

(11) Número de Publicação: PT 2411521 E

(51) Classificação Internacional:

A61K 31/7125 (2015.01) A61K 38/08

(2015.01)

C12N 15/117 (2015.01) A61K 45/06 (2015.01)

C07K 14/705 (2015.01) A61P 31/04 (2015.01)

A61P 31/10 (2015.01) A61P 31/12 (2015.01)

**A61P 37/04 (2015.01) A61K 9/00 (2015.01)**

Digitized by srujanika@gmail.com

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

(22) Data de pedido: **2010.03.25**

(30) Prioridade(s): 2009.03.25 US 163137 P  
2009.05.18 US 179246 P

(43) Data de publicação do pedido: **2012.02.01**

(45) Data e BPI da concessão: 2015.01.14  
077/2015

(73) Titular(es):

**THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY  
OF TEXAS SYSTEM  
201 WEST 7TH STREET AUSTIN, TX 78701 US**

(72) Inventor(es):

(72) INVENTOR(S)  
**BURTON DICKEY**

**MICHAEL TUVIM**

SCOTT EVANS

US

US

US

(74) Mandatário:

(1) MANGATAN  
**ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA**

RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES PARA ESTIMULAÇÃO DE RESISTÊNCIA IMUNITÁRIA INATA DE MAMÍFEROS CONTRA PATOGÉNICOS**

(57) Resumo:

AS CONCRETIZAÇÕES DO INVENTO SÃO DIRIGIDAS A MÉTODOS DE TRATAR, INIBIR OU ATENUAR UMA INFECÇÃO MICROBIANA NUM INDIVÍDUO QUE TEM TAL INFECÇÃO OU QUE ESTÁ EM RISCO DE A DESENVOLVER, COMPREENDENDO A ETAPA DE ADMINISTRAR UMA QUANTIDADE EFICAZ DE UM AGONISTA TLR9 E DE UM AGONISTA TLR 2/6 AO INDIVÍDUO.

RESUMO

**"Composições para estimulação de resistência imunitária  
inata de mamíferos contra patogénios"**

As concretizações do invento são dirigidas a métodos de tratar, inibir ou atenuar uma infecção microbiana num indivíduo que tem tal infecção ou que está em risco de a desenvolver, compreendendo a etapa de administrar uma quantidade eficaz de um agonista TLR9 e de um agonista TLR 2/6 ao indivíduo.

## DESCRIÇÃO

### **"Composições para estimulação de resistência imunitária inata de mamíferos contra patogénios"**

#### ANTECEDENTES DO INVENTO

##### **I. CAMPO DO INVENTO**

O presente invento refere-se na generalidade aos campos da microbiologia, imunologia e farmacoterapia anti-microbiana. Mais concretamente, as composições do invento referem-se à modulação da imunidade inata nos pulmões de um indivíduo para o tratamento ou atenuação de infecção ou invasão microbianas usando composições de moléculas pequenas.

##### **II. ANTECEDENTES**

A susceptibilidade dos pulmões a infecção deriva dos requisitos estruturais para a permuta gasosa. A fim de suportar a ventilação, os seres humanos expõem continuamente 100 m<sup>2</sup> de superfície pulmonar ao ambiente externo. Os pulmões estão expostos não apenas a ar, mas também a partículas, gotículas e patogénios que se encontram nele suspensos. Ao contrário das superfícies cutâneas que estão revestidas por pele impermeável ou do tracto gastrointestinal com uma camada adsorvente espessa de muco, os pulmões apresentam uma vasta interface ambiental com uma barreira de defesa mínima. A existência de uma barreira mais substancial é excluída pela necessidade de difusão gasosa sem impedimentos.

Apesar das sua vulnerabilidade estrutural, os pulmões geralmente defendem-se com sucesso contra a infecção através de vários mecanismos mecânicos, humorais e celulares (Knowles et al., 2002; Martin e Frevert, 2005; Rogan, et al., 2006; Travis, et al., 2001); (Mizgerd, 2008; Bals e Hiemstra, 2004; Bartlett et al., 2008; Hiemstra, 2007; Hippensiel et al., 2006; Schutte e McCray, 2002). A maioria dos micróbios patogénicos inalados não penetram nos alvéolos devido ao impacto contra as paredes das vias aéreas, nas quais ficam aprisionados pelo muco e seguidamente são expelidos através do sistema de transporte mucociliar (Knowles et

al., 2002). Para os patogénios que escapam a este destino, a presença constitutiva de péptidos anti-microbianos no fluido de revestimento das vias aéreas limita o seu crescimento (Rogan, et al., 2006; Travis, et al., 2001). Os macrófagos alveolares que residem nos espaços aéreos mais distantes são capazes de ingerir estes organismos, depurando assim os pulmões de uma infecção potencial.

Apesar de serem muitas vezes consideradas barreiras passivas de permuta de gases, os epitélios das vias aéreas e alveolares suplementam as defesas basais do pulmão através de alterações funcionais e locais estruturais notáveis, quando encontram estímulos patogénicos. Em resposta a inflamação vírica, fúngica ou alérgica, as células excretoras das vias respiratórias aumentam rapidamente a sua altura e preenchem o seu citoplasma apical com grânulos de excreção, um processo denominado metaplasia inflamatória (Evans et al., 2004; Williams et al., 2006). Na presença de patogénios, o epitélio alveolar activa os seus sistemas do plasmalema e a maquinaria excretora, envolvendo assim os leucócitos na protecção do pulmão (Evans et al., 2005). Talvez ainda mais importante, as interacções microbianas com os receptores de reconhecimento do padrão epitelial respiratório provocam a expressão de vários produtos microbicidas para o fluido de revestimento das vias respiratórias, incluindo defensinas, catelicidinas, lisozima e espécies reactivas de oxigénio (Rogan et al., 2006; Forteza et al., 2005; Akinbi et al., 2000; Bals e Hiemstra, 2004; Bals e Hiemstra, 2006). Note-se que a pneumonia (bacteriana ou vírica) é a causa principal de morte por infecção a nível mundial.

Há necessidade de métodos e composições adicionais para inibir e/ou tratar infecções microbianas.

### **SUMÁRIO DO INVENTO**

O presente invento é definido pelas reivindicações. Proporciona composições que estimulam resistência inata (Resistência Inata Estimulada (StIR)). Divulgam-se também métodos de usar tais composições para estimular StIR. Em determinadas concretizações StIR é StIR do pulmão. Um aspecto do invento proporciona maior razão ou índice terapêutico/de

toxicidade. As concretizações do invento incluem composições e formulações para o melhoramento das defesas biológicas de um indivíduo mamífero, e.g., um humano, contra infecção, por exemplo, a imunidade do indivíduo contra infecção. Em determinados aspectos depositam-se composições do invento numa quantidade eficaz nos pulmões de um indivíduo. Os aspectos do invento proporcionam uma melhoria ou aumento rápido e temporizado das defesas biológicas contra infecção microbiana. A melhoria da imunidade de um indivíduo atenua as infecções microbianas. A atenuação pode ser por inibição, tratamento ou prevenção de infecção ou crescimento ou sobrevivência microbiana. Os aspectos do invento melhoram as defesas do pulmão e do tracto respiratório de um indivíduo.

Em determinados aspectos da divulgação, consideram-se métodos de tratar, inibir ou atenuar uma infecção bacteriana num indivíduo que tem tal infecção ou que está em risco de a desenvolver, compreendendo os métodos administrar uma quantidade eficaz de uma composição STIR compreendendo um ou mais ligandos para um ou mais receptores inatos. Vários receptores inatos foram identificados como incluindo receptor do tipo Toll (TLR), receptores de lectina do tipo C (CLR) e receptores do tipo domínio de oligomerização e ligação de nucleótido (receptores do tipo Nod ou NLR), não se lhes limitando. Os TLR são uma classe de proteínas que desempenha um papel chave no sistema imunitário inato. Estes são receptores não catalíticos que atravessam uma membrana única e que reconhecem moléculas conservadas estruturalmente derivadas de micróbios. Estes micróbios, uma vez presentes à superfície ou no interior da pele ou do tracto intestinal, pulmão e mucosa genitourinária, são reconhecidos pelos TLR, que activam as respostas celulares imunitárias. Curiosamente, muitos destes agonistas TLR não induzem uma STIR significativa quando administrados sozinhos. Tipicamente, um indivíduo a ser tratado usando os métodos aqui descritos foi exposto a um micróbio patogénico ou está em risco de tal exposição.

Determinadas concretizações das divulgações dirigem-se a composições capazes de serem administradas ao tracto respiratório compreendendo 1, 2, 3, 4 ou mais agonistas TLR, assim como métodos usando tais composições. Os agonistas TLR são seleccionados de agonista TLR2/1, TLR2/6, TLR3, TLR4,

TLR5, TLR9 ou TLR7. Em determinados aspectos os agonistas TLR são seleccionados de agonista TLR9 e TLR2/6. Num aspecto adicional os agonistas TLR são seleccionados do agonista TLR5. Ainda num aspecto adicional pode usar-se um agonista TLR5 em combinação com um agonista TLR2/6, TLR4, TLR9 ou TLR7. Em determinados aspectos pode usar-se um agonista TLR9 em combinação com um agonista TLR2/6, TLR4, TLR5 ou TLR7. Noutro aspecto pode usar-se um agonista TLR2/6 em combinação com um agonista TLR4, TLR5, TLR9 ou TLR7. Em determinados aspectos pode usar-se um agonista TLR4 em combinação com um agonista TLR2/6, TLR5, TLR9 ou TLR7. Num aspecto adicional pode usar-se um agonista TLR7 em combinação com um agonista TLR2/6, TLR4, TLR5 ou TLR9. Ainda num aspecto adicional qualquer destas combinações duplas pode incluir um terceiro ou um quarto ou um quinto agonista TLR seleccionado de agonista TLR2/6, TLR4, TLR5, TLR9 ou TLR7.

Determinadas concretizações da divulgação são dirigidas a métodos de tratar, inibir ou atenuar uma infecção microbiana compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um agonista TLR9 e de um agonista TLR2/6 a um indivíduo que tem um infecção microbiana ou que está em risco de a desenvolver ou de a contrair. Em determinados aspectos o agonista TLR2/6 é PAM2CSK4. Num aspecto adicional o agonista TLR9 é um oligodesoxinucleótido (ODN) do tipo C. O ODN do tipo C pode incluir, ODN2395 ou ODNM362 ou ODN10101 ou outro ODN de tipo C ou seu análogo, não se lhes limitando. Em determinados aspectos o indivíduo foi exposto a um micróbio patogénico ou está em risco de o ser. O micróbio pode ser um vírus, uma bactéria ou um fungo.

Noutros aspectos o agonista TLR9 e o agonista TLR2/6 são administrados numa formulação de nebulizador. O agonista TLR9 e/ou o agonista TLR2/6 podem ser administrados numa quantidade desde cerca de 0,1, 1, 5, 10, 50 µg ou mg/kg a cerca de 5, 10, 50, 100 µg ou mg/kg de peso corporal do indivíduo, incluindo todos os valores e gamas intermediários.

Determinadas concretizações são dirigidas a uma composição farmaceuticamente aceitável compreendendo um agonista TLR9 e um agonista TLR2/6, um agente anti-inflamatório e um ou mais excipientes farmacêuticos, em que a referida composição é

estéril e essencialmente isenta de micróbios patogénicos. Em determinados aspectos o agonista TLR2/6 é PAM2CSK4. Num aspecto adicional o agonista TLR9 é um oligodesoxinucleótido (ODN) do tipo C. O ODN do tipo C pode incluir, ODN2395 ou ODNM362 ou ODN10101, não se lhes limitando.

Em determinados aspectos a composição STIR compreende um polipéptido flagelina compreendendo 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22 aminoácidos consecutivos do péptido QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA (SEQ ID NO:2), que é conhecido como um agonista TLR5 ou um seu segmento ou derivado. Um polipéptido da divulgação pode também compreender uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 70, 80 ou 90%, incluindo todos os valores e gamas entre estes, idêntica a SEQ ID NO:2. Noutros aspectos, a flagelina é um polipéptido ou péptido de flagelina sintetizado e/ou purificado ou isolado. A expressão "purificado" ou "isolado" significa que essa componente foi previamente isolada ou purificada de outras proteínas ou reagentes de síntese ou produtos secundários e que a componente é pelo menos cerca de 95% pura antes de ser formulada na composição. Em determinadas concretizações, a componente purificada ou isolada é cerca de, ou é pelo menos cerca de 80, 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5% ou mais pura ou qualquer gama derivável destas. Tal componente purificada pode ser então misturada com outras componentes para formar uma composição tal como aqui descrita.

Uma proteína flagelina recombinante ou seu fragmento ou segmento compreende 5, 10, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350 ou 400 aminoácidos consecutivos, incluindo todos os valores e gamas entre estes, de SEQ ID NO:2 ou outros polipéptidos flagelina. Estes fragmentos ou segmentos são pelo menos, no máximo ou cerca de 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100% idênticos a SEQ ID NO:2 ou outros polipéptidos de flagelina. Em determinados aspectos, um polipéptido flagelina ou segmento é pelo menos 75% idêntico à sequência de SEQ ID NO:2. Noutro aspecto, o polipéptido flagelina ou segmento é pelo menos 80% idêntico à sequência de SEQ ID NO:2. Noutro aspecto, o polipéptido flagelina ou segmento é pelo menos 85% idêntico à sequência de SEQ ID NO:2. Noutro aspecto, o polipéptido flagelina ou segmento é pelo menos 90% idêntico

à sequência de SEQ ID NO:2. Noutro aspecto, o polipéptido flagelina ou segmento é pelo menos 95% idêntico à sequência de SEQ ID NO:2. Os derivados ou variantes de flagelina ou seus segmentos incluem inserção, deleção e mutações pontuais de SEQ ID NO:2. Uma mutação de inserção específica é uma proteína de fusão que comprehende sequências de aminoácidos exógenos a flagelina nos terminais carboxilo ou amino. São conhecidas na especialidade várias proteínas de flagelina e incluem uma flagelina com o número de acesso BAB58984 (gi|14278896); YP\_001330159 (gi|150402865); YP\_001323483 (gi|150399716); CAA28975 (gi|1333716); CAA02137 (gi|1567895); CAA67105 (gi|1580779); AAR10473 (gi|38049688); CAR58992 (gi|197093531); YP\_001217666 (gi|147675484); CAL12564 (gi|122089712); BAD14977 (gi|46093563); ou CAD05707 (gi|16503200), não se lhes limitando.

Podem administrar-se concretizações do invento através do tracto respiratório. As composições para uso do invento incluem a administração de uma composição por inalação ou outros métodos de administração ao tracto respiratório superior e/ou inferior. Em determinados aspectos a administração é por inalação. Em determinados aspectos, a composição STIR é administrada numa formulação de nebulizador ou aerossol. Num aspecto adicional a composição é em aerossol ou nebulizador ou numa forma que pode ser inalada por um indivíduo ou instilada a este. A composição pode ser administrada por inalação ou inspiração. A composição STIR, incluindo o agonista TLR individualmente ou num agregado, pode ser administrada numa quantidade de desde cerca de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 µg ou mg/kg a cerca de 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 200 µg ou mg/kg do peso corporal do indivíduo. Noutros aspectos, pode administrar-se a um indivíduo cerca de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 200 µg ou mg de STIR ou agonista TLR individualmente ou a totalidade de todos os agonistas TLR. O indivíduo pode estar exposto a um vírus, bactéria ou fungo inalado ou estar em risco de tal exposição. Ainda concretizações adicionais da divulgação incluem métodos nos quais a composição é administrada antes; após; durante; antes e depois; antes e durante; durante e depois; antes, após e durante a exposição

ou suspeita de exposição ou risco aumentado de exposição ao organismo. O indivíduo pode ser exposto a uma arma biológica ou a um patogénio oportunista. Em aspectos específicos o indivíduo está imuno-comprometido, tal como um doente de cancro ou um doente de SIDA.

Ainda noutra concretização, a presente divulgação é dirigida a uma composição farmaceuticamente aceitável compreendendo um ou mais agonistas TLR; um agente anti-inflamatório; um agente anti-microbiano; e/ou um ou mais excipientes farmacêuticos. Tipicamente tais composições são estéreis e essencialmente isentas de micrónio patogénicos.

Em determinados aspectos o micrónio patogénico ou potencialmente patogénico que se trata ou contra o qual se protege é um vírus, uma bactéria e/ou um fungo. Em determinados aspectos, um micrónio é um vírus. O vírus pode ser da família de vírus Adenoviridae, Coronaviridae, Filoviridae, Flaviviridae, Hepadnaviridae, Herpesviridae, Ortomixoviridae, Paramyxovirinae, Pneumovirinae, Picornaviridae, Poxiridae, Retroviridae ou Togaviridae; e/ou vírus Parainfluenza, Influenza, H5N1, Marburg, Ébola, coronavírus da síndrome respiratória aguda grave, vírus da febre amarela, vírus sincicial respiratório humano, Hantavírus ou Vacinium.

Ainda outro aspecto, o micrónio patogénico ou potencialmente patogénico que se trata ou contra o qual se protege é uma bactéria. Uma bactéria pode ser uma bactéria intracelular, gram positiva ou gram negativa. Num aspecto adicional, as bactérias incluem uma bactéria *Staphylococcus*, um *Bacillus*, uma *Francisella* ou uma *Yersinia*, não se lhes limitando. Ainda num aspecto adicional, a bactéria é *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Staphylococcus aureas*. Em determinadas concretizações, uma bactéria é *Bacillus anthracis* e/ou *Staphylococcus aureas*. Ainda num aspecto adicional, uma bactéria é uma bactéria resistente a fármacos, tal como *Staphylococcus aureas* multirresistente (MRSA). Os bacilos gram-negativos medicamente relevantes representativos incluem *Hemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia*

*coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhi*. As bactérias gram positivas representativas incluem *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Actinobacteria* e *Clostridium*. Mycoplasma que não têm paredes celulares e não podem sofrer coloração Gram, incluindo as bactérias que são derivadas de tais formas, não se lhes limitando.

Ainda noutro aspecto, o micrório patogénico ou potencialmente patogénico que se trata ou contra o qual se protege é um fungo, tal como membros da família *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, *Pneumocystis* ou *Zygomycetes*. Ainda em concretizações adicionais um fungo inclui *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* ou *Pneumocystis carinii*, não se lhes limitando. A família zygomycetes inclui Basidiobolales (Basidiobolaceae), Dimargaritales (Dimargaritaceae), Endogonales (Endogonaceae), Entomophthorales (Ancylistaceae, Completoriaceae, Entomophthoraceae, Meristacraceae, Neozygitaceae), Kickxellales (Kickxellaceae), Mortierellales (Mortierellaceae), Mucorales e Zoopagales. A família *Aspergillus* inclui *Aspergillus caesiellus*, *A. candidus*, *A. carneus*, *A. clavatus*, *A. deflectus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. penicilloides*, *A. restrictus*, *A. sojae*, *A. sydowi*, *A. tamari*, *A. terreus*, *A. ustus*, *A. Versicolor* e semelhantes, não se lhes limitando. A família *Candida* inclui *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. milleri*, *C. oleophila*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. utilis* e semelhantes, não se lhes limitando.

Em determinados aspectos as bactérias patogénicas podem ser uma bactéria intracelular, gram positiva ou gram negativa. Em determinadas concretizações a bactéria é um *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Francisella* ou *Yersinia*. Ainda em aspectos adicionais a bactéria é *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureas*, *Pseudomonas aeruginosa*, e/ou *Burkholderia cepacia*.

As expressões "atenuar", "inibir", "reduzir" ou "prevenção" ou quaisquer variações destas expressões, quando utilizadas nas reivindicações e/ou no fascículo incluem qualquer diminuição mensurável ou inibição completa para obter um resultado pretendido, e.g., redução na carga bacteriana ou crescimento bacteriano após exposição.

O uso da palavra "um" ou "uma" quando usada em conjugação com a expressão "compreendendo" nas reivindicações e/ou no fascículo pode significar "um" mas é também consistente com o significado de "um ou mais", "pelo menos um" e "um ou mais do que um".

Considera-se que qualquer concretização aqui discutida pode ser implementada relativamente a quaisquer métodos ou composições da divulgação e vice versa. Além disso, podem usar-se composições e kits da divulgação para obter métodos da divulgação.

Ao longo deste pedido, a expressão "cerca" é usada para indicar que o valor inclui o desvio padrão do erro para o dispositivo ou método em utilização para determinar o valor.

O uso da expressão "ou" nas reivindicações usa-se para significar "e/ou" salvo indicação explícita para se referir a alternativas apenas ou a alternativas mutuamente exclusivas, apesar da divulgação abranger uma definição que se refere apenas a alternativas e "e/ou". Em determinadas listas incluindo e/ou, ou, ou e um ou mais dos membros listados podem ser especificamente excluídos da lista.

Tal como usado neste fascículo e na reivindicação ou reivindicações, as palavras "compreendendo" (e qualquer forma de compreendendo, tal como "compreende" e "compreendem"), "tendo" (e qualquer forma de ter, tal como "tem" e "têm"), "incluindo" (e qualquer forma de incluindo, tal como "inclui" e "incluem") ou "contendo" (e qualquer forma de contendo, tal como "contém" e "contêm") são inclusivas ou abertas e não excluem elementos ou etapas do método adicionais não citadas.

Outros objectos, características e vantagens do presente invento serão óbvios a partir da seguinte descrição detalhada. Entenda-se, contudo, que a descrição detalhada e os exemplos específicos, apesar de indicarem concretizações específicas do invento, são proporcionados a título meramente ilustrativo, dado que várias alterações e modificações dentro do espírito e âmbito do invento serão óbvias para os peritos na especialidade a partir da sua descrição detalhada.

### **Descrição dos Esquemas**

Os seguintes esquemas são parte do presente fascículo e incluem-se para demonstrar adicionalmente determinados aspectos do presente invento. O invento pode ser melhor compreendido em referência a um ou mais destes esquemas em combinação com a descrição detalhada das concretizações específicas aqui apresentadas.

**Figura 1.** A endotoxina natural (um agonista TLR4) induz alguma StIR. Provocaram-se ratinhos Swiss-Webster de tipo selvagem (10/grupo) com *S. pneumoniae* ( $5 \times 10^{10}$  CFU/ml) 24 h após tratamento com lisado NTHi ("NTHi sup"), sendo a concentração de LPS estimada no lisado NTHi ("Endotoxina 1x"), dez vezes superior à LPS que se pensa estar no lisado ("Endotoxina 10x") ou no tratamento.

**Figura 2.** O lípido A hexa-acilado sintético (agonista TLR4) não induz StIR. Trataram-se ratinhos Swiss-Webster de tipo selvagem (8/grupo) com suspensões de lípido A sintético ou PBS 24 h antes da provocação com *P. aeruginosa*.

**Figura 3.** Apresenta-se uma experiência representativa de ratinhos Swiss-Webster (8/grupo) tratados com imiquimod (agonista TLR7) em dose elevada ou reduzida ou PBS 24 h antes de provocação infecciosa com *P. aeruginosa*.

**Figura 4.** A estimulação com TLR9 sozinho induz protecção mínima. Trataram-se ratinhos Swiss-Webster de tipo selvagem (8/grupo) com PBS ou ODN2395 24 h antes da infecção com *P. aeruginosa* inalada.

**Figura 5.** O tratamento em dose elevada com um agonista TLR2/6 induz StIR. Trataram-se ratinhos Swiss-Webster de tipo selvagem com dose elevada ou reduzida de Pam2CSK4 ou PBS 24 h antes da infecção com *P. aeruginosa*.

**Figura 6.** Uma combinação de agonistas TLR induz uma StIR superior do que qualquer um deles isoladamente. Trataram-se ratinhos Swiss-Webster de tipo selvagem com ODN2395 (20 µg/ml, 8 ratinhos), Pam2CSK4 (20 µg/ml, 8 ratinhos), ambos os agonistas (10 ratinhos) ou PBS (10 ratinhos).

**Figura 7.** Um fragmento sintético de flagelina (agonista TLR5) induz StIR. Um segmento altamente conservado de 22 aminoácidos de flagelina ou PBS sozinho foi administrado por aerossol a Swiss-Webster de tipo selvagem 24 h antes da infecção com *P. aeruginosa*.

**Figura 8.** Efeito de infecção por aerossol com influenza A/conjunto 11-29-05 de pulmão HK em peso corporal: um tratamento de aerossol de 30 minutos; dose de vírus influenza: 100 TCID<sub>50</sub>/ratinho. O peso diminui inicialmente à medida que a infecção progride, reflectindo a gravidade da doença e seguidamente aumenta durante a recuperação.

**Figura 9.** Efeito de infecção por aerossol com influenza A/conjunto 11-29-05 de pulmão HK na sobrevivência: um tratamento de aerossol de 30 minutos; dose de vírus influenza: 100 TCID<sub>50</sub>/ratinho.

**Figura 10.** Ilustra o efeito de um pré-tratamento de aerossol de 30 minutos com ODN/PAM2/PolyIC na sobrevivência de ratinhos infectados com aerossol influenza A/HK; dose de vírus 130 TCID<sub>50</sub>/ratinho.

**Figura 11.** Efeito de infecção por aerossol com influenza A/conjunto 11-29-05 de pulmão HK em peso corporal: um tratamento de aerossol de 30 minutos; dose de vírus influenza: 100 TCID<sub>50</sub>/ratinho. O peso diminui inicialmente à medida que a infecção progride, reflectindo a gravidade da doença e seguidamente aumenta durante a recuperação.

**Figuras 12A e 12B.** A sinalização MyD88, mas não TRIF, é necessária para resistência a pneumonia induzida por lisado bacteriano. Figura 12A. Provocaram-se por inalação ratinhos *Myd88<sup>-/-</sup>* e de tipo selvagem com *P. aeruginosa* com ou sem pré-tratamento 24 h antes com lisado em aerossol de *H. influenzae* não tipável (NTHi). Esquerda, sobrevivência (N = 10 ratinhos/grupo, \*p<0,0001). Direita, carga bacteriana do pulmão imediatamente após infecção (direita, N = 3 ratinhos/grupo, \*\*p<0,004, †p=0,39 relativamente ao controlo de tipo selvagem). Figura 12B. Provocação com *P. aeruginosa* de ratinhos *Trif<sup>-/-</sup>* com ou sem pré-tratamento com o lisado bacteriano. Esquerda, sobrevivência (N = 10 ratinhos/grupo, \*p<0,0001). Direita, carga bacteriana do pulmão imediatamente após infecção (N = 3 ratinhos/grupo, \*p<0,0001).

**Figura 13. A morte induzida por patogénio não é prejudicada em ratinhos deficientes em receptor de interleucina-1.** Trataram-se ratinhos *Il1r<sup>-/-</sup>* e de tipo selvagem com PBS ou com um lisado de *Haemophilus influenzae* não tipável (NTHi) em aerossol 24 h antes de provocação com *P. aeruginosa*. Apresenta-se a carga bacteriana de homogenados de pulmão imediatamente após infecção. (N = 3 ratinhos/grupo, \*p=0,001 relativamente a tipo selvagem + PBS, \*\*p=0,01 relativamente a *Il1r<sup>-/-</sup>*, †p=0,66 relativamente a tipo selvagem + PBS, ‡p=0,89 relativamente a tipo selvagem + NTHi)

**Figura 14. Contagens de leucócitos em fluido de lavagem bronco-alveolar após tratamento com ligandos TLR sintéticos sozinhos.** Submeteram-se ratinhos a BAL 24 h após tratamento com PBS ou um dos seguintes ligandos TLR: Pam3CSK4 (agonista TLR2/1, 1 µg/ml, 3 µg/ml, 10 µg/ml), Pam2CSK4 (agonista TLR2/6, 1 µg/ml, 3 µg/ml, 10 µg/ml), Poly(I:C) (agonista TLR3, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml), lípido A sintético (MPLA, agonista TLR4, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml), Flg22 (22 mero sintético de flagelina, agonista TLR5, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 1000 µg/ml), imiquimod (TLR7 e TLR8, 100 µg/ml, 300 µg/ml, 1000 µg/ml) ou ODN2395 (agonista TLR9, 2 µg/ml, 20 µg/ml). Apresentam-se contagens de neutrófilos (barras negras) e de macrófagos (barras cinzentas) em fluido BAL.

