

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

(22) Data de pedido: <b>2003.12.05</b>	(73) Titular(es): <b>THE FEINSTEIN INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH 350 COMMUNITY DRIVE MANHASSET, NY 11030</b> <b>US</b>
(30) Prioridade(s): <b>2002.12.06 US 431650 P</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2008.07.30</b>	
(45) Data e BPI da concessão: <b>2014.02.12 099/2014</b>	(72) Inventor(es): <b>KEVIN J. TRACEY</b> <b>US</b> <b>HONG WANG</b> <b>US</b>
	(74) Mandatário: <b>ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO</b> <b>RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE UM AGONISTA COLINÉRGICO SELECTIVO PARA UM RECEPTOR NICOTÍNICO ALFA 7**

(57) Resumo:

SÃO PROPORCIONADOS MÉTODOS DE INIBIÇÃO DA LIBERTAÇÃO DE UMA CITOCINA PRÓ-INFLAMATÓRIA DE UM MACRÓFAGO. OS MÉTODOS COMPREENDEM O TRATAMENTO DO MACRÓFAGO COM UM AGONISTA COLINÉRGICO, NUMA QUANTIDADE SUFICIENTE PARA DIMINUIR A QUANTIDADE DA CITOCINA PRÓ-INFLAMATÓRIA QUE É LIBERTADA DO MACRÓFAGO, EM QUE O AGONISTA COLINÉRGICO É SELECTIVO PARA UM RECEPTOR NICOTÍNICO &#913;7. SÃO TAMBÉM PROPORCIONADOS MÉTODOS PARA INIBIR UMA CASCATA DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NUM DOENTE. OS MÉTODOS COMPREENDEM O TRATAMENTO DO DOENTE COM UM AGONISTA COLINÉRGICO EM UMA QUANTIDADE SUFICIENTE PARA INIBIR A CASCATA DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS, EM QUE O AGONISTA COLINÉRGICO É SELECTIVO PARA UM RECEPTOR NICOTÍNICO &#913;7. SÃO TAMBÉM PROPORCIONADOS OS MÉTODOS PARA DETERMINAR SE UM COMPOSTO É UM AGONISTA COLINÉRGICO REACTIVO COM UM RECEPTOR NICOTÍNICO &#913;7. OS MÉTODOS COMPREENDEM DETERMINAR SE O COMPOSTO INIBE A LIBERTAÇÃO DE UMA CITOCINA PRÓ-INFLAMATÓRIA DE UMA CÉLULA DE MAMÍFERO. ADICIONALMENTE, SÃO PROPORCIONADOS MÉTODOS PARA DETERMINAR SE UM COMPOSTO É UM ANTAGONISTA COLINÉRGICO REACTIVO COM UM RECEPTOR NICOTÍNICO &#913;7. ESTES MÉTODOS COMPREENDEM DETERMINAR SE O COMPOSTO REDUZ A CAPACIDADE DE UM AGONISTA COLINÉRGICO PARA INIBIR A LIBERTAÇÃO DE UMA CITOCINA PRÓ-INFLAMATÓRIA DE UMA CÉLULA DE MAMÍFERO. SÃO TAMBÉM PROPORCIONADOS OS OLIGONUCLEÓTIDOS OU MIMÉTICOS, CAPAZES DE INIBIR A ATENUAÇÃO DA LIBERTAÇÃO DE TNF INDUZIDA POR LIPOPOLISSACÁRIDO DE UM MACRÓFAGO DE MAMÍFERO, POR EXPOSIÇÃO DO MACRÓFAGO A UM AGONISTA COLINÉRGICO. OS OLIGONUCLEÓTIDOS OU MIMÉTICOS CONSISTEM ESSENCIALMENTE DE UMA SEQUÊNCIA DE COMPRIMENTO MAIOR DO QUE 5 NUCLEÓTIDOS QUE É COMPLEMENTAR A UM ARNM DE UM RECEPTOR &#913;7. ADICIONALMENTE, SÃO

PROPORCIONADOS MÉTODOS PARA INIBIR A ATENUAÇÃO DA LIBERTAÇÃO DE TNF DE UM MACRÓFAGO DE MAMÍFERO, POR EXPOSIÇÃO DO MACRÓFAGO A UM AGONISTA COLINÉRGICO. ESTES MÉTODOS COMPREENDEM TRATAR O MACRÓFAGO COM O OLIGONUCLEÓTIDO OU MIMÉTICO DESCRITO ACIMA.

## **RESUMO**

### **"MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE UM AGONISTA COLINÉRGICO SELECTIVO PARA UM RECEPTOR NICOTÍNICO ALFA 7"**

São proporcionados métodos de inibição da libertação de uma citocina pró-inflamatória de um macrófago. Os métodos compreendem o tratamento do macrófago com um agonista colinérgico, numa quantidade suficiente para diminuir a quantidade da citocina pró-inflamatória que é libertada do macrófago, em que o agonista colinérgico é selectivo para um receptor nicotínico  $\alpha 7$ . São também proporcionados métodos para inibir uma cascata de citocinas inflamatórias num doente. Os métodos compreendem o tratamento do doente com um agonista colinérgico em uma quantidade suficiente para inibir a cascata de citocinas inflamatórias, em que o agonista colinérgico é selectivo para um receptor nicotínico  $\alpha 7$ . São também proporcionados os métodos para determinar se um composto é um agonista colinérgico reactivo com um receptor nicotínico  $\alpha 7$ . Os métodos compreendem determinar se o composto inibe a libertação de uma citocina pró-inflamatória de uma célula de mamífero. Adicionalmente, são proporcionados métodos para determinar se um composto é um antagonista colinérgico reactivo com um receptor nicotínico  $\alpha 7$ . Estes métodos compreendem determinar se o composto reduz a capacidade de um agonista colinérgico para inibir a libertação de uma citocina pró-inflamatória de uma célula de mamífero. São também proporcionados os oligonucleótidos ou miméticos, capazes de inibir a atenuação da libertação de TNF induzida por lipopolissacárido de um macrófago de mamífero, por exposição do macrófago a um agonista

colinérgico. Os oligonucleótidos ou miméticos consistem essencialmente de uma sequência de comprimento maior do que 5 nucleótidos que é complementar a um ARNm de um receptor  $\alpha 7$ . Adicionalmente, são proporcionados métodos para inibir a atenuação da libertação de TNF de um macrófago de mamífero, por exposição do macrófago a um agonista colinérgico. Estes métodos compreendem tratar o macrófago com o oligonucleótido ou mimético descrito acima.

## **DESCRIÇÃO**

### **"MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE UM AGONISTA COLINÉRGICO SELECTIVO PARA UM RECEPTOR NICOTÍNICO ALFA 7"**

#### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

Os vertebrados atingem a homeostase interna durante infecção ou lesão, equilibrando as actividades das vias pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. No entanto, em muitos estados de doença, esta homeostase interna torna-se desequilibrada. Por exemplo, a endotoxina (lipopolissacárido, LPS) produzida por todas as bactérias Gram-negativas, activa os macrófagos para a libertação de citocinas que são potencialmente letais (Tracey *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1999; Nathan, 1987; Dinarello, 1994).

A inflamação e outros estados perniciosos (tal como o choque séptico causado por exposição a endotoxina) são frequentemente induzidos por citocinas pró-inflamatórias, tais como o factor de necrose tumoral (TNF, também conhecido como TNF $\alpha$  ou caquetina), interleucina (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL 18, interferão  $\gamma$ , factor activador de plaquetas (PAF), factor inibidor da migração de macrófagos (MIF) e outros compostos (Thompson, 1998). Outros compostos determinados, por exemplo, a proteína de elevada mobilidade do grupo 1 (HMG-1), são induzidos durante os vários estados, tal como a septicemia, e podem também servir como citocinas pró-inflamatórias (publicação PCT WO 00/47104). Estas citocinas pró-inflamatórias são produzidas

por vários tipos de células diferentes, a maioria células imunitárias (por exemplo, monócitos, macrófagos e neutrófilos), mas também por células não imunes, tais como fibroblastos, osteoblastos, células do músculo liso, células epiteliais e neurónios (Zhang e Tracey, 1998). As citocinas pró-inflamatórias contribuem para várias doenças, nomeadamente sepsia, através da sua libertação durante uma cascata de citocinas inflamatórias.

As cascatas de citocinas inflamatórias contribuem para características perniciosas de inúmeras doenças, incluindo inflamação e apoptose (Pulkki, 1997). Incluem-se as doenças caracterizadas por reacções localizadas e sistémicas, incluindo, sem limitação, doenças envolvendo o trato gastrointestinal e tecidos associados (tais como apendicite, úlceras péptica, gástrica e duodenal, peritonite, pancreatite, colite ulcerativa, colite pseudomembranosa, aguda e isquémica, diverticulite, epiglottite, acalasia, colangite, doença celíaca, colecistite, hepatite, doença de Crohn, enterite e doença de Whipple); doenças e estados inflamatórios sistémicos ou locais (tais como asma, alergia, choque anafiláctico, doenças do complexo imune, isquemia de órgãos, lesão de reperfusão, necrose de órgãos, febre dos fenos, sepsia, septicemia, choque endotóxico, caquexia, hiperpirexia, granuloma eosinofílico, granulomatose e sarcoidose); doenças envolvendo o sistema urogenital e tecidos associados (tais como o aborto séptico, epididimite, vaginite, prostatite e uretrite); doenças envolvendo o sistema respiratório e tecidos associados (tais como bronquite, enfisema, rinite, fibrose cística, síndrome de dificuldade respiratória do adulto, pneumonite, pneumoultramicroscopicossilicovulcanoconiose, alveolite, bronquiolite, faringite, pleurite e sinusite); doenças

resultando de infecção por vários vírus (tais como influenza, vírus sincicial respiratório, VIH, vírus da hepatite B, vírus da hepatite C e herpes), bactérias (tais como bacteriemia disseminada, febre de Dengue), fungos (tal como candidíase) e parasitas protozoários e multicelulares (tais como malária, filariose, amebíase e cistos hidáticos); doenças dermatológicas e estados da pele (tais como queimaduras, dermatite, dermatomiosite, queimadura solar, verrugas urticárias e pápulas); doenças envolvendo o sistema cardiovascular e tecidos associados (tais como vasculite, angeíte, endocardite, arterite, aterosclerose, tromboflebite, pericardite, miocardite, isquemia do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva, periartrite nodosa e febre reumática); doenças envolvendo o sistema nervoso central ou periférico e tecidos associados (tais como doença de Alzheimer, meningite, encefalite, esclerose múltipla, enfarte cerebral, embolia cerebral, síndrome Guillaume-Barre, neurite, neuralgia, lesão da medula espinal, paralisia e uveíte); doenças dos ossos, articulações, músculos e tecidos conjuntivos (tais como as diversas artrites e artralguas, osteomielite, fascite, doença de Paget, gota, doença periodontal, artrite reumatóide e sinovite); outros distúrbios autoimunes e inflamatórios (tais como miastenia gravis, tiroidite, lúpus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, síndrome de Behcets, rejeição de aloenxertos, doença do enxerto-versus-hospedeiro, diabetes de Tipo I, espondilite anquilosante, doença de Berger e síndrome de Retier); bem como vários cancros, tumores e distúrbios de proliferação (tal como doença de Hodgkins); e, em qualquer caso, a resposta inflamatória do hospedeiro ou imune a qualquer doença principal (Gattorno *et al.*, 2000; Yeh e Schuster, 1999;. McGuinness *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 1999; Prystowsky e Rege, 1997; Kimmings *et al.*, 2000; Hirano, 1999; Lee *et al.*, 1995;

Waserman *et al.*, 2000; Katagiri *et al.*, 1997; Bumgardner e Orosz, 1999; Dibbs *et al.*, 1999; Blum e Miller, 1998; Blackwell e Christman, 1996; Fox, 2000; Carteron, 2000; Hommes e van Deventer, 2000; Gracie *et al.*, 1999; Kanai *et al.*, 2001; Jander e Stoll, 2001; Watanabe *et al.*, 1997; Rayner *et al.*, 2000; Amrani *et al.*, 2000).

Os mamíferos respondem à inflamação causada por cascatas de citocinas inflamatórias, em parte, através de regulação do sistema nervoso central. Esta resposta tem sido detalhadamente caracterizada em relação aos mecanismos de resposta humoral sistémica durante as respostas inflamatórias a endotoxina (Besedovsky *et al.*, 1986; Woiciechowsky *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 1991; Lipton e Catania, 1997). Num conjunto de respostas, as fibras nervosas vagais aferentes são activadas por endotoxina ou citocinas, estimulando a libertação de respostas anti-inflamatórias humorais através da libertação da hormona glucocorticóide (Watkins e Maier, 1999; Sternberg, 1997; Scheinman *et al.*, 1995.). Trabalhos anteriores elucidaram o papel da sinalização do nervo vago como um componente crítico no ciclo aferente que modula as respostas por adrenocorticotropina e febre à endotoxemia e citocinemias sistémicas (Gaykema *et al.*, 1995; Fleshner *et al.*, 1998; Watkins *et al.*, 1995; Romanovsky *et al.*, 1997).

Um outro conjunto de respostas é através da sinalização do nervo vago eferente, denominado de "via anti-inflamatória colinérgica" (Borovikova *et al.*, 2000). A estimulação do nervo vago eferente atenua a resposta inflamatória sistémica e inibe a libertação de TNF (Id.; Bernik *et al.*, 2002; Tracey *et al.*, 2001; Pedido de Patente U.S. Nº. 09/855.446). A acetilcolina, o



principal neurotransmissor do nervo vago, atenua a síntese de citocinas por macrófagos por sinalização através de receptores nicotínicos de acetilcolina sensíveis a  $\alpha$ -bungarotoxina, mas a identidade do receptor de macrófago essencial é desconhecida.

Os receptores nicotínicos de acetilcolina são uma família de canais iónicos, pentaméricos dependentes de ligandos. Nos humanos, foram identificadas 16 subunidades diferentes ( $\alpha$ 1-7,  $\alpha$ 9-10,  $\beta$ 1-4,  $\delta$ ,  $\epsilon$  e  $\gamma$ ) que formam um grande número de receptores homo- e hetero-pentaméricos com propriedades estruturais e farmacológicas distintas (Lindstrom, 1995; Leonard e Bertrand, 2001; Le Novère e Changeux, 1995). A principal função conhecida desta família de receptores é a de transmitir sinais para o neurotransmissor acetilcolina nas junções neuromusculares e no sistema nervoso periférico e central (Lindstrom, 1995; Leonard e Bertrand, 2001; Le Novère e Changeux, 1995; Marubio e Changeux, 2000; Steinlein, 1998). O trabalho anterior dos mesmos requerentes indicou a presença de receptores nicotínicos sensíveis a  $\alpha$ -bungarotoxina em macrófagos humanos primários (Borovikova *et al.*, 2000), mas a identidade da subunidade de receptor específico era desconhecida.

O conhecimento do receptor nicotínico específico que é responsável pela inibição da inflamação seria útil para identificar agonistas específicos do receptor que inibiria a inflamação. Seria provável que tais agonistas tenham menos efeitos secundários do que os agonistas actualmente identificados que são relativamente não específicos. A identificação de outros efeitos fisiológicos influenciados pelo receptor anti-inflamatório também seria facilitada.

## DESCRIÇÃO DOS DOCUMENTOS RELACIONADOS DA TÉCNICA ANTERIOR

### Referências citadas

Amrany, Y. *et al.* Respir. Res. 1:49-53 (2000).

Bernik, T.R. *et al.* Estimulação farmacológica da via anti-inflamatória colinérgica. J. Exp. Med. 195:781-788 (2002).

Besedovsky, H. *et al.* Science 233:652-54 (1986).

Bianchi, M. *et al.* Um inibidor do transporte de arginina em macrófagos e produção de óxido nítrico (CNI-1493) previne a inflamação aguda e a letalidade por endotoxina. Mol. Med. 1:254-266 (1995).

Blackwell, T.S. e Christman, J.W. Br. J. Anaesth. 77: 110-17 (1996).

Blum, A. e Miller, H. Am. Heart J. 135:181-86 (1998).

Borovikova, L.V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W. & Tracey, K.J. A estimulação do nervo vago atenua o resposta inflamatória sistêmica a endotoxina. Nature 405:458-462 (2000).

Bumgardner, G.L. e Orosz, C.G. Semin. Liver Dis. 19: 189-204 (1999).

Carteron, N.L. Mol. Med. Today 6:315-23 (2000).

Cohen, P.S. et al. O importante papel da p38 MAP cinase na replicação de de VIH-1 em células T. Molecular Medicine 3:339-346 (1997).

Dibbs, Z. et al. Proc. Assoc. Am. Physicians 111:423-28 (1999).

Dinareello, C.A. FASEB J. 8:1314-25 (1994).

Drisdel, R.C. e Green, W.N. Receptores de  $\alpha$ -bungarotoxina neuronais são homómeros de subunidade  $\alpha 7$ . J. Neurosci. 20:133-139 (2000).

Feng, G., Steinbach, J.H. e Sanes, J.R. Rapsina aglomera receptores de acetilcolina neuronais, mas não é essencial para a formação de uma sinapse colinérgica interneuronal. J. Neurosci. 18:4166-4176 (1998).

Fleshner, M. et al. J. Neuroimmunol. 86:134-41 (1998).

Fox, D.A. Arch. Intern. Med. 28:437-444 (2000).

Franceschini, D. et al. Respostas barorreflexas alteradas em ratinhos  $\alpha 7$  deficientes. Behavioural Brain Res. 113:3-10 (2000).

Francis, M.M. et al. Mol.Pharmacol. 60:71-79 (2001).

Gattorno, M. et al. J. Reumatol. 27:2251-2255 (2000).

Gault, J. *et al.* Organização genômica e duplicação parcial do gene do receptor nicotínico de acetilcolina  $\alpha 7$  neuronal humano (CHRNA7). *Genomics* 52:173-185 (1998).

Gaykema, R.P. *et al.* *Endocrinology* 136: 4717-4720 (1995).

Gracie, J.A. *et al.* *J. Clin. Invest.* 104:1393-1401 (1999).

Holladay *et al.* Receptores nicotínicos de acetilcolina neuronais como alvos para desenvolvimento de fármacos. *Journal of Medicinal Chemistry* 40: 4169-4194 (1997).

Hommes, D.W. e van Deventer, S.J. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 3:191-95 (2000).

Hsu, H.Y. *et al.* *J. Pediatr. Gastroenterol.* 29:540-45 (1999).

