tem mostrado a produção excessiva da mucina nas células epiteliais não ciliadas (Temann *et al.*, 1998; Louahed *et al.*, 2000). A indução da mucina no pulmão do rato transgénico que expressa IL9 sugere que a IL9 promove a produção do muco através destas células (ver figura 8). As

células Caco2 activadas que expressam o ARNm de MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5B e MUC5AC foram produzidas e utilizadas para testar os inibidores da produção de mucina. Estas células podem ser coradas para detectar a mucina utilizando um corante de ácido periódico com reactivo de Schiff (PAS). Como o mostrado na figura 1A, as células Caco2 activadas não tratadas coram intensamente para os glicoconjugados positivos de mucina com PAS. As células de controlo e activadas foram cultivadas na presença de ácido niflúmico (NFA) ou ácido 4,4'-diisotiocianostilbeno-2,2'-dissulfónico (DIDS). A coloração com PAS das células activadas tratadas com inibidor revelou significativamente menos glicoconjugados com uma coloração positiva quando comparadas com as células não tratadas (figura 1D em comparação com a figura 1B).

Apesar de que tenha sido identificado um potencial terapêutico para a redução da mucina na asma, os Titulares também reconheceram um potencial terapêutico para a redução da mucina na fibrose quística. Os doentes com fibrose quística estão impedidos por uma doença pulmonar caracterizada por secreções espessas que causam a obstrução das vias respiratórias e a colonização e infecção posterior por microrganismos patogénicos inalados (Eng *et al.*, 1996). Consequentemente os Titulares provêem um medicamento para tratar a fibrose quística reduzindo a produção de mucina no pulmão. A produção excessiva de mucina na fibrose quística também está presente nos canais pancreáticos que subministram enzimas digestivas ao tracto GI produzindo síndrome de má absorção, esteatorreia e diarreia. Consequentemente os Titulares também provêem um medicamento para tratar a fibrose quística reduzindo a produção de mucina no pâncreas.

Os Titulares também identificaram um potencial terapêutico para a redução da mucina na bronquite crónica e no enfisema. Os doentes com bronquite crónica e enfisema estão impedidos por uma doença pulmonar caracterizada por secreções espessas que

provocam a obstrução das vias respiratórias e a colonização e a infecção posterior por microrganismos patogénicos inalados (Eng et al., 1996). Consequentemente os Titulares provêem um medicamento para tratar a bronquite crónica e o enfisema reduzindo a produção de mucina no pulmão.

Como aqui utilizado, um indivíduo pode ser qualquer mamífero, na medida em que o mamífero necessite a modulação de um processo patológico ou biológico mediado pela produção de mucina. A designação "mamífero" significa um indivíduo que pertence à categoria dos Mamíferos. A invenção é particularmente útil no tratamento de indivíduos humanos.

Os processos patológicos referem-se a uma categoria de processos biológicos que produzem um efeito deletério. Por exemplo, a produção excessiva de mucina da invenção pode estar associada a uma doença respiratória, incluindo uma doença pulmonar obstrutiva crónica (EPOC), doença pulmonar inflamatória, fibrose quística e doença infecciosa aguda ou crónica. As EPOC incluem bronquite, asma e enfisema. A produção excessiva de mucina pode estar também associada a doenças GI como por exemplo a síndrome de má absorção, esteatorreia e diarreia que estão presentes na fibrose quística.

Como é utilizado na presente invenção, diz-se que um agente modula um processo patológico quando o agente reduz o grau ou gravidade do processo. Por exemplo, a obstrução das vias respiratórias pode ser evitada ou a progressão da doença modulada pela administração de agentes que reduzam ou modulem de alguma forma a síntese, níveis e/ou a produção excessiva de mucina.

Composições Terapêuticas

Os agentes da presente invenção podem ser providos sozinhos ou em combinação com outros agentes que modulem um processo patológico particular. Por exemplo, um agente da presente

invenção pode ser administrado em combinação com agentes antiasmáticos. Noutra forma de realização, um agente pode ser administrado em combinação com expectorantes, mucolíticos, antibióticos, anti-histamínicos ou descongestionantes. Ainda noutra forma de realização, um agente pode ser administrado com um agente tensioactivo, um agente estabilizante, um agente potenciador da absorção, um agonista de um adreno-receptor beta ou de um receptor de purina ou um aromatizante ou outro agente que melhore o sabor das composições. Como exemplo, as composições da invenção podem adicionalmente conter um agente activo, um expectorante como por exemplo a guaifenesina, um agente estabilizante como por exemplo a ciclodextrina e/ou um agente potenciador da absorção como por exemplo o quitosano. Qualquer um destes agentes pode ser utilizado nas composições da invenção.

Como é utilizado na presente invenção, diz-se que dois ou mais agentes são administrados em combinação quando os agentes são simultaneamente administrados ou são administrados independentemente de maneira a que os agentes ajam ao mesmo tempo.

Os agentes da presente invenção podem ser administrados via parenteral, subcutânea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, tópica ou oral. De forma alternativa, ou simultaneamente, a administração pode ser por via oral ou nasal ou directamente nos pulmões. Numa forma de realização preferida, os compostos desta invenção podem ser administrados por inalação. Para o tratamento por inalação o composto pode estar numa solução útil para a administração por aerossol líquido, inaladores dosificadores, ou numa forma adequada para um inalador de pó seco. A dose administrada dependerá da idade, saúde, e peso do receptor, e se existe algum com o tipo de tratamento coexistente, frequência de tratamento e a natureza do efeito desejado.

Nalgumas formas de realização preferidas, os agentes da presente invenção podem ser formulados como aerossóis. A formulação de aerossóis farmacêuticos é uma rotina para os técnicos especializados, ver por exemplo, Sciarra, J. in Remington: The Science and Practice of Pharmacy 19th Edition, Chapter 95, Mack Publishing Company, Easton, PA. Os agentes podem ser formulados como aerossóis de solução, de dispersão ou aerossóis de suspensão de pó seco, emulsões ou preparações semi-sólidas. O aerossol pode ser subministrado utilizando qualquer sistema propulsor conhecido dos técnicos especializados. Os aerossóis podem ser aplicados ao tracto respiratório superior, por exemplo por inalação nasal, ou ao tracto respiratório inferior ou aos dois.

Os compostos utilizados nos medicamentos desta invenção podem ser administrados sistémica ou topicamente, dependendo de considerações como por exemplo a situação a ser tratada, a necessidade de tratamento num sítio específico, quantidade de medicamento a ser administrado e considerações idênticas.

Qualquer formação tópica comum pode ser empregue como por exemplo uma solução, uma suspensão, um gel, uma pomada ou um bálsamo. A preparação destas formulações tópicos estão descritas e exemplificadas na técnica de formulações farmacêuticas, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Sciences. Para a aplicação tópica, estes compostos poderão também ser administrados como um pó ou pulverização, particularmente em forma de aerossol. O ingrediente activo pode ser administrado nas composições farmacêuticas adaptadas à administração sistémica. Como é sabido, se um medicamento tem de ser administrado sistemicamente, este pode ser preparado como um pó, pílula, pastilha ou como um xarope ou elixir para a administração oral. Para a administração intravenosa, intraperitoneal ou intralesional, o composto será preparado como uma solução ou suspensão que possa ser administrado por injecção. Nalguns casos, pode ser útil formular estes compostos

em forma de supositório ou como uma formulação de libertação prolongada para depositar debaixo da pele ou com injeção intramuscular.

Uma quantidade eficaz de uma composição ou agente nele contido é aquela quantidade que reduzirá, diminuirá ou reduzirá a activação, função, estabilidade ou síntese da mucina. As composições ou agentes preferidos, reduzem, diminuem ou descem a activação, função, estabilidade, ou síntese da mucina dependente do canal de cloreto, incluindo a activação, a função, a estabilidade, ou a síntese da mucina dependente do canal de cloreto ICACC. Uma quantidade eficaz dada variará com cada situação e nalguns casos pode variar com a severidade da doença a ser tratada e com a sensibilidade do doente ao tratamento. Consequentemente, uma quantidade eficaz dada será melhor determinada no momento e lugar através da experimentação de rotina. No entanto, antecipamos que no tratamento de doenças pulmonares obstrutivas crónicas de acordo com a presente invenção, a formulação contém entre 0,001 e 5 por cento em peso, preferencialmente 0,01 a 1%, habitualmente constituirá uma quantidade terapeuticamente eficaz. Quando é administrado sistemicamente, uma quantidade entre 0,01 e 100 mg por kg de massa corporal ao dia, ainda que preferencialmente de 0,1 a 10 mg/kg/dia, na maioria dos casos produzirá um resultado terapêutico.

Quando é administrada por inalação, uma quantidade entre 0,01 e 100 mg por kg de massa corporal ao dia, ainda que preferencialmente de 0,10 a 10 mg/kg/dia, na maioria dos casos produzirá um resultado terapêutico. Nalguns casos, uma unidade de aerossol dosificada contém 0,8 mg de talniflumato. Nesta formulação, a dose de manutenção para um adulto é aproximadamente de 2 inalações (1,6 mg) duas vezes ao dia (3,2 mg).

A invenção inclui também composições farmacêuticas que compreendem os compostos da invenção juntamente com um suporte aceite na Indústria Farmacêutica. Os suportes aceites na Indústria Farmacêutica podem ser líquidos estéreis, como por exemplo água e óleos, incluindo os de origem petrolífera, animal, vegetal ou sintético, como por exemplo o óleo de amendoim, o óleo de soja, o óleo mineral, o óleo de sésamo e outros. A água é um suporte preferido quando a composição farmacêutica é administrada por via intravenosa ou por inalação. Também pode ser empregue uma solução salina ou um tampão de fosfato salino como suportes, particularmente para a inalação por aerossóis. Podem também ser empregues soluções salinas com lactato e soluções de dextrose aquosa e de glicerina como suportes líquidos, particularmente para soluções injectáveis. Os suportes farmacêuticos adequados estão descritos em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, 1995.

Além do agente farmacologicamente activo, as composições da presente invenção podem conter suportes adequados aceites na Indústria Farmacêutica compreendendo excipientes e auxiliares que facilitem o processamento dos compostos activos nas preparações que possam ser farmacêuticamente utilizadas para administrar no lugar de acção. As formulações adequadas para a administração parenteral incluem soluções aquosas dos compostos activos na forma hidrossolúvel, por exemplo, sais hidrossolúveis. Além de que, podem ser administradas suspensões dos compostos activos como suspensões de injeção de óleo apropriadas. Os solventes ou veículos lipofílicos adequados incluem óleos gordos, por exemplo, óleo de sésamo, ou ésteres de ácido gordo sintético, por exemplo, oleato de etilo ou triglicérides. As suspensões aquosas para injeção podem conter substâncias que aumentem a viscosidade da suspensão incluindo, por exemplo, carboximetilcelulose de sódio, sorbitol e/ou dextrano. Opcionalmente, a suspensão pode conter também estabilizadores como o acima descrito. Também podem ser

utilizadas lipossomas para encapsular o agente a subministrar na célula.

A formulação farmacêutica para a administração sistémica de acordo com a invenção pode ser formulada para a administração entérica, parenteral ou tópica. De facto, estes três tipos de formulações podem ser utilizadas simultaneamente para obter a administração sistémica da substância activa.