**Figuras 15A - 15G.** O tratamento em aerossol com ligandos TLR sintéticos individuais não induz um nível elevado de

resistência contra pneumonia. Provocaram-se ratinhos de tipo selvagem com *P. aeruginosa* após tratamento (8 ml nebulizados ao longo de 20 min) com PBS ou com os seguintes ligandos TLR sintéticos 24 h antes: Figura 15A. agonista TLR2/1 Pam3CSK4 100 µg/ml, Figura 15B. agonista TLR2/6 Pam2CSK4 10 µg/ml, Figura 15C. agonista TLR3 poli(I:C) 100 µg/ml, Figura 15D. agonista TLR4 MPLA 100 µg/ml, Figura 15E. agonista TLR5 Flg22 100 µg/ml, Figura 15F. agonista TLR7 e TLR8 imiquimod 1 mg/ml, ou Figura 15G. agonista TLR9 ODN 2395 20 µg/ml. As curvas de sobrevivência são exemplos representativos de pelo menos três experiências distintas para ratinhos tratados e não tratados (N = 8 ratinhos/grupo, \*p=0,5, \*\*p=1,0, †p=0,47, ‡p=0,2).

**Figuras. 16A – 16C.** Os agonistas TLR2/6 e TLR9 cooperam para induzir resistência contra pneumonia bacteriana. Figura 16A. Esquerda, sobrevivência de ratinhos provocados com *P. aeruginosa* 24 h após tratamento com PBS, Pam2CSK4 10 µg/ml, ODN 2395 20 µg/ml, a combinação ou a combinação em dose dupla (N = 6 ratinhos/grupo, ‡p=0,008 relativamente a PBS). Direita, Carga bacteriana de homogenados de pulmão imediatamente após infecção com *P. aeruginosa* (N = 3 ratinhos/grupo, #p=0,045 relativamente a PBS, ##p=0,030 relativamente a PBS). Figura 16B. Esquerda, sobrevivência de ratinhos provocados com *S. pneumoniae* 24 h após tratamento com PBS, Pam2CSK4 10 µg/ml, ODN 2395 20 µg/ml, a combinação ou a combinação em dose dupla (N = 10 ratinhos/grupo, ‡p<0,0001 relativamente a tratados com PBS). Direita, carga bacteriana de homogenados de pulmão imediatamente após infecção com *S. pneumoniae* 2x10<sup>10</sup> (N = 3 ratinhos/grupo, †p<0,001, ‡p<0,0001). Figura 16C. Contagem de células de BAL de ratinhos 4 ou 24 h após tratamento com PBS, Pam2CSK4 10 µg/ml, ODN 2395 20 µg/ml ou a combinação de Pam2CSK4 e ODN2395 (N = 3 ratinhos/grupo, \*p=0,016 relativamente a PBS, \*\*p<0,0001 relativamente a PBS, †p=0,041 relativamente a Pam2 sozinho).

**Figuras 17A – 17F.** Nem todas as combinações de agonistas TLR proporcionam proteção significativa contra pneumonia. Provocaram-se ratinhos do tipo selvagem com *P. aeruginosa* após tratamento com PBS ou com as seguintes combinações de agonistas TLR 24 h antes: Figura 17A. Pam2CSK4 e poly(I:C), Figura 17B. Pam2CSK4 e Flg22, Figura 17C. Pam2CSK4 e imiquimod, Figura 17D. ODN2395 e poly(I:C), Figura 17E.

ODN2395 e Flg22, Figura 17F. ODN2395 e Pam3CSK4. As curvas de sobrevivência são exemplos representativos de pelo menos três experiências distintas ( $N = 8$  ratinhos/grupo, \* $p=0,20$ , \*\* $p=0,08$ , † $p=1,0$ , ‡ $p=0,5$ ) .

**Figuras 18A - 18B.** TLR2 é suficiente para promover sinergia protectora de Pam2CSK4 e ODN2395, mas não é necessário para resistência induzida. Figura 18A. *Esquerda*, sobrevivência de ratinhos  $Tlr2^{-/-}$  e de tipo selvagem provocados com *P. aeruginosa* com ou sem tratamento com ODN2395 e Pam2CSK4 24 h antes ( $N = 8$  ratinhos/grupo, \* $p<0,0002$ ). *Direita*, Carga bacteriana de homogenados de pulmão imediatamente após infecção com *P. aeruginosa* ( $N = 4$  ratinhos/grupo, \*\* $p<0,0001$  relativamente a tipo selvagem + PBS, † $p=0,59$  relativamente a  $Tlr2^{-/-}$  + PBS) Figura 18B. *Esquerda*, sobrevivência de ratinhos TLR2 $^{-/-}$  e de tipo selvagem provocados com *P. aeruginosa* com ou sem tratamento 24 h antes com um lisado em aerossol de *H. influenzae* não tipável (NTHi) ( $N = 10$  ratinhos/grupo, \* $p<0,0002$ ). *Direita*, Carga bacteriana de homogenados de pulmão imediatamente após infecção com *P. aeruginosa* ( $N = 3$  ratinhos/grupo, † $p=0,03$  relativamente a tipo selvagem + PBS, # $p=0,002$  relativamente a  $Tlr2^{-/-}$  + PBS).

**Figuras 19A - 19B.** Os CpG ODN de classe C de ligação a TLR9, ao contrário dos de classe A ou B, interagem sinergicamente com Pam2CSK4 para induzir resistência a pneumonia bacteriana. Figura 19A. Sobrevivência de ratinhos de tipo selvagem tratados com Pam2CSK4 e ODN2395 ou Pam2CSK4 e um controlo de ODN aleatório 24 h antes de provação com *P. aeruginosa* ( $N = 10$  ratinhos/grupo, \* $p<0,0001$ ). Figura 19B. Sobrevivência de ratinhos de tipo selvagem provocados com *P. aeruginosa* 24 h após tratamento com PBS ou Pam2CSK4 combinado com um CpG ODN de classe A (ODN1585 ou ODN2216), um CpG ODN de classe B (ODN 2006-G5) ou um CpG ODN de classe C (M362 ou ODN2395) ( $N = 10$  ratinhos/grupo, \* $p=0,01$  relativamente a PBS, \*\* $p=0,0001$  relativamente a PBS; † $p=0,3$  relativamente a Pam2 + ODN2395).

**Figuras 20A - 20D.** Os agonistas TLR2/6 e TLR9 cooperam para induzir morte bacteriana por células epiteliais respiratórias murinas e humanas *in vitro*. Figura 20A.

Trataram-se células MLE-15 com Pam2CSK4 (10 µg/ml) e/ou ODN2395 (20 µg/ml) durante 4 h antes da infecção com *B. anthracis* (1000 esporos). Apresentam-se CFU bacterianas 4 h após infecção (\*p=0,05 relativamente a PBS, \*\*p=0,016 relativamente a PBS, #p>0,05 relativamente a qualquer dos agonistas separadamente). Figura 20B. Tratou-se meio de cultura MLE (sem células) com ODN2395 e Pam2CSK4, infectado com esporos de *B. anthracis* (1000 esporos) e cultivou-se após 4 h (†p=1,0). Figura 20C. Trataram-se células A549 com ODN2395 e Pam2CSK4 durante 4 h antes da infecção com *P. aeruginosa* (2700 CFU). Apresentam-se CFU bacterianas 4 h após infecção (\*p=0,01 relativamente a PBS, \*\*p=0,003 relativamente a PBS, \*\*\*p=0,001 relativamente a PBS, #p=>0,05 relativamente a qualquer dos agonistas separadamente). Figura 20D. Tratou-se meio de cultura MLE (sem células) com ODN2395 e Pam2CSK4, infectado com *P. aeruginosa* (4000 CFU) e cultivou-se após 4 h (‡p=0,58).

**Figura 21.** Sobrevida de ratinhos Swiss-Webster imunizados com diferentes agonistas TLR sintéticos e provocados intranasalmente com 5 LD<sub>50</sub> de esporos de *Bacillus anthracis* Ames (MD-10-013). Pré-trataram-se ratinhos com agonistas TLR em aerossol tal como indicado 24 horas antes de provação com antraz. ALIIS = lisado bacteriano NTHi, 2395 = ODN2395, 10101 = ODN10101, M362 = ODN-M362. 1x = ODN a 40 µg/ml e Pam2 a 20 µg/ml.

**Figura 22.** Efeito de pré-tratamento com ODN/Pam2 ou lisado NTHi em aerossol sobre a sobrevida de ratinhos infectados com influenza A/HK. Um tratamento de 30 minutos com aerossol; Dose de vírus influenza: 100 TCID<sub>50</sub>/ratinho.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

O sistema imunitário é o sistema de células e órgãos especializados que protegem um organismo das influências biológicas externas. Quando o sistema imunitário funciona adequadamente, protege o corpo de infecções microbianas e destrói células de cancro e substâncias estranhas. Se o sistema imunitário enfraquece a sua capacidade de defender o corpo também enfraquece, permitindo que os patogénios se desenvolvam no corpo.

O sistema imunitário está muitas vezes dividido em: (a) uma imunidade inata compreendendo componentes que proporcionam uma "primeira linha" de defesa imediata para afastar continuamente patogénios e (b) uma imunidade adaptativa (adquirida) compreendendo a produção de anticorpos e produção ou estimulação de células T especificamente concebidas para se dirigirem a determinados抗原s. Usando a imunidade adaptativa, o corpo pode desenvolver ao longo do tempo uma imunidade específica para um ou mais抗原s particulares. Esta resposta demora dias a desenvolver-se e portanto não é eficaz na prevenção de uma invasão inicial, mas prevenirá normalmente qualquer infecção subsequente e também ajuda na depuração de infecções de maior duração.

Em resposta a determinados estímulos inflamatórios, as células excretoras do epitélio das vias respiratórias de ratinhos e humanos sofrem rapidamente uma alteração notável de estrutura denominada metaplasia inflamatória. A maioria das alterações estruturais podem ser atribuídas ao aumento da produção de mucinas formadoras de gel excretadas, sendo também reguladas positivamente por macromoléculas adicionais com funções na excreção de mucinas, morte de micróbios ou sinalização inflamatória. Pensa-se que a função fisiológica desta resposta é o aumento das defesas locais contra patogénios microbianos, apesar dessa hipótese ter sido formalmente pouco ensaiada. Paradoxalmente, a produção e excreção excessivas de mucinas formadoras de gel é a principal causa de obstrução das vias aéreas em doenças inflamatórias comuns das vias respiratórias tais como asma, fibrose cística e doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC). A estimulação da imunidade inata sem a produção de mucina proporcionaria um método adicional de atenuar infecção do tracto respiratório por prevenção e/ou tratamento de um indivíduo.

As concretizações da divulgação incluem a estimulação das vias respiratórias de um indivíduo com uma composição compreendendo 1, 2, 3, 4 ou mais agonistas TLR, incluindo seus segmentos ou derivados ou análogos. Espera-se que um indivíduo ao qual se administre uma composição do invento, tenha uma resposta terapêutica, profilática ou terapêutica e profilática a um organismo infeccioso potencial. Em aspectos particulares,

a composição éposta sob a forma de aerossol e administrada através do tracto respiratório. Usa-se a composição para induzir ou desencadear de outro modo um efeito protector através, por exemplo, da activação ou do aumento da imunidade inata dos pulmões.

Determinados aspectos da divulgação incluem moléculas pequenas e/ou agonistas TLR derivados de diferentes microorganismos ou sintetizados pelo Homem. Tipicamente, a molécula e/ou agonista TLR não provoca uma produção aumentada de mucinas excretadas. Podem usar-se concretizações da divulgação como agentes terapêuticos preventivos e de antecipação contra por exemplo, armas biológicas, micróbios com novas virulências ou micróbios oportunistas.

## **I. COMPOSIÇÕES STIR**

### **A. Compostos e partes heterólogas**

Várias moléculas que não são do hospedeiro ou heterólogas podem estimular, facilitar ou contribuir para a produção de uma resposta imunitária. Estas partes incluem vários agonistas de receptores inatos e/ou componentes microbianos.

#### **1. Ligandos de receptor inatos**

Os receptores de reconhecimento de padrões ou PRR (receptores inatos) são proteínas expressas por células do sistema imunitário inato para identificar padrões moleculares associados a patogénios ou PAMP, que estão associados a patogénios microbianos ou stress celular. Os PAMP incluem hidratos de carbono bacterianos (e.g., lipopolissacárido ou LPS, manose), ácidos nucleicos (e.g., ADN ou ARN bacteriano ou vírico), peptidoglicanos e ácidos lipotécóicos (de bactérias Gram positivas), N-formilmetionina, lipoproteínas, glucanos fúngicos e semelhantes, não se lhes limitando.

Os PRR são tipicamente classificados de acordo com a sua especificidade de ligando, função, localização e/ou relações evolutivas. Com base na função os PRR podem dividir-se em PRR endocíticos ou PRR de sinalização. Os PRR de sinalização incluem as grandes famílias de receptores do tipo Toll ligados

à membrana e receptores citoplasmáticos do tipo NOD. Os PRR endocíticos promovem a ligação, envolvimento e destruição de microrganismos pelos fagócitos, sem emitir um sinal intracelular. Estes PRR reconhecem hidratos de carbono e incluem receptores de manose de macrófagos, receptores de glucano presentes em todos os fagócitos e receptores de sequestração que reconhecem ligandos carregados, encontram-se em todos os fagócitos e medeiam a remoção de células apoptóticas.

Identificaram-se vários receptores inatos incluindo receptor do tipo Toll (TLR), receptor de lectina do tipo C (CLR) e receptores do tipo domínio de oligomerização de ligação de nucleótidos (receptor do tipo Nod ou NLR), não se lhes limitando. Os TLR são uma classe de proteínas que desempenha um papel chave no sistema imunitário inato. São receptores não catalíticos que atravessam uma membrana única e reconhecem moléculas derivadas de micróbios que estão conservadas estruturalmente. Caso estes micróbios estejam presentes à superfície da pele ou no interior desta ou da mucosa do tracto intestinal, estes são reconhecidos pelos TLR que activam as respostas imunitárias da célula. Curiosamente, muitos destes agonistas TLR não induzem uma StIR significativa quando administrados sozinhos. Tipicamente, um indivíduo a ser tratado usando os métodos aqui descritos foi exposto a um micrório patogénico ou está em risco de tal exposição.

#### a. Agonista de receptor do tipo Toll (TLR)

Os receptores do tipo Toll (TLR) são os PRR melhor caracterizados (Ishii et al., 2008). São proteínas transmembranares altamente conservadas, consistindo de um ectodomínio com várias repetições ricas em leucina para reconhecimento de padrão, uma hélice que atravessa uma membrana e um domínio de receptor Toll/interleucina-1 (TIR) para sinalização intracelular. Foram identificados pelo menos 13 TLR de mamífero, cada um localizado especificamente na membrana plasmática ou membranas endossómicas e cada um detecta um complementar único de PAMP (Akira et al., 2006; Shi et al., 2006). Por reconhecimento de PAMP, a transdução de sinal ocorre através de recrutamento específico por TLR de combinações de proteína adaptadora TIR citosólica.

Concertadamente com um ou mais dos quatro outros adaptadores, a proteína adaptadora TIR MyD88 é necessária para sinalizar a maioria dos TLR. Os eventos de sinalização independentes de MyD88 observados por parte de TLR3 e TLR4 necessitam do adaptador TIR, TRIF (também denominado TICAM-1), com ou sem participação de TRAM (Yamamoto *et al.*, 2003). A cascata de sinalização do adaptador TIR específico de TLR activa factores de transcrição específicos de receptor, tal como NF- $\kappa$ B, activando os factores de regulação de proteína-1 e interferão (IRF), levando à expressão de genes anti-inflamatórios e anti-microbianos (Akira *et al.*, 2006; O' Neill, L.A. e Bowie, 2007; Takeda, K. e Akira, 2004).

Um agonista TLR é qualquer composto ou substância que funciona para activar um TLR, *e.g.*, para induzir um evento de sinalização mediado por uma via de transdução de sinal TLR. Os agonistas TLR adequados incluem agonistas TLR1, agonistas TLR2, agonistas TLR3, agonistas TLR4, agonistas TLR5, agonistas TLR6, agonistas TLR7, agonistas TLR8 e agonistas TLR9.

É agora amplamente reconhecido que a geração de imunidade protectora depende não só da exposição a抗原, mas também do contexto no qual se encontra o抗原. Existem numerosos exemplos nos quais a introdução de um novo抗原 num hospedeiro e num contexto inflamatório gera tolerância imunológica em vez de imunidade a longo prazo enquanto a exposição a抗原 na presença de um agente inflamatório (adjuvante) induz imunidade (Mondino *et al.*, 1996; Pulendran *et al.*, 1998; Jenkins *et al.*, 1994; e Keamey *et al.*). Dado que tal pode significar a diferença entre tolerância e imunidade, têm sido desenvolvidos muitos esforços para a descoberta de "adjuvantes" presentes em agentes infecciosos que estimulam as vias moleculares envolvidas na criação do contexto imunogénico apropriado de apresentação de抗原. Sabe-se agora que uma grande parte da actividade adjuvante é devida a interacções de produtos microbianos e víricos com diferentes membros dos Receptores do Tipo Toll (TLR) expressos em células imunitárias (Beutler *et al.*, 2004; Kaisho, 2002; Akira *et al.*, 2003; e Takeda e Akira, 2004). Os TLR são nomeados com base na sua homologia com uma molécula em *Drosophila*, denominada Toll, que funciona no seu

desenvolvimento e está envolvida em imunidade anti-microbiana (Lernaitre *et al.*, 1996; e Hashimoto *et al.*, 1988).

Os trabalhos iniciais mostraram que os homólogos mamíferos de Toll e das moléculas da via Toll eram críticos para a capacidade das células do sistema imunitário inato responderem a provocações microbianas e subprodutos microbianos (Medzhitov *et al.*, 1997; Medzhitov *et al.*, 1998; Medzhitov *et al.*, 2000; e Janeway *et al.*, 2002). Desde a identificação de LPS como um agonista TLR4 (Poltorak *et al.*, 1998) têm sido descritos vários outros agonistas TLR tal como polipéptidos HPV multi-tipo triacilo (TLR1), peptidoglicano, ácido lipoteicóico e Pam<sub>3</sub>Cys (TLR2), ARN em cadeia dupla (TLM), flagelina (TLR5), polipéptidos HPV multi-tipo diacilo tal como Malp-2 (TLR6), imidazoquinolinas e ARN em cadeia simples (TLR7,8), ADN bacteriano, sequências CpG de ADN não metiladas e mesmo complexos ADN genómico-anticorpo humanos (TLR9) (Takeuchi *et al.*, 2001; Edwards *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2003; Nagase *et al.*, 2003).

A expressão "agonista", tal como aqui utilizada, refere-se a um composto que pode combinar um receptor (*e.g.*, um TLR) para produzir uma actividade celular. Um agonista pode ser um ligando que se liga directamente ao receptor. Alternativamente, um agonista pode combinar-se com um receptor indirectamente através de, por exemplo, (a) formação de um complexo com outra molécula que se liga directamente ao receptor, ou (b) resulta de outro modo numa modificação de outro composto de modo a que o outro composto se ligue directamente ao receptor. Pode denominar-se um agonista como um agonista de um TLR particular (*e.g.*, um agonista TLR7) ou uma combinação específica de TLR (*e.g.*, um agonista TLR 7/8 - um agonista tanto de TLR7 como de TLR8).

As expressões "CpG-ODN", "ácido nucleico CpG", "polinucleótido CpG" e "oligonucleótido CpG" aqui usadas independentemente, referem-se a um polinucleótido que comprehende pelo menos uma parte 5' -CG-3' e em muitas concretizações comprehende uma parte 5' -CG-3' não metilada. Em geral, a CpG de ácido nucleico é um ADN ou ARN em cadeia simples ou em cadeia dupla com pelo menos seis bases de nucleótido que podem compreender ou consistir de um nucleótido

modificado ou de uma sequência de nucleósidos modificados. Em algumas concretizações, a parte 5' -CG-3' do ácido nucleico CpG é parte de uma sequência de nucleótidos palindrómica. Em algumas concretizações, a parte 5' -CG-3' do ácido nucleico CpG é parte de uma sequência de nucleótidos não palindrómica.

Os agonistas TLR adequados incluem agonistas TLR isolados de ocorrência natural; e agonistas TLR sintéticos. Os agonistas TLR isolados de uma fonte de agonista TLR de ocorrência natural são geralmente purificados, e.g., o agonista TLR purificado é pelo menos cerca de 80% puro, pelo menos cerca de 90% puro, pelo menos cerca de 95% puro, pelo menos cerca de 98% puro, pelo menos cerca de 99% puro ou mais que 99% puro. Preparam-se agonistas TLR sintéticos por métodos padrão e são geralmente pelo menos cerca de 80% puros, pelo menos cerca de 90% puros, pelo menos cerca de 95% puros, pelo menos cerca de 98% puros, pelo menos cerca de 99% puros ou mais que 99% puros.

Os agonistas TLR adequados incluem agonistas TLR que não estão ligados a qualquer outro composto. Os agonistas TLR adequados incluem agonistas TLR que estão ligados, covalentemente ou não covalentemente, a um segundo composto. Em algumas concretizações um agonista TLR está ligado a outro composto directamente. Noutras concretizações um agonista TLR está ligado a outro composto através de um ligante. Um composto ao qual um agonista TLR está ligado inclui um transportador, um esqueleto, um suporte insolúvel, uma micropartícula, uma microesfera e semelhantes. Os transportadores incluem polipéptidos terapêuticos; polipéptidos que proporcionam solubilidade aumentada; polipéptidos que aumentam a semivida do agonista TLR num meio fisiológico (e.g., soro ou outro fluido corporal); e semelhantes. Em algumas concretizações, conjugar-se-á um agonista TLR, directamente ou através de um ligante, a um segundo agonista TLR.

Em algumas concretizações, o agonista TLR é uma versão de pró-fármaco de um agonista TLR. Os pró-fármacos são compostos por uma parte de pró-fármaco ligada covalentemente a um agente terapêutico activo. Os pró-fármacos são capazes de ser convertidos a fármacos (agentes terapêuticos activos) in

vivo através de determinadas modificações químicas ou enzimáticas da sua estrutura. Os exemplos de partes de pró-fármacos são bem conhecidos na especialidade e podem encontrar-se nas seguintes referências: Biological Approaches to the Controlled Delivery of Drugs, R. L. Juliano, New York Academy of Sciences, (1988); Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism: Chemistry, Biochemistry, and Enzymology, Bernard Testa, Vch Verlagsgesellschaft Mbh, (2003); e Prodrugs: Topical and Ocular Drug Delivery, Kenneth Sloan, Marcel Dekker; (1992). Os exemplos de partes de pró-fármaco são péptidos, e.g., péptidos que dirigem o ligando TLR ao local de acção e um péptido que possui dois ou mais ácidos carboxílicos livres e não acoplados no seu terminal amino. Outros exemplos de partes de pró-fármaco cliváveis incluem grupos éster, grupos éter, grupos acilo, grupos alquilo, grupos fosfato, grupos sulfonato, N-óxidos e grupos carbonilo terc-butóxilo.

Em algumas concretizações o agonista TLR é um agonista TLR monomérico. Noutras concretizações o agonista TLR é multimerizado, e.g., o agonista TLR é polimérico. Em algumas concretizações, um agonista TLR multimerizado é homofuncional, e.g., é composto por um tipo de agonista TLR. Noutras concretizações, o agonista TLR multimerizado é um agonista TLR heterofuncional.

Em algumas concretizações, um ligando TLR é um ligando TLR quimérico (também aqui referido como um ligando TLR "heterofuncional"). Em algumas concretizações, o agonista TLR quimérico comprehende uma parte de agonista TLR9 e uma parte de agonista TLR2. Os seguintes são exemplos não limitativos de agonistas TLR heterofuncionais.

Em algumas concretizações, um ligando TLR quimérico tem a seguinte fórmula:  $(X)_n - (Y)_m$ , em que X é um agonista TLR1, agonista TLR2, agonista TLR3, agonista TLR4, agonista TLR5, agonista TLR6, agonista TLR7, agonista TLR8 e agonista TLR9 e em que Y é um agonista TLR2, agonista TLR3, agonista TLR4, agonista TLR5, agonista TLR6, agonista TLR7, agonista TLR8 e agonista TLR9 e n e m são independentemente um número inteiro desde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais incluindo todos os valores e gamas entre estes. Em determinadas concretizações X ou Y é TLR9 e X ou Y é TLR2/6.

**Agonistas TLR2.** Os agonistas TLR2 incluem agonistas TLR2 isolados de ocorrência natural; e agonistas TLR2 sintéticos. Os agonistas TLR2 isolados de uma fonte de ocorrência natural de agonista TLR2 são geralmente purificados, e.g., o agonista TLR2 purificado é pelo menos cerca de 80% puro, pelo menos cerca de 90% puro, pelo menos cerca de 95% puro, pelo menos cerca de 98% puro, pelo menos cerca de 99% puro ou mais de 99% puro. Preparam-se os agonistas TLR2 sintéticos por meios padrão e são geralmente pelo menos cerca de 80% puros, pelo menos cerca de 90% puros, pelo menos cerca de 95% puros, pelo menos cerca de 98% puros, pelo menos cerca de 99% puros ou mais de 99% puros.

Os agonistas TLR2 incluem agonistas TLR2 que não estão ligados a qualquer outro composto. Os agonistas TLR2 incluem agonistas TLR2 que estão ligados, covalentemente ou não covalentemente, a um segundo composto. Em algumas concretizações, liga-se um agonista TLR2 a outro composto directamente. Noutras concretizações, um agonista TLR2 está ligado a outro composto através de um ligante.

Os agonistas TLR2 incluem lipopéptidos triacilados e diacilados sintéticos. Um exemplo não limitativo de um ligando TLR2 é FSL-1 (uma lipoproteína sintética derivada de *Mycoplasma salivarium* 1), Pam<sub>3</sub>Cys (tripalmitoil-S-gliceril cisteína) ou S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-(2RS)-propil]-N-palmitoil-(R)-cisteína, em que "Pam<sub>3</sub>" é "tripalmitoil-S-gliceril" (Aliprantis *et al.*, 1999). Os derivados de Pam<sub>3</sub>Cys são também agonistas TLR2 adequados, em que os derivados incluem, hidroxitricloridrato de S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-(2-R,S)-propil]-N-palmitoil-(R)-Cys-(S)-Ser-(Lys)<sub>4</sub>; Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-Ser-Asn-Ala; PaM<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub>; Pam<sub>3</sub>Cys-Ala-Gly; Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-Gly; Pam<sub>3</sub>Cys-Ser; PaM<sub>3</sub>Cys-OME; Pam<sub>3</sub>Cys-OH; PamCAG, palmitoil-Cys((RS)-2,3-di(palmitoiloxi)-propil)-Ala-Gly-OH; e semelhantes, não se lhes limitando. Outro exemplo não limitativo de um agonista TLR2 adequado é Pam<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub> PaM<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub> (dipalmitoil-S-glicerilcisteína-serina-(lisina)<sub>4</sub>; ou Pam<sub>2</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub>) é um lipopéptido diacilado sintético. Descreveram-se na literatura agonistas TLR sintéticos. Consultar, e.g., Kellner *et al.* (1992); Seifer *et al.* (1990); Lee *et al.* (2003).