Hu, X.X. *et al.* *J. Neuroimmunol.* 31:35-42 (1991).

Jander, S. e Stoll, G.J. *Neuroimmunol.* 114:253-58 (2001).

Kanai, T. *et al.* *Digestion* 63 Supl. 1:37-42 (2001).

Katagiri, M. *et al.* *J. Clin Gastroenterol.* 25 Supl. 1: S211-14 (1997).

Keffer, J. *et al.* Ratinhos transgênicos expressando fator de necrose tumoral humano: um modelo genético preditivo de artrite. *EMBO J.* 10:4025-4031 (1991).

Kem, W.R. *et al.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 283:979-992 (1997).

Kimmings, A.N. *et al.* Eur. J. Surg. 166:700-05 (2000).

Kontoyiannis, D. *et al.* Regulação on/off alterada da biossíntese de TNF em ratinhos sem TNF com elementos ricos em AU: implicações para imunopatologias associadas a articulações e a intestino. Immunity 10:387-398 (1999).

Kumins, N.H., Hunt, J., Gamelli, R.L. e Filkins, J.P. Hepatectomia parcial reduz o pico induzido pela endotoxina no nível de factor de necrose de tumor circulantes em ratos. Shock 5:385-388 (1996).

Le Novere, N. & Changeux, J.P. Evolução molecular do receptor nicotínico de acetilcolina: um exemplo da família de multigenes nas células excitáveis. J. Mol. Evol. 40:155-172 (1995).

Lee, H.G., *et al.* Clin. Exp. Immunol. 100:139-44 (1995).

Leonard, S. e Bertrand, D. Receptores nicotínicos neuronais: da estrutura à função. Nicotine & Tobacco Res. 3:203-223 (2001).

Lin, W. *et al.* Papéis distintos do nervo e do músculo na diferenciação pós-sináptica da sinapse neuromuscular. Nature 410:1057-1064 (2001).

Lindstrom, J.M. Receptores nicotínicos de acetilcolina. Em "Manual de receptores e canais: Canais iónicos dependentes de ligando e de diferença de potencial" Editado por R. Alan North. CRC Press, Inc.(1995).

Marubio, L.M. e Changeux, J.P. Ratinhos nocaute no receptor nicotínico de acetilcolina como modelos animais para estudar a função do receptor. Eur. J. Pharmacol. 393:113-121 (2000).

McGuinness, P.H. *et al.* Gut 46:260-69 (2000).

Nathan, C.F.J. Clin. Invest. 79:319-26 (1987).

Orr-Urtreger, A. *et al.* Ratinhos deficientes no receptor nicotínico de acetilcolina neuronal  $\alpha 7$  não têm locais de ligação a  $\alpha$ -bungarotoxina nem correntes nicotínicas rápidas no hipocampo. J. Neurosci. 17:9165-9171 (1997).

Peng, X. *et al.* Receptor de acetilcolina  $\alpha 7$  humano: clonagem da subunidade  $\alpha 7$  a partir da linha celular SH-SY5Y e determinação das propriedades farmacológicas dos receptores nativos e de homómeros  $\alpha 7$  funcionais expressos em oócitos de *Xenopus*. Mol. Pharmacol. 45:546-554 (1994).

Pulkki, K.J. Ann.Med. 29:339-43 (1997).

Prystowsky, J.B. e Rege, R.V.J. Surg. Res. 71:123-26 (1997).

Rayner, SA *et al.* Clin. Exp. Immunol. 122:109-16 (2000).

Romanovsky, A.A. *et al.* *Sou. J. Physiol.* 273: R407-13 (1997).

Seguela, P. *et al.* Clonagem molecular, propriedades funcionais e distribuição de  $\alpha 7$  em cérebro de rato: um canal de catião nicotínico altamente permeável a cálcio. *J. Neurosci.* 13:596-604 (1993).

Scheinman R.I. *et al.* *Science* 270:283-86 (1995).

Shoop, R.D., Yamada, N. e Berg, D.K. Ligações ao citoesqueleto de receptores de acetilcolina neuronais contendo subunidades  $\alpha 7$ . *J. Neurosci.* 20:4021-4029 (2000).

Shoop, R.D. *et al.* Transientes de cálcio sinapticamente impulsionados via receptores nicotínicos em cristas somáticas. *J. Neurosci.* 21:771-781 (2001).

Simosky, J.K. *et al.* *Biol. Psychiatry* 50:493-500 (2001).

Steinlein, O. Novas funções para os receptores de acetilcolina nicotina? *Behavioural Brain Res.* 95:31-35 (1998).

Sternberg, E.M.J. *Clin. Invest.* 100:2641-47 (1997).

Tsutsui, H. *et al.* *Immunol. Rev.* 174:192-209 (2000).

Tracey, K.J. *et al.* Choque e lesão tecidular induzidos por caquectina humana recombinante. *Science* 234:470-474 (1986).

Tracey, K.J., Czura, C.J. e Ivanova, S. Mente sobre a imunidade. FASEB J. 15:1575-1576 (2001).

Vijayaraghavan, S. *et al.* Os receptores nicotínicos que se ligam  $\alpha$ -bungarotoxina nos neurónios aumentam o  $\text{Ca}^{2+}$  livre intracelular. Neuron 8:353-362 (1992).

Wang, H. *et al.* HMG-1 como um mediador tardio de letalidade por endotoxina em ratinhos. Science 285:248-251 (1999).

Waserman, S. *et al.* Can. Respir. J. 7:229-37 (2000).

Watanabe, H. *et al.* J. Reconstr. Microsurg. 13:193-97 (1997).

Watkins, L.R. e Maier, S.F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:7710-13 (1999).

Watkins, L.R. *et al.* Neurosci. Lett. 183:27-31 (1995).

Woiciechowsky, C. *et al.* Nat. Med. 4:808-13 (1998).

Yeh, S.S. e Schuster, M.W. Am. J. Clin. Nutr. 70, 183-97 (1999).

Zhang e Tracey, em The Cytokine Handbook, 3<sup>a</sup> ed., Ed. Thompson, Academic Press, 515-47 (1998).

Publicação do pedido de patente PCT WO 97/30998.

Publicação do pedido de patente PCT WO 00/47104.



Publicação do pedido de patente PCT WO 01/85727.

Publicação do pedido de patente PCT WO 02/44176.

Publicação do pedido de patente PCT WO 02/057275.

Pedido de Patente U.S. N° 09/855.446.

Publicação do pedido de patente U.S. N° 2002/0040035.

Publicação do pedido de patente U.S. N° 2002/0086871.

Patente U.S. N° 5.902.814.

Patente U.S. N° 5.977.144.

Patente U.S. N° 6.110.914.

Patente U.S. N° 6.407.095.

Patente U.S. N° 6.436.909.

## **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

Deste modo, a presente invenção baseia-se na verificação de que o receptor  $\alpha 7$  é o receptor sensível a  $\alpha$ -bungarotoxina que influencia a libertação de citocinas pró-inflamatórias de macrófagos. Com esse conhecimento, vários métodos e composições seriam entendidos serem úteis para o tratamento de estados

inflamatórios e na identificação de compostos úteis para esse tratamento. Os estudos de resposta de macrófagos a agonistas e antagonistas colinérgicos também são facilitados por este conhecimento.

A invenção é dirigida a métodos para determinar se um composto é um agonista colinérgico selectivo para um receptor nicotínico  $\alpha 7$  como definido nas reivindicações. Os métodos compreendem determinar se o composto inibe a libertação de uma citocina pró-inflamatória de uma célula de mamífero e determinar se o composto é um agonista colinérgico reactivo com pelo menos um receptor nicotínico que não é  $\alpha 7$ . Nestes métodos, um composto que inibe a libertação da citocina pró-inflamatória da célula de mamífero mas não é um agonista colinérgico reactivo com pelo menos um receptor nicotínico que não é  $\alpha 7$ , é um agonista colinérgico selectivo para um receptor nicotínico  $\alpha 7$ .

No exemplo relacionado, a presente divulgação, compreendendo a invenção, é dirigida a métodos para determinar se um composto é um antagonista colinérgico reactivo com um receptor nicotínico  $\alpha 7$ . Estes métodos compreendem determinar se o composto reduz a capacidade de um agonista colinérgico para inibir a libertação de uma citocina pró-inflamatória de uma célula de mamífero. Nestes métodos, um composto que reduz a capacidade de um agonista colinérgico para inibir a libertação de uma citocina pró-inflamatória de uma célula de mamífero é um antagonista colinérgico reactivo com um receptor  $\alpha 7$ .

Num exemplo adicional, a presente revelação é dirigida a métodos para determinar se um composto de teste tem a capacidade de inibir a inflamação. Estes métodos compreendem determinar se

o composto de ensaio é um agonista colinérgico reactivo com um receptor nicotínico  $\alpha 7$ .

Outros métodos para determinar se um composto de teste tem a capacidade para inibir a inflamação também são parte da revelação. Estes métodos compreendem determinar se o composto de teste inibe a ligação de um antagonista a um receptor nicotínico  $\alpha 7$ .

A presente revelação é também dirigida para oligonucleótidos ou miméticos, capazes de inibir a atenuação da libertação de TNF induzida por lipopolissacárido a partir de um macrófago de mamífero durante a exposição do macrófago a um agonista colinérgico. Os oligonucleótidos ou miméticos consistem essencialmente de uma sequência superior a 5 nucleótidos de comprimento que é complementar a um ARNm de um receptor de  $\alpha 7$ .

Adicionalmente, a revelação é dirigida a métodos de inibição da atenuação da libertação de TNF por um macrófago de mamífero, durante exposição do macrófago a um agonista colinérgico. Estes métodos compreendem o tratamento do macrófago com o oligonucleótido ou mimético acima descrito.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

A FIG. 1 são micrografias fluorescentes que estabelecem que receptores nicotínicos de ligação a  $\alpha$ -bungarotoxina são agrupados na superfície de macrófagos. Macrófagos humanos primários foram corados com  $\alpha$ -bungarotoxina marcada com FITC ( $\alpha$ -bgt, 1,5  $\mu$ g/mL) e visualizadas com um microscópio confocal de

fluorescência. Os painéis 1a e b mostram micrografias de menor ampliação. a. As células foram coradas com  $\alpha$ -bungarotoxina sozinha. b. Foi adicionado 500  $\mu$ M de nicotina antes da adição de  $\alpha$ -bungarotoxina. Painéis 1c e 1d mostram micrografias com maior ampliação para revelar os agregados de receptores. c. Os planos de focagem estavam nas camadas interiores perto do meio (três células mais baixas) ou próximo à superfície (célula superior) de células. d. O plano de focagem estava na superfície superior da célula.

A FIG. 2 apresenta fotografias de géis e transferências de Western mostrando o ARNm e a expressão de proteína de receptores nicotínicos  $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 7 em macrófagos humanos primários. O painel a mostra resultados de RT-PCR com iniciadores específicos de  $\alpha$ 7, gerando uma banda  $\alpha$ 7 a 843 pb. Os produtos de PCR foram verificados por sequenciação (dados não mostrados). MAC1 e MAC2: macrófagos derivados de dois dadores não relacionados. O painel b mostra transferências de Western. Os lisados celulares de células PC12 ou de macrófagos humanos (MAC) foram incubados com pérolas de Sepharose de controlo ou pérolas de Sepharose conjugadas com  $\alpha$ -bungarotoxina. As proteínas ligadas foram, então, analisadas por anticorpos monoclonais e policlonais  $\alpha$ 7-específicos, tal como indicado.

A FIG. 3 mostra gráficos e micrografias que estabelecem que oligonucleótidos anti-sentido para a subunidade  $\alpha$ 7 de receptores nicotínicos de acetilcolina inibem o efeito da nicotina sobre a libertação de TNF. Os painéis a-c são gráficos que resumem resultados experimentais que mostram a libertação de TNF estimulada por LPS de macrófagos primários humanos pré-tratados com os oligonucleótidos anti-sentido para várias subunidades de

receptores nicotínicos. Onde indicado, foi adicionada nicotina (Nic, 1  $\mu$ M) 5-10 minutos antes da indução por LPS (100 ng/mL). Os níveis de TNF no meio de cultura celular foram determinados por ensaios de L929. CT: culturas de macrófagos de controlo (não estimuladas). AS $\alpha$ 7, AS $\alpha$ 1 e AS $\alpha$ 10: oligonucleótidos anti-sentido para subunidades  $\alpha$ 7,  $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 10, respectivamente. Os painéis d e e são micrografias fluorescentes que mostram coloração FITC- $\alpha$ -bungarotoxina de macrófagos humanos primários tratados (e) ou não tratados (d) com o oligonucleótido anti-sentido  $\alpha$ 7 (AS $\alpha$ 7) e visualizadas por microscopia confocal de fluorescência.

A FIG. 4 são gráficos que resumem experiências que demonstram a produção aumentada de citocinas em ratinhos  $\alpha$ 7-deficientes durante endotoxemia. Ratinhos deficientes em subunidades  $\alpha$ 7 (-/-) ou ratinhos de tipo selvagem agrupados por sexo e por idade (+/+) foram injectados com LPS (0,1 mg/kg, ip). Foi obtido sangue e órgãos 1 h (para TNF) ou 4 horas (para IL-1 $\beta$  e IL-6), após estimulação com LPS. Os níveis de TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 no soro ou órgãos foram medidos por ELISA. Painel a: níveis de TNF no soro. n = 10 por grupo. Painel b: níveis de TNF no fígado. n = 6 por grupo. Painel c: níveis de TNF no baço. n = 6 por grupo. Painel d: níveis de IL-1 $\beta$  no soro. n = 8 por grupo. Painel e: IL-6 no soro. n = 9 por grupo. \* = P<0,05 versus controlos do tipo selvagem.

A FIG. 5 é um gráfico que mostra que a estimulação do nervo vago não inibe o TNF em ratinhos deficientes na subunidade  $\alpha$ 7 do receptor nicotínico de acetilcolina. Ratinhos deficientes em subunidades  $\alpha$ 7 (-/-) ou ratinhos de tipo selvagem agrupados por sexo e por idade (+/+) foram submetidos a operação simulada (sham) ou estimulação do nervo vago (VNS, vago esquerdo, 1 volt,

2 ms, 1 Hz); foi recolhido sangue 2 h após a administração de LPS. Os níveis séricos de TNF foram determinados por ELISA. n = 10 (SHAM  $\alpha 7$  +/+). n = 11 (VNS  $\alpha 7$  +/+, SHAM  $\alpha 7$  -/-, VNS  $\alpha 7$  -/-). \* =  $P < 0,05$  vs SHAM  $\alpha 7$  +/+.

A FIG. 6 é um traçado gráfico que mostra a mortalidade (percentagem de sobrevivência) de ratinhos no decurso da administração de composto (V) ou composto (VI), após a indução da sepsia utilizando um modelo de punção e ligadura do ceco.

A FIG. 7 é uma comparação lado a lado de traçados gráficos que representam os valores medidos da libertação de TNF- $\alpha$  induzida por LPS de células de ratinho de tipo macrófagos RAW 264.7 tratadas com concentrações crescentes de composto (V) ou nicotina, como uma função das concentrações destes compostos.

A FIG. 8A é um traçado gráfico que mostra a percentagem de inibição da libertação de TNF- $\alpha$  induzida por LPS de células de ratinho de tipo macrófagos RAW 264.7 tratadas com concentrações crescentes de composto (VI), como uma função do tempo de pré-incubação.

A FIG. 8B é um traçado gráfico que mostra a percentagem de inibição da libertação induzida por LPS de TNF- $\alpha$  de células de ratinho de tipo macrófagos RAW 264.7 tratadas com concentrações crescentes de composto (VI) como uma função da concentração do composto (VI).

A FIG. 9 é um gráfico de barras da concentração sanguínea medida de TNF- $\alpha$  após a administração de LPS a ratinhos que foram pré-administrados com composto (VI).

A FIG. 10 é uma comparação lado a lado de gráficos de barras que representam o peso de cólon (A) e o comprimento do cólon (B) de ratinhos que foram administrados com o composto (VI), após indução da colite por dextrano sulfato de sódio.

A FIG. 11 é um gráfico de barras que mostra a concentração medida de TNF- $\alpha$  libertado por células do tipo macrófagos de ratinho RAW264.7 estimuladas por LPS após pré-incubação com quantidades crescentes de composto (VII).

## DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

### Definições de substituintes

O termo "alquilo", como aqui utilizado, excepto se indicado de outro modo, inclui radicais hidrocarboneto monovalentes saturados tendo porções lineares ou ramificadas, tipicamente C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, De um modo preferido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. Exemplos de grupos alquilo incluem mas não estão limitados a metilo, etilo, propilo, isopropilo e t-butilo.

O termo "alcenilo", como aqui utilizado, excepto se indicado de outro modo, inclui porções alquilo tendo pelo menos uma ligação dupla carbono-carbono, em que alquilo é como definido acima. Exemplos de alcenilo incluem mas não estão limitados a etenilo e propenilo.

O termo "alcinilo", como aqui utilizado, excepto se indicado de outro modo, inclui porções alquilo tendo pelo menos

uma ligação tripla carbono-carbono, em que alquilo é como definido acima. Exemplos de grupos alcinilo incluem mas não estão limitados a etinilo e 2-propinilo.

O termos "alcoxilo", como aqui utilizado, significa um grupo "alquil-O-", em que alquilo é como definido acima.

O termo "cicloalquilo", como aqui utilizado, excepto se indicado de outro modo, inclui porções alquilo cíclicas saturadas não aromáticas em que o alquilo é como definido acima. Exemplos de cicloalquilo incluem mas não estão limitados a ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclo-hexilo, e ciclo-heptilo. Grupos "bicicloalquilo" são grupos carbocíclicos saturados não aromáticos consistindo de dois anéis. Exemplos de grupos bicicloalquilo incluem mas não estão limitados a biciclo-[2.2.2]-octilo e norbornilo. O termo "cicloalcenilo" e "tricicloalcenilo" referem-se a porções cicloalquilo e bicicloalquilo carbocíclicas não aromáticas como definido acima, excepto compreendendo uma ou mais ligações duplas carbono-carbono ligando membros do anel de carbono (uma ligação dupla "endocíclico") e/ou uma ou mais ligações duplas carbono-carbono que ligam um membro do anel de carbono e um carbono adjacente e fora do anel (uma ligação dupla "exocíclica"). Exemplos de grupos cicloalcenilo incluem mas não estão limitados a ciclopentenilo e ciclo-hexenilo. Um exemplo não limitativo de um grupo bicicloalcenilo é norbornilo. Os grupos cicloalquilo, cicloalcenilo, bicicloalquilo, bicicloalcenilo também incluem grupos semelhantes aos descritos acima para cada uma destas respectivas categorias, mas que estão substituídas com uma ou mais porções oxo. Exemplos de tais grupos com porções oxo incluem mas não estão limitados a



oxociclopentilo, oxociclobutilo, oxociclopentenilo e norcanforilo.