As formulações adequadas para a administração oral incluem cápsulas de gelatina duras ou moles, pílulas, comprimidos, incluindo comprimidos revestidos, elixires, suspensões, xaropes ou inalações e formas de libertação controlada das mesmas. As formulações adequadas para a inalação oral ou para a inalação nasal incluem soluções aquosas com ou sem excipientes bem conhecidas na técnica.

Colocando em prática a presente invenção esta pode empregar os termos e as técnicas habituais de biologia molecular, farmacologia, imunologia e bioquímica geralmente conhecidos dos técnicos especializados. Ver por exemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1985.

Sem mais descrição, pensamos que um técnico especializado, utilizando a descrição anterior e os seguintes exemplos ilustrativos, pode fazer e utilizar os compostos da presente invenção e pôr em prática os métodos reivindicados. Consequentemente, os seguintes exemplos de trabalho salientam especificamente formas preferidas de realizar a presente invenção.

Exemplos

Exemplo 1: o NFA inibe a produção de mucina por células Caco2 activadas para a produção excessiva de mucina

Foram produzidas e utilizadas células Caco2 activadas que expressam o ARNm de MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5B e MUC5AC para testar os inibidores da produção de mucina. Estas células podem ser coradas para detectar a mucina utilizando corante de ácido periódico com reactivo de Schiff (PAS). Como o mostrado na figura 1, ainda que as células de controlo Caco2 mostraram uma coloração com PAS basal com umas pequenas vesículas de glicoconjugados dispersas (painel A), a activação das células Caco2 aumentou espectacularmente o número e intensidade de glicoconjugados de mucina positivos de PAS (painel B). As células Caco2 activadas foram cultivadas na presença de ácido niflúmico (NFA) ou ácido 4,4'-diisotiocianostilbeno-2,2'-dissulfónico (DIDS). Nas concentrações indicadas (100 μ M para NFA e 300 μ M para DIDS), a coloração com PAS das células Caco2 activadas tratadas com um inibidor revelou significativamente menos glicoconjugados de mucina com coloração positiva em comparação com as células não tratadas (figura 1D em comparação com a figura 1B). Além de que, a ligeira coloração observada nas células do controlo foi também inibida (figura 1C em comparação com a figura 1A). A produção de mucina por células Caco2 activadas poderão também ser inibidas por outros fenamatos como por exemplo o flufenamato (FFA), tolfenamato (TFLA) e parcialmente por mefenamato (MFA) e meclofenamato (MLFA) (figura 2). Os compostos relacionados Naproxen (MMNA) e Sulindac foram ineficazes. Esta menor produção de mucina nas células tratadas com NFA não foi devido às alterações espectaculares da condição fisiológica das células, dado que a sua viabilidade não foi afectada com concentrações ainda mais elevadas de NFA (figura 3). Considerando no seu conjunto, os resultados são consistentes com aqueles medicamentos que inibem a activação epitelial. Além de que, os resultados demonstram claramente um efeito directo do NFA e seus análogos (derivados do ácido fenilntranílico mostrados na figura 11), DIDS, e SIDS na produção excessiva de

muco, que é uma característica identificativa de diversas doenças pulmonares obstrutivas crónicas.

Exemplo 2: o NFA inibe a produção de eotaxina por células Caco2 activadas para a produção excessiva de mucina

Foram produzidas e utilizadas células LHL4 activadas que expressam e segregam eotaxina para testar os inibidores da produção de eotaxina. A eotaxina das células foi ensaiada *in vitro* por uma técnica ELISA bem conhecida na técnica (R&D Systems). Como o mostrado na figura 4, as células LHL4 activadas foram cultivadas em ausência (controlo) ou presença de concentrações cada vez maiores de ácido niflúmico (NFA). Foi observada uma inibição significativa da produção de eotaxina com concentrações cada vez maiores de NFA. Foi observada uma inibição similar com DIDS e SIDS numa experiência idêntica. As células Mad/C3 mostram uma inibição similar da produção de eotaxina por NFA, DIDS, e SIDS. Considerando no seu conjunto, estes resultados demonstram claramente um efeito directo do NFA na produção da eotaxina.

Exemplo 3: Inibição da produção excessiva de mucina nos modelos de murínos da asma por NFA

Foram adquiridos ao Instituto Oncológico Nacional ou aos Laboratórios Jackson (Bar Harbor ME) ratos machos e fêmeas certificados como indemnes de vírus das seguintes cepas, DBA, C57B6 e B6D2F1. Os ratos transgénicos IL-9 (Tg5) e da cepa de origem (FVB), foram obtidos no Instituto Ludwig (Bruxelas, Bélgica). Os animais foram alojados numa instalação de ar passado por um filtro absoluto e foi-lhes deixado livre acesso à comida e à água durante 3 a 7 dias antes da manipulação experimental. As instalações dos animais foram mantidas a 22C e o ciclo de claridade:escuridão foi automaticamente controlado (10:14 horas claridade:escuridão).

Fenotipado e eficácia do tratamento prévio

Os animais ou não receberam tratamento prévio ou foram sensibilizados por aspiração nasal ao antigénio de *Aspergillus fumigatus* para avaliar o efeito do tratamento prévio na hipersensibilidade bronquial, composição do fluido de lavagem broncoalveolar, produção de mucina e IgE no soro. Foi efectuado um teste de estimulação aos ratos com *Aspergillus* ou solução salina por via intranasal (nos dias 0, 7, 14, 21 e 22) e foram fenotipados 24 horas depois da última dose. Os ratos sensibilizados foram tratados nos dias 0 a 21 com PBS assim como com 100 µg de NFA por instilação intratraqueal (IT). A inibição da produção de muco e a expressão da mucina no pulmão foi utilizada para avaliar o efeito do tratamento com NFA, ou poderá ser utilizado para avaliar os efeitos de outros candidatos do medicamento. Para determinar a resposta broncoconstrictora, a pressão do sistema respiratório na traqueia foi medida e foi registada antes e durante a exposição ao medicamento. Os ratos foram anestesiados e instrumentados como o previamente descrito. (Levitt *et al.*, 1988; Levitt & Mitzner, 1989; Kleeberger *et al.*, 1990; Levitt, 1991; Levitt & Ewart; 1995; Ewart *et al.*, 1995). A sensibilidade da via respiratória foi medida em relação a um ou mais do seguinte: 5-hidroxitriptamina, acetilcolina, atracúrio ou um análogo da substância P. Foi utilizada uma medida simples e repetitiva da mudança no valor máximo da pressão inspiratória seguida do teste de estimulação broncoconstrictora que foi denominado Índice do Tempo de Pressão das Vias respiratórias (APTI) (Levitt *et al.*, 1988; Levitt & Mitzner, 1989). O APTI foi avaliado pela mudança no valor máximo da pressão respiratória integrada desde o tempo da injeção até que o valor máximo da pressão regresse à linha base ou patamar. O APTI foi comparável à resistência da via respiratória, no entanto, o APTI inclui um componente adicional relacionado com a recuperação da broncoconstrição.

Antes do sacrifício, recolheu-se o sangue inteiro dos animais anestesiados para as medições do IgE no soro por punção com uma agulha pela veia cava inferior. As amostras foram centrifugadas para separar as células e o soro foi recolhido e utilizado para medir os níveis de IgE totais. As amostras que não foram imediatamente medidas foram congeladas a -20°C .

Todas as amostras de soro IgE foram medidas usando um ensaio ELISA sanduíche para detectar os anticorpos. As placas de microtitulação foram revestidas com $50\ \mu\text{l}$ por poço, com anticorpo IgE anti-murina de rato (Southern Biotechnology) a uma concentração de $2,5\ \mu\text{g/ml}$ num tampão de revestimento de carboneto de sódio-bicarbonato de sódio com azida de sódio. As placas foram cobertas com um revestimento plástico e incubaram durante 16 horas a 4°C . As placas foram lavadas três vezes com um tampão de lavagem de 0,05% Tween-20 num tampão de fosfato salino, incubando durante cinco minutos para cada lavagem. O bloqueio de sítios de ligação não específicos foi realizado adicionando $200\ \mu\text{l}$ por poço de albumina de soro bovino a 5% no tampão de fosfato salino, cobrindo com um revestimento plástico e incubando durante 2 horas a 37°C . Depois de lavar três vezes com tampão de lavagem, a cada poço foram adicionadas amostras de ensaio de $50\ \mu\text{l}$ duplicadas. As amostras de ensaio foram avaliadas depois de terem sido diluídas 1:10, 1:50 e 1:100 com albumina de soro bovino a 5% no tampão de lavagem. Adicionalmente às amostras de ensaio, um conjunto de standards de IgE (PharMingen) foi avaliado a concentrações de 0,8 ng/ml a 200 ng/ml em albumina de soro bovino a 5% em tampão de lavagem, para gerar uma curva standard. Uma placa virgem sem amostra ou standard foi utilizada para pôr a zero o leitor de placas (fundo). Depois de adicionar as mostras e os standards a placa foi coberta com um revestimento plástico e incubada durante 2 horas à temperatura ambiente. Depois de lavar três vezes com um tampão de lavagem, foi adicionado $50\ \mu\text{l}$ de um conjugado de peroxidase para marcar a IgE por peroxidase de rábano silvestre

do anticorpo secundário anti-murina a uma concentração de 250 ng/ml em albumina de soro bovino a 5% em tampão de lavagem. A placa foi coberta com um revestimento plástico e incubado 2 horas à temperatura ambiente. Depois de lavar três vezes com o tampão de lavagem, 100 μ l de substrato 0,5 mg/ml de o-fenilenodiamina foi adicionado em 0,1 M de tampão de citrato a cada poço. Depois de 5 a 10 minutos a reacção foi detida com 50 μ l de ácido sulfúrico a 12,5% e a absorbencia foi medida a 490 nm num leitor de placas MR5000 (Dynatech). Uma curva standard das concentrações de IgE foi construída com a concentração de antigénios no eixo X (escala log) e absorbencia no eixo Y (escala linear). A concentração de IgE nas amostras foi interpolada da curva standard.

Foi realizada uma lavagem broncoalveolar (LBA) e uma análise celular como o anteriormente descrito (Kleeberger *et al.*, 1990). A histologia pulmonar foi realizada depois de os pulmões terem sido cheios com fixador *in situ* e colocados em formaldeído, ou depois de os ter extraído e congelado imediatamente em nitrogénio líquido. Dado que a instrumentação anterior pode induzir a erros, animais separados serão utilizados para estes estudos. Assim, um pequeno grupo de animais foi tratado em paralelo exactamente da mesma forma que o grupo que recebeu vários tratamentos prévios excepto que estes animais não foram utilizados para outros ensaios além do ensaio à sensibilidade bronquial. Depois de ensaiar a sensibilidade bronquial, os pulmões foram extraídos e foram submergidos em nitrogénio líquido como o acima indicado. O crio-seccionamento, a coloração e o exame histológico foram realizados de uma maneira óbvia para os técnicos especializados.

O NFA foi utilizado terapêuticamente, que bloqueia a activação das células epiteliais e reduz a produção de mucina e eotaxina *in vitro*, para avaliar a importância da activação das células epiteliais *in vivo* na produção de mucina induzida por

antigénios, sensibilidade bronquial, IgE em soro e inflamação da via respiratória como o avaliado por LBA em ratos. Foram determinados os efeitos do tratamento com NFA na sensibilidade da via respiratória, LBA, produção de muco, e níveis de IgE em soro relativo aos controlos correspondentes tratados com veículo. As figuras 5 e 6 mostram que o NFA é capaz de suprimir a hipersensibilidade da via respiratória e a eosinofilia pulmonar por LBA respectivamente, no entanto, não foi produzido nenhum efeito nos níveis de IgE em soro. Além de que o NFA poderá suprimir também a produção excessiva de muco no pulmão provocado pela exposição a antigénios (figura 7).