**Agonistas TLR3.** Os agonistas TLR3 incluem agonistas TLR3 isolados de ocorrência natural; e agonistas TLR3 sintéticos. Os agonistas TLR3 isolados de uma fonte de ocorrência natural de agonista TLR3 são geralmente purificados, e.g., o agonista TLR3 purificado é pelo menos cerca de 80% puro, pelo menos cerca de 90% puro, pelo menos cerca de 95% puro, pelo menos cerca de 98% puro, pelo menos cerca de 99% puro ou mais de 99% puro. Preparam-se agonistas TLR3 sintéticos por métodos padrão e são geralmente pelo menos cerca de 80% puros, pelo menos cerca de 90% puros, pelo menos cerca de 95% puros, pelo menos cerca de 98% puros, pelo menos cerca de 99% puros ou mais de 99% puros.

Os agonistas TLR3 incluem agonistas TLR3 que não estão ligados a qualquer outro composto. Os agonistas TLR3 incluem agonistas TLR3 que estão ligados, covalentemente ou não covalentemente, a um segundo composto. Em algumas concretizações liga-se um agonista TLR3 directamente a outro composto. Noutras concretizações liga-se um agonista TLR3 a outro composto através de um ligante.

Os agonistas TLR3 incluem ARN em cadeia dupla (ARNds) de ocorrência natural; ARN em cadeia dupla sintéticos; e análogos de ARN em cadeia dupla sintéticos; e semelhantes (Alexopoulou *et al.*, 2001). Um exemplo não limitativo de um ARN em cadeia dupla sintético é poly(I:C).

**Agonistas TLR4.** Os agonistas TLR4 adequados incluem agonistas TLR4 isolados de ocorrência natural; e agonistas TLR4 sintéticos. Os agonistas TLR4 isolados de uma fonte de ocorrência natural de agonista TLR4 são geralmente purificados, e.g., o agonista TLR4 purificado é pelo menos cerca de 80% puro, pelo menos cerca de 90% puro, pelo menos cerca de 95% puro, pelo menos cerca de 98% puro, pelo menos cerca de 99% puro ou mais de 99% puro. Preparam-se agonistas TLR4 sintéticos por métodos padrão e são geralmente pelo menos cerca de 80% puros, pelo menos cerca de 90% puros, pelo menos cerca de 95% puros, pelo menos cerca de 98% puros, pelo menos cerca de 99% puros ou mais de 99% puros.

Os agonistas TLR4 incluem agonistas TLR4 que não estão ligados a qualquer outro composto. Os agonistas TLR4 adequados incluem agonistas TLR4 que estão ligados, covalentemente ou não covalentemente, a um segundo composto. Em algumas concretizações liga-se um agonista TLR4 directamente a outro composto. Noutras concretizações liga-se um agonista TLR4 a outro composto através de um ligante. Os compostos adequados aos quais um agonista TLR4 está ligado incluem um transportador, um esqueleto e semelhantes.

Os agonistas TLR4 incluem lipopolissacáridos (LPS) de ocorrência natural, e.g., LPS de uma vasta variedade de bactérias Gram negativas; derivados de LPS de ocorrência natural; LPS sintéticos; proteína de choque térmico-60 (Hsp60) de bactérias; polímeros de ácido manurónico; flavolipinas; ácidos teicorónicos; pneumolisina de *S. pneumoniae*; fímbrias bacterianas, proteínas de envelope do vírus sincicial respiratório; e semelhantes. O agonista TLR4 também inclui monofosforil lípido-A sintético (MPLA, Invivogen) e dissacárido-hexacílio fosforilado (PHAD, Avanti Polar Lipids), assim como outros agonistas TLR4 sintéticos.

**Agonistas TLR 5.** Os agonistas TLR5 adequados incluem agonistas TLR5 isolados de ocorrência natural; e agonistas TLR5 sintéticos. Os agonistas TLR5 isolados de uma fonte de ocorrência natural de agonista TLR5 são geralmente purificados, e.g., o agonista TLR5 purificado é pelo menos cerca de 80% puro, pelo menos cerca de 90% puro, pelo menos cerca de 95% puro, pelo menos cerca de 98% puro, pelo menos cerca de 99% puro ou mais de 99% puro. Preparam-se agonistas TLR5 sintéticos por métodos padrão e são geralmente pelo menos cerca de 80% puros, pelo menos cerca de 90% puros, pelo menos cerca de 95% puros, pelo menos cerca de 98% puros, pelo menos cerca de 99% puros ou mais de 99% puros.

Os agonistas TLR5 incluem agonistas TLR5 que não estão ligados a qualquer outro composto. Os agonistas TLR5 adequados incluem agonistas TLR5 que estão ligados, covalentemente ou não covalentemente, a um segundo composto. Em algumas concretizações liga-se um agonista TLR5 directamente a outro composto. Noutras concretizações liga-se um agonista TLR5 a outro composto através de um ligante. Os compostos adequados

aos quais um agonista TLR5 está ligado incluem um transportador, um esqueleto e semelhantes.

Os agonistas TLR5 incluem um segmento de flagelina de 22 aminoácidos altamente conservado assim como flagelina completa e outros de seus segmentos.

**Agonistas TLR7.** Os agonistas TLR7 adequados incluem agonistas TLR7 isolados de ocorrência natural; e agonistas TLR7 sintéticos. Os agonistas TLR7 isolados de uma fonte de ocorrência natural de agonista TLR7 são geralmente purificados, e.g., o agonista TLR7 purificado é pelo menos cerca de 80% puro, pelo menos cerca de 90% puro, pelo menos cerca de 95% puro, pelo menos cerca de 98% puro, pelo menos cerca de 99% puro ou mais de 99% puro. Preparam-se agonistas TLR7 sintéticos por métodos padrão e são geralmente pelo menos cerca de 80% puros, pelo menos cerca de 90% puros, pelo menos cerca de 95% puros, pelo menos cerca de 98% puros, pelo menos cerca de 99% puros ou mais de 99% puros.

Os agonistas TLR7 incluem agonistas TLR7 que não estão ligados a qualquer outro composto. Os agonistas TLR7 adequados incluem agonistas TLR7 que estão ligados, covalentemente ou não covalentemente, a um segundo composto. Em algumas concretizações, liga-se um agonista TLR7 directamente a outro composto. Noutras concretizações, liga-se um agonista TLR7 a outro composto através de um ligante.

Os ligandos TLR7 incluem compostos de imidazoquinolina; análogos de guanosina; compostos de pirimidinona tais como análogos de bropirimina e de bropirimina; e semelhantes. Os compostos de imidazoquinolina que funcionam como ligandos TLR7 incluem, imiquimod, (também denominado Aldara, R-837, S-26308) e R-848 (também denominados resiquimod, S-28463; com a estrutura química: 4-amino-2-etoximetil-, -dimetil-1H-imidazol[4,5-c]quinolina-1-etanol), não se lhes limitando. Os agentes imidazoquinolina adequados incluem aminas de imidazoquinolina, aminas de imidazopiridina, aminas de cicloalquilimidazopiridina fundidas em 6,7 e aminas de imidazoquinolina em ponte 1,2. Estes compostos foram descritos nas patentes U.S. 4 689 338, 4 929 624, 5 238 944, 5 266 575, 5 268 376, 5 346 905, 5 352 784, 5 389 640, 5 395 937, 5

494 916, 5 482 936, 5 525 612, 6 039 969 e 6 110 929. As espécies específicas de agentes imidazoquinolina que são adequados para usar num método objecto incluem R-848 (S-28463); 4-amino-2-etoximetil-, -dimetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-s-i-etanol; e 1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina (R-837 ou Imiquimod). Também é adequado para utilização o composto hidrato de 4-amino-2-(etoximetil)-, -dimetil-6,7,8,9-tetra-hidro-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-1-etanol (consultar, e.g., BM-003 em Gorden et al. (2005)).

Os compostos adequados incluem os que contêm uma 2-aminopiridina fundida a um anel heterocíclico de cinco membros contendo azoto. Tais compostos incluem, por exemplo, aminas de imidazoquinolina incluindo aminas de imidazoquinolina substituídas tal como, por exemplo, aminas de imidazoquinolina substituídas com amida, aminas de imidazoquinolina substituídas com sulfonamida, aminas de imidazoquinolina substituídas com ureia, aminas de imidazoquinolina substituídas com éter arílico, aminas de imidazoquinolina substituídas com éter heterocíclico, aminas de imidazoquinolina substituídas com amidoéter, aminas de imidazoquinolina substituídas com sulfonamidoéter, éteres de imidazoquinolina substituídas com ureia, aminas de imidazoquinolina substituídas com tioéter e aminas de imidazoquinolina substituídas com 6-arilo, 7-arilo, 8-arilo ou 9-arilo ou heteroarilo, não se lhes limitando; aminas de tetra-hidroimidazoquinolina incluindo aminas de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas com amida, aminas de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas com sulfonamida, aminas de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas com ureia, aminas de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas com ariléter, aminas de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas com éter heterocíclico, aminas de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas com amidoéter, aminas de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas com sulfamidoéter, éteres de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas com ureia e aminas de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas com tioéter, não se lhes limitando; aminas de imidazopiridina incluindo aminas de imidazopiridina substituídas com amida, aminas de imidazopiridina substituídas com sulfonamida, aminas de imidazopiridina substituídas com ureia, aminas de imidazopiridina substituídas com ariléter, aminas de

imidazopiridina substituídas com éter heterocíclico, aminas de imidazopiridina substituídas com amidoéter, aminas de imidazopiridina substituídas com sulfonamidoéter, éteres de imidazopiridina substituídos com ureia e aminas de imidazopiridina substituídas com tioéter; aminas de imidazoquinolina com ponte em 1,2; aminas de cicloalquilimidazopiridina fundidas em 6,7; aminas de imidazonaftiridina; aminas de tetra-hidroimidazonaftiridina; aminas de oxazoloquinolina; aminas de tiazoloquinolina; aminas de oxazolopiridina; aminas de tiazolopiridina; aminas de oxazolonaftiridina; aminas de tiazolonaftiridina; e dímeros de 1H-imidazo fundidos a aminas de piridina, aminas de quinolina, aminas de tetra-hidroquinolina, aminas de naftiridina e aminas de tetra-hidronaftiridina, não se lhes limitando.

Os compostos incluem uma amina de imidazoquinolina substituída, uma amina de tetra-hidroimidazoquinolina, uma amina de imidazopiridina, uma amina de imidazoquinolina com ponte em 1,2, uma amina de cicloalquilimidazopiridina fundida em 6,7, uma amina de imidazonaftiridina, uma amina de tetra-hidroimidazonaftiridina, uma amina de oxazoloquinolina, uma amina de tiazoloquinolina, uma amina de oxazolopiridina, uma amina de tiazolopiridina, uma amina de oxazolonaftiridina e uma amina de tiazolonaftiridina.

Tal como aqui utilizado, uma amina de imidazoquinolina substituída refere-se a uma amina de imidazoquinolina substituída com amida, uma amina de imidazoquinolina substituída com sulfonamida, uma amina de imidazoquinolina substituída com ureia, uma amina de imidazoquinolina substituída com ariléter, uma amina de imidazoquinolina substituída com éter heterocíclico, uma amina de imidazoquinolina substituída com amidoéter, uma amina de imidazoquinolina substituída com sulfonamidoéter, um éter de imidazoquinolina substituído com ureia, aminas de imidazoquinolina substituídas com tioéter ou aminas de imidazoquinolina substituídas com 6-arilo, 7-arilo, 8-arilo ou 9-arilo ou heteroarilo.

Os análogos de guanosina que funcionam como ligandos TLR7 incluem determinados ribonucleótidos e desoxirribonucleótidos

de guanina substituídos em C8 e dissubstituídos em N7 e C8, incluindo, Loxorribina (7-alil-8-oxoguanosina), 7-tia-8-oxoguanosina (TOG), 7-desazaguanosina e 7-desazadesoxiguanosina (Lee et al., 2003), não se lhes limitando. Bropirimina (PNU-54461), uma 5-halo-6-fenilpirimidinona e análogos de bropirimina são descritos na literatura e são também adequados para utilização. Consultar, e.g., Vroegop et al. (1999). Os exemplos adicionais de guanosinas substituídas em C8 adequadas incluem 8-mercaptoguanosina, 8-bromoguanosina, 8-metilguanosina, 8-oxo-7,8-di-hidroguanosina, C8-arylarnino-2'-desoxiguanosina, C8-propinilguanosina, ribonucleósidos de guanina substituídos em C8 e em N7 tais como 7-alil-8-oxoguanosina (loxorribina) e 7-metil-8-oxoguanosina, 8-aminoguanosina, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina e 8-hidroxiguanosina, não se lhes limitando.

Em algumas concretizações um ligando TLR7 guanina substituída é monomérico. Noutras concretizações um ligando TLR7 guanina substituída é multimérico. Assim, em algumas concretizações, um ligando TLR7 tem a fórmula: (B)<sup>q</sup>, em que B é um ligando TLR7 guanina substituída e q é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. Os monómeros de ligando TLR7 individuais num ligando TLR7 multimérico estão ligados, covalentemente ou não covalentemente, quer directamente entre si, quer através de um ligante. Os agonistas TLR7 adequados incluem um ligando TLR7 tal como descrito na publicação de patente U.S. 2004/0162309.

Em algumas concretizações, um agonista TLR7 é um agonista TLR7 selectivo, e.g., o agonista modula a actividade celular através de TLR7, mas não modula a actividade celular através de TLR8. Os agonistas selectivos para TLR7 incluem os apresentados na publicação de patente U.S. 2004/0171086. Tais compostos agonistas selectivos TLR7 incluem N<sup>1</sup>-{4-[4-amino-2-(2-metoxietil)-6,7,8,9-tetra-hidro-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]butil}-4-fluoro-1-benzenossulfonamida, N<sup>1</sup>-[4-(4-amino-2-(2-metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butil]-4-fluoro-1-benzenossulfonamida, N-[4-(4-amino-2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butil]metanossulfonamida, N-{3-[4-amino-2-(2-metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]-2,2-dimetilpropil}benzamida, N-(2-{2-[4-amino-2-(2-metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]etoxy}etil)-N-metilmetanossulfonamida, N-(2-{2-[4-amino-2-(2-metoxietil)-

6,7,8,9-tetra-hidro-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]etoxi}etil)benzamida, N-[4-(4-amino-2-metil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butil)ciclopantanocarboxamida, 1-[4-(1,1-dioxidoisotiazolidin-2-il)butil]-2-(2-metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, 2-metil-1-[5-metilsulfonil)pentil-6,7,8,9-tetra-hidro-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, N-{2-[4-amino-2-(etoximetil)-6,7-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il]-1,1-dimetiletil}-N-ciclohexilureia, N-[2-(4-amino-2-etil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)-1,1-dimetiletil]benzamida, N-[3-(4-amino-2-butil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)-2,2-dimetilpropil]metanossulfonamida, 1-[6-(metanossulfonil)hexil]-6,7-dimetil-2-propil-1H-imidazo[4,5-c]piridin-4-amina, 6-(6-amino-2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)-N-metoxi-N-metil-hexamida, 1-[2,2-dimetil-3-(metilsulfonil)propil]-2-(etoximetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, N-[4-(4-amino-2-metil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butil]-N-metil-N-fenilureia, 1-{3-[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-8-il]fenil}etanona, 7-(4-amino-2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)-2-metilheptan-2-ol, N-metil-4-(4-amino-2-etil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butano-1-sulfonamida, N-(4-metoxibenzil)-4-(4-amino-2-etil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butano-1-sulfonamida, N-{2-[4-amino-3-(etoximetil)-6,7-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il]-1,1-dimetiletil}metanossulfonamida, 2-etoximetil-1-(3-metoxipropil)-7-(5-hidroximetilpiridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, 1-[(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil]-2-(etoximetil)-7-(piridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, éster etílico do ácido 4-[3-(4-amino-6,7-dimetil-2-propil-1H-imitizo[4,5-c]piridin-1-il)propano-1-sulfonil]benzóico, 2-butil-1-{2-[2-(metilsulfonil)etoxi]etil}-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, N-(2-{4-amino-2-etoximetil-7-[6-(metanossulfonilamino)hexiloxi]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il}-1,1-dimetiletil)metanossulfonamida, N-(6-{[4-amino-2-etoximetil-1-(2-metanossulfonilamino-2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-7-il]oxi}hexil)acetamida, 1-[4-(1,1-dioxidoisotiazolidin-2-il)butil]-2-etoximetil-7-(piridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, 1-[4-(1,1-dioxidoisotiazolidin-2-il)butil]-2-etoximetil-7-(piridin-4-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, 1-[4-(1,1-dioxidoisotiazolidin-2-il)butil]-2-etoximetil-7-fenil-1H-

imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, 2-(etoximetil)-1-[1-(metilsulfonil)piperidin-4-il]metil}-7-(piridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, 2-(etoximetil)-1-[1-isobutirilpiperidin-4-il]metil]-7-(piridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, 2-(etoximetil)-1-[1-(morfolic-4-ilcarbonil)piperidin-4-il]metil}-7-(piridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, ácido ciclopropanocarboxílico [3-(4-amino-2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)propoxi]amida, éster do ácido isopropilcarbâmico 4-amino-2-(2-metoxietil)-1-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-7-il, etil 4-(4-amino-2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butirato, 1-[4-amino-2-etil-7-(piridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]-2-metilpropan-2-ol, 1-(4-amino-2-etil-7-[5-{hidroximetil}piridin-3-il]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)-2-metilpropan-2-ol, 1-(3-[4-amino-2-(2-metoxietil)-8-(piridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]propil]pirolidin-2-ona, N-(2-{4-amino-2-etoximetil-7-[6-(metanossulfonilamino)hexiloxi]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il}-1,1-dimetiletيل)acetamida, 1-{3-[4-amino-7-(3-hidroximetilfenil)-2-(2-metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]propil}pirrolidin-2-ona, N-{4-[4-amino-2-etoximetil-7-(piridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]butil}-N'-propilureia, N-{4-[4-amino-2-etoximetil-7-(piridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]butil}butiramida, 5-(4-amino-2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)-4,4-dimetilpentan-2-ona, 1-ciclo-hexilmetil-2-etoximetil-7-(5-hidroximetilpiridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, N,N-dimetil-5-(4-amino-2-etoximetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)pentano-1-sulfonamida, N-{3-[4-amino-2-etoximetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]amino}propil}metanossulfonamida e/ou N,N-dimetil-4-(4-amino-2-etoximetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butano-1-sulfonamida.

Agonistas selectivos TLR7 adequados adicionais incluem, 2-(etoximetil)-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina (patente U.S. 5 389 640); 2-metil-1-[2-(3-piridin-3-ilpropoxi)etil]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina (WO 02/46193); N-(2-{2-[4-amino-2-(2-metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]etoxi}etil)-N-metilciclo-hexanocarboxamida (publicação de patente U.S. 2004/0171086); 1-[2-(benziloxi)etil]-2-metil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina (WO

02/46189); N-[8-[4-amino-2-(2-metioxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]octil]-N-fenilureia (publicação de patente U.S. 2004/0171086 (IRM5)); 2-butil-1-[5-(metilsulfonil)pentil]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina (WO 02/46192); N-[3-[4-amino-2-(2-metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]propil]-4-metilbenzenossulfonamida (patente U.S. 6 331 539); e N-[4-(4-amino-2-etil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butil]ciclo-hexanocarboxamida (publicação de patente U.S. 2004/0171086 (IRM8)), não se lhes limitando. Também é adequado para utilização o agonista selectivo de TLR7 N-[4-(4-amino-2-etil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butil]metanossulfonamida (Gorden *et al.*, 2005).

**Agonistas TLR8.** Os agonistas TLR8 adequados incluem agonistas TLR8 isolados de ocorrência natural; e agonistas TLR8 sintéticos. Os agonistas TLR8 isolados de uma fonte de ocorrência natural de agonista TLR8 são geralmente purificados, e.g., o agonista TLR8 purificado é pelo menos cerca de 80% puro, pelo menos cerca de 90% puro, pelo menos cerca de 95% puro, pelo menos cerca de 98% puro, pelo menos cerca de 99% puro ou mais de 99% puro. Preparam-se agonistas TLR8 sintéticos por métodos padrão e são geralmente pelo menos cerca de 80% puros, pelo menos cerca de 90% puros, pelo menos cerca de 95% puros, pelo menos cerca de 98% puros, pelo menos cerca de 99% puros ou mais de 99% puros.

Os agonistas TLR8 incluem agonistas TLR8 que não estão ligados a qualquer outro composto. Os agonistas TLR8 incluem agonistas TLR8 que estão ligados, covalentemente ou não covalentemente, a um segundo composto. Em algumas concretizações liga-se um agonista TLR8 directamente a outro composto. Noutras concretizações liga-se um agonista TLR8 a outro composto através de um ligante.

Os agonistas TLR8 incluem compostos tais como R-848 e seus derivados e análogos, não se lhes limitando. Os agonistas TLR8 adequados incluem compostos com 2-aminopiridina fundida a um anel heterocíclico de cinco membros contendo azoto. Tais compostos incluem, por exemplo, aminas de imidazoquinolina incluindo aminas de imidazoquinolina substituídas tal como, por exemplo, aminas de imidazoquinolina substituídas com amida, aminas de imidazoquinolina substituídas com

sulfonamida, aminas de imidazoquinolina substituídas com ureia, aminas de imidazoquinolina substituídas com éter arílico, aminas de imidazoquinolina substituídas com éter heterocíclico, aminas de imidazoquinolina substituídas com amidoéter, aminas de imidazoquinolina substituídas com sulfonamidoéter, éteres de imidazoquinolina substituídas com ureia, aminas de imidazoquinolina substituídas com tioéter e aminas de imidazoquinolina substituídas com 6-arilo, 7-arilo, 8-arilo ou 9-arilo ou heteroarilo, não se lhes limitando; aminas de tetra-hidroimidazoquinolina incluindo aminas de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas com amida, aminas de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas com sulfonamida, aminas de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas com ureia, aminas de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas com ariléter, aminas de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas com éter heterocíclico, aminas de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas com amidoéter, aminas de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas com sulfonamidoéter, éteres de tetra-hidroimidazoquinolina substituídos com ureia e aminas de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas com tioéter, não se lhes limitando; aminas de imidazopiridina incluindo aminas de imidazopiridina substituídas com amida, aminas de imidazopiridina substituídas com sulfonamida, aminas de imidazopiridina substituídas com ureia, aminas de imidazopiridina substituídas com ariléter, aminas de imidazopiridina substituídas com éter heterocíclico, aminas de imidazopiridina substituídas com amidoéter, aminas de imidazopiridina substituídas com sulfonamidoéter, éteres de imidazopiridina substituídos com ureia e aminas de imidazopiridina substituídas com tioéter; aminas de imidazoquinolina com ponte em 1,2; aminas de cicloalquilimidazopiridina fundidas em 6,7; aminas de imidazonaftiridina; aminas de tetra-hidroimidazonaftiridina; aminas de oxazoloquinolina; aminas de tiazoloquinolina; aminas de oxazolopiridina; aminas de tiazolopiridina; aminas de oxazolonaftiridina; aminas de tiazolonaftiridina; e dímeros de 1H-imidazo fundidos a aminas de piridina, aminas de quinolina, aminas de tetra-hidroquinolina, aminas de naftiridina ou aminas de tetra-hidronaftiridina, não se lhes limitando.

Numa concretização particular, o agonista TLR8 é uma amina de imidazoquinolina substituída com amida. Numa concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de imidazoquinolina substituída com sulfonamida. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de imidazoquinolina substituída com ureia. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de imidazoquinolina substituída com ariléter. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de imidazoquinolina substituída com éter heterocíclico. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de imidazoquinolina substituída com amidoéter. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de imidazoquinolina substituída com sulfonamidoéter. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é um éter de imidazoquinolina substituído com ureia. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de imidazoquinolina substituída com tioéter. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de imidazoquinolina substituída com 6-arilo, 7-arilo, 8-arilo ou 9-arilo ou heteroarilo.

Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de tetra-hidroimidazoquinolina substituída com amida. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de tetra-hidroimidazoquinolina substituída com sulfonamida. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de tetra-hidroimidazoquinolina substituída com ureia.

Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de tetra-hidroimidazoquinolina substituída com ariléter. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de tetra-hidroimidazoquinolina substituída com éter heterocíclico. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de tetra-hidroimidazoquinolina substituída com amidoéter. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de tetra-hidroimidazoquinolina substituída com sulfonamidoéter. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é um éter de tetra-hidroimidazoquinolina substituído com ureia. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de tetra-hidroimidazoquinolina substituída com tioéter.

Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de imidazopiridina substituída com amida. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de imidazopiridina substituída com sulfonamida. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de imidazopiridina substituída com ureia. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de imidazopiridina substituída com ariléter. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de imidazopiridina substituída com éter heterocíclico. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de imidazopiridina substituída com amidoéter. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de imidazopiridina substituída com sulfonamidoéter. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é um éter imidazopiridina substituído com ureia. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de imidazopiridina substituída com tioéter.

Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de imidazopiridina com ponte em 1,2. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de cicloalquilimidazopiridina fundida em 6,7.

Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de imidazonaftiridina. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de tetra-hidroimidazonaftiridina. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de oxazoloquinolina. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de tiazoloquinolina. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de oxazolopiridina. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de tiazolopiridina. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de oxazolonaftiridina. Noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é uma amina de tiazolonaftiridina.

Ainda noutra concretização alternativa, o agonista TLR8 é um de mero de 1H-imidazo fundido com uma amina de piridina, amina de quinolina, amina de tetra-hidroquinolina, amina de naftiridina ou uma amina de tetra-hidronaftiridina.

Em algumas concretizações, o agonista TLR8 é um agonista TLR8 selectivo, e.g., o agonista modula a actividade celular através de TLR8, mas não modula a actividade celular através de TLR7. Os agonistas selectivos de TLR8 incluem os da publicação de patente U.S. 2004/0171086. Tais compostos agonistas TLR8 selectivos incluem os compostos apresentados na publicação de patente U.S. Nº 2004/0171086 que inclui N-[4-amino-2-(2-metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]butil}quinolin-3-carboxamida, N-[4-[4-amino-2-(2-metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]butil}quinoxolina-2-carboxamida e N-[4-(4-amino-2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butil]morfolina-4-carboxamida, não se lhes limitando.

Outros agonistas selectivos TLR8 adequados incluem, 2-propiltiazolo[4,5-c]quinolin-4-amina (patente U.S. 6 110 929); N<sup>1</sup>-[2-(4-amino-2-butil-1H-imidazo[4,5-c][1,5]naftiridin-1-il)etil]-2-amino-4-metilpentanamida (patente U.S. 6 194 425); N<sup>1</sup>-[4-(4-amino-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butil]-2-fenoxiben zamida (patente U.S. 6 451 810); N<sup>1</sup>-[2-(4-amino-2-butil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)etil]-1-propanossulfonamida (patente U.S. 6 331 539); N-[2-[2-(4-amino-2-etil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)etiloxi]etil]-N' -fenilureia (publicação de patente U.S. 2004/0171086); 1-{4-[3,5-diclorofenil]tio}butil}-2-etil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina (publicação de patente U.S. 2004/0171086); N-[2-[4-amino-2-(etoximetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]etil ]-N' -(3-cianofenil)ureia (WO 00/76518 e publicação de patente U.S. nº 2004/0171086); e 4-amino-, -dimetil-2-metoxietil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-1-etanol (patente U.S. 5 389 640), não se lhes limitando. Incluem-se para uso como agonistas TLR8 selectivos, os compostos da publicação de patente U.S. nº 2004/0171086. Também adequado para uso é o composto 2-propiltiazolo-4,5-c]quinolin-4-amina (Gorden et al., 2005 anteriormente).