O termo "cicloalcoxilo", como aqui utilizado, excepto se indicado de outro modo, inclui o grupo "cicloalquil-O", em que o cicloalquilo é definido acima.

O termo "arilo", como aqui utilizado, refere-se a grupo carbocíclico. Exemplos de grupos arilo incluem, mas não estão limitados a fenilo e naftilo.

O termo "heteroarilo", como aqui utilizado, refere-se a grupos aromáticos contendo um ou mais heteroátomos (O, S, ou N). Um grupo heteroarilo pode ser monocíclico ou policíclico. Os grupos heteroarilo desta invenção podem também incluir sistemas de anéis substituídos com uma ou mais porções oxo. Exemplos de grupos heteroarilo incluem, mas não estão limitados a piridinilo, piridazinilo, imidazolilo, pirimidinilo, pirazolilo, triazolilo, pirazinilo, quinolilo, isoquinolilo, tetrazolilo, furilo, tienilo, isoxazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, pirrolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, indolilo, benzimidazolilo, benzofuranilo, cinolinilo, indazolilo, indolizininilo, ftalazinilo, piridazinilo, triazinilo, isoindolilo, purinilo, oxadiazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo, furazanilo, benzofurazanilo, benzotiofenilo, benzotriazolilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo, di-hidroquinolilo, tetra-hidroquinolilo, di-hidroisoquinolilo, tetra-hidroisoquinolilo, benzofurilo, furopiridinilo, pirolopirimidinilo, e azaindolilo.

Os grupos heteroarilo precedentes podem ser ligados por C ou ligados por N (onde tal é possível). Por exemplo, um grupo derivado de pirrole pode ser pirrol-1-ilo (ligado a N) ou pirrol-3-ilo (ligado a C).

No contexto da presente divulgação, um grupo carbocíclico bicíclico é um composto bicíclico que tem carbono apenas como um átomo do anel. A estrutura do anel pode, em particular, ser aromática, saturada, ou parcialmente saturada. Exemplos de tais compostos incluem mas não estão limitados a indanilo, naftalenilo, azuleno.

No contexto da presente divulgação, um grupo amino pode ser um primário ( $-NH_2$ ), secundário ( $-NHR_a$ ) Ou terciário ( $NR_aR_b$ ), em que  $R_a$  e  $R_b$  pode ser qualquer um dos grupos alquilo, alcenilo, alcinilo, alcoxilo, cicloalquilo, cicloalcoxilo, arilo, heteroarilo e um grupo carbocíclico bicíclico.

A prática da presente invenção irá empregar, excepto se indicado de outro modo, técnicas convencionais de cultura de células, biologia molecular, microbiologia, biologia celular e imunologia que estão bem dentro das competências da técnica. Tais técnicas são plenamente explicadas na literatura. Veja-se, por exemplo, Sambrook *et al.*, 1989, "Clonagem Molecular: Um Manual de Laboratório", Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel *et al.* (1995), "Protocolos Curtos em Biologia Molecular", John Wiley and Sons; Métodos em Enzimologia (vários volumes); Métodos em Biologia Celular (vários volumes), e Métodos em Biologia Molecular (vários volumes).

Os sais farmaceuticamente aceitáveis dos compostos aqui divulgados, podem ser utilizados para praticar o utilização dos compostos encontrados no método da presente invenção. Tal como aqui utilizado, um "sal farmaceuticamente aceitável" do composto divulgado é um produto contendo uma ligação iónica da reacção de um composto da invenção com um ácido ou uma base adequados para a administração a um indivíduo. Por exemplo, um sal de ácido de um composto contendo um grupo amina ou outro grupo básico pode ser obtido por reacção do composto com um ácido orgânico ou inorgânico adequado, tal como cloreto de hidrogénio, brometo de hidrogénio, ácido acético, ácido perclórico e semelhantes. Outros exemplos de tais sais incluem cloridratos, bromidratos, sulfatos, metanossulfonatos, nitratos, maleatos, acetatos, citratos, fumaratos, tartaratos (e. g. (+)-tartaratos, (-)-tartaratos ou suas misturas incluindo misturas racémicas), succinatos, benzoatos e sais com aminoácidos, tal como o ácido glutâmico. Os sais também podem ser formados com bases orgânicas adequadas, quando o composto compreende um grupo funcional ácido, tais como  $\text{-COOH}$  ou  $\text{-SO}_3\text{H}$ . Tais bases adequadas para a formação de sais de adição de base farmaceuticamente aceitáveis com compostos da presente invenção incluem bases orgânicas que são não tóxicas e suficientemente fortes para reagir com o grupo funcional ácido. Tais bases orgânicas são bem conhecidas na técnica e incluem aminoácidos, tais como arginina e lisina, mono-, di- e trietanolamina, colina, mono-, di- e triálquilamina, tais como metilamina, dimetilamina e trimetilamina, guanidina, N-benzilfenetilamina, N-metilglucosamina, N-metilpiperazina, morfolina, etilenodiamina, tris(hidroximetil)aminometano, e semelhantes.

Como aqui utilizado, uma "composição farmacêutica" é uma formulação compreendendo os compostos divulgados e um diluente ou veículo farmacêuticamente aceitável, numa forma adequada para administração a um indivíduo. A composição farmacêutica pode estar em bruto ou em forma de dosagem unitária. A forma de dosagem unitária pode estar em qualquer de uma variedade de formas, incluindo, por exemplo, uma cápsula, um saco IV, um comprimido, uma única bomba de um inalador de aerossol, ou um frasquinho. A quantidade de ingrediente activo (*i. e.*, uma formulação do composto divulgado ou os seus sais) numa dose unitária de composição é uma quantidade eficaz e pode ser variada de acordo com o tratamento particular envolvido. Pode ser evidente que pode ser necessário realizar variações de rotina na dosagem dependendo da idade e estado do doente. A dosagem irá também depender da via de administração. Estão contempladas uma variedade de vias incluindo tópica, oral, pulmonar, rectal, vaginal, parentérica, incluindo transdérmica, subcutânea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal e intranasal.

Os compostos aqui descritos, e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis podem ser utilizados em preparações farmacêuticas, em combinação com um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável. Veículos farmacêuticamente aceitáveis adequados incluem enchimentos ou diluentes sólidos inertes e soluções aquosas ou orgânicas estéreis. Os compostos estarão presentes em tais composições farmacêuticas em quantidades suficientes para proporcionar a quantidade de dosagem desejada na gama aqui descrita. As técnicas para a formulação e administração dos compostos da presente invenção

podem ser encontrados em *Remington: a Ciência e a Prática de Farmácia*, 19ª edição, Mack Publishing Co., Easton, PA (1995).

Como aqui utilizado, um "indivíduo" inclui mamíferos, e. g., humanos, animais de companhia (e. g., cães, gatos, aves e semelhantes), animais de quinta (e. g., vacas, ovelhas, porcos, cavalos, aves e semelhantes) e laboratório animais (e. g., ratos, ratinhos, cobaios e outros). Num exemplo preferido dos métodos descritos, o sujeito é humano.

Como aqui utilizado, uma "quantidade terapeuticamente eficaz" de um composto da invenção divulgada é a quantidade que, quando administrada a um sujeito em necessidade de tratamento, melhora o prognóstico do sujeito, e. g., atrasa o início e/ou reduz a gravidade de um ou mais dos sintomas do sujeito associados com uma infecção fúngica. A quantidade do composto divulgado para ser administrada a um sujeito irá depender da doença em particular, do modo de administração e das características do indivíduo, tais como estado geral de saúde, outras doenças, idade, sexo, genótipo, peso corporal e tolerância a drogas. O perito na técnica será capaz de determinar as dosagens apropriadas dependendo destes e de outros factores. As quantidades eficazes dos compostos divulgados tipicamente variam entre cerca de 0,1 mg/kg de peso corporal por dia e cerca de 1000 mg/kg de peso corporal por dia e, de um modo preferido, entre 1 mg/kg de peso corporal por dia e 100 mg/kg de peso corporal por dia.

A presente invenção baseia-se na identificação do receptor sensível a  $\alpha$ -bungarotoxina que, quando exposto a um agonista do receptor, inibe a libertação de citocinas pró-inflamatórias de

macrófagos quando os macrófagos são estimulados de outra forma a libertar citocinas inflamatórias. O receptor responsável para esta inibição é o receptor  $\alpha 7$ . Assim, o tratamento de um macrófago com um agonista do receptor  $\alpha 7$  inibe a libertação de macrófagos de citocinas pró-inflamatórias, especialmente TNF, se o macrófago fosse de outro modo estimulado, e. g., com o lipopolissacárido bacteriano (LPS), para libertar as citocinas pró-inflamatórias.

Deste modo, um exemplo da presente divulgação é dirigido a métodos de inibição da libertação de citocina pró-inflamatória de uma célula de mamífero. Os métodos compreendem o tratamento da célula com um agonista colinérgico em uma quantidade suficiente para diminuir a quantidade de citocina pró-inflamatória libertada da célula, em que o agonista colinérgico é selectivo para um receptor nicotínico  $\alpha 7$ .

Tal como aqui utilizado, uma citocina é uma proteína ou péptido solúvel que é naturalmente produzido por células de mamíferos e que actuam *in vivo* como reguladores humorais a concentrações de micro a picomolares. As citocinas podem, seja em condições normais ou patológicas, modular as actividades funcionais de células e tecidos individuais. Uma citocina pró-inflamatória é uma citocina que é capaz de causar qualquer das seguintes reacções fisiológicas associadas com inflamação: vasodilatação, hiperemia, aumento da permeabilidade dos vasos com edema associado, acumulação granulócitos e fagócitos mononucleares ou a deposição de fibrina. Em alguns casos, a citocina pró-inflamatória também pode causar apoptose, tal como na insuficiência cardíaca crónica, em que o TNF tem sido mostrado estimular a apoptose de cardiomiócitos (Pulkki, 1997;

Tsutsui *et al.*, 2000). Exemplos não limitativos de citocinas pró-inflamatórias são factor de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-18, interferão  $\gamma$ , HMG-1, factor de activação de plaquetas (PAF) e factor inibidor da migração de macrófagos (MIF). Num exemplo da presente divulgação compreendendo a invenção, a citocina pró-inflamatória que é inibida pelo tratamento com o agonista colinérgico é o TNF, porque esta citocina é produzida pelos macrófagos e medeia condições deletérias para muitos distúrbios importantes, por exemplo, choque endotóxico, asma, artrite reumatóide, doença inflamatória biliar, insuficiência cardíaca e rejeição de aloenxerto.

Citocinas pró-inflamatórias devem ser distinguidas de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4, IL-10 e IL-13, que não são mediadores de inflamação. Num exemplo, a libertação de citocinas anti-inflamatórias não é inibida por agonistas colinérgicos.

Em muitos casos, as citocinas pro-inflamatórias são produzidas numa cascata de citocinas inflamatórias, aqui definido como uma libertação *in vivo* de pelo menos uma citocina pró-inflamatória num mamífero em que a libertação de citocinas afecta um estado fisiológico do mamífero.

Qualquer célula de mamífero que produz citocinas pró-inflamatórias, são úteis para a prática da presente divulgação compreendendo a invenção. Exemplos não limitativos são os monócitos, macrófagos, mastócitos, neutrófilos, células epiteliais, osteoblastos, fibroblastos, células do músculo liso

e neurónios. Em formas de realização preferidas, a célula é um macrófago.

Tal como aqui utilizado, um "receptor colinérgico  $\alpha 7$ " é um receptor compreendendo uma subunidade  $\alpha 7$ . O receptor pode compreender apenas subunidades  $\alpha 7$ ; em alternativa, o receptor compreende subunidade(s)  $\alpha 7$  e subunidade(s) de outros subtipos de receptores colinérgicos. Num exemplo, o receptor é uma homopentâmero. Noutro exemplo, o receptor é uma heteropentâmero.

Tal como aqui utilizado, um "agonista do receptor colinérgico  $\alpha 7$ " é um composto que se liga a um receptor compreendendo uma subunidade  $\alpha 7$ , *in vivo* ou *in vitro*, induzindo o receptor para desempenhar a sua função fisiológica. Numa forma de realização, um agonista do receptor colinérgico inibe a libertação de TNF a partir de células que expressam os receptores colinérgicos compreendendo subunidades  $\alpha 7$  quando a célula é de outro modo estimulada para libertar essas citocinas pró-inflamatórias. O perito na técnica pode determinar se um composto particular é um agonista do receptor  $\alpha 7$  por qualquer um de vários métodos bem conhecidos, por exemplo, os proporcionados no Exemplo A abaixo.

Quando se refere o efeito do agonista colinérgico na libertação de citocinas pró-inflamatórias, uma cascata de citocinas inflamatórias ou o efeito de estimulação do nervo vago numa cascata de citocinas inflamatórias, a utilização dos termos "inibir" ou "diminuir" engloba, pelo menos, uma pequena mas mensurável redução na libertação de citocinas pró-inflamatórias. Num exemplo da presente divulgação, a libertação da citocina pró-inflamatória é inibida em pelo menos 20% relativamente a



controles não tratados; em formas de realização mais preferidas, a inibição é pelo menos 50%; em ainda outro exemplo, a inibição é pelo menos 70%, e ainda em outro exemplo, a inibição é pelo menos 80%. Tais reduções na libertação de citocinas pró-inflamatórias são capazes de reduzir os efeitos deletérios de uma cascata de citocinas inflamatórias em formas de realização *in vivo*.

Qualquer agonista  $\alpha 7$ , conhecido actualmente ou identificado mais tarde, seria expectável inibir a libertação de citocinas pró-inflamatórias de células humanas. Num exemplo da presente divulgação compreendendo a invenção, o agonista colinérgico não é tóxico de outro modo para a célula às concentrações úteis. Num exemplo, o agonista colinérgico tem sido terapeuticamente utilizado *in vivo* ou é produzido de modo natural pelas células de mamífero. Exemplos não limitativos incluem acetilcolina, muscarina, nicotina, 3-2,4-dimetoxibenzilidina anabaseína (DMXB-A, também conhecido como GTS-21) (Kem *et al.*, 1997; Simosky *et al.*, 2001), colina, iodeto de cocaína (Francis *et al.*, 2001).

Em formas de realização muito preferidas, o agonista colinérgico é um agonista que é selectivo para  $\alpha 7$ , uma vez que um tal agonista seria esperado causar menos efeitos laterais que um agonista colinérgico não específico (e. g., nicotina) a um indivíduo que está a ser tratado contra a inflamação. Como aqui utilizado, um agonista é selectivo para  $\alpha 7$  se esse agonista é um agonista que activa  $\alpha 7$  numa extensão maior do que to esse agonista activa pelo menos um outro receptor nicotínico. Uma tal diferença de activação pode ser determinada por comparação dos vários receptores por qualquer método conhecido, por exemplo

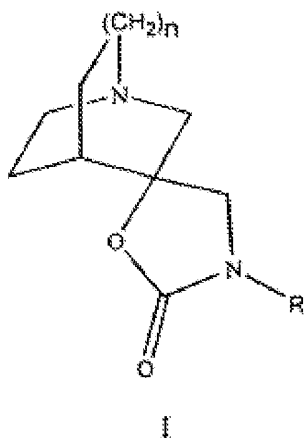
utilizando um ensaio *in vitro* de ligação a receptor, tais como os produzidos por NovaScreen Biosciences Corporation (Hanover, MD), ou pelos métodos divulgados nos documentos WO 02/44176 (testado  $\alpha 4\beta 2$ ), Patente U.S. Nº. 6.407.095 (receptor nicotínico periférico do tipo gânglio), Publicação do Pedido de Patente U.S. Nº. 2002/0086871 (ligação de ligandos marcados a membranas preparadas de células GH<sub>4</sub>Cl transfectadas com o receptor de interesse), Publicação do Pedido de Patente U.S. 2002/0086871 ( $\alpha 1$  e  $\alpha 4$ ) e documento WO 97/30998. As referências que descrevem métodos para a determinação de agonistas que são selectivos para os receptores  $\alpha 7$  incluem: Pat. U.S. 5.977.144 (Table 1), WO 02/057275 (p 41-42) e Holladay *et al.* (1997). Ensaaios para outros subtipos de receptores nicotínicos são conhecidos do especialista na técnica.

Num método preferido, a ligação ou a actividade (respostas comuns) de oócitos de *Xenopus* expressando o subtipo de receptor  $\alpha 7$  ou outro subtipo de receptor (e. g.,  $\alpha 4\beta 2$ ) após administração do agonista. Agonistas que resultam numa maior expressão do subtipo de receptor  $\alpha 7$  são considerados serem agonistas selectivos para  $\alpha 7$ . Utilizando qualquer dos métodos acima ou um método equivalente, é preferido que o agonista selectivo para  $\alpha 7$  seja pelo menos duas vezes, de um modo mais preferido pelo menos cinco vezes, de um modo ainda mais preferido pelo menos 10 vezes e, de um modo muito preferido pelo menos 50 vezes mais capaz de activar o receptor  $\alpha 7$  que pelo menos um outro receptor nicotínico.

Um agonista é específico para  $\alpha 7$  se esse agonista activa o receptor  $\alpha 7$  num grau muito superior (*i. e.*, pelo menos 10 vezes, de um modo preferido pelo menos 20 vezes, de um modo mais

preferido pelo menos 50 vezes) que qualquer outro receptor. De um modo muito preferido, o agonista específico não irá activar outro receptor nicotínico a qualquer grau mensurável (*i. e.*, significativo a  $P = 0,05$  vs. receptor não tratado numa comparação bem controlada). Exemplos não limitativos de agonistas específicos para  $\alpha 7$  são DMXB-A (Composto (V)) e iodeto de cocaína.