Exemplo 4: a activação epitelial por IL9 num rato transgénico produz a produção excessiva de muco e a expressão genética da mucina. Um modelo para a selecção do medicamento.

Nos nossos laboratórios foram criados ratos transgénicos IL9 machos e fêmeas certificados como indemnes de vírus (IL9TG5-FVB/N) de 5 a 6 semanas de idade. Os ratos machos e fêmeas FVB/N de 5 a 6 semanas de idade foram adquiridos aos Laboratórios Jackson (Bar Harbor ME). Os animais foram alojados numa instalação de ar passado por um filtro absoluto e foi-lhes deixado livre acesso à comida e à água durante 3 a 7 dias antes da manipulação experimental. As instalações dos animais foram mantidas a 22°C e o ciclo de claridade:escuridão foi automaticamente controlado (10:14 horas claridade:escuridão).

Fenotipado e eficácia do tratamento.

Os animais foram fenotipados antes de receber algum ou 24 horas depois de receber um pseudotratamento (veículo) intratraqueal (IT), ou medicamentos no mesmo veículo como o que foi utilizado nos controlos tratados identicamente. Os ratos foram tratados IT uma vez ao dia durante três dias. O NFA (100 µg) ou anticorpo para IL-9 foram administrados em PBS IT. As respostas ao

tratamento foram medidas avaliando a inibição da mucina por exame histológico (Coloração de PAS superior a 10 secções dos pulmões tratadas e do controlo ou transferências proteicas Western de expressão de MUC1, MUC2 e MUC3 dos mesmos pulmões. A figura 8 mostra que os ratos transgénicos IL-9 constitutivamente produzem de maneira excessiva mucina em comparação com os ratos FVB de controlo. Uma redução dos altos níveis de produção de mucina constitutiva que se dá no transgénico IL9 asmático (figura 8) (controlo com veículo e simpes) a níveis comparáveis à produção de mucina de linha base mais baixa encontrada nos pulmões FVB/N (controlo positivo normal) foi considerado significativo para qualquer medicamento. A expressão da produção de muco no transgénico IL9 está especificamente associado a uns maiores níveis de ARNm estáveis de MUC2 e MUC5AC como foi demonstrado pela reacção em cadeia da polimerase com transcrição reversa RT-PCR (figura 9).

Foi mostrado que o anticorpo IL-9 de neutralização produz uma redução significativa da produção de mucina nos pulmões de transgénicos IL9 (figura 10). O NFA também diminuiu a produção de mucina neste modelo.

Exemplo 5: Inibição da produção excessiva de mucina nos modelos murinos de asma por talniflumato.

Os ratos machos certificados indemnes de vírus B6D2F1 de 5 a 6 semanas de idade foram adquiridos nos Laboratórios Jackson (Bar Harbor ME). Os animais foram alojados em instalações com ar passado por um filtro absoluto e foi-lhes deixado livre acesso à comida e à água 5 a 7 dias antes da manipulação experimental. As instalações dos animais foram mantidas a 22°C e o ciclo de claridade:escuridão foi automaticamente controlado (12:12 horas de claridade:escuridão).

Fenotipado e eficácia do tratamento

Os animais foram alimentados *ad libitum* com comida para ratos mouse chow contendo talniflumato ou com comida para ratos mouse chow normal. Os animais receberam ou não tratamento prévio ou foram sensibilizados por aspiração nasal de antigénio de *Aspergillus fumigatus* para avaliar o efeito do pré-tratamento na hipersensibilidade bronquial, composição do fluido de lavagem broncoalveolar, produção de mucina e IgE em soro. Aos ratos com *Aspergillus* foi-lhes feito um teste de estimulação (nos dias 0, 7, 16 e 17) e foram fenotipados 24 horas após última dose. Foi utilizada a inibição da produção de muco no pulmão para avaliar o efeito do tratamento com talniflumato, ou poderá ser utilizada para avaliar os efeitos do tratamento com outros candidatos do medicamento. Para determinar a resposta broncoconstrictora, a pressão do sistema respiratório na traqueia foi medida e foi registada antes e durante a exposição ao medicamento. Os ratos foram anestesiados e instrumentados como o anteriormente descrito. (Levitt *et al.*, 1988; Levitt & Mitzner, 1989; Kleeberger *et al.*, 1990; Levitt, 1991; Levitt & Ewart, 1995; Ewart *et al.*, 1995). Foi medida a sensibilidade da via respiratória relativa a um ou mais de o seguinte: 5-hidroxitriptamina, acetilcolina, atracúrio ou um análogo da substância P. Foi utilizada uma medida simples e repetitiva da mudança no valor máximo da pressão inspiratória seguida do teste de estimulação broncoconstrictora que foi denominado Índice do Tempo de Pressão da Via Respiratória (APTI) (Levitt *et al.*, 1988; Levitt & Mitzner; 1989). O APTI foi avaliado pela mudança no valor máximo da pressão respiratória integrada desde o tempo de injeção até que o valor máximo da pressão regressa à linha base ou patamar. O APTI foi comparável à resistência da via respiratória, no entanto, o APTI inclui um componente adicional relacionado com a recuperação da broncoconstrição. Foi realizada uma lavagem broncoalveolar (LBA) e uma análise celular como o anteriormente descrito (Kleeberger *et al.*, 1990). A histologia pulmonar foi realizada depois de recolher os pulmões e de os imediatamente congelar em nitrogénio líquido. Após o teste de sensibilidade bronquial, os pulmões foram extraídos e

submergidos em nitrogénio líquido como o acima indicado. Foi realizado o crio-seccionamento, a coloração e o exame histológico de uma maneira óbvia para os técnicos especializados. As respostas ao tratamento foram medidas pela valoração da inibição da mucina por exame histológico (Coloração de PAS dos pulmões de controlo e dos tratados).

O tratamento oral com talniflumato reduziu a coloração da mucina. A figura 15A mostra a Coloração de PAS num pulmão de rato obtido de ratos Asp-sens que foram alimentados com comida para ratos mouse chow normal. A figura 15B mostra os resultados obtidos dos ratos Asp-sens alimentados com comida para ratos mouse chow contendo talniflumato. A figura 16 mostra os resultados da alimentação com comida para ratos mouse chow coberta com talniflumato na eosinofilia pulmonar determinada por lavagem broncoalveolar. O talniflumato reduziu o número de células eosinofílicas obtidas de ratos sensibilizados ao *Aspergillus fumigatus* em comparação com os ratos sensibilizados alimentados com comida para ratos mouse chow standard.

Exemplo 6: a super-expressão de ICACC-1 nas linhas de células epiteliais que aumenta a produção de mucina

As células NCI-H292, uma linha celular de carcinoma mucoepidermoide pulmonar humana foram adquiridas à American Type Culture Collection (Manassas VA) e cultivadas num meio RPMI1640 complementado com 10% de FBS e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco/BRL). As células cresceram numa incubadora que continha ar húmido, complementado com 5% de CO₂ a 37°C. Foram estabelecidas linhas celulares estáveis NCI-H292 da super-expressão de hICACC-1 por transfecção de ADNc 3- hICACC-1 usando um kit de transfecção Fujin de acordo com as instruções do fabricante (Boehringer-Mannheim). Foi produzida uma linha celular de controlo, NCI-H292/ctl, pela transfecção de ADNpc 3 (ctl) na linha celular NCI-H292 utilizando o mesmo procedimento.

A expressão do gene hICACC-1 foi confirmada para o transfectante ADNpc 3-hICACC-1 por análise Northern.

Para o ensaio ELLA (ensaio de lectina ligada a uma enzima específica), as células foram colocadas nas placas de cultivo de tecido de 24 poços e incubadas durante 72 horas até à confluência. Os sobrenadantes foram transferidos a placas de 96 poços previamente cobertas com 1 µg/ml de anticorpo anti-MUC5A/C (New marker, Fremont CA) e bloqueadas com 1 % de BSA. O anticorpo ligado MUC5A/C foi seguidamente detectado com HRP-lectina (Sigma).

Para a RT-PCR total o ARN foi isolado das linhas celulares utilizando o reagente Trizol (Gibco/BRL) seguindo o protocolo do fabricante. A RT-PCR foi realizada por transcrição inversa de 1 µg de ARN total e amplificando o ADNc com os iniciados apropriados por PCR. Os produtos foram separados por electrofórese em 2% de gel de agarose e visualizados por coloração com brometo de etídio. Os pares do iniciador utilizados para gerar a mensagem ICACC-1 humano foram: 5'-GGCACAGATCTTTTCATTGCTA-3' sentido e 5'-GTGAATGCCAGGAATGGTGCT-3' antisentido o que deu um produto de 182 pares de bases. Os pares de iniciadores utilizados para gerar mensagens de mucina estão relacionados no quadro 1.

Quadro 1 (os números entre parêntesis referem-se à posição do oligonucleotídeo contido no ADNc publicado).

Gene (Entrada #)	Iniciador sentido (5' - 3')	Iniciador de inversão (5' - 3')
HMUC1 (J05582)	GCCAGTAGCACTCACCATAGCTCG (3113-3136)	CTGACAGACAGCCAAGGCAATGAG (3627- 3605)
HMUC5AC (AF015521)	GTGGAACCACGATGACAGC (610-629)	TCAGCACATAGCTGCAGTCG (1428-1408)
HPMS2 (U13696)	GGACGAGAAGTATAACTTCGAG (2133-2154)	CATCTCGCTTGTGTTAAGAGC (2505-2485)

As células NCI-H292 expressam MUC1 constitutivamente, enquanto que a expressão de ARNm de MUC2 e MUC5A/C estão por debaixo de os níveis de detecção na linha base. A figura 12A mostra os resultados de uma análise de transferência de Northern de células transfectadas ANDpc3-hICACC-1 que mostram um maior nível de expressão para ARNm ICACC. A análise de transferência Western de lisado celular completo a partir de clones que super-expressam ICACC-1 revelou uma produção acentuada da proteína MUC2 (figura 12B). A expressão de MUC5A/C aumentou significativamente nas células de super-expressão ICACC-1, enquanto que MUC1 não variou na análise RT-PCR (figura 12C). A análise específica ELLA também revelou a produção excessiva de proteína MUC5A/C nos clones de super-expressão ICACC-1 em comparação com as células não transfectadas NCI-H292 ou as células transfectadas com o vector vazio (figura 12D).