**Agonistas TLR9.** Os agonistas TLR9 adequados incluem agonistas TLR9 isolados de ocorrência natural; e agonistas TLR9 sintéticos. Os agonistas TLR9 isolados de uma fonte de ocorrência natural de agonista TLR9 são geralmente purificados, e.g., o agonista TLR9 purificado é pelo menos cerca de 80% puro, pelo menos cerca de 90% puro, pelo menos

cerca de 95% puro, pelo menos cerca de 98% puro, pelo menos cerca de 99% puro ou mais de 99% puro. Preparam-se agonistas TLR9 sintéticos por métodos padrão e são geralmente pelo menos cerca de 80% puros, pelo menos cerca de 90% puros, pelo menos cerca de 95% puros, pelo menos cerca de 98% puros, pelo menos cerca de 99% puros ou mais de 99% puros.

Os agonistas TLR9 incluem agonistas TLR9 que não estão ligados a qualquer outro composto. Os agonistas TLR9 incluem agonistas TLR9 que estão ligados, covalentemente ou não covalentemente, a um segundo composto. Em algumas concretizações liga-se um agonista TLR9 directamente a outro composto. Noutras concretizações liga-se um agonista TLR9 a outro composto através de um ligante.

Os exemplos de agonistas TLR9 (também aqui denominados "ligandos TLR9") incluem ácidos nucleicos compreendendo a sequência 5' -CG-3' (um "ácido nucleico CpG"), em determinados aspectos C não é metilado. As expressões "polinucleótido" e "ácido nucleico" tal como aqui usadas indiferentemente no contexto de moléculas de ligando TLR9, referem-se a um polinucleótido de qualquer comprimento e abrangem, entre outros, oligonucleótidos em cadeia simples e em cadeia dupla (incluindo desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos ou ambos), oligonucleótidos modificados e oligonucleósidos, sozinhos ou como parte de uma construção maior de ácido nucleico ou como parte de um conjugado com uma molécula que não seja de ácido nucleico tal como um polipeptídeo. Assim, um ligando TLR9 pode ser, por exemplo, ADN em cadeia simples (ADNss), ADN em cadeia dupla (ADNd), ARN em cadeia simples (ARNss) ou ARN em cadeia dupla (ARNd). Os ligandos TLR9 também abrangem ARN ou ADN bacterianos impuros e desintoxicados (e.g., de micobactérias), assim como plasmídeos enriquecidos, enriquecidos no ligando TLR9. Em algumas concretizações, um "plasmídeo enriquecido em ligando TLR9" refere-se a um plasmídeo linear ou circular que comprehende ou é concebido racionalmente para compreender, um maior número de motivos CpG do que o normalmente encontrado em ADN de mamífero.

Descrevem-se exemplos não limitativos de plasmídeos enriquecidos em ligando TLR9 em Roman et al. (1997). As modificações de oligonucleótidos incluem modificações do grupo

3' OH ou 5' OH, modificações da base de nucleótido, modificações da componente de açúcar e modificações do grupo fosfato, não se lhes limitando.

Um ligando TLR9 pode compreender pelo menos um nucleósido compreendendo um L-açúcar. O L-açúcar pode ser desoxirribose, ribose, pentose, desoxipentose, hexose, desoxi-hexose, glucose, galactose, arabinose, xilose, lixose ou um grupo ciclopentilo de "análogo" de açúcar. O L-açúcar pode estar na forma piranosilo ou furanosilo.

Os ligandos TLR9 geralmente não proporcionam, nem há qualquer requisito para que proporcionem, expressão de qualquer sequência de aminoácidos codificada pelo polinucleótido e assim a sequência de um ligando TLR9 pode ser não codificante e geralmente é não codificante. Os ligandos TLR9 podem compreender uma molécula linear em cadeia dupla ou em cadeia simples, uma molécula circular ou podem compreender tanto segmentos lineares como circulares. Os ligandos TLR9 podem ser em cadeia simples ou podem ser completa ou parcialmente em cadeia dupla.

Em algumas concretizações um ligando TLR9 para uso num método objecto é um oligonucleótido, e.g., consiste de uma sequência desde cerca de 5 nucleótidos a cerca de 200 nucleótidos, desde cerca de 10 nucleótidos a cerca de 100 nucleótidos, desde cerca de 12 nucleótidos a cerca de 50 nucleótidos, desde cerca de 15 nucleótidos a cerca de 25 nucleótidos, desde 20 nucleótidos a cerca de 30 nucleótidos, desde cerca de 5 nucleótidos a cerca de 15 nucleótidos, desde cerca de 5 nucleótidos a cerca de 10 nucleótidos ou desde cerca de 5 nucleótidos a cerca de 7 nucleótidos de comprimento. Em algumas concretizações, um ligando TLR9 que tem menos de cerca de 15 nucleótidos, menos de cerca de 12 nucleótidos, menos de cerca de 10 nucleótidos ou menos de cerca de 8 nucleótidos de comprimento está associado a uma molécula maior.

Em algumas concretizações um ligando TLR9 não proporciona expressão de um péptido ou polipéptido numa célula eucariótica, e.g., a introdução de um ligando TLR9 numa célula eucariótica não resulta na produção de um péptido ou

polipéptido porque o ligando TLR9 não proporciona transcrição de um ARNm que codifica um péptido ou polipéptido. Nestas concretizações, um ligando TLR9 não apresenta regiões de promotor e outros elementos de controlo necessários para transcrição numa célula eucariótica.

Pode isolar-se um ligando TLR9 a partir de uma bactéria, e.g., separada de uma fonte bacteriana; produzido por métodos sintéticos (e.g., produzido por métodos padrão para síntese química de polinucleótidos); produzido por métodos recombinantes padrão, seguidamente isolado a partir de uma fonte bacteriana; ou uma combinação dos anteriores. Em muitas concretizações, o ligando TLR9 é purificado, e.g., é pelo menos cerca de 80% puro, pelo menos cerca de 90% puro, pelo menos cerca de 95% puro, pelo menos cerca de 98% puro, pelo menos cerca de 99% puro ou mais, e.g., 99,5%, 99,9% puro ou mais. Em muitas concretizações, o ligando TLR9 é sintetizado quimicamente e seguidamente purificado.

Em outras concretizações, um ligando TLR9 é parte de uma construção de nucleótidos maiores (e.g., um vector de plasmídeo, um vector vírico ou outra de tais construções). É conhecida na especialidade uma vasta variedade de vectores plasmídicos e víricos e não é necessário aqui elaborar sobre o assunto. Tem sido descrito um grande número de tais vectores em várias publicações, incluindo, e.g., Current Protocols in Molecular Biology, (1987 e actualizações).

De um modo geral, um ligando TLR9 usado numa composição objecto comprehende pelo menos um motivo CpG não metilado. A posição relativa de qualquer sequência CpG num polinucleótido em determinadas espécies de mamíferos (e.g., roedores) é 5' - CG-3' i.e., a C está na posição 5' relativamente a G na posição 3' ).

Em algumas concretizações, um ligando TLR9 comprehende uma sequência nuclear palindrómica central comprehendendo pelo menos uma sequência CpG, em que a sequência nuclear palindrómica central contém um esqueleto fosfodiéster e em que a sequência nuclear palindrómica central é flanqueada de um ou de ambos os lados por sequências de poliguanosina contendo um esqueleto fosforotiolato.

Noutras concretizações, um ligando TLR9 compreende uma ou mais sequências TCG no terminal 5' do ácido nucleico ou perto deste; e pelo menos dois dinucleótidos CG adicionais. Em algumas destas concretizações, os pelo menos dois dinucleótidos CG adicionais estão espaçados entre si por três nucleótidos, dois nucleótidos ou um nucleótido. Em algumas destas concretizações, os pelo menos dois dinucleótidos CG adicionais são contíguos entre si. Em algumas destas concretizações, o ligando TLR9 compreende (TCG)<sub>n</sub>, em que n = 1 a 3 no terminal 5' do ácido nucleico. Noutras concretizações, o ligando TLR9 compreende (TCG)<sub>n</sub>, em que n = 1 a 3 e em que a sequência (TCG)<sub>n</sub> está flanqueada por um nucleótido, dois nucleótidos, três nucleótidos, quatro nucleótidos ou cinco nucleótidos na extremidade 5' da sequência (TCG)<sub>n</sub>.

Os exemplos de motivos CpG consensuais de ligandos TLR9 úteis no invento incluem: 5' -Purina-Purina-(C)-(G)-Pirimidina-Pirimidina-3' , em que o ligando TLR9 compreende um motivo CpG flanqueado por pelo menos dois nucleótidos purina (e.g., GG, GA, AG, AA, II, etc.) e pelo menos dois nucleótidos pirimidina (CC, TT, CT, TC, UU, etc.); 5' -Purina-TCG-Pirimidina-Pirimidina-3' ; 5' -TCG-N-N-3' ; em que N é qualquer base; 5' -Nx(CG)nNy, em que N é qualquer base, em que x e y são independentemente qualquer número inteiro desde 0 a 200, e.g., 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11-15, 16-20, 21-25, 25-30, 30-50, 50-75, 75-100, 100-150 ou 150-200; e n é qualquer número inteiro que é 1 ou superior, e.g., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou superior. 5' -Nx(TCG)nNy, em que N é qualquer base, em que x e y são independentemente qualquer número inteiro desde 0 a 200, e.g., 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11-15, 16-20, 21-25, 25-30, 30-50, 50-75, 75-100, 100-150 ou 150-200; e n é qualquer número inteiro que é 1 ou superior, e.g., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou superior. 5' -(TCG)n-3' , em que n é qualquer número inteiro que é 1 ou superior, e.g., para proporcionar um ligando TLR9 baseado em TCG (e.g., em que n=3, o polinucleótido compreende a sequência 5' -TCGNNTCGNNTCG-3' ; SEQ ID NO:3); 5' Nm-(TCG)n-Np-3' , em que N é qualquer nucleótido, em que m é zero, um, dois ou três, em que n é qualquer número inteiro que é 1 ou superior e em que p é um, dois, três ou quatro; 5' Nm-(TCG)n-Np-3' , em que N é qualquer nucleótido, em que m é zero a 5 e em que n é qualquer

número inteiro que é 1 ou superior, em que p é quatro ou superior e em que a sequência N-N-N-N compreende pelo menos dois dinucleótidos CG que são contíguos entre si ou estão separados por um nucleótido, dois nucleótidos ou três nucleótidos; e 5' -Purina-Purina-CG-Pirimidina-TCG-3' , não se lhes limitando necessariamente.

Nos casos em que um ligando TLR9 de ácido nucleico compreende uma sequência com a fórmula: 5' -Nm-(TCG)n-Np-3' , em que N é qualquer nucleótido, em que m é zero a 5 e em que n é qualquer número inteiro que é 1 ou superior, em que p é quatro ou superior e em que a sequência N-N-N-N compreende pelo menos dois dinucleótidos CG que são contíguos entre si ou estão separados por um nucleótido, dois nucleótidos ou três nucleótidos, os exemplos de ligandos TLR9 úteis no invento incluem: (1) uma sequência com a fórmula em que n=2 e Np é NNCGNNCG; (2) uma sequência com a fórmula em que n=2 e Np é AACGTTCG; (3) uma sequência com a fórmula em que n=2 e Np é TTTCGAACG; (4) uma sequência com a fórmula em que n=2 e Np é TACGTACG; (5) uma sequência com a fórmula em que n=2 e Np é ATCGATCG; (6) uma sequência com a fórmula em que n=2 e Np é CGCGCGCG; (7) uma sequência com a fórmula em que n=2 e Np é GCCGGCCG; (8) uma sequência com a fórmula em que n=2 e Np é CCCGGGCG; (9) uma sequência com a fórmula em que n=2 e Np é GGCGCCCG; (10) uma sequência com a fórmula em que n=2 e Np é CCCGTTCG; (11) uma sequência com a fórmula em que n=2 e Np é GGCGTTCG; (12) uma sequência com a fórmula em que n=2 e Np é TTCGCCCG; (13) uma sequência com a fórmula em que n=2 e Np é TTCGGGCG; (14) uma sequência com a fórmula em que n=2 e Np é AACGCCCG; (15) uma sequência com a fórmula em que n=2 e Np é AACGGGCG; (16) uma sequência com a fórmula em que n=2 e Np é CCCGAACG; e (17) uma sequência com a fórmula em que n=2 e Np é GGCGAACG; e em que, em qualquer de 1-17, m=zero, um, dois ou três, não se lhes limitando necessariamente.

Nos casos em que um ligando TLR9 de ácido nucleico compreende uma sequência com a fórmula: 5' Nm-(TCG)n-Np-3' , em que N é qualquer nucleótido, em que m é zero, um, dois ou três, em que n é qualquer número inteiro que é 1 ou superior e em que p é um, dois, três ou quatro, os exemplos de ligandos TLR9 úteis no invento incluem: (1) uma sequência com a fórmula em que m=zero, n=1 e Np é T-T-T; (2) uma sequência com a

fórmula em que m=zero, n=1 e Np é T-T-T-T; (3) uma sequência com a fórmula em que m=zero, n=1 e Np é C-C-C-C; (4) uma sequência com a fórmula em que m=zero, n=1 e Np é A-A-A-A; (5) uma sequência com a fórmula em que m=zero, n=1 e Np é A-G-A-T; (6) uma sequência com a fórmula em que Nm é T, n=1 e Np é T-T-T; (7) uma sequência com a fórmula em que Nm é A, n=1 e Np é T-T-T; (8) uma sequência com a fórmula em que Nm é C, n=1 e Np é T-T-T; (9) uma sequência com a fórmula em que Nm é G, n=1 e Np é T-T-T; (10) uma sequência com a fórmula em que Nm é T, n=1 e Np é A-T-T; (11) uma sequência com a fórmula em que Nm é A, n=1 e Np é A-T-T; e (12) uma sequência com a fórmula em que Nm é C, n=1 e Np é A-T-T, não se lhes limitando necessariamente.

A estrutura nuclear de um ligando TLR9 útil no invento pode estar flanqueada a montante e/ou a jusante por um qualquer número ou composição de nucleótidos ou nucleósidos. Em algumas concretizações, a sequência nuclear de um ligando TLR9 tem pelo menos 6 bases ou 8 bases de comprimento e o ligando TLR9 completo (sequências nucleares mais sequências flanqueadoras 5', 3' ou ambas) tem habitualmente entre 6 bases ou 8 bases e até cerca de 200 bases de comprimento.

Os ligandos TLR9 baseados em ADN úteis no invento incluem polinucleótidos compreendendo uma ou mais das seguintes sequências de nucleótidos: AGCGCT, AGCGCC, AGCGTT, AGCGTC, AACGCT, AACGCC, AACGTT, AACGTC, GGCCT, GGCGCC, GGCGTT, GGCGTC, GACGCT, GACGCC, GACGTT, GACGTC, GTCGTC, GTCGCT, GTCGTT, GTCGCC, ATCGTC, ATCGCT, ATCGTT, ATCGCC, TCGTCG e TCGTCGTCG, não se lhes limitando necessariamente.

Os ligandos TLR9 adicionais úteis no invento incluem, polinucleótidos compreendendo uma ou mais das seguintes sequências de nucleótidos: TCGXXXX, TCGAXXX, XTCGXXX, XTCGAXX, TCGTCGA, TCGACGT, TCGAACG, TCGAGAT, TCGACTC, TCGAGCG, TCGATT, TCGCTT, TCGGTT, TCGTTT, TCGTCGT, ATCGATT, TTCGTT, TTTCGATT, ACGTCG, AACGTTC, TGACGTT, TGTGCGTT, TCGXXX, TCGAXX, TCGTCG, AACGTT, ATCGAT, GTCGTT, GACGTT, TCGXX, TCGAX, TCGAT, TCGTT, TCGTC, TCGA, TCGT, TCGX e TCG (em que "X" é qualquer nucleótido), não se lhes limitando necessariamente.

Os ligandos TLR9 baseados em ADN úteis no invento incluem polinucleótidos compreendendo as seguintes sequências de nucleótido octaméricas: AGCGCTCG, AGCGCCCG, AGCGTTCG, AGCGTCCG, AACGCTCG, AACGCCCG, AACGTTCG, AACGTCCG, GGCGCTCG, GGCGCCCG, GGCGTTCG, GGCGTCCG, GACGCTCG, GACGCCCG, GACGTTCG e GACGTCCG, não se lhes limitando necessariamente.

Um ligando TLR9 útil para levar a cabo um método objecto pode compreender um ou mais de qualquer dos motivos CpG anteriores. Por exemplo, um ligando TLR9 útil no invento pode compreender uma ocorrência ou múltiplas ocorrências (e.g., 2, 3, 4, 5 ou mais) do mesmo motivo CpG. Alternativamente, um ligando TLR9 pode compreender múltiplos motivos CpG (e.g., 2, 3, 4, 5 ou mais) em que pelo menos dois dos múltiplos motivos CpG têm diferentes sequências consensuais ou em que todos os motivos CpG no ligando TLR9 têm diferentes sequências consensuais.

Um ligando TLR9 útil no invento pode incluir ou não regiões de palindroma. Caso estejam presentes, um palindroma pode estender-se apenas a um motivo CpG, caso esteja presente, na sequência nuclear hexamérica ou octamérica ou pode abranger mais da sequência hexamérica ou octamérica assim como sequências de nucleótido flanqueadoras.

**Ligandos TLR9 multiméricos.** Em algumas concretizações um ligando TLR9 é multimérico. Um ligando TLR9 multimérico compreende dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais ligandos TLR9 de ácido nucleico individuais (monoméricos), tal como descrito anteriormente, ligados através de ligações não covalentes, ligado através de ligações covalentes e quer ligado directamente entre si, quer ligado através de um ou mais espaçadores. Os espaçadores adequados incluem moléculas de ácido nucleico e moléculas que não são de ácido nucleico, desde que sejam biocompatíveis. Em algumas concretizações o ligando TLR9 multimérico compreende uma matriz linear de ligandos TLR9 monoméricos. Noutras concretizações um ligando TLR9 multimérico é uma matriz ramificada ou dendrimérica de ligandos TLR9 monoméricos.

Em algumas concretizações, um ligando TLR9 multimérico tem a estrutura geral  $(X_1)_n(X_2)_n$  em que X é um ligando TLR9 de

ácido nucleico tal como descrito anteriormente e com um comprimento de desde cerca de 6 nucleótidos a cerca de 200 nucleótidos, e.g., desde cerca de 6 nucleótidos a cerca de 8 nucleótidos, desde cerca de 8 nucleótidos a cerca de 10 nucleótidos, desde cerca de 10 nucleótidos a cerca de 12 nucleótidos, desde cerca de 12 nucleótidos a cerca de 15 nucleótidos, desde cerca de 15 nucleótidos a cerca de 20 nucleótidos, desde cerca de 20 nucleótidos a cerca de 25 nucleótidos, desde cerca de 25 nucleótidos a cerca de 30 nucleótidos, desde cerca de 30 nucleótidos a cerca de 40 nucleótidos, desde cerca de 40 nucleótidos a cerca de 50 nucleótidos, desde cerca de 50 nucleótidos a cerca de 60 nucleótidos, desde cerca de 60 nucleótidos a cerca de 70 nucleótidos, desde cerca de 70 nucleótidos a cerca de 80 nucleótidos, desde cerca de 80 nucleótidos a cerca de 90 nucleótidos, desde cerca de 90 nucleótidos a cerca de 100 nucleótidos, desde cerca de 100 nucleótidos a cerca de 125 nucleótidos, desde cerca de 125 nucleótidos a cerca de 150 nucleótidos, desde cerca de 150 nucleótidos a cerca de 175 nucleótidos ou desde cerca de 175 nucleótidos a cerca de 200 nucleótidos; e em que n é qualquer número desde um a cerca de 100, e.g., n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 desde 10 a cerca de 15, desde 15 a cerca de 20, desde 20 a cerca de 25, desde 25 a cerca de 30, desde 30 a cerca de 40, desde 40 a cerca de 50, desde 50 a cerca de 60, desde 60 a cerca de 70, desde 70 a cerca de 80, desde 80 a cerca de 90 ou desde 90 a cerca de 100. Nestas concretizações, X e X<sub>2</sub> diferem na sequência de nucleótidos entre si em pelo menos um nucleótido e podem diferir na sequências de nucleótidos entre si por dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais bases.

Tal como referido anteriormente, em algumas concretizações, um ligando TLR9 multimérico objecto compreende um ligando TLR9 separado de um ligando TLR9 adjacente por um espaçador. Em algumas concretizações um espaçador é um ácido nucleico que não é de TLR9. Noutras concretizações um espaçador é uma parte que não é de ácido nucleico. Os espaçadores adequados incluem os descritos na publicação de patente U.S. 20030225016. Um ligando TLR9 é multimerizado usando qualquer método conhecido.

**Modificações de ligando TLR9.** Um ligando TLR9 adequado para uso numa composição objecto pode ser modificado de várias formas. Por exemplo, um ligando TLR9 pode compreender modificações do grupo fosfato do esqueleto (e.g., ligações internucleótido metilfosfonato, fosforotiolato, fosforoamidato e fosforoditiolato), cujas modificações podem, por exemplo, aumentar a sua estabilidade *in vivo*, tornando-as particularmente úteis em aplicações terapêuticas. Uma modificação de grupo fosfato particularmente útil é a conversão às formas fosforotiolato ou fosforoditiolato de um ligando TLR9 de ácido nucleico. Os fosforotiolatos e fosforoditiolatos são mais resistentes a degradação *in vivo* do que as suas congéneres de oligonucleótido não modificado, aumentando as semividas dos ligandos TLR9 e tornando-os mais disponíveis para o indivíduo a ser tratado.

Outros ligandos TLR9 modificados abrangidos pelo presente invento incluem ligandos TLR9 com modificações na extremidade 5', na extremidade 3' ou em ambas as extremidades 5' e 3'. Por exemplo, a extremidade 5' e/ou 3' pode ser associada covalentemente ou não covalentemente com uma molécula (seja ela ácido nucleico, diferente de ácido nucleico ou ambas) para, por exemplo, aumentar a biodisponibilidade do ligando TLR9, aumentar a eficácia de absorção quando pretendido, facilitar a entrega a células de interesse e semelhantes. As moléculas para conjugação com um ligando TLR9 incluem, colesterol, fosfolípidos, ácidos gordos, esteróis, oligossacáridos, polipéptidos (e.g., imunoglobulinas), péptidos, antigénios (e.g., péptidos, moléculas pequenas, etc.), moléculas de ácido nucleico lineares ou circulares (e.g., um plasmídeo), suportes insolúveis, polipéptidos terapêuticos e semelhantes, não se lhes limitando necessariamente. Os polipéptidos terapêuticos que são adequados para ligação a um agonista TLR9 incluem um factor de crescimento de células dendríticas (e.g., GM-CSF); uma citocina; um interferão (e.g., um IFN-, um IFN-, etc.); um antagonista TNF-; e semelhantes, não se lhes limitando.

Um ligando TLR9 é em algumas concretizações, ligado (e.g., conjugado, ligado covalentemente, associado não covalentemente ou adsorvido) a um suporte insolúvel. Um exemplo não

limitativo de um suporte insolúvel é poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo) catiónico.

São conhecidos na especialidade conjugados adicionais de ligando TLR9 e métodos para os produzir e descrevem-se em, por exemplo, WO 98/16427 e WO 98/55495. Assim, a expressão "ligando TLR9" inclui conjugados compreendendo um ligando TLR9 de ácido nucleico.

Pode conjugar-se um polipéptido, e.g., um polipéptido terapêutico, directa ou indirectamente, e.g., através de uma molécula ligante, a um ligando TLR9. Conhece-se na especialidade uma grande variedade de moléculas ligantes e podem ser usadas nos conjugados. A forma de ligação do péptido ao oligonucleótido pode ser através da cadeia lateral reactiva de um péptido ou do N terminal ou do C terminal de um péptido. A ligação do oligonucleótido ao péptido pode ser em qualquer dos terminais 3' ou 5' ou pode ser interna. Um ligante pode ser uma molécula orgânica, inorgânica ou semi-orgânica e ser um polímero de uma molécula orgânica, de uma molécula inorgânica ou um co-polímero compreendendo moléculas tanto inorgânicas como orgânicas.

Caso estejam presentes, as moléculas ligantes têm geralmente um comprimento suficiente para permitir oligonucleótidos e/ou polinucleótidos e um polipéptido ligado para permitir algum movimento de flexibilidade entre o oligonucleótido e o polipéptido. As moléculas ligantes têm geralmente um comprimento de cerca de 6-50 átomos. As moléculas ligantes podem também ser, por exemplo, arilacetíleno, oligómeros de etilenoglicol contendo 2-10 unidades de monómero, diaminas, diácidos, aminoácidos ou suas combinações. Outras moléculas de ligando que podem ligar oligonucleótidos podem usar-se no âmbito desta divulgação.

#### b. Agonista de receptor do tipo NOD (NLR)

Os receptores do tipo NOD (NLR) são proteínas citoplasmáticas que podem ter uma variedade de funções na regulação de respostas inflamatórias e apoptóticas. Aproximadamente 20 destas proteínas foram encontradas no genoma de mamífero e incluem duas subfamílias principais

denominadas NOD e NALP, o transactivador de MHC de classe II (CIITA) e algumas outras moléculas (e.g., IPAF e BIRC1). O conhecimento actual sugere que algumas destas proteínas reconhecem moléculas endógenas ou microbianas ou respostas ao stress e formam oligómeros que activam caspases inflamatórias (e.g., caspase 1) provocando clivagem e activação de citocinas inflamatórias importantes tal como IL-1 e/ou activar a via de sinalização NF- $\kappa$ B para induzir produção de moléculas inflamatórias. A família NLR é conhecida por diferentes designações, incluindo a família CATERPILLER (ou CLR) ou NOD-LRR.

São correntemente conhecidos ligandos para NOD1 e NOD2. NOD1 reconhece uma molécula denominada meso-DAP, que é um constituinte peptidoglicano apenas de bactérias Gram negativas. As proteínas NOD2 reconhecem MDP (muramildipéptido) intracelular, que é um constituinte peptidoglicano tanto de bactérias Gram positivas como de bactérias Gram negativas. As NOD transduzem sinais na via de NF- $\kappa$ B e MAP cinases atrás da cinase de serina-treonina denominada RIP2. As proteínas NOD têm essa designação por conterem um domínio de oligomerização de ligação de nucleótido que liga trifosfatos de nucleótido. As NOD sinalizam através de domínios CARD N-terminais para activar eventos de indução génica a jusante e interagir com moléculas microbianas através de uma região C-terminal de repetições ricas em leucina (LRR).

Tal como as NOD, as proteínas NALP contêm LRR no terminal C, que parece actuar como um domínio regulatório e podem estar envolvidas no reconhecimento de patogénios microbianos. Tal como as NOD, estas proteínas também contêm um local de ligação de nucleótido (NBS) para trifosfatos de nucleótido. A interacção com outras proteínas (e.g., a molécula adaptadora ASC) é mediada através do domínio pirina (PYD) N-terminal. Existem 14 membros desta subfamília em humanos (denominados NALP1 a NALP14). As mutações em NALP3 são responsáveis pelas doenças auto-inflamatórias da síndrome auto-inflamatória familiar por frio, síndrome de Muckle-Wells e doença inflamatória multissistémica de início neonatal. Os activadores de NALP3 incluem muramildipéptido, ADN bacteriano, ATP, toxinas, ARN em cadeia dupla, paramixovírus e cristais de ácido úrico.