Em alguns exemplos, da presente divulgação compreendendo a invenção, o agonista colinérgico é um composto de fórmula I:



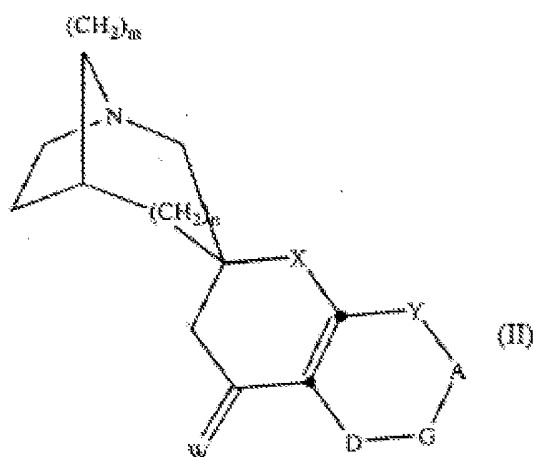
onde R representa hidrogénio ou metilo, e

n representa 0 ou 1;

ou um seu sal farmacêuticamente aceitável. Em formas de realização particularmente preferidas o agonista colinérgico é (-)-espiro[1-azabicyclo[2.2.2]octano-3,5'-oxazolidin-2'-ona] (Composto (VII)). Métodos para a preparação de compostos de fórmula I são descritos na Patente U.S. Nº. 5.902.814, cujos

ensinamentos são aqui incorporados por referência na sua totalidade.

Em outros exemplos, o agonista colinérgico nicotínico é um composto de fórmula II:



onde:

m é 1 ou 2;

n é 0 ou 1;

Y é CH, N ou NO;

X é oxigénio ou enxofre;

W é oxigénio, H<sub>2</sub> ou F<sub>2</sub>;

A é N ou C(R<sup>2</sup>);

G é N ou C(R<sup>3</sup>);

D é N ou C(R<sup>4</sup>);

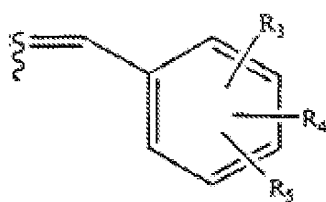
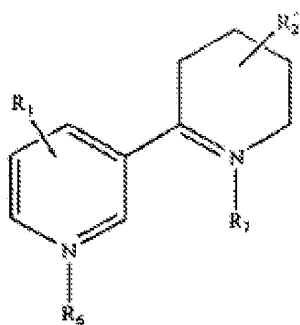
com a condição de que não mais de um de A, G e D seja azoto mas pelo menos um de Y, A, G e D seja azoto ou NO;

R<sup>1</sup> é hidrogénio ou alquiloC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

$R^2$ ,  $R^3$  e  $R^4$  são independentemente hidrogénio, halogéneo, alquiloC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alceniloC<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, alciniloC<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, arilo, heteroarilo, OH, OalquiloC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>R<sup>1</sup>, -CN, -NO<sub>2</sub>, -NR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>, -CF<sub>3</sub> ou -OSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, ou  $R^2$  e  $R^3$ ,  $R^3$  e  $R^4$ , respectivamente, podem em conjunto formar outro anel de seis membros aromático ou hetero-aromático partilhando A e G, ou G e D, respectivamente, contendo entre zero e dois átomos de azoto, e substituído com um ou dois dos seguintes substituintes: independentemente hidrogénio, halogéneo, alquiloC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alceniloC<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, alciniloC<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, arilo, heteroarilo, OH, OalquiloC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>R<sup>1</sup>, -CN, -NO<sub>2</sub>, -NR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>, -CF<sub>3</sub> ou -OSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>;  $R^5$  e  $R^6$  são independentemente hidrogénio, alquiloC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, C(O)R<sup>7</sup>, C(O)NHR<sup>8</sup>, C(O)OR<sup>9</sup>, SO<sub>2</sub>R<sup>10</sup> ou podem em conjunto ser (CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>Q(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> onde Q é O, S, NR<sup>11</sup>, ou uma ligação; j é 2 a 7; k é 0 a 2;  $R^7$ ,  $R^8$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$  e  $R^{11}$  são independentemente alquiloC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, arilo ou heteroarilo, ou um seu enantiómero,

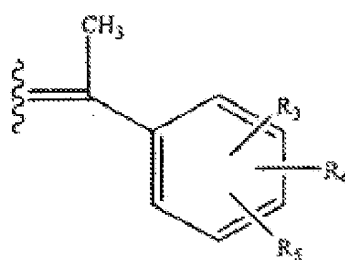
ou um seu sal farmacêuticamente aceitável. Em formas de realização preferidas, um agonista colinérgico é um composto de fórmula II em que m é 1; n é 0; p é 0; x é oxigénio; A é C(R<sup>2</sup>); G é C(R<sup>3</sup>); e D é C(R<sup>4</sup>). Numa forma de realização particularmente preferida o agonista colinérgico nicotínico é (R)-(-)-5'-fenilespiro[1-azabicyclo[2.2.2]octano-3,2'-(3'H)-furo[2,3-b]piridina]. Métodos de preparação de compostos de fórmula II estão descritos na Patente U.S. N°. 6.110.914.

Em exemplos adicionais, o agonista colinérgico nicotínico é um composto de fórmula III:

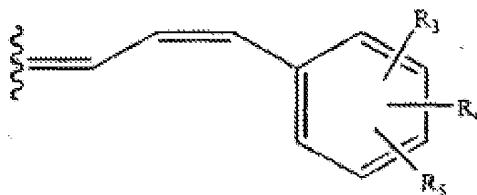


III

onde  $R_1$ ,  $R_6$  e  $R_7$  são hidrogénio ou alquilo  $C_1-C_4$ ; e  $R_2$  é seleccionado de um grupo de



e

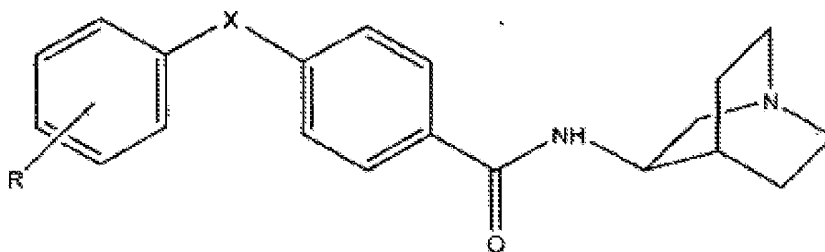


e onde  $R_3$ ,  $R_4$  e  $R_5$  são seleccionados do grupo consistindo de hidrogénio, alquilo $C_1-C_4$  opcionalmente substituído com N,N-dialquilamino tendo 1 a 4 carbonos em cada um dos alquilos, alcóxilo $C_1-C_6$  opcionalmente substituído com N,N-dialquilamino tendo 1 a 4 carbonos em cada um dos alquilos, carboalcóxilo tendo 1 a 4 carbonos no alcóxilo, amina, amida tendo 1 a 4 carbonos no acilo, ciano e N,N-dialquilamino tendo 1 a 4 carbonos em cada um dos alquilos, halogénio, hidróxido ou nítro.

Num exemplo, um agonista é um composto de fórmula III, onde  $R_2$  está ligado à posição 3 do anel de tetra-hidropiridina, e ainda onde  $R_3$ , o qual está ligado à posição 4 ou 2 do anel de fenilo, é seleccionado do grupo consistindo de amina, hidróxido, cloro, ciano, dimetilamino, metilo, metóxido acetilamino, acetóxido, e nítro. Num exemplo particularmente preferido, o agonista é um composto de fórmula III, onde  $R_3$  é hidróxido, e onde  $R_1$ ,  $R_4$ , e  $R_5$  são hidrogénio. Numa outra forma de realização particularmente preferida, o agonista é um composto de fórmula III onde  $R_3$  é acetilamino e em que  $R_1$ ,  $R_4$  e  $R_5$  são hidrogénio. Noutro exemplo particularmente preferido, o agonista é um composto de fórmula III em que  $R_3$  é acetóxido e em que  $R_1$ ,  $R_4$  e  $R_5$  são hidrogénio. Noutro exemplo particular, o agonista é um composto de fórmula 3, em que  $R_3$  é metóxido e em que  $R_1$ ,  $R_4$  e  $R_5$  são hidrogénio. Ainda noutro exemplo, o agonista é um composto de fórmula III, em que  $R_3$  é metóxido e em que  $R_1$  e  $R_4$  são

hidrogénio e ainda em que  $R_3$  está ligado à posição 2 do anel fenilo e  $R_5$ , o qual está ligado à posição 4 do anel fenilo, é metoxilo ou hidroxilo. Num exemplo particularmente preferido, o agonista colinérgico nicotínico é seleccionado do grupo consistindo de 3-2,4-dimethoxybenzilidina anabaseína (DMXB-A; Composto (V)), 3-(4-hidroxibenzilideno)anabaseína, 3-(4-metoxibenzilideno)anabaseína, 3-(4-aminobenzilideno)anabaseína, 3-(4-hidroxi-2-metoxibenzilideno)anabaseína (Composto (VI)), 3-(4-metoxi-2-hidroxibenzilideno)anabaseína, trans-3-cinamilideno anabaseína, trans-3-(2-metoxi-cinamilideno)anabaseína e trans-3-(4-metoxicinamilideno)anabaseína. Métodos de reparação de compostos de fórmula III estão descritos na Patente U.S. N°. 5.977.144.

Ainda em outros exemplos, o agonista é um composto de fórmula IV:



IV

onde X é O ou S; e

R é seleccionado do grupo consistindo de H,  $OR_1$ ,  $NHC(O)R_1$ , e um halogéneo, em que  $R_1$  é um hidrogénio ou um alquilo  $C_1$ - $C_4$ . Numa forma de realização particularmente preferida, o agonista colinérgico nicotínico é seleccionado do grupo



consistindo de N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il]-4-(4-hidroxifenoxi)benzamida, N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il]-4-(4-acetamidofenoxi)benzamida, N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il]-4-(fenilsulfanil)benzamida e N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il]-4-(3-clorofenilsulfonil)benzamida. Métodos de preparação de compostos de fórmula IV estão descritos na Publicação do Pedido de Patente PCT WO 01/85727.

Ainda em outros exemplos, o agonista é o éster 1-(2-fluorofenil)-etílico do ácido (1-aza-bicyclo[2.2.2]oct-3-il)-carbâmico. Métodos de preparação deste composto foram descritos na Publicação do Pedido de Patente U.S. 2002/0040035.

Ainda em outros exemplos, o agonista  $\alpha 7$  é um anticorpo, o qual é um agonista selectivo (de um modo muito preferido um agonista específico) do receptor nicotínico  $\alpha 7$ . Os anticorpos podem ser policlonais ou monoclonais; podem ser de qualquer um de um número de fontes como humana, eucariótica não humana, celular, fúngica ou bacteriana; podem ser codificados por sequências codificantes genómicas ou de origem em vector; e podem ser potenciadas contra  $\alpha 7$  nativo ou recombinante, ou os seus fragmentos, com ou sem a utilização de adjuvantes, tudo de acordo com uma variedade de métodos e procedimentos bem conhecidos na técnica para gerar e produzir anticorpos. Outros exemplos de tais anticorpos úteis incluem mas não estão limitados a tipos quiméricos, de cadeia simples e vários anticorpos humanos ou humanizados, bem como vários seus fragmentos, tais como fragmentos Fab e fragmentos produzidos por sistemas de expressão especiais.

A presente divulgação é também dirigida a anticorpos que são agonistas  $\alpha 7$ , como descrito acima.

Um exemplo não limitativo de métodos para a produção de anticorpos para o receptor nicotínico  $\alpha 7$  é imunizar um animal de laboratório adequado com o receptor  $\alpha 7$  ou um seu fragmento e isolar os anticorpos potenciados pela imunização que ligam  $\alpha 7$ . Procedimentos de imunização e de isolamento são bem conhecidos de alguém com conhecimentos comuns na técnica. Os anticorpos que são agonistas podem ser identificados pelos processos aqui descritos, por exemplo, combinando os anticorpos isolados com um macrófago que foi estimulado para libertar citocina pró-inflamatória, ou qualquer outro método adequado para avaliar a actividade do receptor  $\alpha 7$ . A inibição da libertação de citocinas é indicativa da actividade agonista. A selectividade para  $\alpha 7$  pode ser avaliada por rastreio para a actividade contra pelo menos um outro receptor nicotínico ou colinérgico, como discutido anteriormente. Os anticorpos que se verificou serem agonistas selectivos para o receptor  $\alpha 7$  podem ser ainda avaliados quanto à sua eficácia no tratamento de uma ou mais das doenças inflamatórias aqui descritas, e. g., testes adicionais *in vitro* ou *in vivo* em modelos animais. A presente divulgação também inclui anticorpos agonistas selectivos de  $\alpha 7$  identificados por este método.

A presente invenção é útil para o estudo de células em cultura, por exemplo, para estudar o efeito da libertação de citocinas inflamatórias na biologia de macrófagos, ou para testar compostos para actividade agonista colinérgica. No entanto, as aplicações *in vivo* caracterizam muitos dos exemplos preferidos. Nesses exemplos, a célula está num doente que sofre

ou está em risco de sofrer de um estado mediado por uma cascata de citocinas inflamatórias. Tal como aqui utilizado, um doente pode ser qualquer mamífero. No entanto, no exemplo preferido, o doente é um humano.

Qualquer estado mediado por uma cascata de citocinas inflamatórias pode ser tratado utilizando a presente invenção. Num exemplo, o estado é aquele em que a cascata de citocinas inflamatórias é afetada através da libertação de citocinas pró-inflamatórias de um macrófago. O estado pode ser um em que a cascata de citocinas inflamatórias provoca uma reacção sistémica, tal como com o choque séptico. Em alternativa, o estado pode ser mediado por uma cascata de citocinas inflamatórias localizadas, como na artrite reumatóide.

Exemplos não limitantes de estados que podem ser tratadas com utilidade utilizando a presente invenção incluem aqueles estados enumerados na secção do estado da técnica desta divulgação. De um modo preferido, o estado é a apendicite, úlceras pépticas, gástricas ou duodenais, peritonite, pancreatite, colite aguda ou isquémica, diverticulite, epiglote, acalasia, colangite, colecistite, hepatite, doença de Crohn, enterite, doença de Whipple, asma, alergia, choque anafilático, doença de complexo imune, isquemia de órgãos, lesão de reperfusão, necrose de órgãos, febre dos fenos, sepsia, septicemia, choque endotóxico, caquexia, hiperpirexia, granuloma eosinofílico, granulomatose, sarcoidose, aborto séptico, epididimite, vaginite, prostatite, uretrite, bronquite, enfisema, rinite, fibrose cística, pneumonite, pneumoultramicroscopicossilicovulcanoconiose, alveolite, bronquiolite, faringite, pleurisia, sinusite, influenza, vírus

sincicial respiratório, herpes, bacteremia disseminada, febre de Dengue, candidíase, malária, filariose, amebíase, cistos hidáticos, queimaduras, dermatite, dermatomiosite, queimaduras solares, urticária, verrugas, pápulas, vasulite, angiite, endocardite, arterite, aterosclerose, tromboflebite, pericardite, miocardite, isquemia do miocárdio, periartrose nodosa, febre reumática, doença de Alzheimer, doença celíaca, insuficiência cardíaca congestiva, síndrome da dificuldade respiratória do adulto, meningite, encefalite, esclerose múltipla, enfarte cerebral, embolia cerebral, síndrome Guillame-Barre, neurite, neuralgia, lesão da medula espinal, paralisia, uveíte, artrite, artralguas, osteomielite, fascite, doença de Paget, gota, doença periodontal, artrite reumatóide, sinovite, miastenia gravis, tiroidite, sistémica lúpus eritematoso, síndrome de Goodpasture, síndrome de Behcet, rejeição de aloenxertos, doença do enxerto-versus-hospedeiro, diabetes do Tipo I, espondilite anquilosante, doença de Berger, diabetes do Tipo II, espondilite anquilosante, doença de Berger, síndrome de Retier ou doença de Hodgkins.

Num exemplo alternativo, o estado é qualquer um dos estados listados acima, desde que o estado não seja colite ulcerosa, acidente vascular cerebral, diabetes do Tipo II, doença de Crohn, doença de Alzheimer ou uma doença inflamatória da pele.

Num exemplo, o estado é apendicite, úlceras pépticas gástricas ou duodenais, peritonite, pancreatite, hepatite, doença de Crohn, asma, alergia, choque anafilático, isquemia de órgãos, lesão por reperfusão, necrose de órgãos, febre dos fenos, sepsia, septicemia, choque endotóxico, caquexia, aborto séptico, bacteremia disseminada, queimaduras, doença de

Alzheimer, doença celíaca, insuficiência cardíaca congestiva, síndrome de dificuldade respiratória do adulto, enfarte cerebral, embolia cerebral, lesão da medula espinal, paralisia, rejeição de aloenxertos ou doença do enxerto-versus-hospedeiro.

Em outro exemplo, o estado é a apendicite, úlceras pépticas gástricas ou duodenais, peritonite, pancreatite, hepatite, asma, alergia, choque anafilático, isquemia de órgãos, lesão por reperfusão, necrose de órgãos, febre dos fenos, sepsia, septicemia, choque endotóxico, caquexia, aborto séptico, bacteremia disseminada, queimaduras, insuficiência cardíaca congestiva, síndrome da dificuldade respiratória do adulto, enfarte cerebral, embolia cerebral, lesão da medula espinal, paralisia, rejeição de aloenxertos ou doença do enxerto-versus-hospedeiro. Num exemplo, o estado é a sepsia.

Ainda noutro exemplo, o estado é seleccionado do grupo consistindo de peritonite, pancreatite, isquemia de órgãos, lesão de reperfusão, sepsia, choque endotóxico, caquexia, queimaduras, síndrome da dificuldade respiratória do adulto, doença pulmonar obstrutiva crónica, psoríase, artrite reumatóide, lúpus sistémico eritematoso, isquemia do miocárdio, e rejeição do enxerto.

Num exemplo alternativo, o estado é seleccionado do grupo consistindo de peritonite, pancreatite, sepsia, choque endotóxico, síndrome da dificuldade respiratória do adulto, doença pulmonar obstrutiva crónica, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistémico, isquemia do miocárdio, rejeição de aloenxerto, asma, doença de enxerto-versus-hospedeiro, insuficiência cardíaca congestiva e fibrose cística.

Estes estados são, de um modo preferido, tratados com qualquer dos compostos I-VII ou com os seus sais farmacêuticamente aceitáveis.