Exemplo 7: Inibição da super-produção de muco e expressão de MUC 5A/C nas células NCI-H292 de super-expressão de hICACC-1

Para a determinação da produção do glicoconjugado mucoso, células NCI-H292/ctl e NCI-H292/hICACC-1 (AAF 15) foram cultivadas em placas de 24 poços durante 3 dias. As células foram seguidamente fixadas com formaldeído e os glicoconjugados mucosos foram visualizados por coloração AB/PAS (Sigma). Ainda que as células de controlo NCI-H292 mostraram uma coloração por PAS basal com alguns poucos grânulos dispersos (figura 13A), a super-expressão de ICACC-1 aumentou espectacularmente o número e intensidade de muco-glicoconjugados positivos por PAS (figura 13B). Para os estudos do bloqueio do canal de cloreto, as células em presença de ácido niflúmico (NFA) (Sigma) foram cultivadas a uma concentração de 100 μM , ácido mefanámico (MFA) a 125 ou 250 μM ou talniflumato a 12, 5, 25 ou 50 μM , ou meios sozinhos. A coloração por PAS das células tratadas com NFA, MFA ou talniflumato revelou significativamente poucos muco-glicoconjugados coloridos positivos em comparação com as células

não tratadas (figuras 13C e 13D e inserto da figura 14). A coloração por PAS das células do controlo tratadas com inibidor não mostrou praticamente nenhuma diferença com as células não tratadas (figuras 13A e 13C).

Os valores IC_{50} para talniflumato (figura 14), Nimesulida (referência figura 17) e MSI-2079 (figura 18, a estrutura de MSI-2079 é mostrada na figura 19 referência) foram determinados com base da sua inibição da secreção de MUC5A/C nas células H292 de expressão de hCLCA1. As células confluentes foram tratadas com o inibidor a concentrações de 0 a 250 μ M em OPTI MEM. O MUC5A/C segregado foi detectado quarenta e oito horas depois de o inibidor ter sido adicionado por um ensaio ELLA como o descrito no exemplo 5. Os valores IC_{50} foram determinados com o software de análise de dados GraphPad Prism. O inserto da figura 14 mostra os níveis da mucina intracelular em resposta ao tratamento com talniflumato detectado por coloração por PAS.

REFERÊNCIAS

- Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, Ebina M and Takishima T. Marked goblet cell hyperplastic with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest*, 101, 916-21, 1992.
- Alexander AG, Barnes NC and Kay AB. Trial of cyclosporin in corticosteroid-dependent chronic severe asthma. *Lancet* 339, 324-328, 1992.
- Basle, R., Roche, W. R., Roberts, J. A., and Holgate, S. T. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am Rev Respir Dis* 139, 806-17, 1989.
- Borchers MT, Wesselkamper S, Wert SE, Shapiro SD and Leikauf GD. Monocyte inflammation augments acrolein- induced Muc5ac expression in mouse lung. *Am J Physiol*, 277(3 Pt 1), L489-97, 1999.
- Bosque, J., Chanez, P., Lacoste, J. Y., Barneon, G., Ghavanian, N., Enander, I., Venge, P., Ahlstedt, S., Simony- Lafontaine, J., Godard, P., and et al. Eosinophilic inflammation in asthma [ver comentarios]. *N Engl J Med* 323, 1033-9, 1990.
- Burrows B, Sears MR, Flannery EM, Herbison GP and Holdaway MD. Relationship of bronchial responsiveness assessed by methacholine to serum IgE, lung function, symptoms and diagnoses in 11-year-old New Zealand children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 90, 376-385, 1992.
- Burrows B, Martinez FD, Halonen M, Barbee RA and Cline MG. Association of asthma with serum IgE levels and skin- test reactivity to allergens. *New Eng. J. Med.* 320, 271-277, 1989.
- Cardell BS and Pearson RSB. Death in asthmatics. *Thorax* 14, 341-52, 1959.
- Chu JW and Sharom FJ. Glycophorin A interacts with interleukin-2 and inhibits interleukin-2-dependent T-lymphocyte proliferation. *Cell. Immunol.* 145, 223-239, 1992.
- Clifford RD, Pugsley A, Radford M and Holgate ST. Symptoms, atopy and bronchial response to methacholine in parents with asthma and their children. *Arch. Dis. Childhood* 62, 66-73, 1987.
- Cutz E, Levison H and Cooper DM. Ultrastructure of airways in children with asthma. *Histopathology*, 2, 407-21, 1978.
- Dugas B, Renauld JC, Pene J, Bonnefoy J, Peti-Frere C, Braquet P, Bosque J, Van Snick J, Mencia-Huerta JM. Interleukin-9 potentiates

the interleukin-4-induced immunoglobulin (IgG, IgM and IgE) production by normal human B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 23, 1687-1692, 1993.

Dunnill MS. The pathology of asthma, with special reference to changes in the bronchial mucosa. *J Clin Invest*, 13, 27- 33, 1960.

Dunnill MS, Massarella GR and Anderson JA. A comparison of the quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in asthmaticus, in chronic bronchitis, and in emphysema. *Thorax*, 24, 176-9, 1969.

Eklund KK, Ghildyal N, Austen KF and Stevens RL. Induction by IL-9 and suppression by IL-3 and IL-4 of the levels of chromosome 14-derived transcripts that encode late-expressed mouse mast cell proteases. *J. Immunol.* 151, 4266- 4273, 1993.

Eng PA, Morton J, Douglass JA, Riedler J, Wilson J and Robertson CF. Short-term efficacy of ultrasonically nebulized hypertonic saline in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 21, 77-83, 1996.

Earle BV. Fatal bronchial asthma. *Thorax* 8, 195-206, 1953.

Ewart S, Levitt RC and Mitzner W. Respiratory system mechanics in mice measured by end-inflation occlusion. *J. Appl. Phys.* 79, 560-566, 1995.

Gergen PJ and Weiss KB. The increasing problem of asthma in the United States. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146, 823-824, 1992.

Gergen PJ. The association of allergen skin test reactivity and respiratory disease among whites in the U.S. population. *Arch. Intern. Med.* 151. 487-492, 1991.

Glynn AA and Michaels L. Bronchial biopsy in chronic bronchitis and asthma. *Thorax*, 15, 142-53, 1960.

Holgate, S. T., Lackie, P. M., Davies, D. E., Roche, W. R., and Walls, A. F. The bronchial epithelium as a key regulator of airway inflammation and remodeling in asthma. *Clin Exp Allergy* 29 Suppl 2, 90-5, 1999.

Halonen M, Stem D, Taussig LM, Wright A, Ray CG and Martinez FD. The predictive relationship between serum IgE levels at birth and subsequent incidences of lower respiratory illnesses and eczema in infants. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146, 666-670, 1992.

Jeffery PK. Morphology of the airway wall in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis*, 143, 1152-8, 1991.

Kleeberger SR, Bassett DJ, Jakab GJ and Levitt RC. A genetic model for evaluation of susceptibility to ozone-induced inflammation. *Am. J. Physiol.* 258, L313-320, 1990.

Levitt RC and Ewart SL. Genetic susceptibility to atracurium-induced bronchoconstriction. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 151, 1537-1542, 1995.

Levitt RC. Understanding biological variability in susceptibility to respiratory disease. *Pharmacogenetics* 1, 94-97, 1991.

Levitt RC and Mitzner W. Autosomal recessive inheritance of airway hyper-reactivity to 5-hydroxytryptamine. *J. Appl. Physiol.* 67, 1125-1132, 1989.

Levitt RC, Mitzner W *et al.* Expression of airway hyper-reactivity to acetylcholine as a simple autosomal recessive trait in mice. *FASEB J.* 2, 2605-2608, 1988.

Louahed J, Kermouni A, Van Snick J and Renauld JC. IL-9 induces expression of granzymes and high affinity IgE receptor in murine T helper clones. *J. Immunol.* 154, 5061-5070, 1995.

Louahed J, Toda M, Jen J, Hamid Q, Renauld JC, Levitt RC and Nicolaidis NC. Interleukin-9 up-regulates mucus expression in the airways. Accepted in *The American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 12/21/99.

Marsh DG, Meyers D A and Bias WB. The epidemiology and genetics of atopic allergy. *New Eng. J. Med.* 305, 1551- 1559, 1982.

Molinoff P *et al.*, Goodman and Gilman's *The Pharmacologic Basis of Therapeutics*, Editorial MacMillan, New York NY, 1995.

McLane MP, Tepper J, Weiss C, Tomer Y, Taylor RE, Tumas D, Zhou Y, Haczku A, Nicolaidis NC and Levitt, RC. Lung delivery of an Interleukin-9 antibody treatment inhibits airway hyper-responsiveness (AHR), LBA eosinophilia, mucin production and serum IgE elevation to natural antigens in a murine model of asthma. Resumen del congreso AAAAI: 3/3- 3/8/2000 en San Diego, CA y del congreso ATS/ALA: 5/5/2000 en Toronto, Canada.

Paillassé, R. The relationship between airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness. *Clin Exp Allergy* 19, 395-8, 1989.

Petit-Frère C, Dugas B, Braquet P, Mencia-Huerta JM. Interleukin-9 potentiates the interleukin-4-induced IgE and IgG1 release from murine B lymphocytes. *Immunology* 79,146-151,1993.

Polito, A. J., and Proud, D. Epithelia cells as regulators of airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 102, 714-8, 1998.

Salvato G. Some histologic changes in chronic bronchitis and asthma. Thorax, 23, 168-72, 1968.

Sears MR, Burrows B, Flannery EM, Herbison GP, Hewitt CJ and Holdaway MD. Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children. New Engl. J. Med. 325(15), 1067-1071, 1991.

Takahashi K, Mizuno H, Ohno H, Kai H, Isohama Y, Takahama K, Nagaoka and Miyata T. Effects of SS320A, a new cysteine derivative, on the change in the number of goblet cells induced by isoproterenol in rat tracheal epithelium. Jpn J Pharmacol, 77, 71-77, 1998.

Takizawa, H. Airway epithelial cells as regulators of airway inflammation (Review). Int J Mol Med 1, 367-78, 1998.

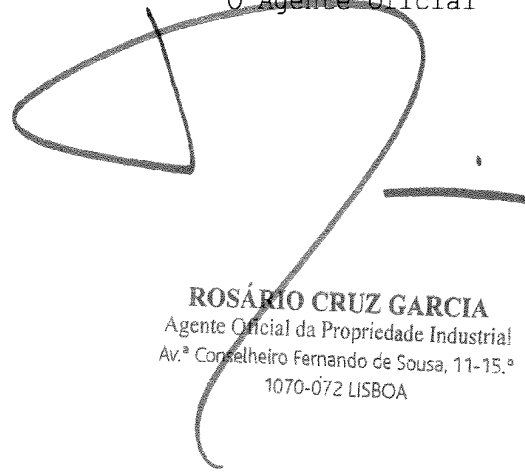
Temann, U. A., Geba, G. P., Rankin, J. A., and Flavell, R. A. Expression of interleukin 9 in the lungs of transgenic mice causes airway inflammation, mast cell hyperplasia, and bronchial hyperresponsiveness. J Exp Med 188, 1307-20, 1998.

Voynow JA and Rose MC. Quantitation of mucin mRNA in respiratory and intestinal epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol, 11, 742-750, 1994.

Voynow JA, Young LR, Wang Y, Horger T, Rose MC and Fischer BM. Neutrophil elastase increases MUC5AC mRNA and protein expression in respiratory epithelial cells. Am J Physiol, 276(5 Pt 1), L835-43, 1999.

Lisboa, 4 de Junho de 2007.

Pela Requerente
O Agente Oficial



ROSÁRIO CRUZ GARCIA
Agente Oficial da Propriedade Industrial
Av.ª Conselheiro Fernando de Sousa, 11-15.º
1070-072 LISBOA

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de uma composição para a produção de um medicamento para o tratamento da produção excessiva de mucina associada a uma doença do tracto respiratório seleccionada do grupo composto por doença pulmonar obstrutiva crónica (EPOC), doença pulmonar inflamatória, fibrose quística e doença infecciosa aguda ou crónica; ou uma doença do tracto gastrointestinal associado a uma fibrose quística seleccionada do grupo composto por síndrome de má absorção, esteatorreia e diarreia num indivíduo, **caracterizada por** a composição compreender talniflumato ou um seu sal aceite na Indústria farmacêutica.