Tem-se demonstrado que outras NLR tais como IPAF e NAIP5/Bircle activam caspase-1 em resposta a *Salmonella* e *Legionella*.

O agonista NLR inclui, GM-tripéptido (*Shigella flexneri*), mesolantionina (*Helicobacter pylori*), meso-DAP, -D-Glu-DAP (iEDAP) (*Escherichia coli* enteroinvadiva), D-lactil-L-ala- -Glu-meso-DAP-Gly (FK156)(*Pseudomonas*), Heptanolil- -Glu-meso-DAP-D-ala (FK565) (*Chlamydia*, *Listeria monocytogenes*), MDP (*Listeria monocytogenes*), MurNAC-L-Ala- -D-Glu-L-Lys (M-TRILys) (*Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella flexneri*), flagelina, ARN bacteriano, ATP, nigericina, maitotoxina, cristais de ácido úrico, aerolisina e toxina letal de Antraz, não se lhes limitando.

c. Agonista de receptor do tipo RIG (RLR)

Várias células no corpo são capazes de detectar vírus infecciosos e iniciar reacções colectivamente denominadas como respostas inatas antivíricas. Estas respostas incluem a produção de citocinas antivíricas tais como interferão (IFN) do tipo I e síntese subsequente de enzimas antivíricas, que são responsáveis pelo impedimento de replicação vírica e promoção de respostas imunitárias adaptativas. Os receptores do tipo RIG (gene indutível por ácido retinóico) detectam moléculas de ARN vírico que desencadeiam componentes do sistema imunitário inato. Os ligandos para RLR incluem, ARNss, ARNds, ácido poli-inosina-policitidílico ("poly(rI:rC)", um análogo sintético de ARN em cadeia dupla (ARNds) e outros ácidos nucleicos víricos - incluindo partes dos genomas de ARN vírico (e.g., vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus da estomatite vesicular (VSV), vírus influenza, vírus da Dengue, vírus do Nilo Ocidental, Reovírus e vírus da encefalomiocardite (EMCV)) - e seus análogos, não se lhes limitando. Um segmento ou análogo de ARN pode ter pelo menos 20, 25, 30, 35, 40 ou mais nucleótidos ou pares de nucleótidos ou o equivalente. Em determinados aspectos o ARN é um ARN 5' trifosfato.

d. Agonista do receptor de leucócitos do tipo imunoglobulina (LIR)

A clonagem de oito moléculas relacionadas com LIR-1 (consultar Fanger et al., 1999 e suas referências), com 63-84% de identidade de aminoácidos com LIR-1, estabeleceu uma nova família de imunorreceptores (LIR). Os LIR podem ser agrupados de acordo com a sua estrutura. Cinco dos LIR (1, 2, 3, 5 e 8) têm domínios citoplasmáticos contendo duas, três ou quatro sequências de imunorreceptores do tipo de motivos inibidores baseados em tirosina (ITIM). Apesar de dois dos motivos baseados em tirosina (motivos números 2 e 3; I/VxYxxL/V) corresponderem à sequência consensual ITIM original, alguns destes LIR contêm motivos baseados em tirosina com um resíduo de asparagina (motivo número 1; NxYxxL/V) ou um resíduo de serina (motivo número 4; SxYxxL/V) localizado dois aminoácidos a montante da tirosina. Contrariamente às LIR contendo ITIM, três das LIR (6a, 6b e 7) contêm regiões citoplasmáticas curtas e um resíduo de arginina carregado positivamente no domínio transmembranar.

Os membros da família LIR ligam moléculas de MHC de classe I. LIR-1 e LIR-2 reconhecem alelos HLA-A (A0101, A0301), HLA-B (B0702, B0802, B1501, B2702) e HLA-C (C0304) e a molécula não clássica de classe I, HLA-G1. A especificidade de ligação de LIR-1 e LIR-2, consequentemente, é distinta da ligação dos KIR, que reconhecem subconjuntos relativamente restritos de alelos de MHC de classe I assim como CD94/NKG2A. Esta última molécula reconhece HLA-E cujas cavidades de ligação estão ocupadas por péptidos derivados da sequência de sinalização de抗igénios de MHC de classe I específicos.

## **2. Componentes microbianas**

### a. EF2505

Em determinados aspectos, abrangem-se métodos de tratar, inibir ou atenuar uma infecção microbiana num indivíduo que tem tal infecção ou que está em risco de a desenvolver, compreendendo os métodos administrar uma quantidade eficaz de um péptido StIR, e.g. proteína EF2505 de *Enterococcus faecalis* (SEQ ID NO:1) ou um fragmento do seu derivado ao respectivo indivíduo. Tipicamente, o indivíduo foi exposto a um micrónio patogénico ou está em risco de tal exposição. Em

determinados aspectos o péptido StIR é um polipéptido ou péptido purificado ou isolado. A expressão "purificado" ou "isolado" significa que essa componente foi previamente isolada ou purificada de outras proteínas e que a componente é pelo menos cerca de 70, 75, 80, 90, 95, 97 ou 99% pura antes de ser formulada na composição. Em determinadas concretizações, a componente purificada ou isolada é cerca de, ou é pelo menos cerca de 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5% pura ou mais, ou qualquer gama derivada destas. Tal componente purificada pode ser então misturada com outras componentes para formar uma composição tal como aqui descrita.

Uma proteína StIR recombinante, e.g., EF2505 ou seu fragmento ou segmento ou seu análogo compreende pelo menos, no máximo ou cerca de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1500, 1600 ou 1651 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO:1, incluindo todos os valores e gamas entre estes. Em determinados aspectos, um seu fragmento ou análogo inclui pelo menos ou no máximo ou cerca da sequência de aminoácidos do aminoácido 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120 ao aminoácido 100, 150, 200, 250, 300, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 390, 395, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450 de SEQ ID NO:1, incluindo todos os valores e gamas entre estes. Num aspecto adicional, um fragmento de polipéptido ou seu análogo inclui uma sequência de aminoácidos compreendendo pelo menos, no máximo ou cerca dos aminoácidos 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ao aminoácido 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450 de SEQ ID NO:1, não se lhes limitando. Em determinados aspectos, um segmento de polipéptido ou seu fragmento ou análogo inclui uma sequência de aminoácidos compreendendo pelo menos ou no máximo ou cerca dos aminoácidos 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 250 ao aminoácido 440,

441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450 de SEQ ID NO:1, incluindo todos os valores e gamas entre estes, não se lhes limitando. Ainda num aspecto adicional, um fragmento de polipéptido ou seu análogo compreende uma sequência de aminoácidos compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100% idêntica ao aminoácido 28 a 449, 28 a 442, 111 a 449, 111 a 442, 223 a 449 ou 223 a 442 de SEQ ID NO:1, incluindo todos os valores e gamas entre estes. Os derivados ou variantes da proteína StIR ou seus segmentos incluem mutantes de inserção, deleção e mutantes pontuais. Uma mutação de inserção particular é uma proteína de fusão que compreende uma sequência de aminoácidos exógena à proteína EF2505 no terminal carboxilo ou amino.

Em determinados aspectos, a proteína StIR ou um fragmento ou um segmento ou um seu derivado é administrada numa formulação nebulizada ou em aerossol. A composição pode ser administrada por inalação ou inspiração. A StIR ou um seu fragmento de derivado pode ser administrada numa quantidade desde cerca de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 µg ou mg/kg a cerca de 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 200 µg ou mg/kg do peso corporal do indivíduo. Noutro aspecto, pode administrar-se a um indivíduo cerca de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 200 µg ou mg de polipéptido StIR ou seu péptido ou variante ou derivado ou análogo. Com base na divulgação que se segue, o perito nesta especialidade será capaz de determinar facilmente segmentos, fragmentos ou derivados de um polipéptido StIR, e.g., proteína EF2505 de *Enterococcus faecalis*. Num aspecto preferido, o fragmento, segmento ou derivado é pelo menos 75% idêntico a uma sequência de SEQ ID NO:1. Noutro aspecto, o fragmento, segmento ou derivado é pelo menos 80% idêntico a uma sequência de SEQ ID NO:1. Noutro aspecto, o fragmento, segmento ou derivado é pelo menos 85% idêntico a uma sequência de SEQ ID NO:1. Noutro aspecto, o fragmento, segmento ou derivado é pelo menos 90% idêntico a uma sequência de SEQ ID NO:1. Noutro aspecto, o fragmento, segmento ou derivado é pelo menos 95% idêntico a uma sequência de SEQ ID NO:1.

Ainda noutra concretização, a presente divulgação é dirigida a uma composição farmaceuticamente aceitável compreendendo um ou mais polipéptidos StIR (*e.g.*, proteína EF2505 de *Enterococcus faecalis*) ou um seu fragmento ou segmento ou derivado ou análogo; um agente anti-inflamatório; um agente anti-microbiano; e/ou um ou mais excipientes farmacêuticos. Tipicamente tais composições são estéreis e essencialmente isentas de micróbios patogénicos.

b. Flagelina

Em determinados aspectos a composição StIR compreende um polipéptido flagelina compreendendo 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22 aminoácidos consecutivos do péptido QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA (SEQ ID NO:2), que é conhecido como um agonista TLR5 ou um seu segmento ou derivado. Um polipéptido da divulgação pode também compreender uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 70, 80 ou 90%, incluindo todos os valores e gamas entre estes, idêntica a SEQ ID NO:2). Noutros aspectos, a flagelina é sintetizada e/ou polipéptido ou péptido de flagelina purificado ou isolado. A expressão "purificado" ou "isolado" significa que essa componente foi previamente isolada ou purificada de outras proteínas ou reagentes de síntese ou subprodutos e que a componente é pelo menos cerca de 95% pura antes de ser formulada na composição. Em determinadas concretizações, a componente purificada ou isolada é cerca de ou é pelo menos cerca de 80, 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5% pura ou mais, ou qualquer gama derivada destas. Tal componente purificada pode ser então misturada com outras componentes para formar uma composição tal como aqui descrito.

Uma proteína flagelina recombinante ou seu fragmento ou segmento compreende 5, 10, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350 ou 400 aminoácidos consecutivos, incluindo todos os valores e gamas entre estes, de SEQ ID NO:2 ou outros polipéptidos de flagelina. Estes fragmentos ou segmentos são pelo menos, no máximo ou cerca de 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100% idênticos a SEQ ID NO:2 ou outros polipéptidos de flagelina. Em determinados aspectos, um polipéptido ou segmento de flagelina é pelo menos 75% idêntico

à sequência de SEQ ID NO:2. Noutro aspecto, o polipéptido ou segmento de flagelina é pelo menos 80% idêntico à sequência de SEQ ID NO:2. Noutro aspecto, o polipéptido ou segmento de flagelina é pelo menos 85% idêntico à sequência de SEQ ID NO:2. Noutro aspecto, o polipéptido ou segmento de flagelina é pelo menos 90% idêntico à sequência de SEQ ID NO:2. Noutro aspecto, o polipéptido ou segmento de flagelina é pelo menos 95% idêntico à sequência de SEQ ID NO:2. Os derivados ou variantes de flagelina ou seu segmento incluem mutações de inserção, deleção e mutações pontuais de SEQ ID NO:2. Uma mutação de inserção particular é uma proteína de fusão que compreende uma sequência de aminoácidos exógena à flagelina no terminal carboxilo ou amino. São conhecidas várias proteínas flagelina e incluem flagelina com os números de acesso BAB58984 (gi|14278896); YP\_001330159 (gi|150402865); YP\_001323483 (gi|150399716); CAA28975 (gi|1333716); CAA02137 (gi|1567895); CAA67105 (gi|1580779); AAR10473 (gi|38049688); CAR58992 (gi|197093531); YP\_001217666 (gi|147675484); CAL12564 (gi|122089712); BAD14977 (gi|46093563); ou CAD05707 (gi|16503200), não se lhes limitando.

#### c. Lisado microbiano

As concretizações da divulgação também incluem composições farmaceuticamente aceitáveis compreendendo um lisado de um micrório essencialmente não patogénico, um agente anti-inflamatório e um ou mais excipientes farmacêuticos, em que a referida composição é estéril e essencialmente isenta de micrório patogénicos. Um lisado microbiano é tipicamente sonicado; homogeneizado; irradiado; lisado por métodos barométricos, pneumáticos, detergentes ou enzimáticos ou suas combinações. Num aspecto particular o lisado microbiano é irradiado com UV antes, durante ou após a lise. O lisado microbiano pode incluir um lisado bacteriano, fúngico ou vírico, não se lhes limitando. Em determinadas concretizações o lisado microbiano é um lisado bacteriano. O microorganismo a partir do qual se prepara o lisado não tem de ser um microorganismo virulento e tipicamente não será um microorganismo virulento. Os aspectos da divulgação incluem um lisado derivado de bactérias com um efeito limitado na saúde do indivíduo. O efeito limitado refere-se à produção de um mínimo de reacções adversas e impedimento não substancial da

função de um tecido, órgão ou sistema de um indivíduo ao longo de um período de pelo menos, no máximo ou cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 dias.

As composições da divulgação não têm de ser derivadas directamente de um organismo virulento contra o qual se procura protecção ou terapia. As bactérias podem ser do género *Haemophilus*, mas não se limitam a *Haemophilus*. Podem identificarse as bactérias que representam uma ameaça mínima de provocar efeitos adversos num indivíduo. Em determinados aspectos a bactéria é *Haemophilus influenzae*, nomeadamente *Haemophilus influenzae* não tipável (NTHi) (Clement et al., 2008; Clement et al., 2009; Evans et al., 2010; Tuvim et al., 2009).

Um lisado microbiano pode ter uma concentração de proteína de pelo menos cerca de, cerca de ou no máximo cerca de 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 ou 10 mg/ml, incluindo todos os valores e gamas entre estes. Em determinados aspectos o lisado microbiano pode ter uma concentração de proteína de pelo menos cerca de, cerca de ou no máximo 10 mg/ml.

As concretizações da divulgação incluem um lisado microbiano que pode ser administrado através do tracto respiratório. Em determinados aspectos a administração é por inalação. Num aspecto adicional a composição é em aerossol ou numa forma que pode ser inalada por um indivíduo. Em determinadas concretizações, uma composição de lisado comprehende um agente anti-inflamatório, incluindo anti-inflamatórios esteróides e não esteróides (NSAID). Para mais detalhes consultar o pedido de patente U.S. 11/830 622 "Composições e métodos para estimulação da imunidade inata do pulmão" Dickey et al.

#### **B. Componentes do hospedeiro ou autólogas**

Várias moléculas derivadas de células e tecidos de um indivíduo ou hospedeiro podem estimular, aumentar ou contribuir para a produção de uma resposta imunitária. Estas partes são referidas como partes ou componentes do hospedeiros ou autólogas e incluem moléculas pequenas libertadas de

células lesionadas, em stress ou moribundas; componentes envolvidas na morte ou neutralização microbiana; citocinas; e macromoléculas libertadas de células ou tecidos.

### **1. Compostos de moléculas pequenas do hospedeiro**

Moléculas pequenas que estão associadas ou libertadas de células que estão lesionadas, em stress ou moribundas, tal como adenosina 5' -trifosfato (ATP), ácido úrico (urato) e adenosina. Estão bem definidos os receptores para muitas destas moléculas e as vias pelas quais modulam inflamação. A inflamação é uma das primeiras respostas do sistema imunitário a infecção ou irritação. A inflamação é estimulada por factores químicos libertados por células lesionadas e serve para estabelecer uma barreira física contra o alastramento da infecção e para promover a cura de qualquer tecido lesionado após depuração de patogénios. Os factores químicos produzidos durante a inflamação (histamina, bradiquinina, serotonina, leucotrienos também prostaglandinas) sensibilizam os receptores de dor, provocam vasodilatação dos vasos sanguíneos no local e atraem fagócitos, especialmente neutrófilos. Os neutrófilos desencadeiam então outras partes do sistema imunitário pela liberação de factores que mobilizam outros leucócitos e linfócitos.

Os compostos de moléculas pequenas do hospedeiros que podem ser incluídos nas composições StIR da divulgação incluem ATP, adenosina, histamina, bradiquinina, serotonina, leucotrienos, prostaglandinas.

### **2. Partes extracelulares do hospedeiro**

Proteínas hospedeiras extracelulares com um papel directo na morte bacteriana e/ou em sinalização, tal como complemento, pentraxinas, defensinas e catelicidinas. Estas moléculas estão muitas vezes presentes de forma constitutiva, mas não sinalizam até se tornarem activadas por ligação a produtos microbianos ou a serem clivadas proteoliticamente ou algum outro mecanismo de activação. Além disso, a sua produção pode ser aumentada. Em determinados aspectos estas proteínas estão quer numa forma activada (quer por activação *in vitro* ou processamento ou por engenharia da proteína).

O sistema de complemento é uma cascata bioquímica que ajuda a depurar patogénios de um organismo. Este é parte do sistema imunitário maior que não é adaptável e não se altera no decurso do tempo de vida do indivíduo; como tal pertence ao sistema imunitário inato. Contudo, pode ser recrutado e posto em acção pelo sistema imunitário adaptativo.

O sistema de complemento consiste em várias proteínas pequenas encontradas no sangue, que normalmente circulam como zimogénios inactivos. Quando estimuladas por um de vários estímulos, as protéases do sistema clivam proteínas específicas para libertar citocinas e iniciar uma cascata de amplificação de clivagens posteriores. O resultado final desta cascata de activação é a amplificação maciça da resposta e activação do complexo de ataque à membrana de morte celular. O sistema de complemento é constituído por mais de 20 proteínas e fragmentos de proteína, incluindo proteínas séricas, proteínas do serosal e receptores de membrana celular. Estas proteínas são sintetizadas principalmente no fígado e constituem cerca de 5% da fracção de globulinas dos soro sanguíneo.

As componentes do sistema de complemento que podem ser incluídas numa composição StIR incluem complexo C1 (C1q, C1r, C1s e C1qr2s2), C1r2s2, C4, C2, C4a, C4b, C2a, C2b C3-convertase (complexo C4b2a), C3a, C3b; convertase C5 (complexo C4bC2aC3b), não se lhes limitando. Factor de aceleração de decaimento (DAF), factor B, C3bB, factor D, Ba, Bb, C3bBb, C3bBbC3b, C5, C5a, C5b, C6, C7, C8, C9 e complexo de ataque de membrana (MAC) (C5b6789).

As pentraxinas são uma família de proteínas que tipicamente apresentam ligação de ligando dependente de cálcio e um estrutura em torta- com um achatamento característico semelhante às lectinas vegetais. As pentraxinas "curtas" incluem a componente de amilóide P do soro (SAP) e a proteína C reactiva (CRP). As pentraxinas "longas" incluem PTX3 (uma molécula modulada por citocina) e várias pentraxinas neuronais.

As defensinas são pequenas proteínas catiónicas ricas em cisteína encontradas tanto em vertebrados como em invertebrados. Estas são activas contra bactérias, fungos e muitos vírus com cápside e sem cápside. Estas consistem de 18-45 aminoácidos incluindo seis (em vertebrados) a 8 resíduos de cisteína conservados. As células do sistema imunitário contêm estes péptidos para assistência na morte de bactérias fagocitadas, por exemplo em granulócitos neutrófilos e em quase todas as células epiteliais. A maioria das defensinas funciona por ligação à membrana celular microbiana e uma vez integrada, forma defeitos de membrana do tipo poro que permitem efluxo de iões e nutrientes essenciais.

As defensinas que se podem incluir em composições StIR da divulgação incluem -defensinas (DEFA1, DEFA1A3, DEFA3 e/ou DEFA4), -defensinas (DEFB1, DEFB4, DEFB103A/DEFB103B a DEFB107A/DEFB107B, DEFB110 a DEFB133) e/ou -defensinas (DEFT1P), não se lhes limitando.

Um péptido antimicrobiano catelicidina é uma família de polipéptidos encontrada em lisossomas em leucócitos polimorfonucleares (PMN). Os membros da família de catelicidina de polipéptidos antimicrobianos são caracterizados por uma região altamente conservada (domínio catelina) e um domínio de péptido catelicidina altamente variável. Os péptidos catelicidina têm sido isolados de muitas espécies diferentes de mamíferos. As catelicidinas foram encontradas originalmente em neutrófilos mas desde aí têm sido encontradas em muitas outras células incluindo células epiteliais e macrófagos activados por bactérias, vírus, fungos ou a hormona 1,25-D. A família catelicidina partilha homologia de sequência primária com a família de catepsinas inibidoras de poteínase de cisteína, apesar de estarem geralmente em falta os resíduos de aminoácido que se pensa serem importantes na inibição de tais protéases.

### **3. Citocinas**

As citocinas são uma categoria de moléculas de sinalização que se usam extensivamente em comunicação celular. Estas são proteínas, péptidos ou glicoproteínas. A expressão citocina abrange uma família grande e diversificada de reguladores

polipeptídicos que são produzidos amplamente em todo o corpo por células de origens embrionárias diversificadas. A acção das citocinas pode ser autócrina, parácrina e endócrina. As citocinas são críticas para o desenvolvimento e funcionamento das respostas imunitárias tanto inata como adaptativa, apesar de não se limitarem apenas ao sistema imunitário. Estas são muitas vezes excretadas pelas células imunitárias que encontraram um patogénio, activando e recrutando assim células imunitárias adicionais para aumentar a resposta do sistema ao patogénio.

As citocinas estimulam as defesas antimicrobianas das células imunitárias inatas, em particular das células epiteliais, tais como IL-17, IL-22, IFN- $\gamma$ . Em alguns casos, tal representa uma amplificação da inflamação inata pelo sistema imunitário inato adaptativo, tal como quando é produzido IL-17 por células Th 17. Noutros casos, as citocinas são libertadas por células que não pertencem ao sistema imunitário adaptativo, por exemplo por células epiteliais, células mesenquimais ou células dendríticas.

As citocinas que podem ser incluídas nas composições STIR da divulgação incluem a superfamília 1 de IL-1 ((IL-1Ra), IL-18, IL-33); a família do tipo IL-6 e que utiliza gp130 (IL-6, IL-11, IL-27, IL-30, IL-31, Oncostatina M, factor de inibição de leucemia, factor neurotrófico ciliar, Cardiotrofina 1); a família IL-10 (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26); interferão do tipo III (IL-28, IL-29); família com cadeia comum (IL-2/15, IL-3, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-21); a família IL-12 (IL-12, IL-23, IL-27, IL-35), IL-5; IL-8; IL-14; IL-16; IL-17/25; IL-32; as quimiocinas CCL (CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9, CCL10, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28); as quimiocinas CXCL (CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCL17); CX3CL-1; XCL1; XCL 2; superfamília TNF (ligando) (ligando 4-1BB, factor de activação de células B, ligando FAS, Linfotoxina, OX40L, RANKL, TRAIL); conjunto das citocinas de diferenciação (CD70, CD153, CD154); interferões (IFN-I alfa (2a peguilado, 2b peguilado), IFN-Ibeta (1a, 1b)), IFN-II e IFN-III.

#### **4. Partes macromoleculares do hospedeiro**

As macromoléculas ou seus fragmentos podem ser libertadas a partir da matriz extracelular, da superfície celular ou interior celular e activar a sinalização imune inata, tal como dectina, versican, HMGB-I, ADN e ARN. Tipicamente, estas macromoléculas estão normalmente ocultadas dos receptores alvo, quer no interior celular, quer encobertas por interacções intramoleculares ou intermoleculares. Estas macromoléculas são libertadas para interagir com receptores alvo após disrupção celular ou após proteólise da superfície celular da matriz para revelar uma parte de sinalização ou algum mecanismo semelhante.

### **II. COMPOSIÇÕES DE POLIPÉPTIDO E DE PÉPTIDO**

Em determinadas concretizações, a presente divulgação refere-se a pelo menos um polipéptido ou péptido (e.g., um segmento de polipéptido) ou seu derivado ou variante. Tal como aqui usado, uma "proteína", "polipéptido", "péptido", "composição de polipéptido ou de péptido" ou "composto de polipéptido ou de péptido", refere-se na generalidade a uma proteína ou polipéptido com pelo menos cinco aminoácidos ou análogos de aminoácido (colectivamente uma molécula amino, consultar seguidamente), não se lhes limitando. Todas as expressões "polipéptido ou péptido" descritas anteriormente podem ser aqui usadas indiferentemente.

Em determinadas concretizações o tamanho de pelo menos uma molécula de polipéptido ou de péptido pode compreender uma molécula contendo pelo menos, no máximo ou cerca de 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 100, 500, 1000 a cerca de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 100, 500 ou mais resíduos de moléculas amino e qualquer valor ou gama deles derivado, não se lhes limitando. A divulgação inclui os comprimentos de aminoácidos contíguos ou seus análogos de qualquer sequência aqui discutida.

Os segmentos ou fragmento de um polipéptido ou péptido incluem o aminoácido 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 350, 400, 450 ao aminoácido 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600 aminoácidos das sequências aqui divulgadas ou referenciadas, incluindo todos os valores e gamas entre estes.

Tal como aqui utilizado, uma "molécula amino" refere-se a qualquer aminoácido, derivado de aminoácido ou aminoácido mimético tal como conhecido pelo perito na especialidade. Em determinadas concretizações, os resíduos da molécula de polipéptido ou de péptido são sequenciais, sem qualquer molécula não amino interrompendo a sequência de resíduos da molécula amino. Noutras concretizações a sequência pode compreender uma ou mais partes de molécula não amino. Em determinadas concretizações, a sequência de resíduos da molécula de polipéptido ou de péptido pode ser interrompida por uma ou mais partes de molécula não amino.

Consequentemente, a expressão "composição de polipéptido ou de péptido" abrange sequências de moléculas amino compreendendo pelo menos um dos 20 aminoácidos comuns em proteínas sintetizadas de forma natural ou pelo menos um aminoácido modificado ou não usual.

Em determinadas concretizações, uma composição de polipéptido ou péptido compreende pelo menos uma proteína, polipéptido ou péptido. Em métodos que envolvem uma composição de agonista TLR, um polipéptido ou péptido pode conter toda a sequência de aminoácidos de um polipéptido flagelina ou parte desta, tal como SEQ ID NO:2 ou polipéptidos homólogos. Em determinadas concretizações, as composições contendo proteína, polipéptido ou péptido serão geralmente proteínas ou péptidos ou proteínas ou péptidos sintéticos sendo cada um essencialmente isento de toxinas, patogénios e imunogénios prejudiciais. Em determinados aspectos o polipéptido é uma sequência de aminoácidos recombinante ou sintética.

As composições de polipéptido ou péptido podem ser produzidas por qualquer técnica conhecida dos peritos na especialidade, incluindo a expressão de proteínas,

polipéptidos ou péptidos através de técnicas padrão de biologia molecular, o isolamento de polipéptidos ou péptidos a partir de fontes naturais ou a síntese química de materiais de polipéptido ou péptido. As regiões de codificação para estes polipéptidos ou péptidos podem ser amplificadas e/ou expressas usando as técnicas aqui divulgadas ou como será conhecido dos peritos na especialidade. Alternativamente, os peritos na especialidade conhecem várias preparações comerciais de proteínas, polipéptidos e péptidos.