A via de administração do agonista colinérgico depende do estado a ser tratado. Por exemplo, a injeção intravenosa pode ser preferida para o tratamento de uma doença sistémica, tal como o choque séptico, e a administração por via oral pode ser preferida para o tratamento de um distúrbio gastrointestinal, tal como a úlcera gástrica. A via de administração e a dosagem do agonista colinérgico a ser administrada pode ser determinada pelo perito na arte sem experimentação indevida em conjunto com estudos padronizados de dose-resposta. Circunstâncias relevantes a serem considerados para realizar essas determinações incluem o estado ou estados a serem tratados, a escolha da composição a ser administrada, a idade, peso e resposta do doente individual, e a gravidade dos sintomas do doente. Assim, dependendo do estado, o agonista colinérgico pode ser administrado por via oral, parentérica, intranasal, vaginal, rectal, lingual, sublingual, bucal, intrabucal e transdérmica ao doente.

Deste modo, as composições de agonistas colinérgicos concebidas para administração oral, lingual, sublingual, bucal e administração intrabucal podem ser feitas sem experimentação indevida através de meios bem conhecidos na técnica, por exemplo, com um diluente inerte ou com um veículo comestível. As composições podem ser incorporadas em cápsulas de gelatina ou comprimidas em comprimidos. Para a finalidade de administração terapêutica oral, as composições farmacêuticas da presente invenção podem ser incorporadas com excipientes e utilizadas na

forma de comprimidos, trociscos, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, bolachas, gomas de mascar e semelhantes.

Os comprimidos, pílulas, cápsulas, trociscos e semelhantes podem também conter ligantes, excipientes, agente de desintegração, lubrificantes, agentes edulcorantes e agentes aromatizantes. Alguns exemplos de ligantes incluem celulose microcristalina, goma de tragacanto ou gelatina. Exemplos de excipientes incluem amido ou lactose. Alguns exemplos de agentes de desintegração incluem o ácido algínico, amido de milho e semelhantes. Exemplos de lubrificantes incluem estearato de magnésio ou estearato de potássio. Um exemplo de um deslizante é o dióxido de silício coloidal. Alguns exemplos de agentes edulcorantes incluem sacarose, sacarina e semelhantes. Exemplos de agentes aromatizantes incluem mentol, salicilato de metilo, aroma de laranja e semelhantes. Os materiais utilizados na preparação destas várias composições devem ser farmacêuticamente puros e não tóxicos nas quantidades utilizadas.

Composições de agonistas colinérgicos encontrados pelos métodos da presente invenção podem ser facilmente administrados por via parentérica, tais como, por exemplo, por injeção intravenosa, intramuscular, intratecal ou subcutânea. A administração parentérica pode ser conseguida por incorporação de composições de agonistas colinérgicos da presente invenção numa solução ou suspensão. Tais soluções ou suspensões podem também incluir diluentes estéreis, tais como água para injeção, solução salina, óleos fixos, polietilenoglicóis, glicerina, propilenoglicol ou outros solventes sintéticos. As formulações parentéricas podem também incluir agentes antibacterianos, tais como, por exemplo, álcool benzílico ou metilparabenos,

antioxidantes, tais como, por exemplo, ácido ascórbico ou bissulfito de sódio, e agentes quelantes, tal como EDTA. Também podem ser adicionados tampões, tais como acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para o ajustamento da tonicidade, tais como cloreto de sódio ou dextrose. A preparação parentérica pode ser encerrada em ampolas, seringas descartáveis ou frascos de doses múltiplas feitos de vidro ou plástico.

A administração rectal inclui a administração das composições farmacêuticas no recto ou intestino grosso. Isto pode ser conseguido utilizando supositórios ou enemas. As formulações em supositório podem ser facilmente preparadas por métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, formulações para supositórios podem ser preparadas por aquecimento de glicerina e cerca de 120° C, dissolvendo o agonista colinérgico na glicerina, misturando a glicerina aquecida após o que pode ser adicionada água purificada e vertendo a mistura quente num molde de supositório.

A administração transdérmica inclui a absorção percutânea do agonista colinérgico através da pele. As formulações transdérmicas incluem adesivos (tal como o adesivo de nicotina bem conhecido), pomadas, cremes, géis, unguentos e semelhantes.

Administrando nasalmente ou administração nasal inclui administrar o agonista colinérgico nas membranas mucosas da passagem nasal ou na cavidade nasal do doente. As composições farmacêuticas para administração nasal de um agonista colinérgico incluem quantidades terapeuticamente eficazes do agonista preparadas por métodos bem conhecidos para serem administradas, por exemplo, como um spray nasal, gotas nasais,



suspensão, gel, pomada, creme ou pó. A administração do agonista colinérgico também pode ser realizada através de um tampão nasal ou esponja nasal.

Como discutido anteriormente, os agonistas colinérgicos preferidos para estes métodos são selectivos ou específicos para o receptor  $\alpha 7$ , incluindo, por exemplo, DMXB-A (composto (V)), iodeto de cocaína.

A presente divulgação compreendendo a invenção é também dirigida a métodos para determinar se um composto é um agonista colinérgico reactivo com um receptor nicotínico  $\alpha 7$ . Os métodos compreendem determinar se o composto inibe a libertação de uma citocina pró-inflamatória de uma célula de mamífero. Nestes métodos, um composto que inibe a libertação da citocina pró-inflamatória de uma célula de mamífero é um agonista colinérgico reactivo com um receptor nicotínico  $\alpha 7$ .

Estes métodos envolvem, de um modo preferido, o tratamento da célula de mamífero com o composto juntamente com um agente que estimula uma cascata de citocinas pró-inflamatórias. Um agente preferido é o lipopolissacárido bacteriano (LPS). O composto pode ser administrado à célula de mamífero antes do agente, ao mesmo tempo que o agente ou depois do agente. De um modo preferido, o composto é administrado antes do agente. Veja-se, e. g., o Pedido de Patente U.S. N°. 09/855.446.

Num exemplo da presente divulgação, os compostos que são determinados serem agonistas  $\alpha 7$  são ainda testados quanto à sua capacidade para activar, pelo menos, um outro subtipo de receptor nicotínico, de modo a determinar se o agonista  $\alpha 7$  é

selectivo ou específico. Os compostos de teste que activam selectiva ou especificamente o subtipo  $\alpha 7$  podem ser ainda submetido a um teste mais avançado, e. g., testes *in vitro* ou testes *in vivo* em modelos animais para avaliar ainda a adequabilidade dos compostos para o tratamento de doentes com doenças inflamatórias.

Estes métodos não são estritamente limitados a qualquer composto particular a ser testado. Embora a maioria dos agonistas colinérgicos agora conhecidos sejam moléculas pequenas, a actividade agonista  $\alpha 7$  pode estar presente numa proteína (e. g., um anticorpo, como discutido anteriormente), um oligonucleótido ou mimético (e. g., um aptâmero) ou qualquer outro composto. Estes métodos são adequados para testar qualquer desses agonistas potenciais  $\alpha 7$ .

Para estes métodos, a célula pode ser qualquer célula que pode ser induzida para produzir uma citocina pró-inflamatória. Em formas de realização preferidas, a célula é uma célula imune, por exemplo, macrófagos, monócitos, ou neutrófilos. Nas formas de realização muito preferidas, a célula é um macrófago.

A citocina pró-inflamatória a ser medida para a inibição pode ser qualquer citocina pró-inflamatória que pode ser induzida a ser libertada da célula. Em formas de realização preferidas, a citocina é o TNF.

A avaliação da inibição da produção de citocinas pode ser feita por quaisquer meios conhecidos, incluindo a quantificação da citocina (e. g., com ELISA), ou por bioensaio, (e. g., determinar se a actividade da citocina pró-inflamatória está

reduzida), ou por medição do ARNm da citocina pró-inflamatória. O perito na técnica pode utilizar qualquer um destes ensaios, sem experimentação indevida. Ver também o Pedido de Patente U.S. Nº. 09/855.446 para exemplos de vários ensaios úteis a este respeito.

Estes métodos podem ser realizados *in vivo*, em que um animal, e. g., um rato, é tratado com o composto, juntamente com um agente que estimula uma cascata de citocinas pró-inflamatórias, e é medido o efeito do agente sobre a indução da cascata de citocinas pró-inflamatórias, e. g., por medição dos níveis de TNF no soro. No entanto, devido à relativa facilidade realizar estes tipos de ensaios em cultura de células em vez de com animais inteiros, os métodos são, de um modo preferido, realizadas *in vitro*, por exemplo, utilizando culturas de macrófagos.

Em exemplos relacionados da presente divulgação, a invenção é dirigida a métodos para determinar se um composto é um antagonista colinérgico reactivo com um receptor nicotínico  $\alpha 7$ . Estes métodos compreendem a determinação de se o composto reduz a capacidade de um agonista colinérgico para inibir a libertação de uma citocina pró-inflamatória de uma célula de mamífero. Nestes exemplos, um composto que reduz a capacidade de um agonista colinérgico para inibir a libertação de uma citocina pró-inflamatória de uma célula de mamífero é um antagonista colinérgico reactivo com um receptor  $\alpha 7$ .

Estes métodos envolvem, de um modo preferido, tratar a célula de mamífero com o composto juntamente com um agonista  $\alpha 7$  e um agente que estimula uma cascata de citocinas pró-

inflamatórias. Assim, estes métodos são essencialmente como os métodos descritos imediatamente acima, excepto que o composto do ensaio anterior é um agonista  $\alpha 7$  que inibe a libertação de citocinas pró-inflamatórias da célula que é de outra forma induzida pelo agente. O composto de teste é avaliado para determinar se pode impedir o agonista  $\alpha 7$  de inibir a cascata de citocina pró-inflamatória, causada pelo agente (e. g., LPS). As células e o agente podem ser como descrito para os métodos imediatamente anteriores; o agonista  $\alpha 7$  pode ser qualquer agonista  $\alpha 7$  não específico, selectivo, ou específico conhecido, por exemplo, nicotina ou DMXB-A. Igualmente como com os métodos imediatamente anteriores, estes métodos podem ser realizados *in vivo* mas são, de um modo preferido, realizados *in vitro*.

Tal como com o método imediatamente anterior, o composto a ser testado para a actividade antagonista  $\alpha 7$  não está limitado a compostos de baixo peso molecular, mas podem incluir qualquer composto, incluindo proteínas, oligopéptidos ou miméticos de oligopéptidos. Também como com o método imediatamente anterior, a avaliação da eficácia do composto de ensaio, por medição da inibição da produção de citocinas, pode ser por quaisquer meios conhecidos, incluindo a quantificação da citocina (e. g., com ELISA), por bioensaio, (por exemplo, a determinação se a actividade da citocina pró-inflamatória está reduzida), ou por medição do ARNm da citocina pró-inflamatória. O perito na técnica pode utilizar qualquer destes ensaios, sem experimentação indevida.

Num outro exemplo, a presente descrição é dirigida a métodos para determinar se um composto de teste tem a capacidade de inibir a inflamação. Em alguns aspectos, estes métodos

compreendem determinar se o composto de teste é um agonista colinérgico reactivo com um receptor nicotínico  $\alpha 7$ . De um modo preferido, os métodos compreendem ainda determinar se o composto de teste é selectivo para  $\alpha 7$  testando o composto de teste quanto à sua capacidade para activar, pelo menos, um outro receptor nicotínico. Estas determinações podem ser realizadas como descrito anteriormente, e. g., determinando se o composto inibe a libertação de uma citocina pró-inflamatória a partir de uma célula de mamífero, de um modo preferido, um macrófago.

Em outros aspectos, os métodos para determinar se um composto de teste tem a capacidade para inibir a inflamação compreendem determinar se o composto de teste inibe a ligação de um antagonista de um receptor nicotínico  $\alpha 7$ , por exemplo determinando se o composto de teste inibe a ligação de FITC- $\alpha$ -bungarotoxina de um macrófago. Ver Exemplo 1, em que, em algumas formas de realização, o método utilizaria o método de coloração de  $\alpha$ -bungarotoxina e microscopia confocal, excepto que o composto de teste seria adicionado para determinar se o composto inibiria a ligação da  $\alpha$ -bungarotoxina aos macrófagos.

Em alguns casos, pode ser desejável restringir a capacidade de uma célula de mamífero para inibir a libertação de citocinas pró-inflamatórias. Exemplos de tais casos são quando as citocinas pró-inflamatórias são desejados para prevenir ou combater o cancro, ou quando os efeitos fisiológicos do receptor  $\alpha 7$  está a ser estudado. A presente divulgação é assim também dirigida a métodos de inibição da atenuação da libertação de citocina pró-inflamatória de uma célula de mamífero, por exposição da célula a um agonista colinérgico. Os métodos compreendem o tratamento da célula com um agente que inibe a

ligação do agonista colinérgico a um receptor  $\alpha 7$ . Tal como com os métodos anteriormente descritos, a célula preferida para estes métodos é um macrófago.

O perito na técnica pode visionar várias formas de como a ligação do agonista ao receptor colinérgico  $\alpha 7$  numa célula pode ser inibida. Exemplos incluem o tratamento da célula com um antagonista  $\alpha 7$ ; o tratamento da célula com um anticorpo ou um aptâmero que se liga ao receptor  $\alpha 7$ , prevenindo a ligação do agonista ao receptor colinérgico; ou, de um modo preferido, o tratamento da célula com um oligonucleótido anti-sentido ou mimético que é complementar ao ARNm de  $\alpha 7$  e capaz de inibir a tradução do ARNm para o receptor  $\alpha 7$ . Ver Exemplo 1 para a demonstração da eficácia de tal mimético anti-sentido. Tal como aqui utilizado, um mimético é um análogo de oligonucleótido que difere quimicamente de um oligonucleótido de ocorrência natural, mas que é capaz de ligação não covalente do tipo oligonucleótido a uma sequência nucleotídica complementar. Ver, por exemplo, a Patente U.S. N°. 6436909 para uma discussão de miméticos úteis. No exemplo preferido, o agente é um oligonucleótido mimético fosforotioato, complementar ao gene  $\alpha 7$  relevante. O gene  $\alpha 7$  é proporcionado, e. g., em Peng *et al.*, 1994. Um exemplo de uma sequência anti-sentido útil é 5'-gcagcgcacgtgtgagtcctcg-3' (ver Exemplo 1) ou uma sequência semelhante, de um modo preferido, em torno do codão de iniciação da tradução do gene da subunidade  $\alpha 7$  humano.

Assim, a divulgação é também dirigida a oligonucleótidos ou miméticos capazes de inibir a atenuação de libertação de TNF induzida por lipopolissacárido de um macrófago em mamíferos, por exposição do macrófago a um agonista colinérgico. Os

oligonucleótidos ou miméticos compreendem uma sequência maior do que 5 nucleótidos de comprimento que é complementar a um ARNm de um receptor  $\alpha 7$ . De um modo preferido, os oligonucleótidos ou miméticos são complementares à região de iniciação da transcrição do ARNm de  $\alpha 7$ . De um modo muito preferido, o oligonucleótido ou mimético compreende a sequência 5'-gcagcgcgatgttgagtcctcg-3'.

#### Exemplo 1. Receptor Nicotínico $\alpha 7$ como Substrato Molecular da Sinapse Neuro-imune

##### Resumo do exemplo

Reporta-se aqui que a subunidade  $\alpha 7$  do receptor nicotínico é necessária para a inibição por acetilcolina da libertação de TNF do macrófago. A  $\alpha$ -bungarotoxina liga-se a grupos de receptores discretos expressos na superfície de macrófagos humanos primários. A imunotransferência com anticorpos específicos para  $\alpha 7$  confirmou a identidade da subunidade  $\alpha 7$  em proteínas isoladas por aderência a esferas conjugadas com  $\alpha$ -bungarotoxina. A exposição de macrófagos a oligonucleótidos anti-sentido  $\alpha 7$  diminuiu a ligação de  $\alpha$ -bungarotoxina e restaurou a libertação de TNF na presença de nicotina. Os ratinhos deficientes na subunidade  $\alpha 7$  do receptor nicotínico produziram significativamente mais TNF, IL- $1\beta$  e IL-6 durante a endotoxemia, comparativamente a ratinhos do tipo selvagem. Macrófagos isolados de murganhos com o gene  $\alpha 7$  desligado não responderam a agonistas colinérgicos e continuaram a produzir TNF. Por fim, a estimulação elétrica do nervo vago utilizando um protocolo que inibiu a libertação de TNF em ratinhos selvagens

não inibiu a libertação de TNF em ratinhos deficientes em  $\alpha 7$ . Assim, a subunidade  $\alpha 7$  do receptor nicotínico de acetilcolina é essencial para a inibição colinérgica de citocinas pró-inflamatórias.

## Resultados e Discussão

Como um primeiro passo para a identificação do receptor de macrófagos envolvido na inibição da libertação de citocinas pró-inflamatórias, macrófagos primários humanos foram marcados com FITC- $\alpha$ -bungarotoxina, um péptido antagonista que se liga a um subconjunto de receptores colinérgicos (Lindstrom, 1995; Leonard & Bertrand, 2001). Foi observada uma forte ligação de  $\alpha$ -bungarotoxina na superfície dos macrófagos (FIG. 1a). Pré-tratamento com nicotina reduziu acentuadamente a intensidade da ligação (FIG. 1b). Nas junções neuromusculares e nas sinapses neuronais, os receptores nicotínicos do formam agregados ou grupos de receptores que facilitam a transmissão do sinal rápido (Lin et al., 2001; Feng et al., 1998; Shoop et al., 2000). Grupos discretos de ligação de  $\alpha$ -bungarotoxina podem ser claramente observados, com a ampliação maior, na superfície de macrófagos, especialmente concentrados na superfície do corpo celular (FIG. 1c, d).

Até à data,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 7$  e  $\alpha 9$  são as subunidades de ligação a  $\alpha$ -bungarotoxina dos receptores nicotínicos conhecidas em células humanas (Lindstrom, 1995; Leonard e Bertrand, 2001). As subunidades  $\alpha 1$  juntamente com  $\beta 1$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$  (adulto) ou  $\gamma$  (fetal), formam receptores nicotínicos heteropentaméricos que regulam a contração muscular;  $\alpha 7$  e  $\alpha 9$  podem cada formar receptores



nicotínicos homopentaméricos (Lindstrom, 1995; Leonard e Bertrand, 2001). Para determinar se estas subunidades dos receptores são expressas em macrófagos, isolou-se ARN de macrófagos humanos primários diferenciados *in vitro* a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e realizaram-se análises por RT-PCR. Para aumentar a sensibilidade e especificidade das experiências, foram realizadas duas rondas de PCR, após transcrição inversa, utilizando iniciadores emparelhados específicos para cada subunidade. As identidades dos produtos de PCR foram confirmadas por sequenciação. A expressão de  $\alpha 1$ ,  $\alpha 10$ , (dados não mostrados) e  $\alpha 7$  (FIG. 2a) ARNm foi detectada em macrófagos humanos provenientes de doadores de sangue não relacionados. A mesma estratégia de RT-PCR não detectou a expressão de ARNm da subunidade  $\alpha 9$  em macrófagos (dados não mostrados).