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** a EPOC ser seleccionada do grupo composto por enfisema, bronquite crónica e asma.

3. Utilização de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** o estado de doença ser o resultado de uma resposta induzida num pulmão por antigénios.

4. Utilização de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada por** a resposta induzida por antigénios ser seleccionada do grupo composto por hipersensibilidade bronquial, eosinofilia e contagem elevada de células na lavagem bronquial, IgE elevado em soro, alterações histológicas associadas à inflamação e à hiperplasia de células caliciformes e células da glândula submucosa associada à produção excessiva de muco.

5. A utilização de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** a produção de mucina ser dependente do canal de cloreto.
6. A utilização de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada por** o canal de cloreto ser um canal de cloreto ICACC.
7. A utilização de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** a composição inibir uma enzima ciclooxygenase.
8. A utilização de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada por** a enzima ciclooxygenase ser ciclooxygenase 2.
9. A utilização de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** a composição ser administrada ao indivíduo topicamente, oralmente, parenteralmente ou por inalação.
10. A utilização de acordo com a reivindicação 9, **caracterizada por** a composição administrada topicamente ser uma solução, suspensão, gel, pomada ou bálsamo.
11. A utilização de acordo com a reivindicação 9, **caracterizada por** a composição administrada oralmente ser uma pastilha, uma cápsula, um xarope ou um elixir.
12. A utilização de acordo com a reivindicação 9, **caracterizada por** a composição administrada parenteralmente ser dada por via intravenosa, intraperitoneal, intralesional, subcutânea ou intramuscular.
13. A utilização de acordo com a reivindicação 9, **caracterizada por** a composição inalada estar em forma de líquido ou de pó.
14. A utilização de acordo com a reivindicação 13, **caracterizada por** a composição inalada estar na forma de um aerossol.

15. A utilização de acordo com a reivindicação 13, **caracterizada por** a composição inalada ser administrada por inalador dosificado.

16. A utilização de acordo com a reivindicação 9, **caracterizada por** a composição ser administrada numa quantidade de 0,01 mg/kg/dia a 100 mg/kg/dia.

17. A utilização de acordo com reivindicação 16, **caracterizada por** a composição ser administrada numa quantidade de 0,10 mg/kg/dia a 10 mg/kg/dia.

18. A utilização de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** a composição adicionalmente compreender pelo menos um agente terapêutico adicional.

19. A utilização de acordo com a reivindicação 18, **caracterizada por** pelo menos um agente terapêutico adicional ser seleccionado do grupo composto por um agente antiasmático, um expectorante, um mucolítico, um antibiótico anti-histamínico, um descongestionante, um agonista adrenorreceptor beta e um agonista receptor de purina.

20. A utilização de acordo com a reivindicação 19, **caracterizada por** o expectorante ser a guaifenesina.

21. A utilização de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** a composição adicionalmente compreender pelo menos um elemento seleccionado do grupo composto por um agente tensioactivo, intensificador da absorção, agente estabilizante, agente aromatizante e suporte aceite na Indústria Farmacêutica.

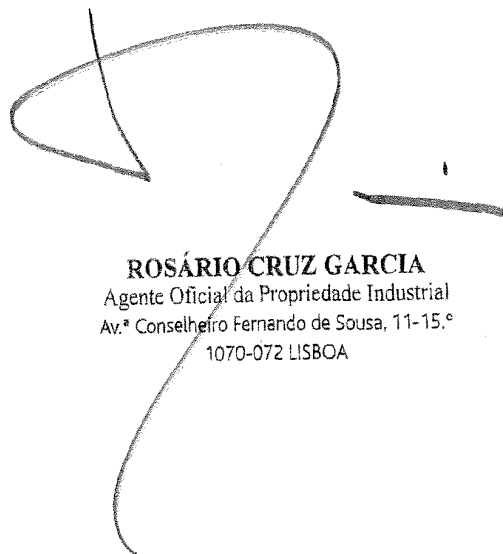
22. A utilização de acordo com a reivindicação 21, **caracterizada por** o agente estabilizante ser o ciclodextrano.

23. A utilização de acordo com a reivindicação 21, **caracterizada por** o intensificador da absorção ser o quitosano.

24. A utilização de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** o indivíduo ser um humano.

Lisboa, 4 de Junho de 2007.

Pela Requerente
O Agente Oficial



ROSÁRIO CRUZ GARCIA
Agente Oficial da Propriedade Industrial
Av.ª Conselheiro Fernando de Sousa, 11-15.º
1070-072 LISBOA

Caco2 de control

Caco2 activadas

Meio

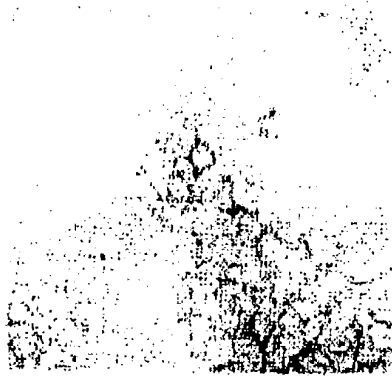


FIG. 1A

FIG. 1B

NFA

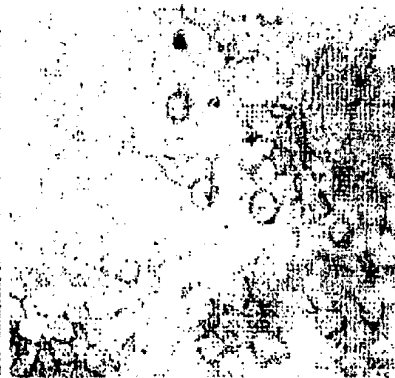
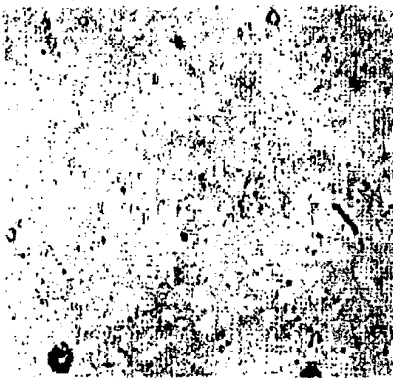
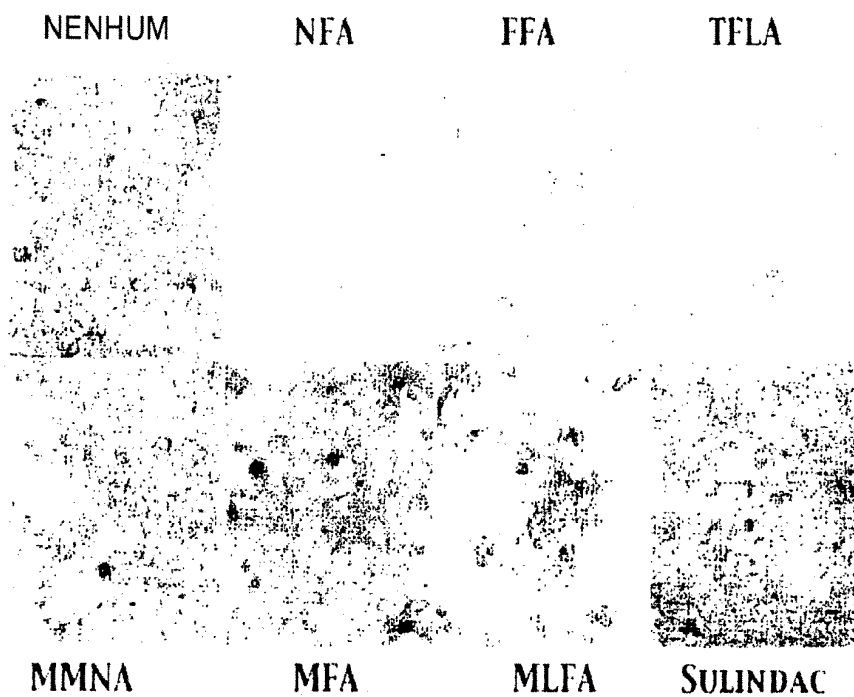