Em determinadas concretizações pode purificar-se um composto de polipéptido ou péptido. De um modo geral, "purificado" referir-se-á a uma composição específica de proteína, polipéptido ou péptido que foi submetida a fraccionação para remover várias outras proteínas, polipéptidos, péptidos e outras moléculas e compostos e cuja composição retém substancialmente a sua actividade, tal como pode ser avaliado, por exemplo, por ensaios de proteína, tal como conhecido pelo perito na especialidade para a proteína, polipéptido ou péptido específicos ou pretendidos.

Considera-se que se pode utilizar virtualmente qualquer componente contendo proteína, polipéptido ou péptido, nas composições e métodos aqui divulgados. Em determinadas concretizações, pretende-se que a formação de um aerossol ou nebulizado ou composição que pode ser posta em aerossol ou nebulizada, possa permitir que a composição seja mais precisa e facilmente aplicada ao sistema respiratório por inalação, inspiração e semelhantes.

#### **A. Variantes e derivados de polipéptido ou péptido**

As variantes ou derivados de sequência de aminoácidos de proteínas, polipéptidos e péptidos da presente divulgação podem ser variantes de substituição, inserção ou deleção, assim como inclusão de análogos ou derivados de aminoácidos. As variantes de deleção têm falta de um ou mais resíduos da proteína nativa que não são essenciais para a função ou actividade imunogénica. Outro tipo comum de variante de deleção é aquela que não apresenta sequências de sinalização de excreção ou sequências de sinalização que levem uma proteína a ligar-se a um parte específica de uma célula ou de

regiões que atravessam a membrana ou outras sequências funcionais que não sejam necessárias para a actividade *in vivo* pretendida. Os mutantes de inserção envolvem tipicamente a adição de material a um ponto não terminal no polipéptido. Tal pode incluir a inserção de um epítopo imunorreactivo ou simplesmente de um único resíduo. As adições terminais, denominadas proteínas de fusão, são discutidas seguidamente.

As variantes de substituição contêm tipicamente a permuta de um aminoácido por outro em um ou mais locais no interior de um polipéptido ou péptido e podem ser concebidas para modular uma ou mais propriedades, tal como a estabilidade contra clivagem proteolítica, sem a perda de outras funções ou propriedades. As substituições deste tipo são preferentemente conservativas, ou seja, um aminoácido é substituído por outro com forma e carga semelhantes. As substituições conservativas são bem conhecidas na especialidade e incluem, por exemplo, as alterações de: alanina para serina; arginina para lisina; asparagina para glutamina ou histidina; aspartato para glutamato; cisteína para serina; glutamina para asparagina; glutamato para aspartato; glicina para prolina; histidina para asparagina ou glutamina; isoleucina para leucina ou valina; leucina para valina ou isoleucina; lisina para arginina; metionina para leucina ou isoleucina; fenilalanina para tirosina, leucina ou metionina; serina para treonina; treonina para serina; triptofano para tirosina; tirosina para triptofano ou fenilalanina; e valina para isoleucina ou leucina.

A expressão "equivalente biologicamente funcional" é bem entendida na especialidade e é definida adicionalmente em detalhe aqui. Consequentemente, um equivalente biologicamente funcional terá uma sequência com cerca de 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de aminoácidos que são idênticos ou funcionalmente equivalentes aos aminoácidos de um polipéptido ou seu péptido ou variante ou análogo ou derivado e proporciona uma actividade/resposta biológica semelhante a flagelina ou outro agonista TLR.

Segue-se uma discussão baseada na alteração dos aminoácidos de um polipéptido ou péptido para criar uma molécula de segunda geração equivalente ou mesmo melhorada.

Por exemplo, determinados aminoácidos podem ser substituídos por outros aminoácidos num polipéptido ou péptido sem perda apreciável de uma actividade particular tal como, aumento da resposta imunológica. Dado que é a capacidade interactiva e a natureza de um polipéptido ou péptido que define tipicamente uma actividade funcional de uma proteína, podem efectuar-se determinadas substituições de aminoácidos numa sequência de polipéptido ou péptido e na sua sequência codificante de ADN subjacente e produzir mesmo assim uma proteína com propriedades semelhantes. Os inventores consideram assim que se podem efectuar várias alterações nas sequências de ADN que codificam os polipéptidos ou péptidos da divulgação sem perda apreciável da sua utilidade ou actividade biológicas, tal como discutido seguidamente.

Ao fazer tais alterações, pode considerar-se o índice hidropático dos aminoácidos. A importância do índice hidropático dos aminoácidos em conferir função biológica interactiva a uma proteína é compreendido na generalidade na especialidade (Kyte e Doolittle, 1982). É aceite que o carácter hidropático relativo do aminoácido contribui para a estrutura secundária da proteína resultante, o que por sua vez define a interacção da proteína com outras moléculas, células, tecidos e semelhantes, por exemplo, enzimas, substratos, receptores, ADN, anticorpos, antigénios, células e sistemas imunológicos e semelhantes.

Considera-se também na especialidade que se pode fazer a substituição de aminoácidos semelhantes eficazmente com base na hidrofilicidade. A patente U.S. 4 554 101 menciona que a hidrofilicidade média local máxima de uma proteína, tal como determinada pela hidrofilicidade dos seus aminoácidos adjacentes, se correlaciona com uma propriedade biológica da proteína. Tal como detalhado na patente U.S. 4 554 101, os seguintes valores de hidrofilicidade foram atribuídos a resíduos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato ( $+3,0 \pm 1$ ); glutamato ( $+3,0 \pm 1$ ); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina ( $-0,5 \pm 1$ ); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptofano (-3,4).

Considera-se ainda que um aminoácido pode ser substituído por outro com um valor de hidrofilicidade semelhante e ainda assim produzir uma proteína equivalente biologicamente e equivalente imunologicamente. Em tais alterações, é preferida a substituição de aminoácidos cujos valores de hidrofilicidade se situam no intervalo  $\pm 2$ , são particularmente preferidos os que se situam no intervalo  $\pm 1$  e são ainda mais particularmente preferidos os que se situam no intervalo  $\pm 0,5$ .

Tal como descrito na generalidade anteriormente, as substituições de aminoácidos baseiam-se geralmente na semelhança relativa dos substituintes de cadeia lateral do aminoácido, por exemplo, na sua hidrofobicidade, hidrofilicidade, carga, tamanho e semelhantes. Os exemplos de substituições que têm em consideração as diferentes características anteriores são bem conhecidos do peritos na especialidade e incluem: arginina e lisina; glutamato e aspartato; serina e treonina; glutamina e asparagina; e valina, leucina e isoleucina.

Podem também modificar-se os aminoácidos internos e/ou os terminais amino e/ou carboxilo dos compostos de polipéptido ou péptido da divulgação para produzir outros compostos da divulgação, i.e., derivados do polipéptido ou péptido. As modificações do terminal amino incluem metilação (e.g., --NHCH<sub>3</sub> ou --N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), acetilação (e.g., com ácido acético ou um seu derivado halogenado tal como ácido -cloroacético, ácido -bromoacético ou ácido -iodoacético), adição de um grupo benziloxicarbonilo (Cbz) ou bloqueamento do terminal amino com qualquer grupo bloqueador contendo uma funcionalidade carboxilato definida por RCOO-- ou funcionalidade sulfônico definida por R-SO<sub>2</sub>--, em que R é selecionado de alquilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo e semelhantes e grupos semelhantes. Pode também incorporar-se um desaminoácido no N-terminal (de modo a que não haja grupo amino N-terminal) para diminuir a susceptibilidade a protéases ou para restringir a conformação do composto de polipéptido ou péptido.

As modificações do terminal carboxilo incluem substituir o ácido livre com um grupo carboxamida ou formando uma lactama cíclica no terminal carboxilo para introduzir restrições

estruturais. Podem também ciclizar-se os péptidos da divulgação ou incorporar um resíduo desamino ou descarboxilo no terminal do péptido, de modo a que não haja grupo amino ou carboxilo terminal, para diminuir a susceptibilidade a protéases ou para restringir a conformação do péptido. Os grupos funcionais C-terminais dos compostos da presente divulgação incluem amida, amida de alquilo inferior, amida de di(alquilo inferior), alcóxi inferior, hidroxi e carboxi e os seus derivados de éster inferior e os seus sais farmaceuticamente aceitáveis.

Podem susbtituir-se as cadeias laterais de ocorrência natural dos 20 aminoácidos codificados geneticamente (ou os estereoisómeros D dos aminoácidos) por outras cadeias laterais, por exemplo com grupos tais como alquilo, alquilo inferior, alquilo cílico com 4, 5, 6 a 7 membros, amida, amida de alquilo inferior, amida de di(alquilo inferior), alcóxi inferior, hidroxi, carboxi e os seus derivados de éster inferior e heterocíclicos com 4, 5, 6 a 7 membros. Em particular, podem utilizar-se análogos de prolina em que o tamanho de anel do resíduo de prolina é alterado de 5 membros para 4, 6 ou 7 membros. Os grupos cílicos podem ser saturados ou insaturados e caso sejam insaturados podem ser aromáticos ou não aromáticos. Os grupos heterocíclicos contêm preferentemente um ou mais heteroátomos de azoto, oxigénio e/ou enxofre. Os exemplos de tais grupos incluem furazanil, furil, imidazolidinil, imidazolil, imidazolinil, isotiazolil, isoxazolil, morfolinil (e.g. morfolino), oxazolil, piperazinil (e.g., 1-piperazinil), piperidil (e.g., 1-piperidil, piperidino), piranil, pirazinil, pirazolidinil, pirazolinil, pirazolil, piridazinil, piridil, pirimidinil, pirrolidinil (e.g., 1-pirrolidinil), pirrolinil, pirrolil, tiadiazolil, tiazolil, tienil, tiomorfolinil (e.g., tiomorfolino) e triazolil. Estes grupos heterocíclicos podem ser substituídos ou não substituídos. Quando um grupo é substituído, o substituinte pode ser alquilo, alcóxi, halogénio, oxigénio ou fenilo substituído ou não substituído.

Podem também modificar-se facilmente polipéptidos ou péptidos por fosforilação e outros métodos (e.g., tal como descrito em Hruby et al.(1990).

Os compostos de péptido da divulgação também servem como modelos estruturais para compostos não peptídicos com actividade biológica semelhante. Os peritos na especialidade reconhecem que várias técnicas estão disponíveis para construir compostos com a mesma actividade biológica ou com actividade biológica semelhante tal como o composto de péptido líder, mas com actividade mais favorável do que o líder relativamente a solubilidade, estabilidade e susceptibilidade a hidrólise e proteólise (consultar, Morgan e Gainor, 1989). Estas técnicas incluem substituir o esqueleto de péptido com um esqueleto composto por fosfonatos, amidatos, carbamatos, sulfonamidas, aminas secundárias e N-metilaminoácidos.

Além disso, os compostos da presente divulgação pode conter uma ou mais ligações dissulfureto intramoleculares. Numa concretização, um monómero ou dímero de péptido comprehende pelo menos uma ligação dissulfureto intramolecular. Em concretizações preferidas, um dímero de péptido comprehende duas ligações dissulfureto intramoleculares. Tais ligações dissulfureto podem formar-se por oxidação dos resíduos de cisteína da sequência nuclear do péptido. Numa concretização faz-se o controlo da formação de ligação com cisteína por escolha de um agente oxidante do tipo e com uma concentração eficaz para optimizar a formação do isómero pretendido. Por exemplo, a oxidação de um dímero de péptido para formar duas ligações dissulfureto intramoleculares (uma em cada cadeia de péptido) é preferentemente obtida (relativamente à formação de ligações dissulfureto intramoleculares) quando o agente oxidante é DMSO. Em determinadas concretizações, a formação de ligações de cisteína é controlada pela utilização selectiva de grupos de protecção de tiol durante a síntese de péptidos.

Outras concretizações desta divulgação proporcionam análogos destes derivados dissulfureto nos quais um dos enxofres foi substituído por um grupo CH<sub>2</sub> ou outro isósteros para enxofre. Estes análogos podem ser preparados a partir dos compostos da presente divulgação, em que cada sequência nuclear contém pelo menos um resíduo Cys (C) ou homocisteína e um ácido -amino- -butírico em vez do segundo resíduo C, através um deslocamento intramolecular ou intermolecular, usando métodos conhecidos na especialidade (Consultar, e.g., Barker et al., 1992 e Or et al., 1991). Um

perito na especialidade considerará facilmente que este deslocamento também pode ocorrer usando outros homólogos de ácido -amino- -butírico e homocisteína.

Além das estratégias de ciclização anteriores, podem usarse outras estratégias de ciclização de péptido não dissulfureto. Tais estratégias de ciclização alternativas incluem, por exemplo, estratégias de ciclização de amida, bem como as que envolvem a formação de ligações tio-éter. Assim, os compostos da presente divulgação podem existir numa forma ciclizada quer com uma ligação amida intramolecular, quer com uma ligação tioéter intramolecular. Por exemplo, pode sintetizar-se um péptido em que se substitui uma cisteína da sequência nuclear por lisina e a segunda cisteína é substituída por ácido glutâmico. Consequentemente pode formar-se um monómero cíclico através de uma ligação amida entre as cadeias laterais destes dois resíduos. Alternativamente, pode sintetizar-se um péptido em que uma cisteína da sequência nuclear é substituída por lisina. Pode então formar-se um monómero cíclico através de uma ligação tio-éter entre as cadeias laterais do resíduo de lisina e do segundo resíduo de cisteína da sequência nuclear. Como tal, além das estratégias de ciclização de dissulfureto, podem usar-se facilmente estratégias de ciclização de amida e estratégias de ciclização de tio-éter para ciclizar os compostos da presente divulgação. Alternativamente, pode inserir-se capuz no terminal amino do péptido com um ácido acético substituído em , em que o substituinte em é um grupo de saída, tal como um ácido -haloacético, por exemplo, ácido -cloroacético, ácido -bromoacético ou ácido -iodoacético.

Podem usar-se polímeros solúveis em água, tal como polietilenoglicol (PEG), para a modificação covalente de polipéptidos ou péptidos de importância terapêutica. Pensa-se que a ligação de tais polímeros melhora a actividade biológica, aumenta a solubilidade em água e melhora a resistência a digestão por protéase. Por exemplo, foi relatado que a ligação covalente de PEG a polipéptidos terapêuticos tais como interleucinas (Knauf, et al., 1988; 15064; Tsutsumi et al., 1995, interferões (Kita et al., 1990), catalase (Abuchowski et al., 1977, superóxido dismutase (Beauchamp et al., 1983 e adenosina desaminase (Chen et

al., 1981) aumentou o seu tempo de semivida *in vivo* e/ou reduziu a sua imunogenicidade e antigenicidade.

Os compostos da divulgação podem compreender adicionalmente uma ou mais partes de polímero solúvel em água. De preferência, estes polímeros são ligados covalentemente aos compostos. O polímero solúvel em água pode ser, por exemplo, polietilenoglicol (PEG), copolímeros de etilenoglicol/propilenoglicol, carboximetilcelulose, dextrans, poli-álcool vinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero etileno/anidrido maléico, poli-aminoácidos (quer homopolímeros, quer copolímeros aleatórios), poli(n-vinilpirrolidona)polietilenoglicol, homopolímeros de propropilenoglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno e polióis polioxietilados.

Os compostos da divulgação podem ser ligados a polímeros solúveis em água (e.g., PEG) usando qualquer de várias estratégias químicas para ligar um ou mais polímeros solúveis em água à parte de ligação de receptor da molécula (e.g., péptido+espaçador). Uma concretização típica utiliza uma junção de ligação simples para ligação covalente do(s) polímero(s) solúvel(eis) em água à parte de ligação de receptor, no entanto em concretizações alternativas podem usar-se junções de ligação múltipla, incluindo variações adicionais em que se ligam espécies diferentes de polímero solúvel em água à parte de ligação de receptor em junções de ligação diferentes, que podem incluir uma ou mais junções de ligação covalente ao espaçador e/ou a uma ou ambas as cadeias de péptido.

Os reagentes PEG incluem mPEG2-NHS, mPEG2-ALD, PEG multibraço, mPEG(MAL)<sub>2</sub>, mPEG2(MAL), mPEG-NH<sub>2</sub>, mPEG-SPA, mPEG-SBA, mPEG-tioésteres, mPEG-ésteres duplos, mPEG-BTC, mPEG-ButyrALD, mPEG-ACET, PEG heterofuncionais (NH<sub>2</sub>-PEG-COOH, Boc-PEG-NHS, Fmoc-PEG-NHS, NHS-PEG-VS, NHS-PEG-MAL), acrilatos de PEG (ACRL-PEG-NHS), PEG-fosfolípidos (e.g., mPEG-DSPE), PEG multibraço da série SUNBRITE, incluindo a série GL de PEG baseados em glicerina activados por uma estratégia química seleccionada por um perito na especialidade, qualquer dos PEG activados SUNBRITE (incluindo carboxilo-PEG, p-NP-PEG, Tresil-

PEG, aldeído-PEG, acetal-PEG, amino-PEG, tiol-PEG, maleimido-PEG, hidroxil-PEG-amina, amino-PEG-COOH, hidroxil-PEG-aldeído, PEG tipo anidrido carboxílico, PEG-fosfolípido funcionalizado, não se lhes limitando, e outros PEG semelhantes e/ou PEG reactivos adequados, tal como seleccionados pelos peritos na especialidade para a sua aplicação e uso específico, não se lhes limitando.

O número de moléculas de polímero ligadas pode variar; por exemplo, pode ligar-se um, dois, três ou mais polímeros a um polipéptido ou péptido da divulgação. Os polímeros de ligação múltipla podem ter as mesmas partes químicas ou partes químicas diferentes (e.g., PEG de pesos moleculares diferentes). Em alguns casos, o grau de ligação de polímero (o número de partes de polímero ligadas a um péptido e/ou o número total de péptidos aos quais o polímero está ligado) pode ser influenciado pela proporção entre as moléculas de polímero e as moléculas de péptido numa reacção de ligação, bem como pela concentração total de cada uma delas na mistura reacional. Em geral, a razão óptima polímero:péptido (em termos da eficácia da reacção para não obter excesso de partes de péptido e/ou polímero que não reagiram) será determinada por factores tais como o grau pretendido de ligação de polímero (e.g., mono, di, tri, etc.), o peso molecular do polímero seleccionado, se o polímero é ramificado ou não e das condições reacionais para o método de ligação específico.

Noutros aspectos, pode derivatizar-se um composto da divulgação pela adição de polímeros insolúveis em água. Os polímeros insolúveis em água representativos incluem polifosfazinas, poli(álcoois vinílicos), poliamidas, policarbonatos, polialcilenos, poliacrilmidas, polialcilenoglicóis, poli-óxidos de alcíleno, polialcilenotereftalatos, poliviniléteres, polivinilésteres, polivinil-halogenetos, polivinilpirrolidona, poliglicolídeos, polissiloxanos, poli-uretanos, poli(metilmetacrilato), poli(etilmetacrilato), poli(isobutilmetacrilato), poli(isodecilmetacrilato), poli(fenilmetacrilato), poli(isopropilacrilato), poli(octadecilacrilato) polietileno, polipropileno,

poli(etilenoglicol), poli(óxido de etileno), poli(etilenotereftalato), poli(vinilacetato), policloreto de vinilo, poli-estireno, polivinilpirrolidona, plurónicos e polivinilfenol e seus copolímeros, não se lhes limitando.

Os polímeros naturais modificados sinteticamente úteis em derivados da divulgação incluem alquilceluloses, hidroxialquilceluloses, éteres de celulose, ésteres de celulose e nitroceluloses, não se lhes limitando. Os membros das classes alargadas de polímeros naturais modificados sinteticamente incluem metilcelulose, etilcelulose, hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetylcelulose, hidroxibutilmetylcelulose, acetato de celulose, propionato de celulose, acetato e butirato de celulose, acetato e ftalato de celulose, carboximetilcelulose, triacetato de celulose, sal de sódio de sulfato de celulose e polímeros de ésteres acrílico e metacrílico e ácido algínico, não se lhes limitando.

Em determinados aspectos pode modificar-se ou derivatizar-se um polipéptido ou péptido da divulgação pela adição de grupos sacárido ou açúcares modificados. A presente divulgação proporciona derivados de polipéptido e péptido que contêm açúcares modificados, nucleótidos-açúcar modificados e conjugados dos açúcares modificados. Nos compostos da divulgação com açúcares modificados, a parte de açúcar é preferentemente um sacárido, um desoxissacárido, um aminossacárido ou um N-acilsacárido. A expressão "sacárido" e os seus equivalentes, "sacarilo", "açúcar" e "glicosilo" referem-se a monómeros, dímeros, oligómeros e polímeros. A parte de açúcar pode também ser funcionalizada com um grupo de modificação. O grupo de modificação está conjugado à parte de açúcar, tipicamente através de conjugação com uma amina, sulfidrilo ou hidroxilo, e.g., hidroxilo primário, parte no açúcar. Numa concretização, o grupo de modificação está ligado através de uma parte amina no açúcar, e.g., através de uma amida, um uretano ou uma ureia que é formada através da reacção da amina com um derivado reactivo do grupo de modificação.

Pode usar-se qualquer açúcar como o açúcar para conjugados da divulgação. Tais açúcares incluem glicose, galactose, manose, fucose e ácido siálico, não se lhes limitando. Outros

açúcares úteis incluem amino-açúcares tais como glucosamina, galactosamina, manosamina, o análogo 5-amino de ácido siálico e semelhantes. O açúcar pode ser uma estrutura encontrada na natureza ou pode ser modificado para proporcionar um local para conjugar um grupo de modificação adicional.

Os peritos na especialidade reconhecerão que as estruturas e composições apresentadas são geralmente aplicáveis transversalmente ao género de grupos sacáridos, grupos sacáridos modificados, grupos sacáridos modificados activados e conjugados de grupos sacáridos modificados.

### **III. ESTIMULAÇÃO DAS DEFESAS DO PULMÃO**

Os inventores usaram ratinhos como modelo para infecção microbiana do pulmão. Em determinados estudos, os ratinhos não tratados têm uma mortalidade de 100%, mas os ratinhos tratados foram altamente protegidos. Sem restrições a qualquer mecanismo ou teoria específicos, pensa-se que a protecção é devida a defesas locais ou imunidade inata. Determinaram-se os efeitos de exposição única e repetida de um indivíduo a uma composição do invento e não se verificou qualquer patologia grave óbvia, tal como morte prematura, perda de peso ou alterações comportamentais.

Um benefício não limitativo do presente invento é que pode ser entregue e tem um efeito rápido e fácil. Igualmente, as composições podem ser produzidas de forma económica em grandes quantidades e é facilmente armazenado, bem como facilmente transportado por uma pessoa fora do ambiente hospitalar. Tipicamente, a administração das composições inventivas do invento resultam em pelo menos alguma morte ou inibição de patogénios invasores mesmo antes de entrada celular. No caso de alguns patogénios entrarem nas células dos pulmões quer escapando morte extracelular, quer porque as composições são administradas após exposição ao patogénio (anteriormente) em vez de antes de exposição ao patogénio (preventivamente), abrange-se que as composições e métodos relacionados promovam morte intracelular resultantes da melhoria ou aumento das respostas locais nos pulmões. Abrange-se que as composições e métodos relacionados têm ou produzem respostas terapêuticas contra uma variedade de patogénios respiratórios.

A protecção ou terapia proporcionada a um indivíduo por uma composição STIR pode ser alargada a classes de patogénios microbianos adicionais, incluindo bactérias gram negativas, bactérias intracelulares, fungos e vírus, devido à actividade alargada dos mecanismos antimicrobianos do tracto respiratório. Um agente tal como o descrito neste pedido simplificaria as contramedidas de armazenamento e distribuição. Igualmente, as composições do invento eliminariam a dificuldade de identificar rapidamente um patogénio específico durante um ataque biológico ou outra exposição ou potencial evento de exposição.

Além disso, as vantagens económicas de produzir e comprar um agente com aplicabilidade em múltiplos contextos civis e de biodefesa são significativas. É particularmente interessante o aumento dos mecanismos epiteliais locais em indivíduos que frequentemente têm neutropenia ou função imunitária adaptativa deficiente, e.g., indivíduos imunocomprometidos. Os métodos tipicamente actuam localmente e não sistemicamente e proporcionam efeitos alargados contra múltiplos patogénios. Os efeitos são rápidos e são interessantes em contextos de biodefesa, médicos e epidémicos.

O aumento das capacidades de defesa inatas dos pulmões em hospedeiros normais seria valioso em epidemias de gripe ou de doenças víricas respiratórias emergentes para os quais não estão disponíveis vacinas imunitárias adaptativas. Os surtos bacterianos com organismos emergentes ou resistentes a fármacos pode também ser uma situação na qual o fortalecimento das defesas inatas do pulmão poderia ser útil. Similarmente, a protecção dos técnicos de saúde durante uma epidemia facilitaria os cuidados de saúde aos doentes, enquanto limitava a propagação.

Muitas pessoas na comunidade vivem com defesas contra a infecção comprometidas cronicamente, tais como doentes com diabetes e doentes que tomam fármacos imunossupressores para doenças auto-imunes ou para evitar rejeição de transplante. Estas pessoas podem beneficiar particularmente do aumento das defesas do pulmão durante epidemias ou alturas em que o potencial de exposição a micróbios é elevado. Ainda mais

importante, os doentes de cancro que estão a fazer quimioterapia e que têm as defesas imunitárias comprometidas, transitória mas gravemente, podem beneficiar de protecção transitória. A pneumonia é uma ocorrência comum nestes doentes e é a principal causa de morte por infecção. Muitos fármacos de quimioterapia, tais como agentes alquilantes e análogos de nucleósidos, causam neutropenia grave transitória. Inicialmente, os doentes neutropénicos são susceptíveis a pneumonia bacteriana de organismos encontrados em hospedeiros normais, bem como de bactérias de baixa virulência, tal como *Stenotrophomonas maltophilia*. Com neutropenia prolongada, os doentes também se tornam susceptíveis a infecção com fungos de baixa virulência, em particular da espécie *Aspergillus*.

As defesas do pulmão podem ser estimuladas para proporcionar protecção transitória durante períodos prolongados de neutropenia. Outros doentes de cancro, tais como os que estão em tratamento com fludarabina ou anticorpos anti-linfócito ou os que estão em tratamento com inibidores de calcineurina e esteróides após transplantes de células estaminais hematopoiéticas, têm imunidade adaptativa deficiente. Estes doentes também podem beneficiar de estimulação episódica da imunidade do pulmão para proteger contra invasão por fungos e bactérias que colonizaram as vias respiratórias ou para protecção contra vírus epidémicos. Os surtos comunitários de vírus respiratórios sazonais de "constipação", tais como parainfluenza e RSV podem causar pneumonia fatal nestes doentes comprometidos e a infecção com muitos destes vírus pode ser facilmente identificada em lavagens nasais.

Por infecção, o reconhecimento de microrganismos é principalmente mediado por um conjunto de moléculas codificadas pela linha germinal nas células imunitárias inatas que se denominam receptores de reconhecimento de padrão (PRR) (Medzhitov e Janeway, 1997). Estes receptores de reconhecimento de padrão são expressos como proteínas ligadas à membrana ou solúveis que reconhecem estruturas moleculares invariantes, denominadas padrões moleculares associados a patogénio (PAMP) (Janeway e Medzhitov, 2002). Os padrões moleculares associados a patogénios são componentes microbianos únicos, conservados e essenciais, tais como LPS,

que são estruturalmente diferentes das moléculas do hospedeiro (Medzhitov e Janeway, 1997; Janeway e Medzhitov, 2002).