A expressão proteica de subunidades  $\alpha 1$  e  $\alpha 7$  foi, de seguida, examinada por transferência de Western. O anticorpo específico  $\alpha 7$  reconheceu uma banda bem definida com um peso molecular aparente de cerca de 55 kD (semelhante ao peso molecular publicado para a proteína  $\alpha 7$  [Peng *et al.*, 1994; Drisdell e Green, 2000]) a partir de macrófagos primários diferenciados e de PBMC indiferenciados (dados não mostrados). A expressão da proteína  $\alpha 1$  foi diminuída para níveis indetectáveis durante a diferenciação *in vitro* de PBMC para macrófagos (dados não mostrados). A subunidade  $\delta$ , um componente necessário do receptor nicotínico de acetilcolina heteropentamérico  $\alpha 1$ , não pode ser detectada por esta estratégia de RT-PCR emparelhada (dados não mostrados). Para confirmar que os sinais positivos em macrófagos representavam o receptor nicotínico  $\alpha 7$  que liga  $\alpha$ -bungarotoxina, utilizou-se pérolas com  $\alpha$ -bungarotoxina

conjugada para isolar as proteínas preparadas a partir de macrófagos humanos ou de células PC 12 (células de feocromocitoma de rato, que foram mostrados expressar o homopentâmero  $\alpha 7$  [Drisdel e Green, 2000]). As proteínas retidas foram analisadas por transferência de Western, utilizando anticorpos policlonais ou monoclonais específicos para  $\alpha 7$  que reconheceram a proteína  $\alpha 7$  humana e de rato (as proteínas  $\alpha 7$  de humano e de rato contêm o mesmo número de aminoácidos e são 94% idênticas [Peng *et al.*, 1994; Seguela *et al.*, 1993]). Os resultados mostraram claramente que os macrófagos humanos expressam a proteína  $\alpha 7$  de ligação a  $\alpha$ -bungarotoxina com peso molecular aparente que é semelhante ao da subunidade  $\alpha 7$  de células PC 12 (FIG. 2b). A identidade da subunidade  $\alpha 7$  de macrófagos foi confirmada por clonagem da  $\alpha 7$  de comprimento total expressa por macrófagos por métodos de RT-PCR. A subunidade  $\alpha 7$  de comprimento total acetilcolina nicotínica em macrófagos contém os exões 1 a 10, idêntico à subunidade  $\alpha 7$  acetilcolina nicotínica expressa em neurónios (Gault *et al.*, 1998). Juntos, estes dados identificam a subunidade  $\alpha 7$  acetilcolina nicotínica como o receptor de ligação a  $\alpha$ -bungarotoxina expresso na superfície de macrófagos humanos.

Para estudar se o receptor  $\alpha 7$  é necessário para a inibição colinérgica da libertação de TNF, sintetizou-se Oligonucleótidos anti-sentido de fosforotioato que rodeiam o codão de iniciação da tradução do gene humano da subunidade  $\alpha 7$ . Oligonucleótidos anti-sentido para regiões semelhantes dos genes das subunidades  $\alpha 1$  e  $\alpha 10$  foram sintetizados como controlos. Os macrófagos expostos aos oligonucleótidos anti-sentido específicos para  $\alpha 7$  (AS $\alpha 7$ ) eram significativamente menos responsivos à acção inibidora do TNF pela nicotina (FIG. 3a). Os oligonucleótidos

anti-sentido para a subunidade  $\alpha 7$  acetilcolina nicotínica restaurou a libertação de TNF de macrófagos, na presença de nicotina. A exposição de macrófagos a AS $\alpha 7$  não estimulou a síntese de TNF, na ausência de LPS e nicotina. Os oligonucleótidos anti-sentido para as subunidades  $\alpha 1$  (AS $\alpha 1$ ) e  $\alpha 10$  (AS $\alpha 10$ ), em condições idênticas, não alterou significativamente o efeito da nicotina sobre a libertação de TNF induzida por LPS (FIG. 3b, c) indicando que a supressão de TNF por nicotina é específica para a subunidade  $\alpha 7$  do receptor nicotínico de acetilcolina. Conjuntos adicionais de oligonucleótidos anti-sentido para  $\alpha 7$ ,  $\alpha 1$  e  $\alpha 10$  deram resultados semelhantes (dados não mostrados). A adição dos oligonucleótidos anti-sentido para a subunidade  $\alpha 7$  de acetilcolina nicotínica a culturas de macrófagos diminuiu a ligação de superfície da  $\alpha$ -bungarotoxina marcada com FITC (FIG. 3d, e). Em conjunto, estes dados indicam que o receptor nicotínico com a subunidade  $\alpha 7$  do receptor nicotínico de acetilcolina é necessário para a inibição dependente da via anti-inflamatória colinérgica da libertação de TNF em macrófagos.

Os macrófagos são a principal fonte de TNF produzido em resposta a endotoxina bacteriana *in vivo* (Bianchi *et al.*, 1995; Kumins *et al.*, 1996). Para investigar se a subunidade  $\alpha 7$  do receptor nicotínico de acetilcolina é essencial para a via anti-inflamatória colinérgica *in vivo*, determinou-se a produção de TNF em ratinhos deficientes no gene  $\alpha 7$  obtidos por tecnologia genética nocaute (Orr-Urtreger *et al.* 1997). Ratinhos sem a subunidade  $\alpha 7$  do receptor desenvolveram-se normalmente e não mostram defeitos anatómicos grosseiros (Id.; Franceschini *et al.*, 2000). O nível de TNF no soro de ratinhos deficientes em subunidade  $\alpha 7$  expostos à endotoxina foi mais do que 5 vezes

superiores do que em ratinhos de controlo do tipo selvagem (TNF no soro de tipo selvagem =  $2,3 \pm 0,3 \text{ ng mL}^{-1}$  vs TNF no soro de ratinhos  $\alpha 7$  nocaute =  $12,2 \pm 4,7 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $p < 0,05$  (teste  $t$  bicaudal) (FIG. 4a). A produção de TNF no fígado e no baço também foi maior em ratinhos nocaute (FIG. 4b, c) indicando uma função crítica da subunidade  $\alpha 7$  do receptor nicotínico de acetilcolina na regulação das respostas inflamatórias *in vivo*. Ratinhos endotoxémicos deficientes em subunidades  $\alpha 7$  também produziram níveis significativamente mais elevados de IL- $1\beta$  (FIG. 4d) e IL-6 (FIG. 4-E), quando comparados com ratinhos de tipo selvagem. Os macrófagos derivados de ratinhos nocaute para a subunidade  $\alpha 7$  eram refractários a agonistas colinérgicos e produziram TNF normalmente na presença de nicotina ou acetilcolina (Tabela 1). Assim, a expressão da subunidade  $\alpha 7$  do receptor nicotínico de acetilcolina em macrófagos é essencial para a modulação colinérgica do TNF.

Tabela 1. Produção de TNF por macrófagos peritoneais do tipo selvagem e deficientes em  $\alpha 7$ .

Tratamento	TNF - $\text{ng mL}^{-1}$	
	Tipo selvagem	Nocaute para $\alpha 7$
Controle	$0,004 \pm 0,0005$	$0,004 \pm 0,0004$
LPS	$16,8 \pm 2,3$	$18,1 \pm 4,9$
LPS + nicotina ( $1 \mu\text{M}$ )	$5,2 \pm 0,9 *$	$17,8 \pm 0,6$
LPS + nicotina ( $10 \mu\text{M}$ )	$7,3 \pm 1,0 *$	$17,4 \pm 2,9$
LPS + Ach ( $1 \mu\text{M}$ )	$10,3 \pm 1,1$	$20,4 \pm 3,8$
LPS + Ach ( $10 \mu\text{M}$ )	$5,7 \pm 0,9 *$	$21,4 \pm 2,4$

Macrófagos peritoneais, isolados de ratinhos de tipo selvagem ou de ratinhos nocaute para a subunidade  $\alpha 7$  do receptor nicotínico de acetilcolina potenciados com tioglicolato, foram estimulados com LPS (100 ng/mL) durante 4 h em cultura. Controlo: culturas de macrófagos não estimulados. Quando indicado, foram adicionados nicotina ou acetilcolina (ACh) 5-10 min antes de LPS. Os níveis de TNF foram determinados por ELISA; os dados apresentados são média  $\pm$  s.e.m. n = 8 por grupo. \* = Significativamente diferente de LPS a  $p < 0,05$  pelo teste *t* bicaudal.

Para determinar se a subunidade  $\alpha 7$  do receptor nicotínico de acetilcolina é requerida para a inibição pelo vago do TNF sistémico, foi aplicada estimulação eléctrica (Borovikova *et al.*, 2000) aos nervos vagos aos ratinhos de tipo selvagem ou deficientes na subunidade  $\beta 7$ , endotoxémicos. A estimulação eléctrica do nervo vago atenuou significativamente os níveis de TNF no soro induzidos por endotoxina em ratinhos do tipo selvagem (Fig. 5). No entanto, a estimulação do nervo vago, utilizando este protocolo, em ratinhos deficientes na subunidade  $\alpha 7$  do receptor nicotínico de acetilcolina, não conseguiu reduzir os níveis de TNF no soro durante a endotoxemia (Fig. 5). Assim, uma resposta funcional à estimulação do nervo vago *in vivo* requer subunidades  $\alpha 7$  do receptor nicotínico de acetilcolina para inibir a libertação de TNF.

Estas observações têm diversas implicações para a compreensão da regulação da inflamação e libertação de TNF, e para o desenho de terapêuticas futuras. Os dados anteriores indicam que a subunidade  $\alpha 7$  do receptor nicotínico de acetilcolina forma receptores homopentaméricos que estão

envolvidos na sinalização química rápida entre as células (Lindstrom, 1995; Leonard & Bertrand, 2001; Le Novère e Changeux, 1995). Os receptores nicotínicos de acetilcolina  $\alpha 7$  neuronais são altamente permeáveis ao cálcio (Vijayaraghavan *et al.*, 1992; Shoop *et al.*, 2001) e foi observado pelas requerentes que a nicotina induz influxo transiente de cálcio em macrófagos (dados não mostrados). O papel ou papéis deste fluxo aumentado de cálcio e os mecanismos intracelulares para inibir a libertação de TNF requerem mais estudo. A interrupção da expressão da subunidade  $\alpha 7$  do receptor nicotínico de acetilcolina *in vivo* aumentou significativamente a libertação de TNF induzida por endotoxina e tornou ineficaz o estimulador do nervo vago como um método para inibir a libertação de TNF. Isto indica que o produto do gene da subunidade  $\alpha 7$  do receptor nicotínico de acetilcolina é essencial para a regulação pelo nervo vago da libertação aguda de TNF durante a resposta inflamatória sistémica à endotoxemia. Parece que a libertação de acetilcolina das terminações do nervo vago, ou talvez outras fontes (*e. g.*, linfócitos ou células epiteliais) podem inibir especificamente a ativação dos macrófagos. Existe o potencial para o desenvolvimento de agonistas colinérgicos que têm como alvo as subunidades  $\alpha 7$  do receptor nicotínico de acetilcolina em células imunes periféricas para utilização como agentes anti-inflamatórios para inibir a libertação de TNF. Também pode ser possível desenvolver estimuladores do nervo vago com actividade anti-inflamatória; dispositivos semelhantes são clinicamente seguros e utilizados no tratamento de alguns doentes com distúrbio de convulsão. O TNF é um alvo para fármacos validado clinicamente para a artrite reumatóide e doença de Crohn, por isso, parece razoável considerar uma

estratégia de inibição do TNF que tem como alvo a subunidade  $\alpha 7$  do receptor nicotínico de acetilcolina.

## Métodos

Coloração com  $\alpha$ -bungarotoxina e microscopia confocal. O isolamento e cultura de macrófagos humanos foram realizados como descrito anteriormente (Borovikova *et al.*, 2000). As células foram diferenciadas durante sete dias na presença de MCSF (2 ng/mL) em meio de cultura completo (RPMI 1640 com 10% de soro humano inactivado por aquecimento). Os macrófagos diferenciados foram incubados com  $\alpha$ -bungarotoxina marcada com FITC a  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  (SIGMA) no meio de cultura de células a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. Quando indicado, a nicotina foi adicionada, a uma concentração final de  $500 \mu\text{M}$  antes da adição de  $\alpha$ -bungarotoxina. As células foram lavadas três vezes com meio RPMI (GIBCO) e depois fixadas durante 15 min à temperatura ambiente em solução paraformaldeído a 4%-PBS (pH 7,2). Após a fixação, as células foram lavadas uma vez com PBS e montadas para observação com microscópio de fluorescência confocal.

RT-PCR. O ARN total foi preparado a partir de macrófagos humanos diferenciados *in vitro* utilizando o reagente TRIzol. A transcrição inversa e o primeiro ciclo de PCR foram realizados utilizando Titan One Tube RT-PCR Kit (Roche Molecular Biochemicals) de acordo com o protocolo do fabricante. O segundo ciclo de PCR emparelhado foi realizado utilizando Promega 2x PCR master mix. Os produtos de PCR do PCR emparelhado foram submetidos a electroforese num gel de agarose e recuperados utilizando o Gene Clean III Kit (Biolab) e enviado para a

sequenciação para confirmar os resultados. Os conjuntos de iniciadores para a transcrição inversa e primeiro ciclo de PCR foram:  $\alpha 1$ : iniciador de sentido 5'-CCAGACCTGAGCAACTTCATGG-3', iniciador anti-sentido 5'-AATGAGTCGACCTGCAAACACG-3';  $\alpha$ : iniciador de sentido 5'-GACTGTTCGTTTCCCAGATGG-3', iniciador anti-sentido 5'-ACGAAGTTGGGAGCCGACATCA-3';  $\alpha 9$ : iniciador de sentido 5'-CGAGATCAGTACGATGGCCTAG-3', iniciador anti-sentido 5'-TCTGTGACTAATCCGCTCTTGC-3'. Os conjuntos de iniciadores para PCR emparelhado foram:  $\alpha 1$ : iniciador de sentido 5'-ATCACCTACCACTTCGTCATGC-3'; iniciador anti-sentido 5'-GTATGTGGTCCATCACCATTGC-3';  $\alpha 7$ : iniciador de sentido 5'-CCCGGCAAGAGGAGTGAAAGGT-3'; iniciador anti-sentido 5'-TGCAGATGATGGTGAAGACC-3';  $\alpha$ : iniciador de sentido 5'-AGAGCCTGTGAACACCAATGTGG-3', iniciador anti-sentido 5'-ATGACTTTCGCCACCTTCTTCC-3'. Para a clonagem do ADNc de  $\alpha 7$  de comprimento total foram utilizados os seguintes iniciadores: 5' AGGTGCCTCTGTGGCCGCA 3' com 5'-GACTACTCAG-TGGCCCTG 3'; 5' CGACACGGAGACGTGGAG 3' com 5'-GGTACGGATG-TGCCAAGGAGT 3'; 5' CAAGGATCCGGACTCAACATGCGCTGCTCG3' com 5' CGGCTCGAGTCACCAGTGTGGTTACGCAAAGTC 3'.

Transferência de Western e ensaio de remoção com  $\alpha$ -bungarotoxina. Foram preparados lisados celulares por incubação de células PC12 ou macrófagos primários humanos com tampão de lise (NaCl a 150 mM, EDTA a 5 mM, Tris pH 7,4 a 50 mM, azida de sódio a 0,02%, 1% de Triton X-100 e cocktail de inibição da protease) em gelo durante 90 min. Foram carregadas quantidades iguais de proteína total em géis de SDS PAGE para transferência de Western com anticorpo específico para  $\alpha 7$  (Santa Cruz sc-1447) ou anticorpo monoclonal para  $\alpha 1$  (Oncogene). Para o ensaio de remoção com  $\alpha$ -bungarotoxina,  $\alpha$ -bungarotoxina (SIGMA)



foi conjugada com pérolas de Sepharose activadas com CNBr (Pharmacia) e, em seguida, incubadas com lisados celulares a 4° C durante a noite. As pérolas e as proteínas ligadas foram lavadas quatro vezes com tampão de lise e depois analisados por transferência de Western com anticorpos específicos para  $\alpha 7$  (policlonais: Santa Cruz H-302, monoclonais: Sigma H-220).

#### Experiências de oligonucleótido anti-sentido.

Oligonucleótidos anti-sentido de fosforotioato foram sintetizados e purificados por Genosys. As sequências dos oligonucleótidos são: AS $\alpha 7$ : 5'-gcagcgcatgttgagtcccg-3'; AS $\alpha 1$ : 5'-gggctccatgggctaccgga-3'; AS $\alpha 10$ : 5'-cccatggccctggcactgc-3'. Essas sequências abrangem as regiões divergentes de iniciação da tradução dos genes  $\alpha 7$ ,  $\alpha 1$  e  $\alpha 10$ . A administração dos oligonucleótidos anti-sentido foi realizada como em Cohen *et al.* (1997) na concentração de 1  $\mu\text{M}$  dos oligonucleótidos durante 24 h. Para as experiências em cultura de células, as culturas de macrófagos pré-tratados com oligonucleótido foram lavadas com meio fresco e foram estimuladas com LPS a 100 ng ml<sup>-1</sup> com ou sem nicotina (1  $\mu\text{M}$ , adicionado 5-10 minutos antes de LPS). Quatro horas após o LPS, os valores de TNF libertado foram determinados pelo ensaio L929 e, depois, verificados por TNF ELISA. Para a coloração de  $\alpha$ -bungarotoxina, células pré-tratadas foram lavadas e processadas para coloração FITC- $\alpha$ -bungarotoxina, como descrito acima. A nicotina e outros agonistas a subunidade  $\alpha 7$  do receptor nicotínico de acetilcolina também inibem significativamente a libertação de TNF induzida por LPS na linha de células do tipo macrófagos de ratinho RAW264.7 (dados não mostrados).