FIG. 1C

FIG. 1D



DOSAGEM DOS COMPOSTOS A 100 μ M

FIG. 2

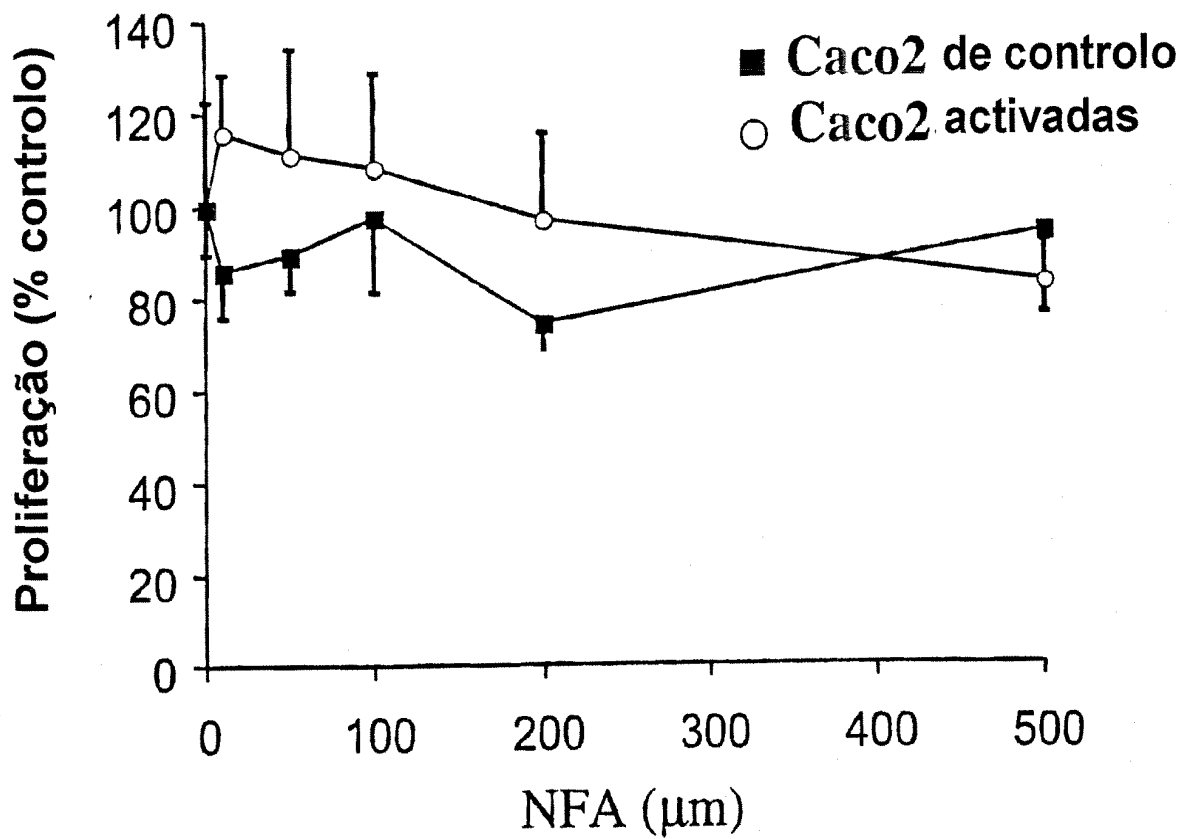


FIG. 3

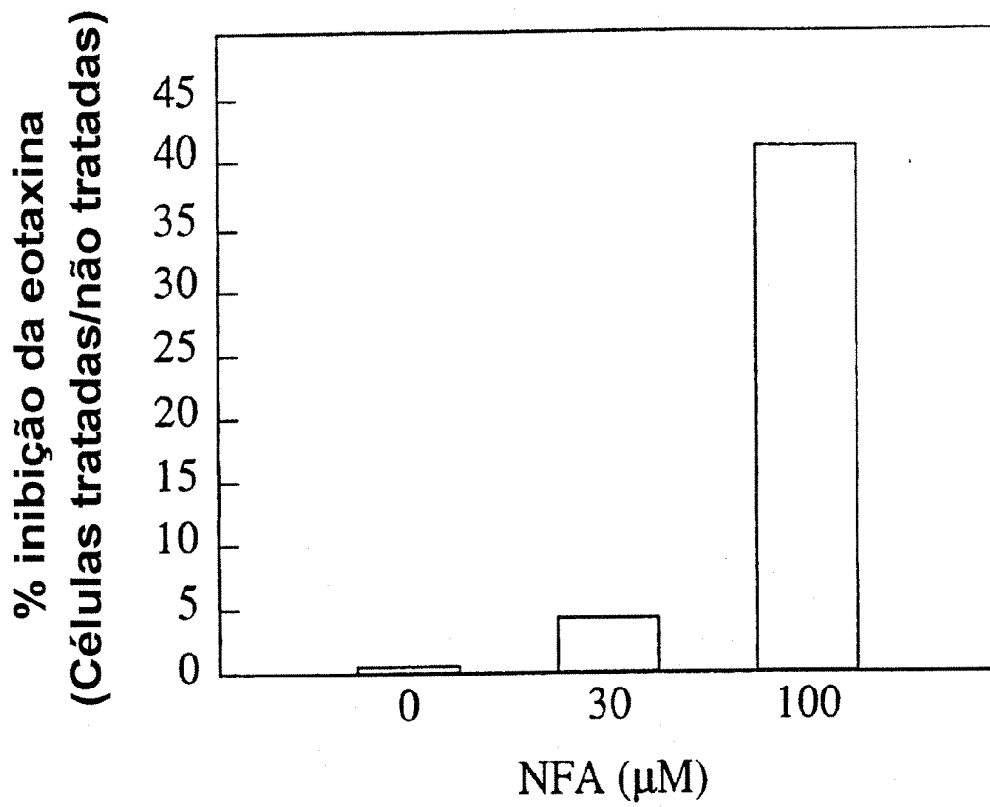


FIG. 4

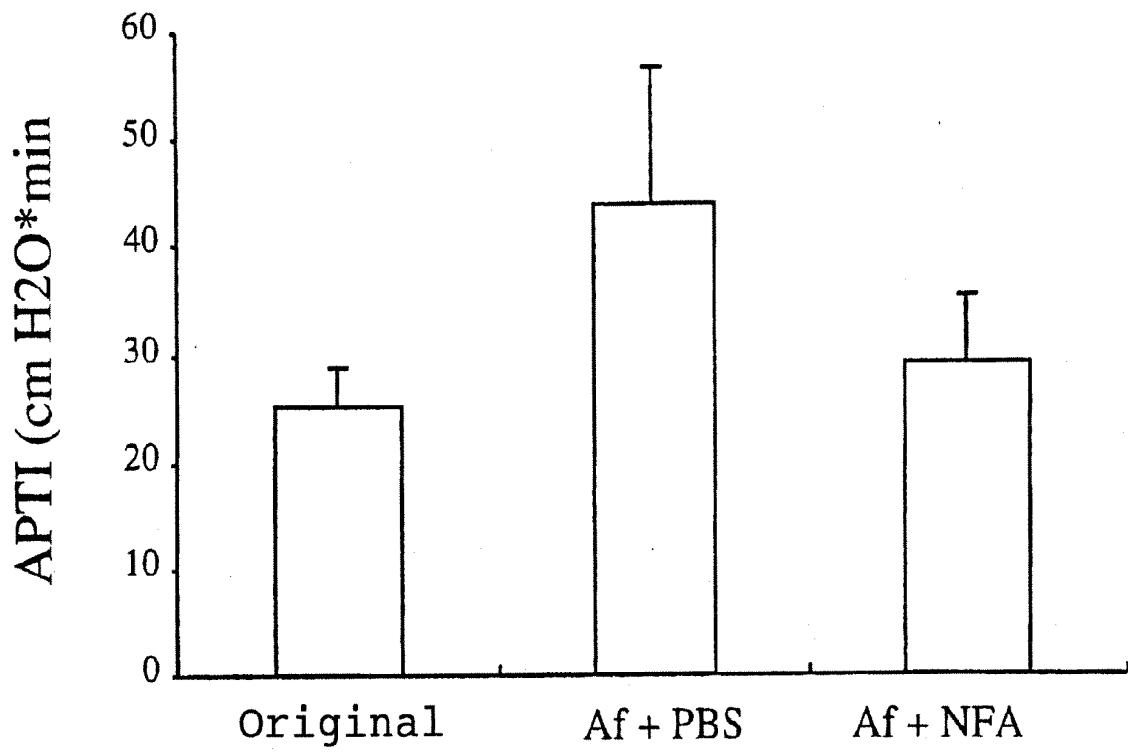


FIG. 5

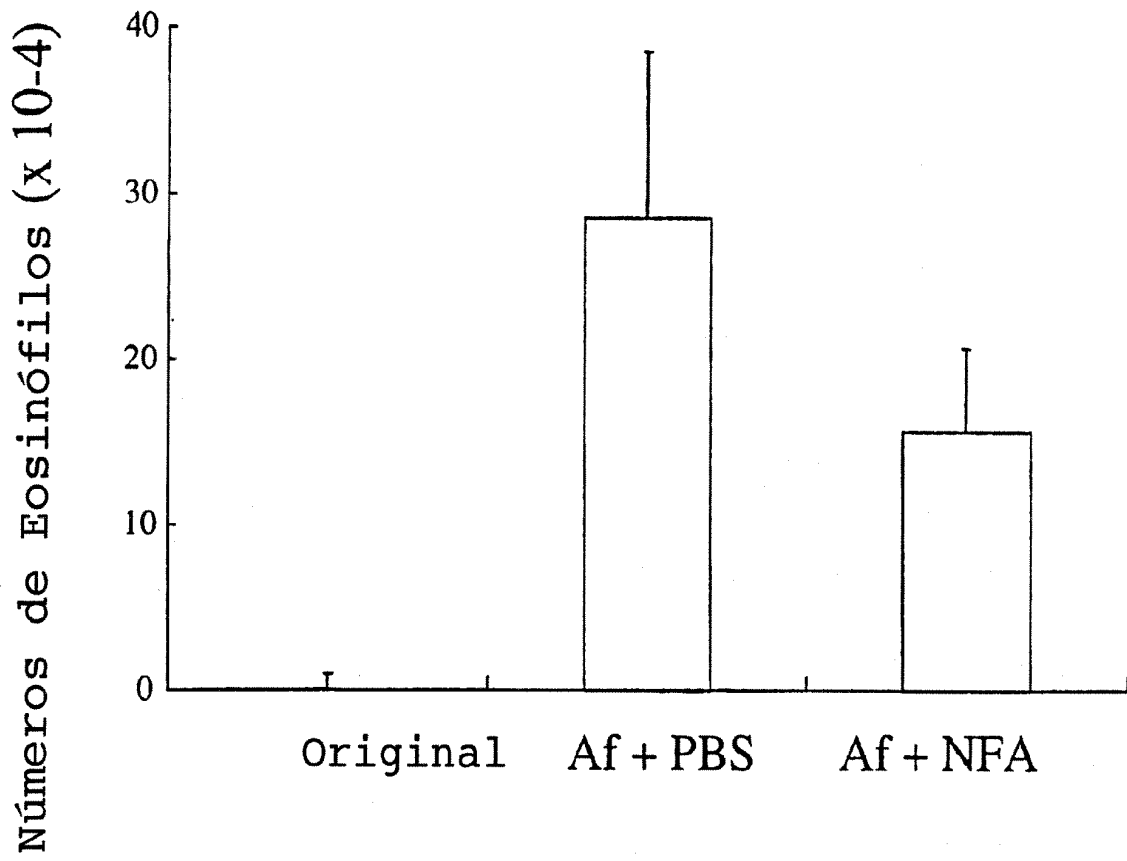


FIG. 6



Original

Af + PBS

Af + PBS + NFA

FIG. 7

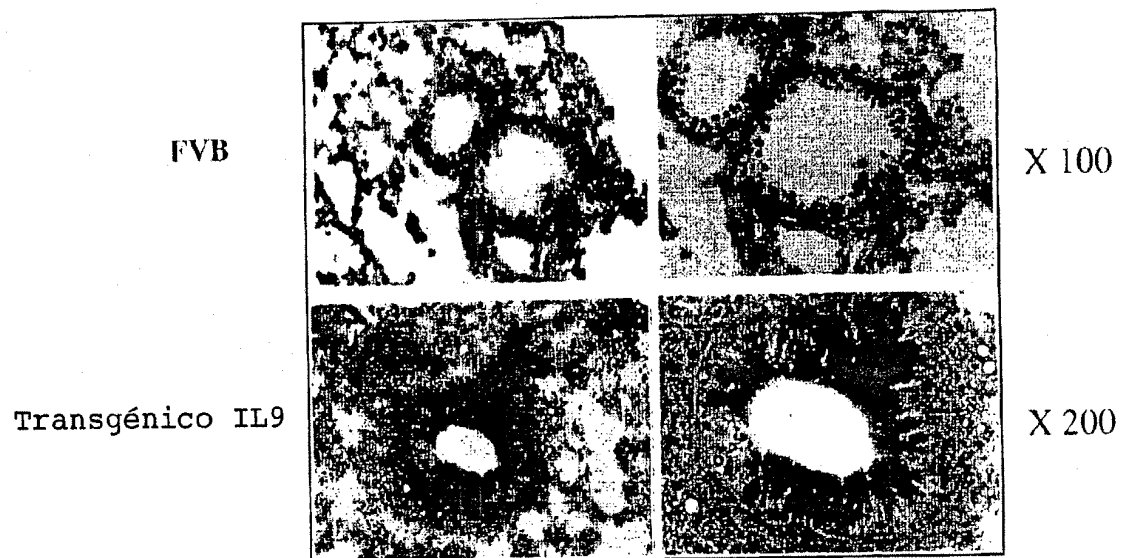


FIG. 8

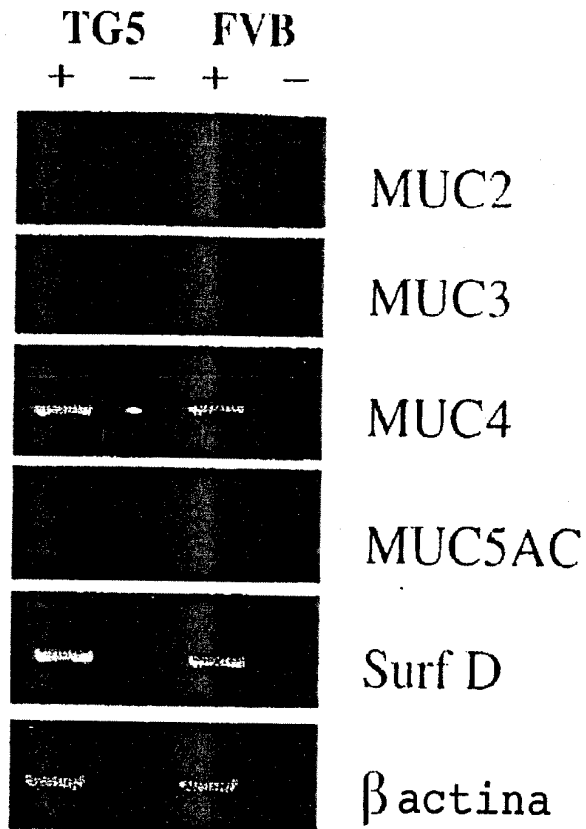
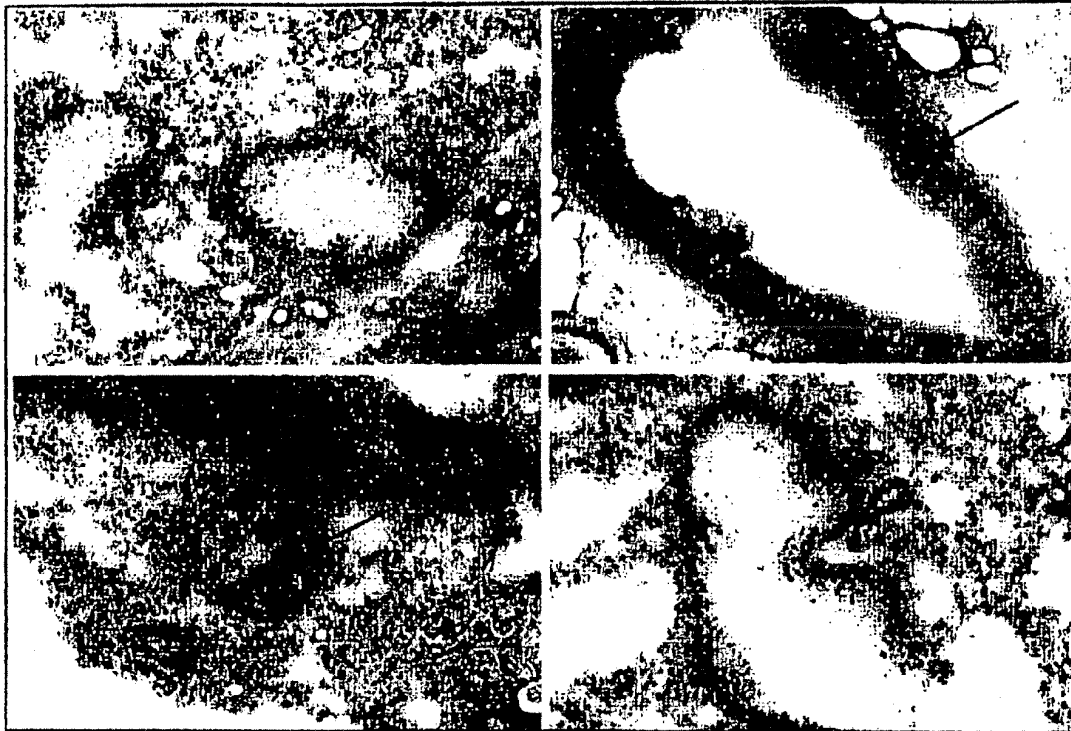


FIG. 9

Original

Antigénio