A maioria dos organismos multicelulares possuem um "sistema imunitário inato" que não muda durante o tempo de vida do organismo. Contrariamente, a imunidade adaptativa constitui as respostas a patogénios que mudam e se desenvolvem durante o tempo de vida de um indivíduo. Os organismos que possuem uma imunidade adaptativa também possuem uma imunidade inata e, com muitos dos mecanismos entre os sistemas sendo comuns, nem sempre é possível estabelecer uma fronteira clara entre os componentes do indivíduo envolvidos em cada um, apesar da nítida diferença de funcionamento. Os vertebrados superiores e todos os mamíferos têm ambos os sistemas imunitários inato e adaptativo.

#### **A. Sistema imunitário inato.**

O sistema imunitário adaptativo pode levar dias ou semanas a ter efeito após uma infecção inicial. No entanto, a maioria dos organismos estão constantemente a serem atacados por patogénios que devem ser controlados pelo sistema imunitário inato de acção mais rápida. A imunidade inata defende contra patogénios pelas respostas rápidas coordenadas através de mecanismos "inatos" que reconhecem um vasto espectro de componentes patogénicos conservados. A maioria dos estudos de imunidade inata centraram-se em leucócitos, tais como neutrófilos, macrófagos e células assassinas naturais. Contudo, as células epiteliais desempenham papéis chave nas defesas inatas que incluem proporcionar uma barreira mecânica à entrada microbiana, sinalização para leucócitos e morte directa de patogénios. Essencialmente, todas estas defesas são altamente indutíveis em resposta à detecção de produtos microbianos e do hospedeiro. Em pulmões saudáveis, o nível de função epitelial imunitária inata basal é baixo. Tal é indicado pelos baixos níveis de morte microbiana espontânea e libertação de citocina, reflectindo estimulação constitutiva baixa no tracto respiratório inferior praticamente estéril quando os mecanismos de depuração mucociliares funcionam eficazmente. Tal contrasta com o cólon, onde estão sempre presentes bactérias e as células epiteliais são activadas constitutivamente. Embora a área superficial dos pulmões

represente um alvo grande para invasão microbiana, as células epiteliais activadas do pulmão que estão justapostas aos patogénios depositados estão posicionadas idealmente para morte microbiana. (Consultar Evans *et al.*, 2010). As plantas e muitos animais inferiores não possuem um sistema imunitário adaptativo e em vez disso usam a sua imunidade inata. As substâncias de fontes microbianas e não microbianas são capazes de estimular as respostas imunitárias inatas.

O sistema imunitário inato, quando activado, tem uma vasta gama de células e mecanismos efectores. Existem vários tipos diferentes de células fagocíticas, que ingerem e destroem os patogénios invasores. Os fagócitos mais comuns são neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. Outro tipo de células, as células assassinas naturais são especialmente aptas para destruir células infectadas por vírus. Outro componente do sistema imunitário inato é conhecido por sistema de complemento. As proteínas de complemento são normalmente componentes inactivos do sangue. Contudo, quando activadas pelo reconhecimento de um patogénio ou anticorpo, as várias proteínas são activadas para recrutar células inflamatórias, revestindo patogénios para torná-los mais facilmente fagocitados e para fazerem poros destrutivos na superfície de patogénios.

A defesa de "primeira linha" inclui barreiras físicas e químicas à infecção, tal como a pele e o revestimento por muco dos intestinos e das vias respiratórias, prevenindo fisicamente a interacção entre o hospedeiro e o patogénio. Os patogénios que penetram estas barreiras encontram moléculas antimicrobianas expressas constitutivamente (*e.g.*, lisozima) que restringem a infecção. A defesa de "segunda linha" inclui células fagocíticas (macrófagos e granulócitos de macrófagos) que podem envolver (fagocitose) substâncias estranhas.

A fagocitose envolve quimiotaxia, em que as células fagocíticas são atraídas pelos microrganismos através de produtos químicos quimiotácticos tais como produtos microbianos, complemento, células danificadas e fragmentos de leucócitos. A quimiotaxia é seguida por adesão, em que o fagócito adere ao microrganismo. A adesão é melhorada por opsonização, em que proteínas do tipo opsoninas revestem a

superfície da bactéria. Tal é seguido por ingestão, na qual o fagócito estende projecções, formando pseudopódes que envolvem o organismo estranho. Finalmente, o patogénio é digerido pelas enzimas no lisossoma, envolvendo espécies reactivas de oxigénio e protéases.

Além disso, as proteínas antimicrobianas podem ser activadas se o patogénio passa através de uma barreira física. Existem várias classes de proteínas antimicrobianas, tais como proteínas de fase aguda (e.g., proteína C reactiva, que melhora a fagocitose e activa o complemento quando se liga a proteína C de *S. pneumoniae*), lisozima e o sistema de complemento).

O sistema de complemento é um grupo muito complexo de proteínas séricas, que é activado de uma forma em cascata. Na activação de complemento estão envolvidas três vias diferentes: (a) uma via clássica que reconhece complexos antigénio-anticorpo, (b) uma via alternativa que se activa espontaneamente em contacto com superfícies de células patogénicas e (c) uma via de lectina de ligação a manose que reconhece açúcares manose, que tendem a aparecer apenas nas superfícies de células patogénicas. Uma cascata de actividade de proteína segue-se à activação de complemento; esta cascata pode resultar numa variedade de efeitos, incluindo opsonização do patogénio, destruição do patogénio pela formação e activação do complexo de ataque à membrana e inflamação.

Os interferões também são proteínas antimicrobianas. Estas moléculas são proteínas que são excretadas pelas células infectadas por vírus. Estas proteínas difundem rapidamente então para células vizinhas, induzindo as células para inibir a propagação da infecção vírica. Essencialmente, estas proteínas antimicrobianas actuam para prevenir a proliferação dos vírus célula a célula.

### **B. Sistema imunitário adaptativo**

O sistema imunitário adaptativo, também denominado "sistema de imunidade adquirida", assegura que a maioria dos mamíferos que sobrevivem à infecção inicial por um patogénio são geralmente imunes a doença posterior causada pelo mesmo

patogénio. O sistema imunitário adaptativo baseia-se em células imunitárias dedicadas denominadas leucócitos (glóbulos brancos) que são produzidas pelas células estaminais na medula óssea e amadurecem no timo e/ou nódulos linfáticos. Em muitas espécies, incluindo mamíferos, o sistema imunitário adaptativo pode ser dividido em: (a) um sistema imunitário humorai que actua contra bactérias e vírus nos líquidos corporais (e.g., sangue) através de proteínas, denominadas imunoglobulinas (também denominadas anticorpos), que são produzidas por células B; e (b) um sistema imunitário celular que destrói células infectadas por vírus (entre outros papéis) com células T (também denominados "linfócitos T"; "T" significa que são desenvolvidos no timo). O sistema imunitário adaptativo é tipicamente dirigido a um patogénio específico, e.g., vacinação.

#### **IV. ORGANISMOS MICROBIANOS**

As concretizações da divulgação incluem composições e métodos relacionados para uma protecção alargada contra uma variedade de patogénios ou patogénios potenciais (e.g., patogénios prioritários NIAID Categorias A, B e C). Por exemplo, a pneumonia bacteriana num hospedeiro normal ocorre a uma taxa de 1/100 pessoas/ano, na maioria dos casos em adultos idosos e crianças de tenra idade e pode ser causada por vários organismos. Mais usualmente é causada por *Streptococcus pneumoniae*, seguido em frequência por *Hemophilus influenzae* encapsulada. Outras bactérias tais como bactérias gram negativas entéricas, anaeróbios e *Staphylococcus aureus* são causas significativas de pneumonia em contextos específicos, tais como unidades de cuidados de saúde. A *Mycobacterium tuberculosis* é altamente infecciosa e historicamente foi uma causa importante de mortalidade mundialmente. Foi maioritariamente controlada com antibióticos no mundo desenvolvido, embora as estirpes multirresistentes continuem a causar problemas e sejam classificadas na Categoria C de agentes de armas biológicas. *Legionella pneumophila* foi primeiramente identificada durante um surto em Philadelphia em 1978, embora agora se reconheça que esteja largamente disseminada a uma baixa taxa endémica relacionada com as fontes ambientes. Igualmente, as infecções fúngicas dos pulmões podem causar doenças sintomáticas em hospedeiros

normais. *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* e *Cryptococcus neoformans* podem todas causar pneumonia relacionada com exposição local a concentrações ambientais elevadas. A pneumonia devida a estes fungos patogénicos é usualmente autolimitada em hospedeiros normais. Alguns microrganismos "atípicos" adicionais, tais como micoplasmas, são responsáveis por uma fracção substancial de pneumonias adicionais em hospedeiros normais. Considera-se que uma composição do presente invento pode proporcionar uma protecção rápida, temporal contra um espectro de agentes que pode causar, por exemplo, pneumonia ou outras doenças. Em determinados aspectos, o presente invento pode ser usado em combinação com um regime de vacinação para proporcionar protecção adicional a um indivíduo que pode ser exposto ou que foi exposto a um ou mais organismos patogénicos ou potencialmente patogénicos.

Em determinados aspectos do invento, as composições podem ser usadas para prevenir, reduzir o risco ou tratar infecção ou exposição a uma arma biológica/micróbio oportunista ou exposição de indivíduos a um agente infeccioso inalado. O único patogénio microbiano que foi usado como arma terrorista na era moderna foi *Bacillus anthracis*, que tem uma taxa de fatalidade de 75% quando a infecção ocorre através das vias respiratórias, mesmo com o uso de antibióticos apropriados. *Francisella tularensis* é um cocobacilo aeróbico, gram negativo que é um patogénio intracelular facultativo. É altamente infeccioso, altamente patogénico e sobrevive em condições ambientais agressivas, tornando-o uma ameaça de arma biológica de terrorismo, mesmo sendo transmitida dificilmente de pessoa para pessoa (Dennis, 2001). Está disponível uma vacina, mas que é apenas parcialmente protectora. A Organização Mundial de Saúde estimou que uma dispersão em aerossol de 50 kg de *Francisella tularensis* virulento numa área metropolitana com 5 milhões de habitantes resultaria em 250000 casos de incapacidade, incluindo 19000 mortes; Os Centros para Controlo de Doença (CDC) estimaram o custo económico de tal ataque em 5,4 mil milhões de dólares americanos por cada 100 000 pessoas expostas (Dennis, 2001).

Outros agentes de bioterrorismo de Classe A que podem ser transmitidos por aerossol são *Yersinia pestis*, vírus da

varíola e vírus da febre hemorrágica. Além disso, vários agentes de Classes B e C podem ser entregues eficazmente pela via respiratória. Conjuntamente, estes organismos compreendem bactérias gram-positivas, gram-negativas, intracelulares e extracelulares, bem como uma variedade de classes víricas. Devido à potencial dificuldade de identificar um agente de bioterrorismo específico, a complexidade de armazenar localmente vacinas imunitárias adaptativas e antibióticos dirigidos contra agentes específicos e a notável virulência de organismos tais como *Bacillus anthracis* mesmo com tratamento apropriado, a estimulação das capacidades de defesa inatas dos pulmões poderia prevenir ou impedir ou atenuar a infecção com um agente de bioterrorismo entregue pela via respiratória; tal efeito poderia ter um elevado valor para a saúde pública.

#### **A. Micróbios patogénicos ou potencialmente patogénicos**

Existem numerosos micróbios que são considerados patogénicos ou potencialmente patogénicos em determinadas condições (i.e., patogénios/micróbios oportunistas). Em determinados aspectos, a patogenicidade é determinada relativamente a infecção através dos pulmões. Os micróbios bacterianos incluem várias espécies dos géneros de bactérias *Bacillus*, *Yersinia*, *Francisella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Burkholderia*, não se lhes limitando. As espécies específicas de bactérias das quais se pode proteger um indivíduo incluem *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureas*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridia spp.*, *Shigella spp.*, *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. paratuberculosis*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. habana*, *M. interjectum*, *M. xenopi*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*, *M. fortuitum*, *M. immunogenum*, *M. chelonae*, *M. marinum*, *M. genavense*, *M. haemophilum*, *M. celatum*, *M. conspicuum*, *M. malmoense*, *M. ulcerans*, *M. smegmatis*, *M. wolinskyi*, *M. goodii*, *M. thermo resistible*, *M. neoaurum*, *M. vaccae*, *M. palustre*, *M. elephantis*, *M. bohemicae* e *M. septicum*, não se lhes limitando.

**B. Vírus**

Existem numerosos vírus e estirpes víricas que são considerados patogénicos ou potencialmente patogénicos em determinadas condições. Os vírus podem ser classificados num dos sete grupos seguintes: Grupo I: vírus com ADN em cadeia dupla, Grupo II: vírus com ADN em cadeia simples, Grupo III: vírus com ARN em cadeia dupla, Grupo IV: vírus com ARN em cadeia simples em sentido positivo, Grupo V: vírus de ARN em cadeia simples em sentido negativo, Grupo VI: vírus de ARN em cadeia simples de transcrição reversa diplóide, Grupo VII: vírus de ADN em cadeia dupla de transcrição reversa circular. Os vírus incluem a família *Adenoviridae*, *Arenaviridae*, *Caliciviridae*, *Coronaviridae*, *Filoviridae*, *Flaviviridae*, *Hepadnaviridae*, *Herpesviridae* (*Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, *Gammaherpesvirinae*), *Nidoviricae*, *Papillomaviridae*, *Paramyxoviridae* (*Paramyxovirinae*, *Pneumovirinae*), *Parvoviridae* (*Parvovirinae*, *Picornaviridae*), *Poxviridae* (*Chordopoxvirinae*), *Reoviridae*, *Retroviridae* (*Orthoretrovirinae*) e/ou *Togaviridae*. Estes vírus incluem várias estirpes de influenza, tal como gripe das aves (e.g., H5N1), não se lhes limitando. Os vírus específicos dos quais se pode proteger um indivíduo incluem Citomegalovírus, vírus sincicial respiratório e semelhantes, não se lhes limitando.

Os exemplos de vírus patogénicos incluem Influenza A, H5N1, Marburg, ébola, dengue, coronavírus de síndrome respiratória aguda grave, vírus da febre amarela, vírus sincicial respiratório humano, vírus *Vaccinium* e semelhantes, não se lhes limitando.

**C. Fungos**

Existem numerosas espécies fúngicas que são consideradas patogénicas ou potencialmente patogénicas em determinadas condições. Pode proporcionar-se protecção para *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* ou *Pneumocystis carinii* e/ou *Blastomyces dermatitidis*, não se lhes limitando.

## V. FORMULAÇÕES E ADMINISTRAÇÃO

As composições farmacêuticas aqui divulgadas podem ser administradas através do sistema respiratório de um indivíduo. Em determinados aspectos, as composições são depositadas no pulmão por métodos e dispositivos conhecidos na especialidade. As composições StIR podem ser preparadas em água adequadamente misturadas com um tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulose. As dispersões também podem ser preparadas em glicerol, polietilenoglicóis líquidos e suas misturas e em óleos. Em condições normais de armazenamento e uso, estas preparações contêm um conservante para evitar o crescimento de microrganismos. As formas farmacêuticas adequadas para inalação incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós estéreis para preparação extemporânea de soluções ou dispersões inaláveis estéreis. Em todos os casos, a forma é tipicamente estéril e capaz de inalação directa ou através de um processo ou dispositivo intermediário. Deve ser estável nas condições de fabrico e armazenamento e deve ser conservada contra a acção contaminante de microrganismos, tal como bactérias e fungos. O transportador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (e.g., glicerol, propilenoglicol e polietilenoglicol líquido e semelhantes), suas misturas adequadas e/ou óleos vegetais. A prevenção da acção de microrganismos pode ser conseguida por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal e semelhantes.

Ocorrerá necessariamente alguma variação de dosagem dependendo da condição do indivíduo em tratamento e das circunstâncias específicas envolvendo exposição ou exposição potencial. A pessoa responsável pela administração determinará, em qualquer circunstância, a dose apropriada para o indivíduo. Além disso, para administração humana, as preparações devem cumprir os padrões de esterilidade, pirogenicidade, segurança geral e pureza requeridos pelo Gabinete de Padrões Biológicos da FDA ou outras organizações semelhantes.

As composições estéreis são preparadas por incorporação dos componentes activos na quantidade necessária no solvente

apropriado, com vários outros ingredientes citados anteriormente, tal como necessário, seguido por exemplo por esterilização por filtração. Em geral, as dispersões são preparadas por incorporação de vários ingredientes activos esterilizados num veículo estéril que contém o meio de dispersão básico e outros ingredientes necessários dos citados anteriormente. No caso de pós estéreis para a preparação de composições estéreis, alguns métodos de preparação são técnicas de secagem em vácuo e liofilização que resultam num pó do ingrediente activo mais quaisquer ingredientes pretendidos adicionais a partir da solução previamente esterilizada por filtração.

A entrega de fármacos pulmonares/respiratórios pode ser implementada por diversas abordagens, incluindo nebulizadores líquidos, inaladores de dose controlada baseados em aerossol (MDI), pulverizadores, dispositivos de dispersão de pós secos e semelhantes. Tais métodos e composições são bem conhecidos pelos peritos na especialidade, tal como indicado pelas patentes U.S. 6 797 258, 6 794 357, 6 737 045 e 6 488 953. De acordo com o invento, pelo menos uma composição farmacêutica pode ser entregue por qualquer de vários dispositivos de inalação ou nasais conhecidos na especialidade para administração de um agente terapêutico por inalação. Outros dispositivos adequados para administração pulmonar directa ou administração nasal são também conhecidos na especialidade. Tipicamente, para administração pulmonar, entrega-se pelo menos uma composição farmacêutica com um tamanho de partícula eficaz para atingir as vias respiratórias inferiores do pulmão ou seios. Alguns exemplos específicos de dispositivos de inalação disponíveis comercialmente adequados para a prática deste invento são Turbohaler™ (Astra), Rotahaler® (Glaxo), Diskus® (Glaxo), inalador Spiros™ (Dura), dispositivos comercializados por Inhale Therapeutics, AERx™ (Aradigm), o nebulizador Ultravent® (Mallinckrodt), o nebulizador Acorn II® (Marquest Medical Products), o inalador de dose controlada Ventolin® (Glaxo), o inalador de pó Spinhaler® (Fisons) ou semelhantes.

Todos tais dispositivos de inalação podem ser usados para a administração de uma composição farmacêutica num aerossol. Tais aerossóis podem compreender quer soluções (tanto aquosas,

como não aquosas), quer partículas sólidas. Os inaladores de dose controlada tipicamente usam um gás propelente e requerem actuação durante a inspiração. Consultar, e.g., WO 98/35888; WO 94/16970. Os inaladores de pó seco usam actuação por respiração de um pó misto. Consultar patentes U.S. 5 458 135; 4 668 218; publicações PCT WO 97/25086; WO 94/08552; WO 94/06498; e pedido europeu EP 0237507. Os nebulizadores produzem aerossóis a partir de soluções, enquanto os inaladores de dose controlada, os inaladores de pó seco e semelhantes geram aerossóis de partículas pequenas. As formulações adequadas para administração incluem pulverizador nasal ou gotas nasais, não se lhes limitando, e podem incluir soluções aquosas ou oleosas de uma composição STIR.

Pode produzir-se um pulverizador compreendendo uma composição farmacêutica do presente invento forçando uma suspensão ou solução de uma composição através de um bocal sob pressão. O tamanho e configuração do bocal, a pressão aplicada e a taxa de alimentação do líquido podem ser seleccionadas para conseguir a saída e o tamanho de partícula pretendidos. Pode produzir-se uma electropulverização, por exemplo, através de um campo eléctrico ligado a uma alimentação através de capilar ou bocal.

Pode administrar-se uma composição farmacêutica do presente invento através de um nebulizador, tal como um nebulizador de jacto ou um nebulizador ultrassónico. Tipicamente num nebulizador de jacto, usa-se uma fonte de ar comprimido para criar um jacto de ar de elevada velocidade através de um orifício. À medida que o gás se expande depois do bocal, cria-se uma região de baixa pressão, que arrasta a composição através de um tubo capilar ligado a um reservatório de líquido. O jacto de líquido do tubo capilar é dividido em filamentos e gotículas instáveis à medida que sai do tubo, criando o aerossol. Pode usar-se uma gama de configurações, caudais e tipos de deflector para conseguir as características de desempenho pretendidas para um determinado nebulizador de jacto. Num nebulizador ultrassônico usa-se energia eléctrica de elevada frequência para criar energia vibracional, mecânica, tipicamente usando conversor piezoeléctrico. Esta energia é transmitida à composição criando um aerossol.

Num inalador de dose controlada (MDI), um propulsor, uma composição e quaisquer excipientes ou outros aditivos estão contidos numa botija como uma mistura com um gás comprimido. A acção da válvula de medição liberta a mistura como um aerossol.

As composições farmacêuticas para uso com um dispositivo de inalação de dose controlada incluirão geralmente um pó finamente dividido contendo uma composição do invento como uma suspensão num meio não aquoso, por exemplo, suspendida num propulsor com a ajuda de um tensioactivo. O propulsor pode ser qualquer material convencional usado para este fim, tal como clorofluorocarboneto, um hidroclorofluorocarboneto, um hidrofluorocarboneto ou um hidrocarboneto incluindo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol e 1,1,1,2-tetrafluoroetano, HFA-134a (hidrofluoroalcano-134a), HFA-227 (hidrofluoroalcano-227) ou semelhantes.

Tal como aqui utilizado, "transportador" inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, veículos, revestimentos, diluentes, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotónicos e de absorção retardada, tampões, soluções transportadoras, suspensões, colóides e semelhantes. O uso de tais meios e agentes para substâncias activas farmacêuticas é bem conhecido na especialidade. A menos que qualquer meio ou agente convencional seja incompatível com o ingrediente activo, abrange-se o seu uso nas composições terapêuticas. Também se podem incorporar ingredientes activos suplementares nas composições.

A frase "farmaceuticamente aceitável" refere-se a entidades moleculares e composições que não produzem uma reacção alérgica ou reacção adversa semelhante quando administradas a um indivíduo. A preparação de uma composição aquosa que contém um polipéptido ou péptido como ingrediente activo é bem entendida na especialidade.

## **VI. TRATAMENTOS DE COMBINAÇÃO**

As composições do presente invento podem ser usadas no contexto de várias aplicações terapêuticas ou profilácticas. De modo a aumentar a eficácia de um tratamento com as composições do presente invento ou para aumentar a protecção de outra terapia (segunda terapia), e.g., vacinação ou terapia antimicrobiana, pode ser desejável combinar estas composições e métodos com outros agentes e métodos eficazes no tratamento, redução do risco de infecção ou prevenção de doenças e condições patológicas, por exemplo, tratamentos antibacterianos, antivíricos e/ou antifúngicos.

Podem usar-se várias combinações; por exemplo, uma composição StIR é "A" e a terapia secundária é "B":

A/B/A    B/A/B    BB/A    A/A/B    A/B/B    B/A/A    A/B/B/B    B/A/B/B  
  
B/B/B/A    B/B/A/B    A/A/B/B    A/B/A/B    A/B/B/A    B/B/A/A  
  
B/A/B/A    B/A/A/B    A/A/A/B    B/A/A/A    A/B/A/A    A/A/B/A

A administração de uma composição do presente invento a um indivíduo seguirá protocolos gerais para a administração através do sistema respiratório e seguir-se-ão também os protocolos gerais para a administração de uma terapia secundária específica, tendo em consideração a toxicidade do tratamento, caso exista. Espera-se que os ciclos de tratamento sejam repetidos tal como necessário. Também se considera que podem ser aplicadas várias terapias padrão, bem como vacinação, em combinação com as terapias descritas.

### **A. Antivíricos**

Em determinados aspectos da divulgação pode usar-se um agente antivírico em combinação com uma composição StIR. Os fármacos antivíricos são uma classe de medicação usada especificamente para tratar infecções víricas e devem ser distinguidos dos viricidas, que desactivam activamente as partículas víricas fora do corpo. A maioria dos antivíricos actualmente disponíveis são concebidos para auxiliar a lidar com VIH, vírus de herpes, vírus de hepatite B e C e vírus de

influenza A e B. Os agentes antivíricos úteis na divulgação incluem imunoglobulinas, amantadina, interferões, análogos de nucleótidos e inibidores de protéase, não se lhes limitando.

Uma estratégia antivírica é interferir com a capacidade do vírus se infiltrar numa célula alvo. Este estágio de replicação vírica pode ser inibido usando agentes que mimetizam a proteína associada a vírus (VAP) e se ligam a receptores celulares. Ou usando agentes que mimetizam o receptor celular e se ligam à VAP. Tal inclui anticorpos anti-VAP, anticorpos anti-idiotípicos de receptor, receptores heterólogos e miméticos de receptor sintéticos. Introduziram-se dois tais "bloqueadores de entrada", amantadina e rimantadina, para combater influenza.

Uma segunda abordagem de terapia antivírica consiste em ter como alvo os processos que sintetizam componentes do vírus, após um vírus invadir uma célula. Uma forma de fazer isto é desenvolver análogos de nucleótidos ou nucleósidos que se parecem com os componentes de montagem de ARN ou ADN, mas que desactivam as enzimas que sintetizam o ARN ou ADN uma vez incorporados os análogos. Os análogos de nucleótidos incluem ribivirina, vidarabina, aciclovir, gangciclovir, zidovudina, didanosina, zalcitabina, estavudina e lamivudina, não se lhes limitando.

Ainda outra técnica antivírica é um conjunto de fármacos baseados em ribozimas, que são enzimas que cortam o ARN ou ADN víricos em locais seleccionados. No seu papel natural, as ribozimas são usadas como parte da sequência de produção vírica, mas estas ribozimas sintéticas são concebidas para cortar ARN e ADN em locais que os inviabilizam.

Alguns vírus incluem uma enzima denominada protéase que corta as cadeias proteicas víricas de modo a poderem ser montadas na sua configuração final. O VIH inclui uma protéase e portanto foi efectuada uma quantidade considerável de investigação para encontrar "inibidores de protéase" que ataquem VIH nessa fase do seu ciclo de vida. Os inibidores de protéase ficaram disponíveis nos anos 90 e provaram ser eficazes, embora possam ter efeitos secundários incomuns, por exemplo causar acumulação de gordura em locais incomuns. Estão

actualmente em desenvolvimento inibidores de protéase melhorados.

O estágio final do ciclo de vida de um vírus é a libertação dos vírus completos da célula hospedeira e esta etapa também tem sido alvo para desenvolver fármacos antivíricos. Dois fármacos denominados zanamivir (RELENZA™) e oseltamivir (TAMIFLU™) que foram introduzidos para tratar influenza previnem a libertação das partículas víricas, bloqueando uma molécula denominada neuraminidase que se encontra na superfície dos vírus da gripe e parece também ser constante numa vasta gama de estirpes de gripe.

Os agentes antivíricos incluem abacavir; acemanano; aciclovir; aciclovir de sódio; adefovir; alovudina; alvircept sudotox; cloridrato de amantadina; amprenavir; aranotina; arildona; mesilato de atevirdina; avridina; cidofovir; cipamfilina; cloridrato de citarabina; mesilato de delavirdina; desciclovir; didanosina; disoxaril; edoxudina; efavirenz; enviradeno; enviroxima; famciclovir; cloridrato de famotina; fiacitabina; fialuridina; fosarilato; fosfonoformato trissódico; fosfoneto de sódio; ganciclovir; ganciclovir de sódio; idoxuridina; indinavir; cetojal; lamivudina; lobucavir; cloridrato de memotina; metisazona; nelfinavir; nevirapina; penciclovir; pirodavir; ribavirina; cloridrato de rimantadina; ritonavir; mesilato de saquinavir; cloridrato de somantadina; sorivudina; statolon; estavudina; cloridrato de tilorona; trifluridina; cloridrato de valaciclovir; vidarabina; fosfato de vidarabina; fosfato de sódio e vidarabina; viroxima; zalcitabina; zidovudina; zinviroxima, interferão, ciclovir, interferão alfa e/ou beta globulina, não se lhes limitando.