Ratinhos deficientes em receptores nicotínicos  $\alpha 7$ . Ratinhos deficientes em receptores nicotínicos  $\alpha 7$  (C57BL/6 de base) e

irmãos tipo selvagem foram adquiridos de The Jackson Laboratory (B6.1297-Chrna<sup>7tm1Bay</sup>, #003232). Acasalamento de ratinhos knockout homozigotos ou ratinhos do tipo selvagem foi estabelecido para obtenção de progenias. Ratinhos machos ou fêmeas com cerca de 8 a 12 semanas de idade (juntamente com os controles do tipo selvagem das mesmas idades e sexo) foram utilizados nas experiências com endotoxinas. Os ratinhos foram pesados individualmente e foi dado 0,1 mg kg<sup>-1</sup> LPS (ip). Para as experiências de TNF, foram recolhidos sangue, fígado e baço uma hora após o LPS. Para as experiências de IL-1 $\beta$  e IL-6, foram recolhidas amostras de sangue quatro horas após LPS. As quantidades de TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 foram determinadas por ELISA. Os genótipos dos ratinhos foram confirmados por estratégias de PCR genômicas. Foram isolados macrófagos peritoneais de ratinhos machos e fêmeas (n = 8/grupo) com cerca de 8 semanas de idade, de tipo selvagem ou de ratinhos nocaute para a subunidade  $\alpha$ 7, potenciados com tioglicolato (48 horas). Os macrófagos foram reunidos para cada grupo e cultivados durante a noite. Foram adicionados nicotina e acetilcolina 5-10 minutos antes de LPS (100 ng mL<sup>-1</sup>). Foi adicionado brometo de piridostigmina (100  $\mu$ M) com a acetilcolina. Quatro horas após a indução com LPS, os níveis de TNF foram medidos por ELISA.

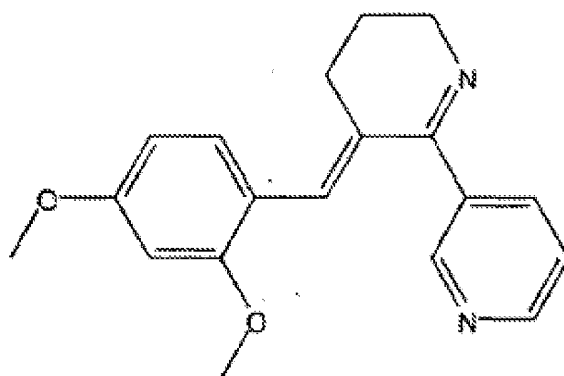
Estimulação do nervo vago. Ratinhos deficiente em receptores nicotínicos  $\alpha$ 7 (C57BL/6 de base, machos e fêmeas) e ratinhos C57BL/6 do tipo selvagem, das mesmas idades e sexo, foram anestesiados com cetamina (100 mg kg<sup>-1</sup>, via intramuscular) e Xilazina (10 mg kg<sup>-1</sup>, intramuscular). Os ratinhos foram submetidos a operação simulada ou a estimulação do nervo vago (vago esquerdo, 1 volt, 2 ms, 1 Hz) com um módulo de estimulação elétrica (STM100A, Harvard Apparatus). A estimulação foi

realizada durante 20 min (10 min antes e 10 min após a administração de LPS). O LPS foi administrado a uma dose letal ( $75 \text{ mg kg}^{-1}$ , via intraperitoneal). Recolheu-se sangue duas horas após a administração de LPS. Os níveis de TNF foram determinados por ELISA.

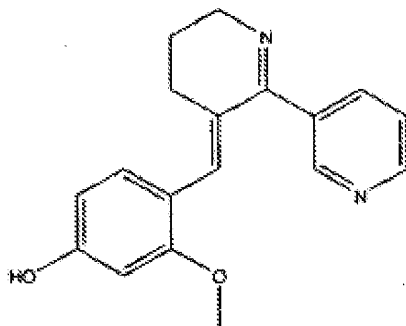
Análise estatística. A análise estatística foi realizada utilizando o teste *t* bicaudal onde indicado;  $P < 0,05$  é considerado significativo. As experiências foram realizadas em duplicado ou triplicado; para as experiências *in vivo* e *ex vivo*, "n" refere-se ao número de animais em cada estado.

**Exemplo 2: Compostos (V) e (VI) são protectores no modelo de sepsia por Ligadura e Punção Cecal de ratinho**

Os compostos de fórmulas (V) e (VI), mostraram-se particularmente eficazes no tratamento da sepsia modelo de sepsia por Ligadura e Punção Cecal de ratinho.



3-(2,4-dimetoxibenxilideno)anabaseína



3-(4-hidroxi-2-metoxibenzilideno)anabaseína

Ligadura e Punção Cecal (CLP) foram realizadas como descrito em Fink e Heard, J. of Surg. Res. 49:186-196 (1990), Wichman *et al.*, Crit. Care Med. 26:2078-2086 (1998) e Remick *et al.*, Shock 4:89-95 (1995). Resumidamente, os ratinhos Balb/c foram anestesiados com 75 mg/kg de cetamina (Fort Dodge, Fort Dodge, Iowa) e 20 mg/kg de xilazina (Boehringer Ingelheim, St. Joseph, MO) por via intramuscular. Foi realizada uma incisão na linha média e o ceco foi isolado. Uma ligadura em sutura 6-0 prolene foi colocada a um nível de 5,0 mm da ponta cecal afastada da válvula ileocecal.

O coto do ceco ligado foi, em seguida, puncionado uma vez com uma agulha de calibre 22, sem extrusão directa de fezes. O ceco foi então recolocado na sua posição intra-abdominal normal. O abdómen foi então fechado com uma sutura contínua de prolene 6-0, em duas camadas, peritoneu e fáscia separadamente para evitar a perda de fluido. Todos os animais foram ressuscitados com uma solução salina normal administrada subcutaneamente a 20 mL/kg de peso corporal. Cada ratinho recebeu uma injeção subcutânea de imipenem (0,5 mg/ratinho) (Primaxin, Merck & Co.,

Inc., West Point, PA), 30 minutos após a cirurgia. Os animais foram então deixados a recuperar.

Os ratinhos foram tratados com 3-2,4-dimetoxibenzilideno anabaseína (Composto (V)), a 4 mg/kg, com 3-(4-hidroxi-2-metoxibenzilideno)anabaseína (Composto (VI)), a 4 mg/kg ou com controlo de veículo. Os compostos e controlo de veículo foram administrados por via intraperitoneal (ip) duas vezes ao dia no dia 1 e dia 2 (24 e 48 horas pós-cirurgia, respectivamente) e foram administrados uma vez no dia 3. A mortalidade foi monitorada diariamente durante catorze dias após cirurgia. Os resultados são apresentados na FIG. 6 que mostra a percentagem de animais sobreviventes após tratamento com Composto (V), composto (VI) ou com veículo de controlo. No dia 14 tinham sobrevivido 91% ( $p < 0,01$ ) dos ratinhos tratados com o Composto (V) e 82% ( $p < 0,02$ ) dos ratinhos tratados com o Composto (VI), enquanto que apenas 30% dos ratinhos tratados com o controlo do veículo sobreviveram. Estes resultados demonstram que os compostos (V) e (VI), melhoraram significativamente a sobrevivência, no modelo sepsia CLP de ratinho.

### **Exemplo 3: Composto (V) e nicotina inibem a libertação de TNF- $\alpha$ induzida por LPS de células do tipo macrófagos RAW264.7 de ratinho**

Células do tipo macrófagos RAW264.7 de ratinho (American Type Tissue Culture Collection, Rockville, Md., EUA) foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal de bovino, penicilina e estreptomicina. As células foram semeadas em placas de cultura de tecidos de 24 poços em meio Opti-MEM 1 e

utilizadas a 90% de confluência. As células foram tratadas com Composto (V) ou nicotina (Sigma) a 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 ou 100  $\mu$ M. Cinco minutos após a adição do composto (V) ou de nicotina, as células foram tratadas com LPS (500 ng/mL). Os sobrenadantes foram recolhidos após 4 horas e o TNF- $\alpha$  foi determinado por ELISA (mouse ELISA kit de R&D Systems Inc., Minneapolis, MN).

Os resultados são mostrados na FIG. 7 que demonstra que, como a nicotina, o composto (V), inibe a libertação de TNF- $\alpha$  de células RAW 264.7 de modo dependente da dose.

**Exemplo 4: Composto (VI) inibe a libertação de TNF- $\alpha$  induzida por LPS de células do tipo macrófagos RAW264.7 de ratinho**

Células do tipo macrófagos RAW264.7 de ratinho (American Type Tissue Culture Collection, Rockville, Md., EUA) foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal de bovino, penicilina e estreptomicina. As células foram semeadas em placas de cultura de tecidos de 24 poços em meio Opti-MEM 1 e utilizadas a 90% de confluência.

Na FIG. 8A, as células foram tratadas com Composto (VI) a 0,1, 1 e 10  $\mu$ M. A 0, 1, 4 ou 24 horas após a pré-incubação com o Composto (VI), as células foram tratadas com LPS (500 ng/mL). Os sobrenadantes foram recolhidos após 4 horas e o TNF- $\alpha$  foi determinado por ELISA (mouse ELISA kit de R&D Systems Inc., Minneapolis, MN). Os resultados mostrados na Fig. 8A são

apresentados como percentagem de inibição do TNF- $\alpha$ . Composto (VI) inibe o TNF- $\alpha$  de um modo dependente da dose.

A Fig.8B apresenta os resultados da condição de 0 horas de pré-incubação da Fig. 8A e é apresentada como a percentagem de inibição do TNF- $\alpha$ . O IC<sub>50</sub> estimado para o composto (VI) é de 0,9  $\mu$ M.

**Exemplo 5: Tratamento com Composto (VI) antes do desafio com LPS inibe o TNF circulante em ratinhos**

Ratinhos C57 B/6 foram tratados com 4 mg/kg de Composto (VI) ou de veículo de controlo por via intraperitoneal (ip). Cinco minutos após o tratamento com o Composto (VI) ou com veículo de controlo, os ratinhos foram injectados com 100  $\mu$ g de LPS i.p. Os ratinhos foram sacrificados 2 horas após o tratamento com LPS e foram recolhidas amostras de sangue para determinação do TNF- $\alpha$ . O TNF- $\alpha$  foi determinado por ELISA, como descrito acima.

Como mostrado na FIG. 9, o tratamento com o Composto (VI) antes do desafio com LPS reduziu os níveis de TNF- $\alpha$  circulante de aproximadamente 50% em comparação com os ratinhos tratados com o controlo de veículo

**Exemplo 6: Composto (VI) reduz a inflamação do cólon em colite por DSS em ratinho**

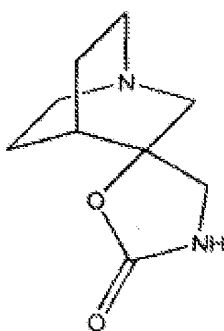
A colite induzida pelo dextrano sulfato de sódio (DSS) foi realizada como descrito em Hove *et al.*, Dig. Dis, Sci. 47(9): 2056-2063 (2002). Ratinhos C57 B/6 foram alimentados com 3% (p/v) de DSS (p. molec. 40 kDa; TdB Consultancy, Uppsala, Suécia) na sua água de beber, durante sete dias. 12 horas após o início da administração de DSS, os murganhos foram injectados com 4 mg/kg de Composto (VI), i.p., duas vezes por dia durante 7 dias. Os ratinhos foram sacrificados no dia 7.

Os cólones foram recolhidos após morte e foram removidos através de uma incisão na linha média. Foi medido o comprimento total do cólon e os resultados são apresentados na Fig. 10(B). O encurtamento do cólon é indicativo de uma maior severidade da colite. Os ratinhos tratados com o Composto (VI) tinham um comprimento do cólon ligeiramente maior do que os ratinhos de controlo ( $p = 0,07$ ), indicando uma menor gravidade da colite em ratinhos tratados com o Composto (VI). Outro indicador da gravidade da doença, o peso do cólon, também foi determinado. Foi registado o peso do cólon molhado e utilizado como um índice do edema inflamatório. Os resultados são mostrados na Fig. 10(A). O peso do cólon em ratinhos tratados com o composto (VI) foi reduzido em comparação com ratinhos nas condições de controlo. Estes resultados sugerem que o Composto (VI) reduz a inflamação do cólon em colite DSS de ratinho.



**Exemplo 7: Composto (VII) inibe a libertação de TNF- $\alpha$  de células do tipo macrófagos RAW264.7 de ratinho estimuladas por LPS**

O composto (VII) mostrou efeito significativo na inibição da libertação de TNF- $\alpha$ .



(-)-espiro-1-azabicyclo[2.2.2]octano-3,5'-oxazolidin-2'-ona

Células do tipo macrófagos RAW 264.7 de ratinho (American Type Tissue Culture Collection, Rockville, Md., EUA) foram cultivadas como descrito acima no Exemplo 3. As células foram tratadas com (-)-espiro[1-azabicyclo[2.2.2]octano-3,5'-oxazolidin-2'-ona] (Composto (VII)), a 0, 0,01, 0,1, 1, 10 e 100  $\mu$ M. Cinco minutos após a adição de composto (VII), as células foram tratadas com LPS (500 ng/mL). O TNF- $\alpha$  foi determinado por ELISA, como descrito acima.

Os resultados são mostrados na FIG. 11, os quais demonstram que as concentrações mais elevadas de Composto (VII) inibem a libertação de TNF- $\alpha$  de células RAW 264.7. A libertação de TNF- $\alpha$

foi diminuída em mais de quatro vezes em células tratadas com 100  $\mu$ M de composto (VII), em comparação com células de controlo.

Lisboa, 12 de Maio de 2014

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Método para determinar se um composto é um agonista colinérgico selectivo para um receptor nicotínico  $\alpha 7$ , o método compreendendo

determinar se o composto inibe a libertação do factor de necrose tumoral (TNF) a partir de um macrófago, e

determinar se o composto é um agonista colinérgico reactivo com pelo menos um receptor nicotínico que não é  $\alpha 7$ ,

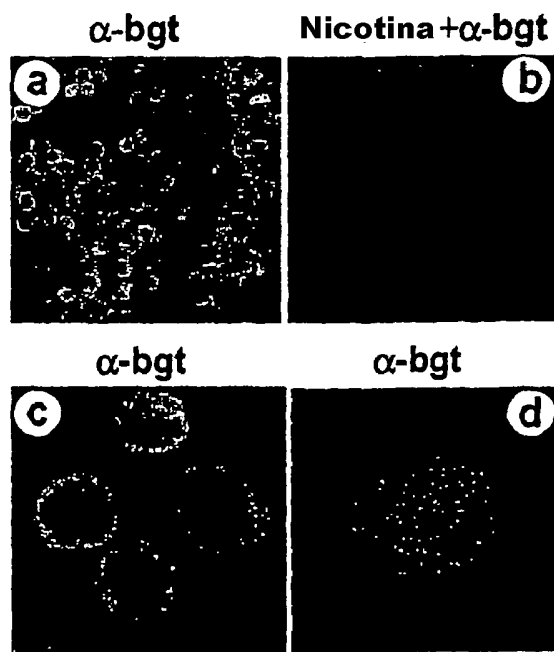
em que um composto que inibe a libertação de TNF a partir de um macrófago, mas não é um agonista colinérgico reactivo com pelo menos um receptor nicotínico que não é  $\alpha 7$ , e activa alfa 7, em maior grau do que o composto activando, pelo menos, um outro receptor nicotínico, é um agonista colinérgico selectivo para um receptor nicotínico  $\alpha 7$ .

2. Método da reivindicação 1 compreendendo ainda o tratamento dos macrófagos com um agente que estimula uma cascata de TNF.
3. Método da reivindicação 2, em que o agente é LPS.
4. Método da reivindicação 1, em que a determinação da inibição da libertação de TNF compreende a medição de ARNm de TNF.

5. Método da reivindicação 1, em que a determinação de inibição de libertação de TNF compreende medição da proteína TNF.
6. Método da reivindicação 1, em que a determinação de inibição de libertação de TNF compreende medição da actividade do TNF.

Lisboa, 12 de Maio de 2014

Fig.1



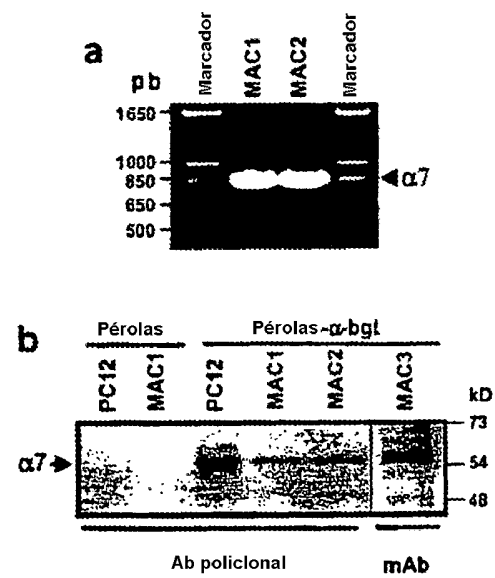
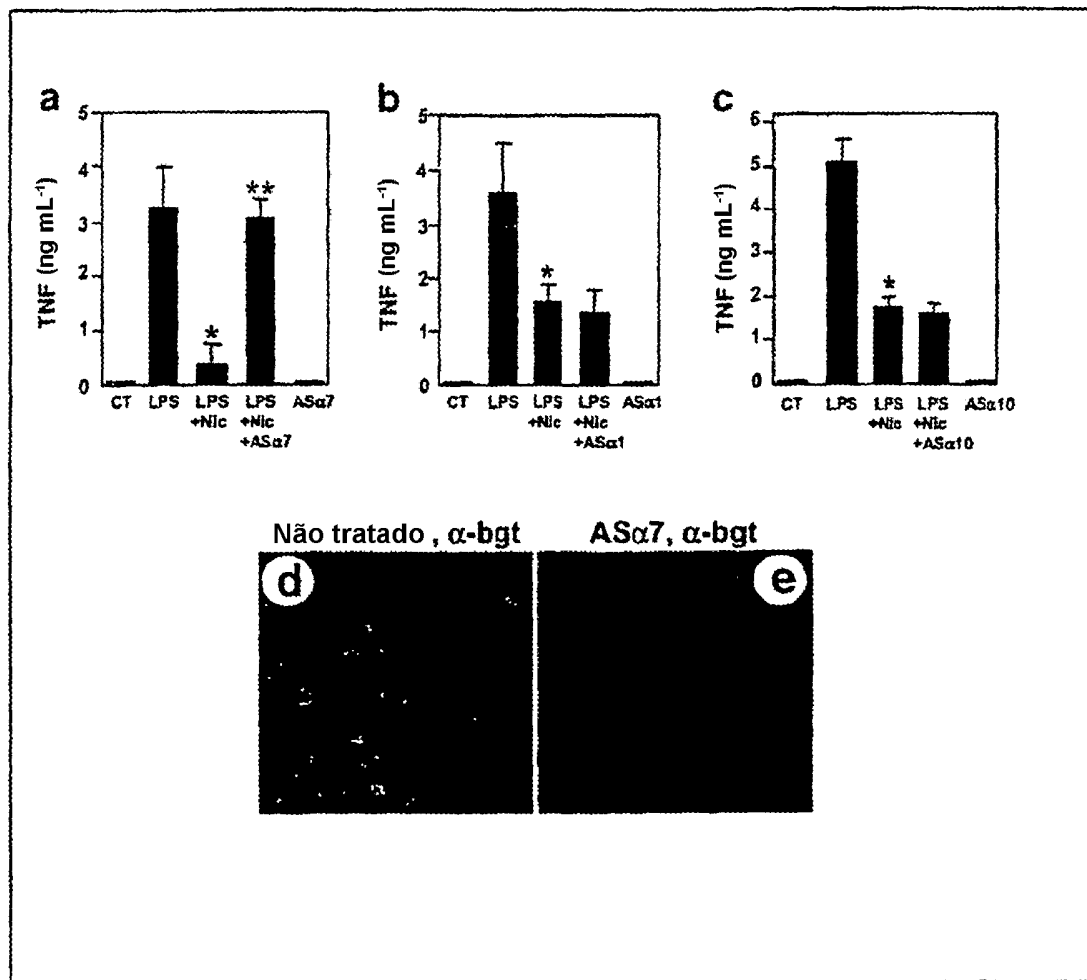
**Fig.2**