Antigénio + controlo Ab

Antigénio + anti IL9

FIG. 10

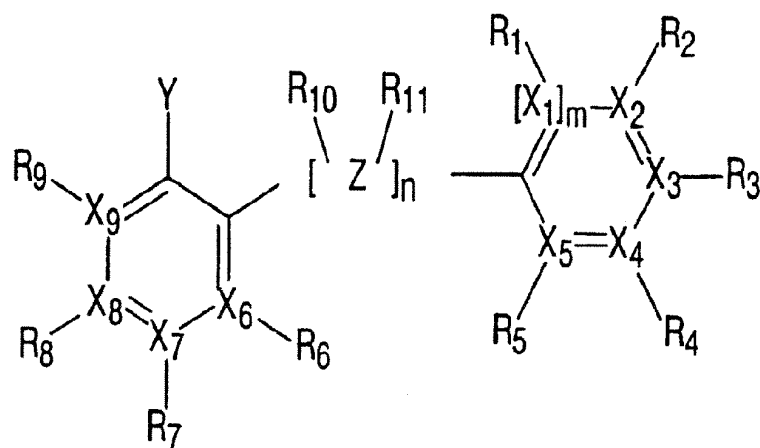


FIG. 11

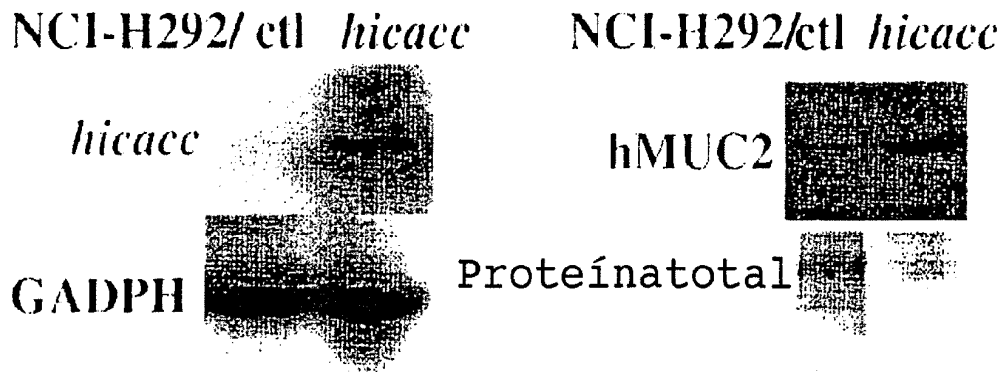


FIG. 12A

FIG. 12B

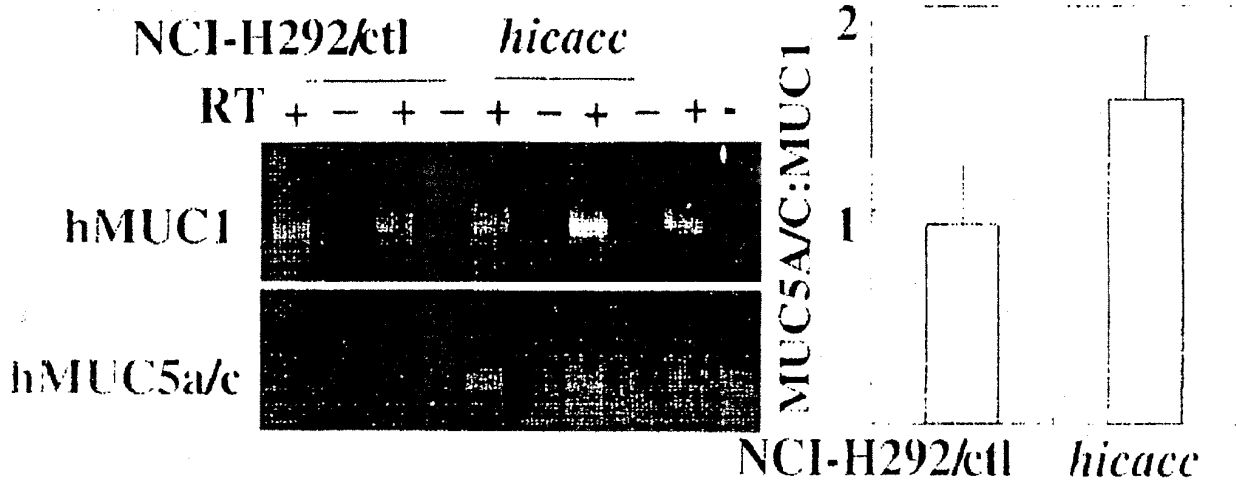


FIG. 12C

FIG. 12D

NCI-H292/ctl

NCI-H292/*icacc*

Meio

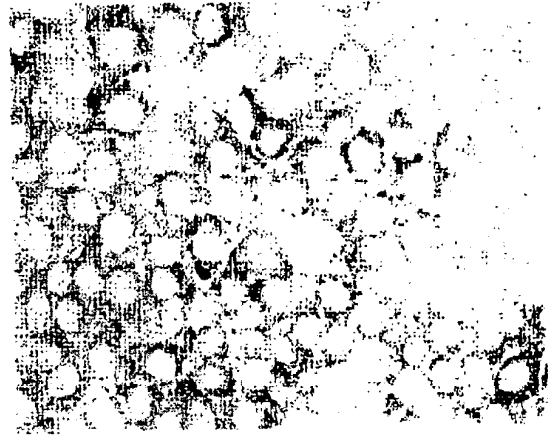
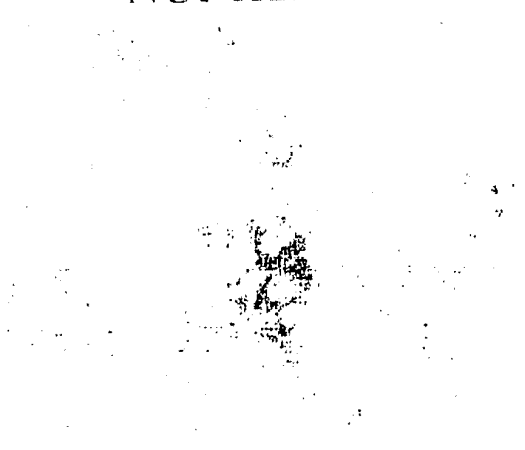


FIG. 13A

FIG. 13B

NFA

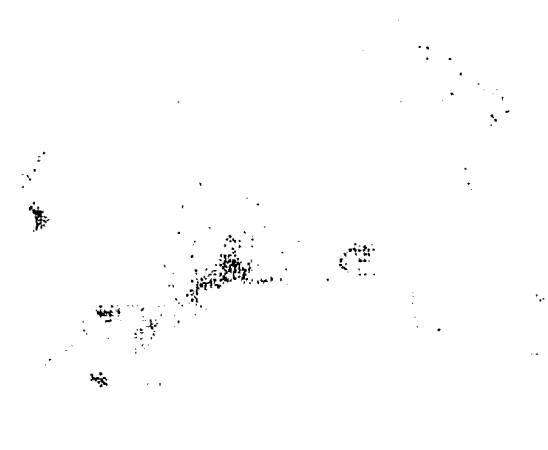
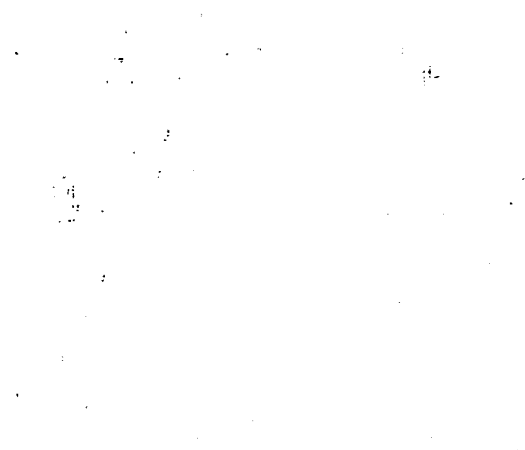


FIG. 13C

FIG. 13D

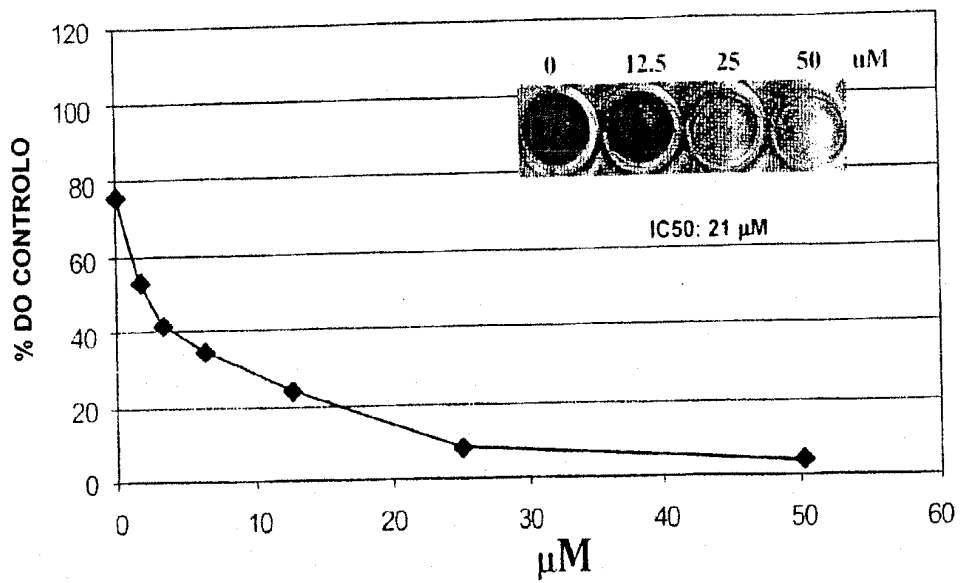


FIG. 14



FIG. 15A

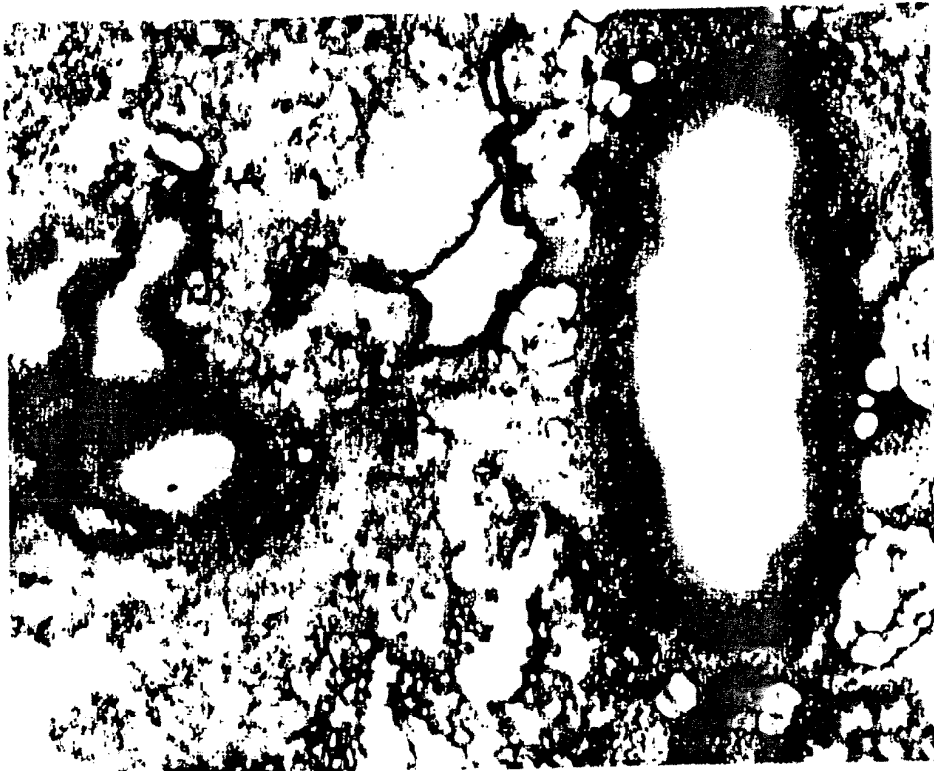


FIG. 15B

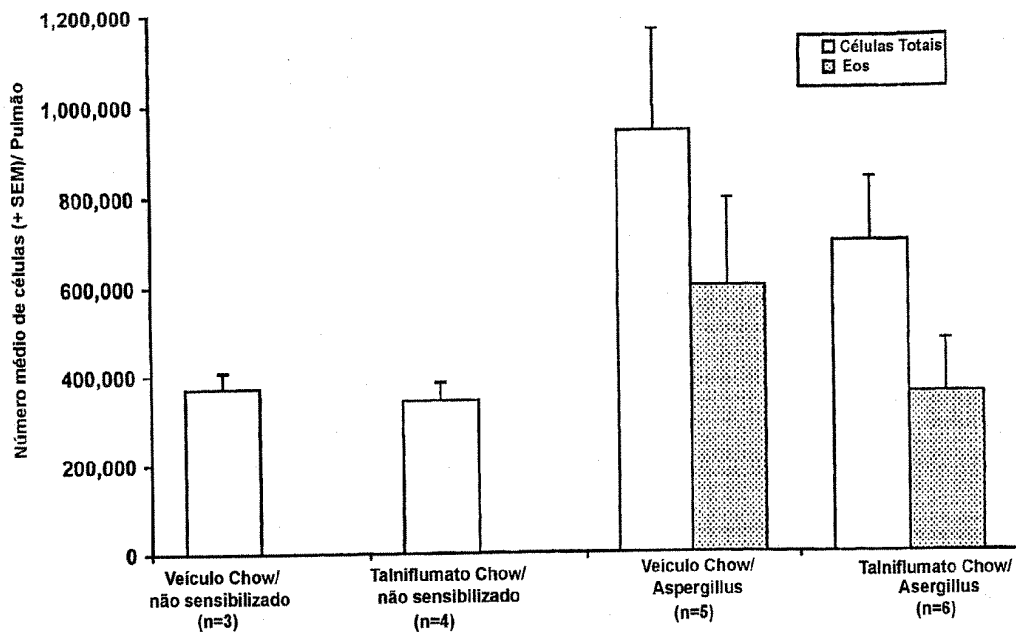


FIG. 16

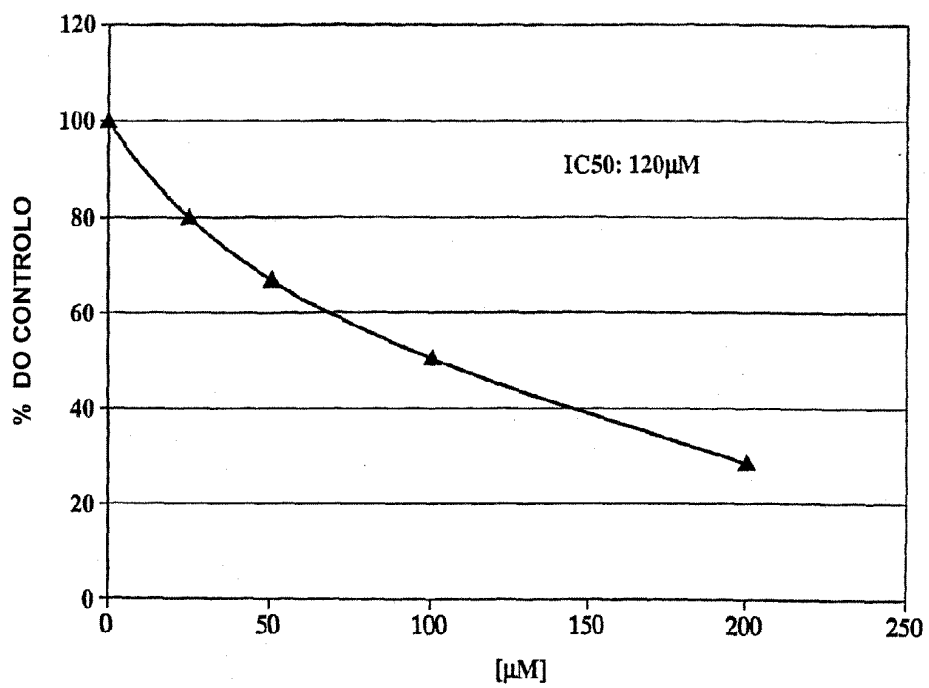


FIG. 17

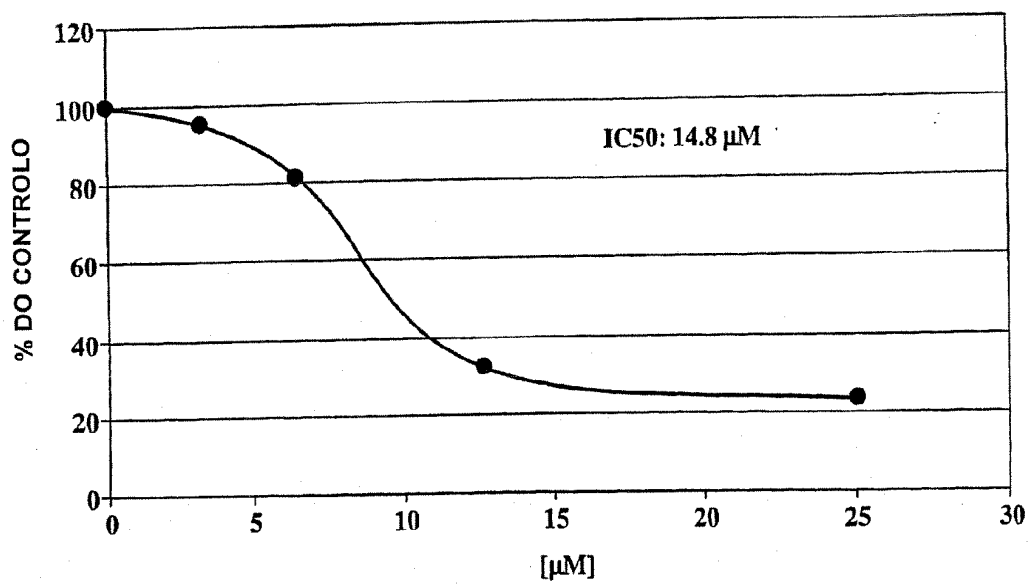


FIG. 18

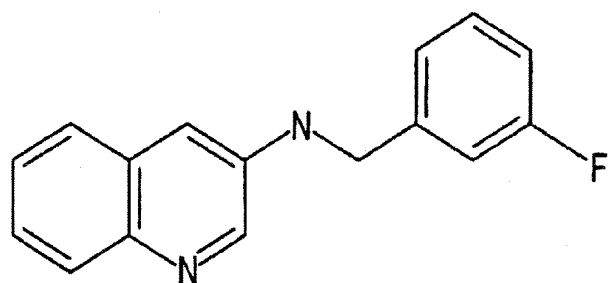


FIG. 19