Fig. 3



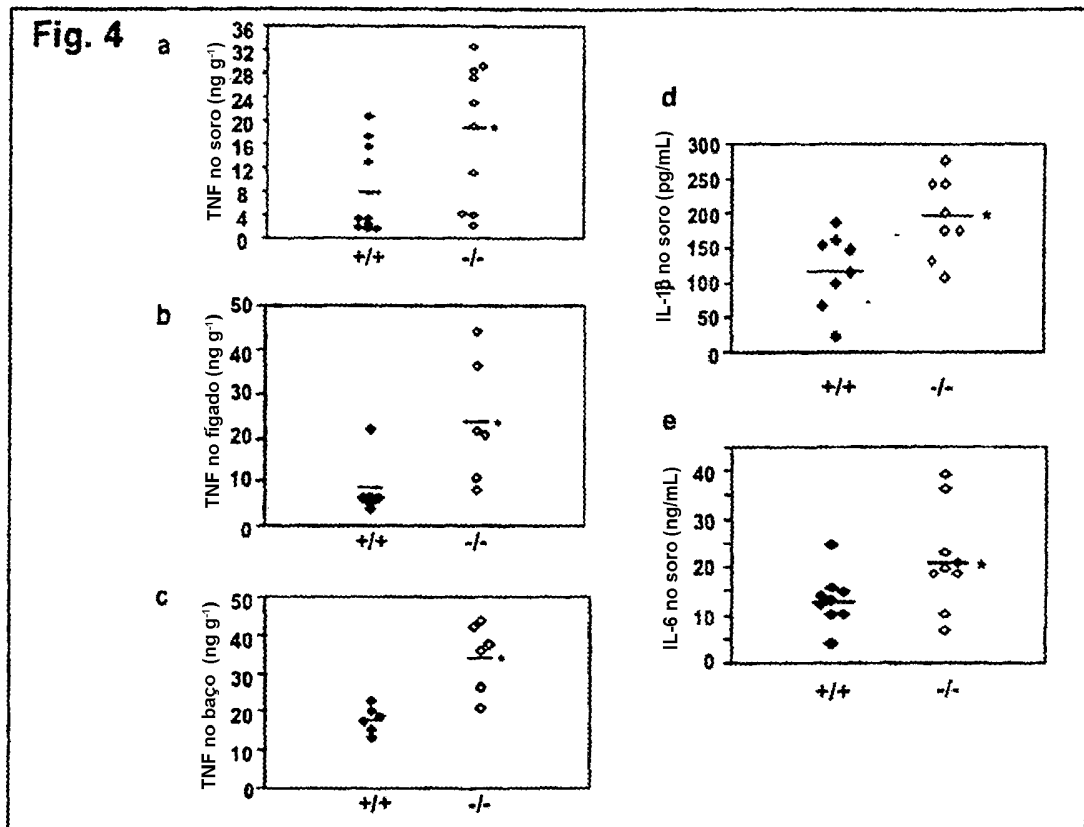
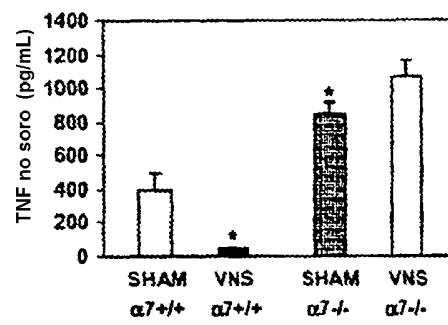




Fig. 5



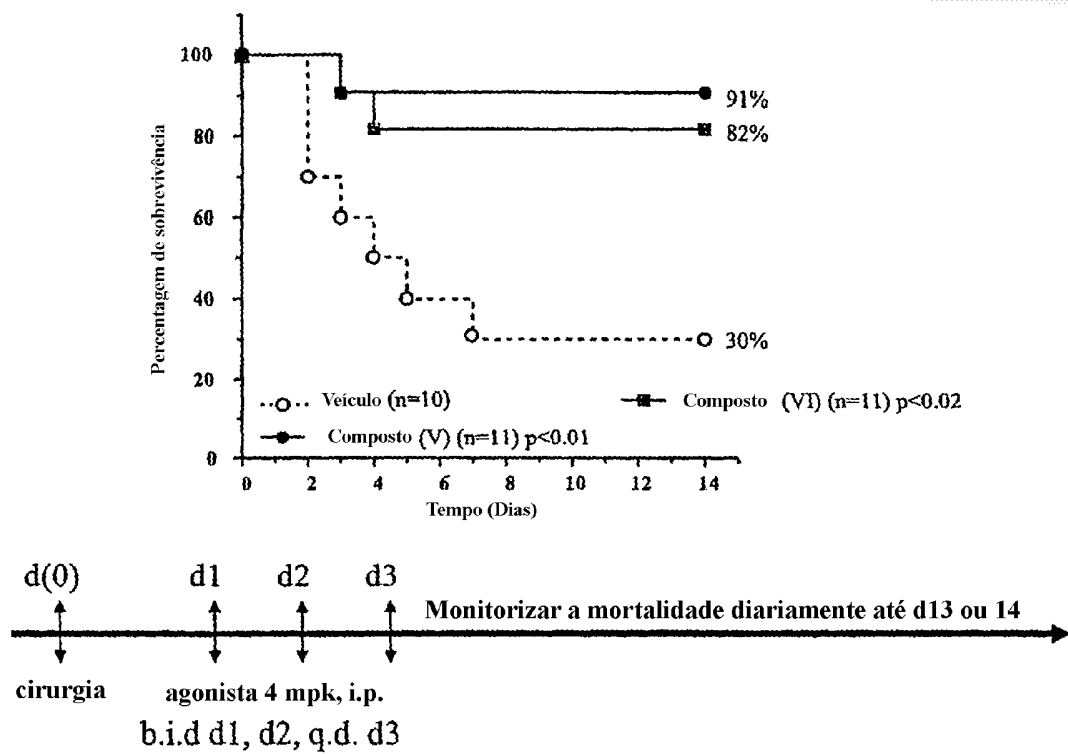
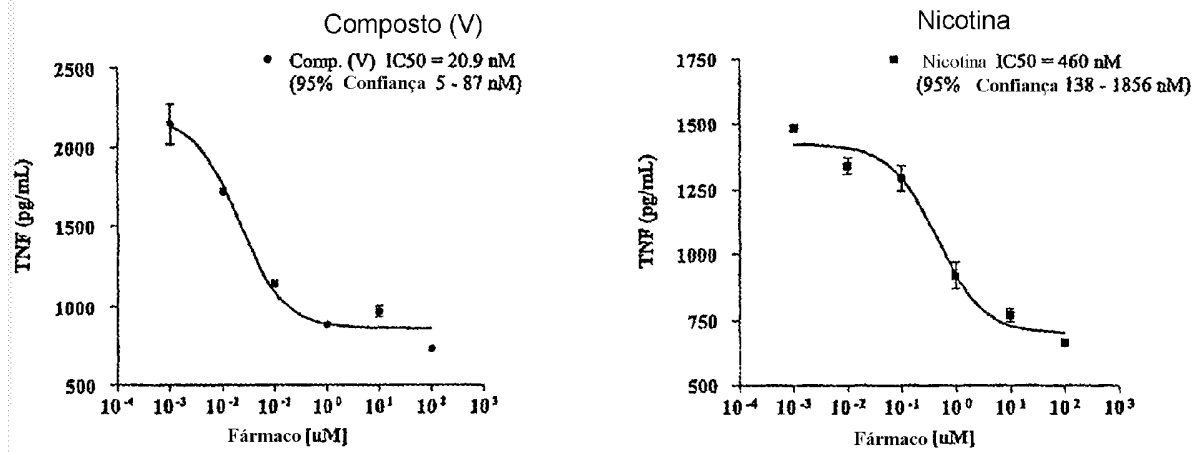


FIG. 6



**Bloqueio de produção de TNF em células RAW264:7 estimuladas por LPS**

**FIG. 7**

A. Percentagem de inibição de TNF-alfa pelo composto (VI) após estimulação com LPS durante 4 horas

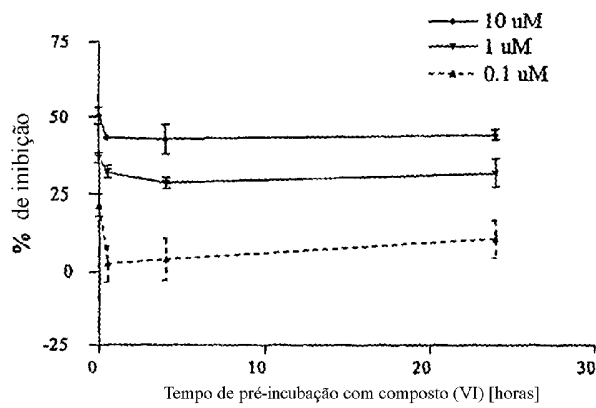


FIG. 8A

B. Curva de dose-resposta de bloqueio de produção de TNF de células RAW264.7 estimuladas com LPS, sem pré-incubação com composto (VI)

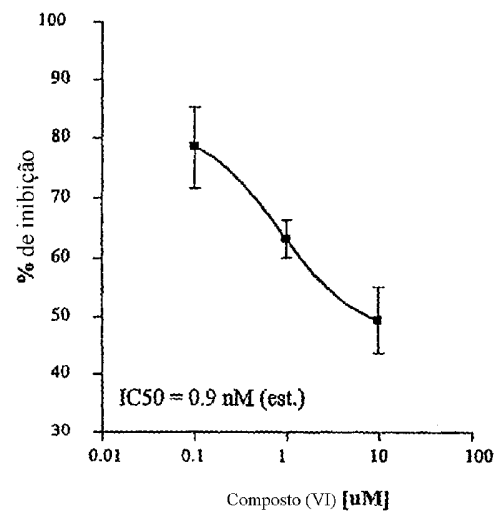


FIG. 8B

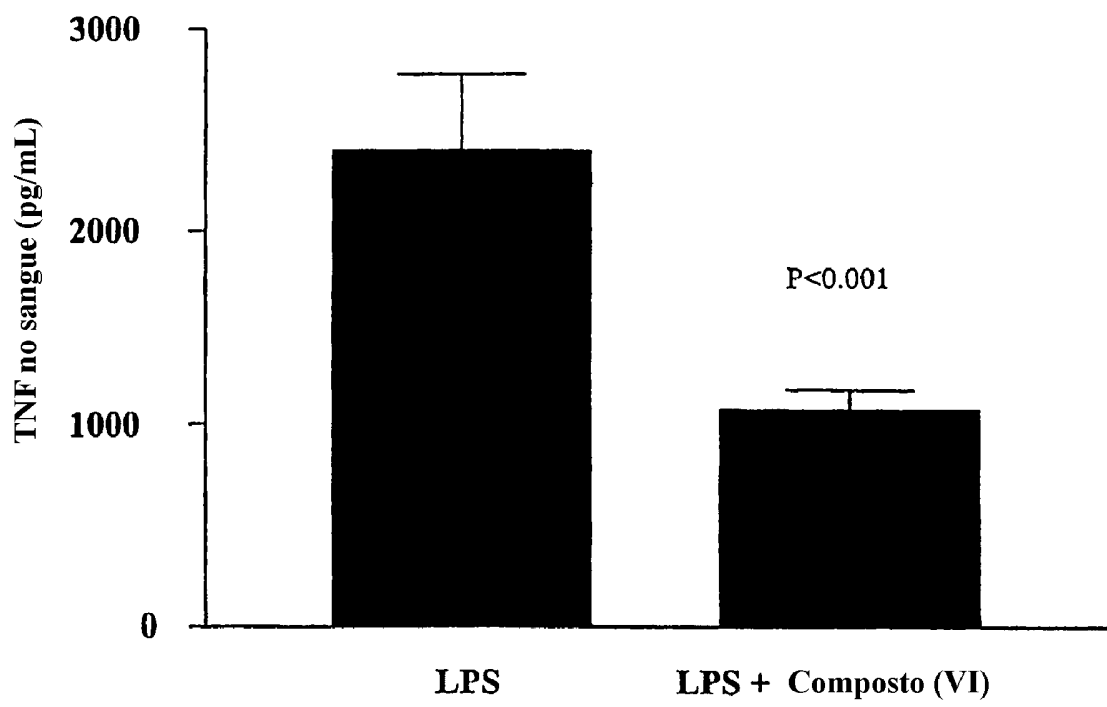


FIG. 9

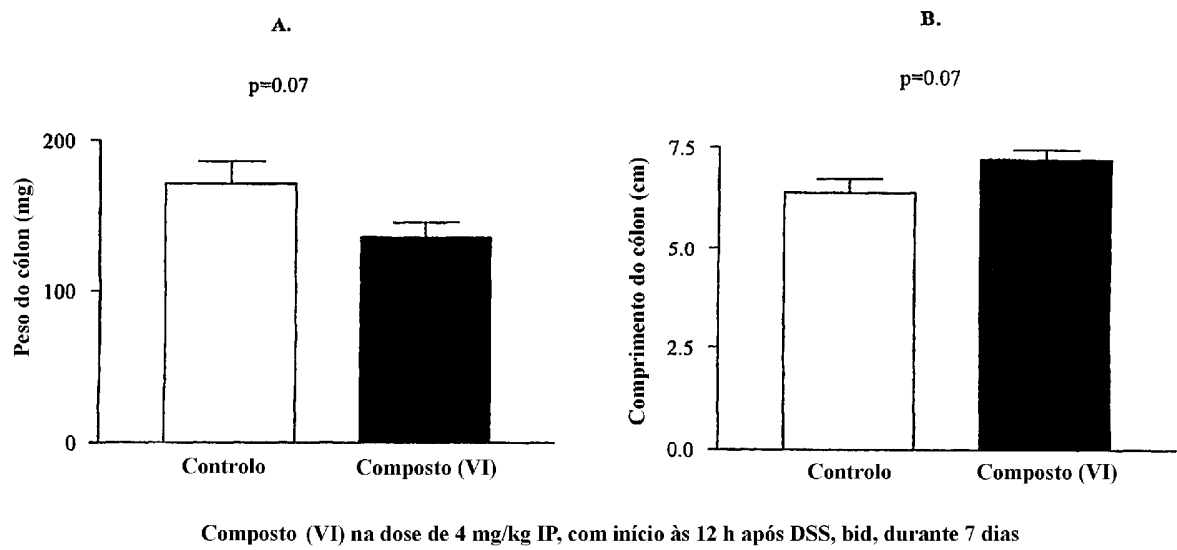


FIG. 10

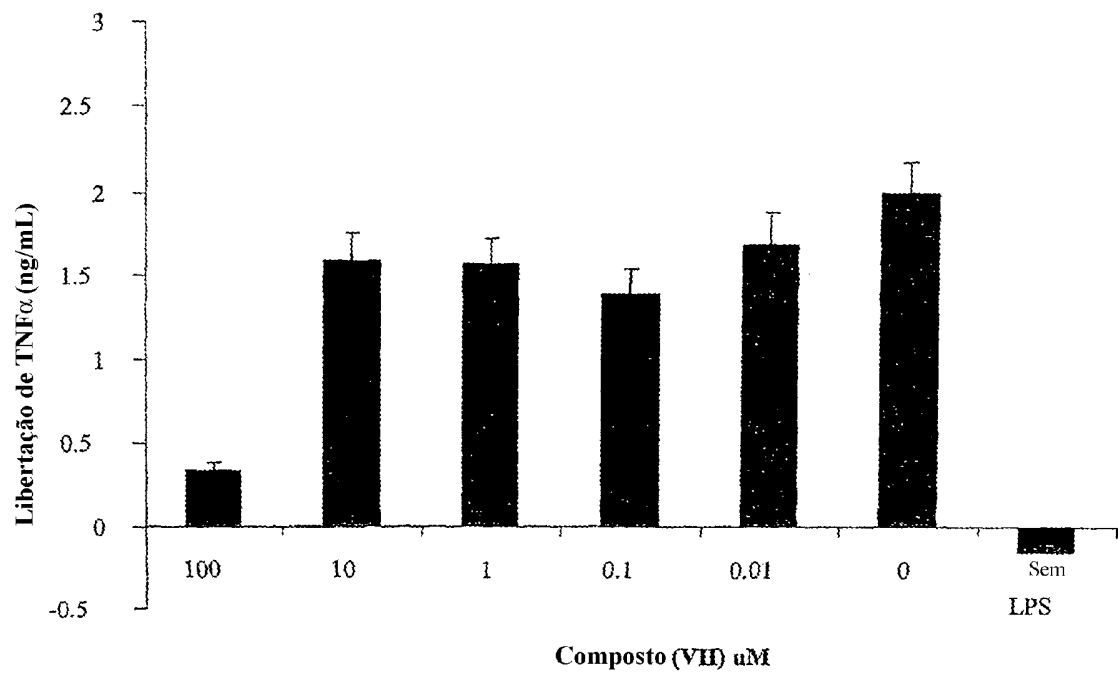


FIG. 11