Em determinadas concretizações um antivírico é ribivirina e ribivirina de alta dosagem. A ribavirina é um fármaco antivírico que é activo contra vários vírus de ADN e ARN. É um membro dos fármacos nucleósidos antimetabolito que interferem com a duplicação do material genético vírico. Embora não seja eficaz contra todos os vírus, a ribavirina tem uma vasta gama de actividade, incluindo actividades importantes contra influenza, flavivírus e agentes de muitas febres hemorrágicas víricas.

Tipicamente a forma oral da ribavirina é usada no tratamento de hepatite C, em combinação com fármacos interferão peguilados. A forma em aerossol tem sido usada no passado para tratar doenças relacionadas com vírus sincicial respiratório em crianças. No entanto, a sua eficácia foi posta em causa em vários estudos e a maioria das instituições já não a usam.

### **B. Antibacterianos**

Os exemplos de antibacterianos incluem antibióticos -lactama, penicilinas (tal como penicilinas naturais, aminopenicilinas, penicilinas resistentes a penicilinase, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas), cefalosporinas (cefalosporinas de primeira geração, segunda geração e terceira geração) e outras -lactamas (tal como imipenem, monobactamas), inibidores de -lactamase, vancomicina, aminoglicosídeos e espectinomicina, tetraciclinas, cloramfenicol, eritromicina, lincomicina, clindamicina, rifampina, metronidazole, polimixinas, sulfonamidas e trimetoprim e quinolinas, não se lhes limitando. Os antibacterianos também incluem: acedapsona, acetossulfona de sódio, alamecina, alexidina, amdinocilina, amdinocilina pivoxil, amicilina, amifloxacina, mesilato de amifloxacina, amicacina, sulfato de amicacina, ácido aminossalícílico, aminossalícilato de sódio, amoxicilina, anfomicina, ampicilina, ampicilina de sódio, apalcilina de sódio, apramicina, aspartocina, sulfato de astromicina, avilamicina, avoparcina, azitromicina, azlocilina, azlocilina de sódio, cloridrato de bacampicilina, bacitracina, bacitracinametilenodissalícilato, bacitracina de zinco, bambermicinas, benzoilpas de cálcio, beritromicina, sulfato de betamicina, biapenem, biniramicina, cloridrato de bifenamina, bispiritiona magsulfex, buticacina, sulfato de butiroicina, sulfato de capreomicina, carbadox, carbenicilina dissódica, carbenicilina-indanil de sódio, carbenicilina-fenil de sódio, carbenicilina de potássio, carumonam de sódio, cefaclor, cefadroxil, cefamandole, naftato de cefamandole, cefamandole de sódio, cefaparola, cefatrizina, cefazaflur de sódio, cefazolina, cefazolina de sódio, cefbuperazona, cefdinir, cefepima, cloridrato de cefepima, cefetecol, cefixima, cloridrato de cefinenoxima, cefinetazole, cefinetazole de

sódio, cefonicid monossódico, cefonicid de sódio, cefoperazona de sódio, ceforanida, cefotaxima de sódio, cefotetan, cefotetan dissódico, cloridrato de cefotiam, cefoxitina, cefoxitina de sódio, cefpimizole, cefpimizole de sódio, cefpiramida, cefpiramida de sódio, sulfato de cefpiroma, cefpodoxima-proxetil, cefprozil, cefroxadina, cefsulodin de sódio, ceftazidima, ceftibuteno, ceftizoxima de sódio, ceftriaxona de sódio, cefuroxima, cefuroxima-axetil, cefuroxima-pivoxetil, cefuroxima de sódio, cefacetile de sódio, cefalexina, cloridrato de cefalexii, cefaloglicini, cefaloridina, cefalotina de sódio, cefapirina de sódio, cefradina, cloridrato de cetociclina, cetofenicol, cloranfenicol, palmitato de cloranfenicol, complexo cloranfenicol-pantotenato, succinato de cloranfenicol e sódio, clor-hexidina-fosfanilato, cloroxilenol, bissulfato de clortetraciclina, cloridrato de clortetraciclina, cinoxacina, ciprofloxacina, cloridrato de ciprofloxacina, cirolemicina, claritromicina, cloridrato de clinafloxacina, clindamicina, cloridrato de clindamicina, cloridrato de palmitato de clindamicina, fosfato de clindamicina, clofazimina, cloxacilina-benzatino, cloxacilina de sódio, cloxiquina, colistimetato de sódio, sulfato de colistina, couermicina, couermicina de sódio, ciclacilina, ciclosserina, dalfopristina, dapsona, daptomicina, demeclocicina, cloridrato de demeclocicina, demecicicina, denofungina, diaveridina, dicloxacilina, dicloxacilina de sódio, sulfato de dihidrostreptomicina, dipiritiona, diritromicina, doxiciclina, doxiciclina de cálcio, doxiciclina fosfate, hclato de doxiciclina, droxacina de sódio, enoxacina, epicilina, cloridrato de epitetraciclina, eritromicina, acistrato de eritromicina, estolato de eritromicina, etilsuccinato de eritromicina, gluceptato de eritromicina, lactobionato de eritromicina, propionato de eritromicina, estearato de eritromicina, cloridrato de etambutol, etionamida, fleroxacina, floxacilina, fludalanina, flumequina, fosfomicina, fosfomicina trometamina, fumoxicilina, cloreto de furazólio, tartrato de furazólio, fusidato de sódio, ácido fusídico, sulfato de gentamicina, gloximonam, gramicidina, haloprogina, hetacilina, hetacilina de potássio, hexedina, ibafloxacina, imipenem, isoconazole, isepamicina, isoniazida, josamicina, sulfato de canamicina, quitasamicina, levofuraltadona, levopropilcicina de potássio, lexitromicina,

lincomicina, cloridrato de lincomicina, lomefloxacina, cloridrato de lomefloxacina, mesilato de lomefloxacina, loracarbef, mafenida, mecloclicina, sulfossalicilato de mecloclicina, fosfato de megalomicina e potássio, mequidox, meropenem, metaciclina, cloridrato de metaciclina, metenamina, hipurato de metenamina, mandelato de metenamina, meticilina de sódio, metioprima, cloridrato de metronidazole, fosfato de metronidazole, mezlocilina, mezlocilina de sódio, minociclina, cloridrato de minociclina, cloridrato de mirincamicina, monensina, monensina de sódio, mafcilina de sódio, nalidixato de sódio, ácido nalidíxico, natamicina, nebramicina, palmitato de neomicina, sulfato de neomicina, undecilenato de neomicina, sulfato de netilmicina, neutramicina, nifuradeno, nifuraldezona, nifuratel, nifuratrona, nifurdazil, nifurimida, nifuirpirinol, nifurquinazol, nifurtiazole, nitrociclina, nitrofurantoina, nitromida, norfloxacina, novobiocina de sódio, ofloxacina, ormetoprima, oxacilina de sódio, oximonam, oximonam de sódio, ácido oxolínico, oxitetraciclina, oxitetraciclina de cálcio, cloridrato de oxitetraciclina, paldimicina, paraclorofenol, paulomicina, pefloxacina, mesilato de pefloxacina, penamecilina, penicilina G de benzatina, penicilina G de potássio, penicilina G de procaina, penicilina G de sódio, penicilina V, penicilina V de benzatina, penicilina V de hidrabamina, penicilina V de potássio, pentizidona de sódio, fenilaminossalicilato, piperacilina de sódio, pirbenicilina de sódio, piridicilina de sódio, cloridrato de pirlimicina, cloridrato de pivampicilina, pamoato de pivampicilina, probenato de pivampicilina, sulfato de polimicina B, porfiromicina, propicacina, pirazinamida, piritonia de zinco, acetato de quindecamina, quinupristina, racefenicol, ramoplanina, ranimicina, relomicina, repromicina, rifabutina, rifametano, rifamexil, rifamida, rifampina, rifapentina, rifaximina, rolitetraciclina, nitrato de rolitetraciclina, rosaramicina, butirato de rosaramicina, propionato de rosaramicina, fosfato de rosaramicina e sódio, estearato de rosaramicina, rosoxacina, roxarsona, roxitromicina, sanciclina, sanfetrinem de sódio, sarmoxicilina, sarpicilina, escopafungina, sisomicina, sulfato de sisomicina, sparfloxacina, cloridrato de espectinomicina, espiramicina, cloridrato de estalimicina, estefimicina, sulfato de estreptomicina, estreptonicozídeo, sulfabenz, sulfabenzamida, sulfacetamida, sulfacetamida de sódio,

sulfacetina, sulfadiazina, sulfadiazina de sódio, sulfadoxina, sulfaleno, sulfamerazina, sulfameter, sulfametazina, sulfametizole, sulfametoxazole, sulfamonometoxina, sulfamoxole, sulfanilato de zinco, sulfanitran, sulfasalazina, sulfasomizole, sulfatiazole, sulfazamet, sulfisoxazole, sulfisoxazole de acetilo, sulfisoxazole diolamina, sulfomixina, sulopenem, sultamicilina, suncilina de sódio, cloridrato de talampicilina, teicoplanina, cloridrato de temafloxacina, temocilina, tetraciclina, cloridrato de tetraciclina, complexo de tetraciclina e fosfato, tetroxoprim, tiamfenicol, tifencilina de potássio, ticarcilina cresilo de sódio, ticarcilina dissódica, ticarcilina monossódica, ticlatona, cloreto de tiódonio, tobramicina, sulfato de tobramicina, tossufloxacina, trimetoprima, sulfato de trimetoprima, trissulfapirimidinas, troleandomicina, sulfato de trospectomicina, tirotricina, vancomicina, cloridrato de vancomicina, virginiamicina e/ou zorbamicina, não se lhes limitando.

### **B. Antifúngicos**

Os agentes antifúngicos incluem azoles, imidazoles, polienos, posaconazole, fluconazole, itraconazole, anfotericina B, 5-fluorocitosina, miconazole, cetoconazole, miambutol (cloridrato de etambutol), dapsona (4,4' -diaminodifenilsulfona), grânulos de Paser (grânulos de ácido aminossalícílico), rifapentina, pirazinamida, isoniazida, rifadina IV, rifampina, pirazinamida, sulfato de estreptomicina e Trecator-SC (etionamida) e/ou voriconazole (Vfend<sup>TM</sup>), não se lhes limitando.

### **C. Outros agentes**

Em determinados aspectos da divulgação pode usar-se um agente anti-inflamatório em combinação com uma composição StIR.

Os anti-inflamatórios esteróides para uso aqui incluem fluticasona, beclometasona, qualquer seu derivado farmaceuticamente aceitável e qualquer sua combinação, não se lhes limitando. Tal como aqui utilizado, um derivado farmaceuticamente aceitável inclui qualquer seu sal, éster,

éter enólico, éster enólico, ácido, base, solvato ou hidrato. Tais derivados podem ser preparados pelos peritos na especialidade usando métodos conhecidos para tal derivatização.

**Fluticasona** - Propionato de fluticasona é um corticosteróide sintético e tem a fórmula empírica C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>F<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S. Tem o nome químico S-(fluorometil)-6 ,9-difluoro-11 -17-di-hidroxi-16 -metil-3-oxoandrosta-1,4-dieno-17 -carbotiolato,17-propionato. o propionato de fluticasona é um pó branco a esbranquiçado com um peso molecular de 500,6 e é praticamente insolúvel em água, completamente solúvel em dimetilsulfóxido e dimetilformamida e ligeiramente solúvel em metanol e em etanol a 95%.

Numa concretização, as formulações da presente divulgação podem compreender um anti-inflamatório esteróide (e.g., propionato de fluticasona)

**Beclometasona** - Em determinados aspectos o anti-inflamatório esteróide pode ser dipropionato de beclometasona ou o seu mono-hidrato. O dipropionato de beclometasona tem o nome químico 9-cloro-11b,17,21-tri-hidroxi-16b-metilpregna-1,4-dieno-3,20-dino.17,21-dipropionato. O composto pode ser um pó branco com um peso molecular de 521,25; e é apenas ligeiramente solúvel em água (Physicians' Desk Reference), muito solúvel em clorofórmio e completamente solúvel em acetona e em álcool.

Proporcionando anti-inflamatórios esteróides de acordo com a presente divulgação pode melhorar-se as composições do invento, por exemplo, atenuando qualquer inflamação indesejada. Os exemplos de outros anti-inflamatórios esteróides para uso aqui incluem betametasona, triamcinolona, dexametasona, prednisona, mometasona, flunisolídeo e budesonídeo, não se lhes limitando.

De acordo ainda com outro aspecto da divulgação, o agente anti-inflamatório não-esteróide pode incluir aspirina, salicilato de sódio, acetaminofeno, fenacetina, ibuprofeno, cetoprofeno, indometacina, flurbiprofeno, diclofenac, naproxeno, piroxicam, tebufelona, etodolac, nabumetona,

tenidap, alcofenac, antipirina, amimopirina, dipirona, animopirona, fenilbutazona, clofezona, oxifenbutazona, prexazona, apazona, benzidamina, bucoloma, cinchopeno, clonixina, ditrazol, epirizole, fenoprofeno, floctafeninl, ácido flufenâmico, glafenina, indoprofeno, ácido meclofenâmico, ácido mefenâmico, ácido niflúmico, salidifamidas, sulindac, suprofeno, tolmetina, nabumetona, tiaramida, proquazona, bufexamac, flumizole, tinoridina, timegadina, dapsona, diflunisal, benorilate, fosfosal, fenclofenac, etodolac, fentiazac, tilomisole, carprofeno, fenbufeno, oxaprozina, ácido tiaprofénico, pirprofeno, feprazona, piroxicam, sudoxicam, isoxicam, celecoxib, Vioxx®, e/ou tenoxicam.

## VII. KITS

Qualquer das composições aqui descritas pode estar compreendida num kit. Num exemplo não limitativo, os reagentes para produção e/ou entrega de uma composição STIR estão incluídos num kit. Em determinados aspectos, o kit é portátil e pode ser transportado por uma pessoa de forma semelhante à que se transporta um inalador para asma. O kit pode incluir adicionalmente um detector de patogénio. O kit pode também conter um propulsor gasoso ou mecânico para as composições da divulgação.

As componentes dos kits podem ser empacotadas sob a forma aquosa, em pó ou liofilizada. Os meios de embalagem dos kits incluem geralmente pelo menos um inalador, botija, frasquinho, tubo de ensaio, frasco, garrafa, seringa ou outro tipo de recipiente, no qual se pode colocar uma componente e, de preferência, adequadamente dividido em aliquotas. Quando existe mais do que uma componente no kit (segundo agente, etc.), o kit também conterá geralmente um segundo, terceiro ou outro recipiente adicional no qual se podem colocar separadamente as componentes adicionais. No entanto, podem estar compreendidas várias combinações de componentes num frasquinho, botija ou inalador. Um recipiente da divulgação pode incluir uma botija ou inalador que pode ser transportado num cinto ou facilmente transportado no bolso, mochila ou outro recipiente de armazenamento. Os kits da presente divulgação também incluirão tipicamente um recipiente

para as composições descritas ou suas variações e quaisquer outros recipientes de reagentes fechados para venda comercial. Tais recipientes podem incluir recipientes de plástico injectado ou moldado nos quais se prendem os frasquinhos pretendidos.

Quando as componentes do kit são proporcionadas numa e/ou mais soluções líquidas, e.g., a solução líquida é uma solução aquosa, sendo preferida, mas não necessária, uma solução aquosa estéril. No entanto, as componentes do kit podem ser proporcionadas como pó(s) seco(s). Quando se proporcionam os reagentes e/ou componentes como um pó seco, o pó pode ser reconstituído pela adição de um solvente adequado ou administrado numa forma em pó. Considera-se que se pode proporcionar um solvente noutro tipo de recipiente.

Um kit também incluirá instruções para uso das componentes do kit bem como o uso de qualquer outro reagente não incluído no kit. As instruções podem incluir variações que podem ser implementadas.

Considera-se que tais reagentes são concretizações dos kits da divulgação. Tais kits, contudo, não estão limitados aos itens específicos identificados anteriormente e podem incluir qualquer reagente usado directa ou indirectamente na detecção de microrganismos patogénicos ou administração de uma composição STIR da divulgação.

## VIII. EXEMPLOS

Os seguintes exemplos são apresentados com o objectivo de ilustrar várias concretizações do invento e não se pretende que de modo algum limitem o presente invento. Um perito na especialidade considerará facilmente que o presente invento está bem adaptado para pôr em prática os objectos e obter os fins e vantagens mencionadas, bem como os objectos, fins e vantagens aqui inerentes. Os presentes exemplos, conjuntamente com os métodos aqui descritos, são actualmente representativos de determinadas concretizações e não se pretende que limitem o âmbito do invento. Parte dos exemplos foram incluídos com objectivos apenas de referência.

### **EXEMPLO 1**

**Provocação com *P. aeruginosa*.** Obteve-se a estirpe PA103 de ATCC e armazenou-se como solução-mãe congelada ( $1 \times 10^8$  CFU/ml) em glicerol a 20% em meio LB (Bio 101 Systems). Incubou-se 1 ml de solução-mãe durante 16 h em 100 ml de meio LB a 37 °C em CO<sub>2</sub> a 5% e seguidamente diluiu-se em 1 L de meio fresco e cultivou-se a 37 °C durante 6-7 h até D<sub>600</sub> de 0,3, obtendo-se  $\sim 3 \times 10^{10}$  CFU. Centrifugou-se a suspensão, lavou-se, ressuspendeu-se e provocou-se em aerossol; determinaram-se as concentrações bacterianas por plaqueamento de diluições em série em placas de ágar-ágar de soja tríptica (Becton Dickinson). Para formação de aerossol, colocou-se 10 ml da suspensão num nebulizador AeroMist CA-209 (CIS-US) actuado por CO<sub>2</sub> a 5% em ar a 10 L/min para promover ventilação forte. Após 30 min, adicionaram-se mais 5 ml, com um total de 10 ml de suspensão transformada em aerossol durante 60 min completos.

**Tratamento com ligando TLR.** Antes das provocações infecciosas, os ratinhos foram tratados com aerossóis de ligandos TLR, sozinhos ou em combinação ou com PBS (controlo negativo). Todos os tratamentos foram entregues 18 horas antes da provocação infecciosa usando um nebulizador AeroMist CA-209 accionado a 10 L/min suplementado com CO<sub>2</sub> a 5% para promover ventilação. Para cada tratamento, colocou-se 10 ml da suspensão do ligando TLR ou PBS no nebulizador e foi administrado ao longo de 20 min. Para as experiências usando combinações de ligandos TLR, ambos os ligandos foram suspensos na mesma suspensão de 10 ml e foram entregues simultaneamente. Para cada ligando, a dosagem inicial de aerossol foi determinada pela concentração mínima de suspensão à qual a infiltração neutrofílica do pulmão foi induzida, tal como determinado por contagens de leucócitos e neutrófilos totais no fluido de lavagem bronco-alveolar 24 h após tratamento.

**Ligandos TLR 4.** Contrariamente ao lípido A de ocorrência natural que contém uma mistura de 5, 6 e 7 grupos acilo, monofosforil-lípido A sintético (MPLA, Invivogen) é um sintético puro contendo 6 grupos acilo gordos. As suspensões de MPLA foram entregues a 100 µg/ml. Outro lípido A sintético com 6 grupos acilo gordos, hexa-acil-dissacárido fosforilado (PHAD, Avanti Polar Lipids) foi entregue a 100 µg/ml.

**Ligandos TLR 2/6.** Pam2CSK4 e FSL-1 (ambos de Invivogen) são lipopéptidos diacilados sintéticos que se sabe que sinalizam através de heterodímeros de TLR2 e TLR6. Pam2CSK4 foi entregue a 6 ou 20 µg/ml, tal como indicado, e FSL-1 foi entregue a 20 µg/ml.

**Ligando TLR 9.** ODN 2395 (Invivogen) é um oligonucleótido CpG do tipo C com elevada afinidade para TLR9 humano e murino. ODN 2395 foi transformado em aerossol a 20 µg/ml.

**Ligando TLR 7.** Imiquimod (R837, Invivogen) é um análogo de amina de imidazoquinolina guanosina que estimula TLR7 e possivelmente TLR8. Imiquimod foi entregue por aerossol a 1 ou 300 µg/ml, tal como indicado.

**Ligando TLR 5.** Identificou-se um segmento de 22 aminoácidos altamente conservados de flagelina, um ligando conhecido de TLR5. Este segmento de aminoácidos foi submetido para síntese a Cell Essentials, Inc., Boston, MA. Confirmou-se que o péptido tem >95% de pureza com base em HPLC e espectrometria de massa Maldi-TOF e confirmou-se a sua solubilidade em PBS. O fragmento sintético de Flg22 foi entregue a 100 µg/ml.

## EXEMPLO 2

### Materiais e métodos

**Animais e reagentes.** Todos os reagentes gerais foram obtidos de Sigma (St Louis, MO), excepto quando indicado. Todos os ratinhos foram manuseados de acordo com as políticas do Institutional Animal Care and Use Committee da University of Texas M. D. Anderson Cancer Center. Usaram-se ratinhos Swiss-Webster fêmeas de tipo selvagem de cinco a oito semanas de idade (Charles River, Wilmington, MA) para a maioria das experiências de protecção e contagem de células. Tal como indicado, usaram-se ratinhos MyD88<sup>-/-</sup> fêmeas de cinco a oito semanas de idade cedidos por Shizuo Akira (1998), ratinhos Trif<sup>-/-</sup> (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) e ratinhos TLR2<sup>-/-</sup> (Jackson) em comparação com ratinhos C57BL/6J de tipo selvagem (Jackson).

**Tratamentos com aerossol.** Cultivou-se solução-mãe congelada de *Haemophilus influenzae* não tipável (NTHi) em ágar-ágar de chocolate (Remel, Lenexa, KS), expandiram-se em meio de infusão cérebro-coração (Acumedia, Baltimore, MD) suplementado com NAD a 3,5 µg/ml e romperam-se num Emulsiflex C5 (Avestin, Mannheim, Alemanha), tal como descrito (Clement et al., 2008; Evans et al., 2010; Moghaddam et al., 2008). Ajustou-se a concentração de proteína a 2,5 mg/ml em solução salina pelo ensaio bicinconínico (Pierce, Rockford, IL) e congelou-se o lisado em aliquotas de 10 ml a -80 °C. Para tratamento, colocou-se uma aliquota descongelada num nebulizador AeroMist CA-209 (CIS-US) accionada por ar a 10 l/min suplementado com CO<sub>2</sub> a 5% (para promover respiração profunda) durante 20 min. O nebulizador foi ligado a um tubo de polietileno (30 cm x 22 mm) a uma câmara de exposição de polietileno de 10 litros, com um tubo de efluxo idêntico com um filtro microbiano de baixa resistência (BB50T, Pall, East Hills, NY) e a sua extremidade foi ventilada para uma câmara de biossegurança.

Pam3CSK4, Pam2CSK4, Poly(I:C), MPLA, imiquimod e ODN 2395 foram adquiridos a InvivoGen (San Diego, Califórnia). Sintetizou-se um mero de Flg22, o domínio mais conservado de flagelina (QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA), por Cell Essentials (Boston, MA). Para tratar os animais, reconstituíram-se agonistas TLR sintéticos em água isenta de endotoxinas, suspenderam-se em 8 ml de PBS estéril às concentrações indicadas e entregaram-se em aerossol aos animais durante 20 min usando a mesma técnica usada para o tratamento com lisado NTHi.

**Provocações infecciosas in vivo.** Tal como descrito previamente (Clement et al., 2008; Clement et al., 2009; Evans et al., 2010), os ratinhos foram provocados por inalação com inóculos bacterianos na gama alvo de LD<sub>80</sub> - LD<sub>100</sub>. A estirpe PA103 de *P. aeruginosa* foi obtida de ATCC e armazenada como uma solução-mãe congelada ( $1 \times 10^8$  CFU/ml) em glicerol a 20% em meio LB (Bio 101 Systems). Incubou-se 1 ml de solução-mãe durante 16 h em 100 ml de meio LB a 37 °C em CO<sub>2</sub> a 5%, seguidamente diluiu-se em 1 l de meio fresco e cultivou-se a 37 °C durante 6-7 h até DO<sub>600</sub> de 0,3, obtendo-se 1-4 x

$10^{10}$  CFU/ml. Armazenou-se *S. pneumoniae* serotipo 4 como solução-mãe congelada ( $1 \times 10^9$  CFU) em glicerol a 20% em meio Todd-Hewett (Becton Dickinson). Incubou-se 1 ml de solução-mãe descongelada durante 16 h em 150 ml de meio Todd-Hewitt a 37 °C em CO<sub>2</sub> a 5%, seguidamente diluiu-se em 1,5 l de meio fresco e cultivou-se em fase exponencial durante 6-7 h a uma DO<sub>600</sub> de 0,3, obtendo-se 2-6  $\times 10^{11}$  CFU/ml. As suspensões bacterianas foram centrifugadas, lavadas, ressuspensas em 10 ml de PBS e transformadas em aerossol ao longo de um período de 60 min usando um sistema idêntico ao usado para os tratamentos. Determinaram-se as concentrações bacterianas por plaqueamento de diluições em série em placas de ágar-ágar de soja tríptica (Becton Dickinson).

**Quantificação de carga de patogénio no pulmão.** Tal como previamente descrito (Clement et al., 2008; Clement et al., 2009; Evans et al., 2010), imediatamente após infecção com patogénios bacterianos, anestesiaram-se os ratinhos, recolheram-se os seus pulmões e homogeneizaram-se em 1 ml de PBS usando um triturador de tecido de 2 ml (Kontes, Vineland, NJ). Plaquearam-se diluições em série dos homogenados em placas de ágar-ágar de soja tríptica (TSA), incubaram-se a 37 °C durante 16 h e contaram-se as colónias bacterianas.

**Análises de fluido de lavagem bronco-alveolar.** Tal como previamente descrito (Clement et al., 2008; Clement et al., 2009; Evans et al., 2010), obteve-se fluido de lavagem bronco-alveolar (BAL) por instilação e recolha de duas aliquotas de 1 ml cada de PBS através de uma cânula com adaptador de ponta luer (Becton Dickinson) inserida através de anéis da traqueia exposta nos pontos de tempo indicados. Determinou-se a contagem de leucócitos totais com um hemocitómetro (Hauser Scientific, Horsham, PA) e contagem diferencial por citocentrifugação de 300 µl de fluido BAL a 2000 rpm durante 5 min, seguido por coloração Wright-Giemsa.

**Ensaio de morte in vitro.** Tal como previamente descrito (Clement et al., 2008; Clement et al., 2009; Evans et al., 2010), cultivaram-se células MLE-15 e células A549 em placas de 6 poços em RPMI-1640 suplementado com FCS inactivado por calor a 10% e penicilina/estreptomicina a 1% (Invitrogen). Quando o crescimento atingiu 80% de confluência, lavaram-se

as células com PBS, forneceu-se meio fresco isento de antibiótico com FCS inactivado por calor a 10% e tratou-se com 20 µl de PBS ou um volume de 20 µl de ODN 2395 (20 µg/ml), Pam2CSK4 (10 µg/ml) ou ambos em RPMI-1640 contendo FCS inactivado por calor a 10%. Após 4 h, adicionaram-se então a todos os poços 1000 esporos de *Bacillus anthracis* estirpe Sterne ou 2000 CFU de *P. aeruginosa* estirpe PA103. Quatro h após infecção, aspirou-se 20 µl do sobrenadante de cada poço, efectuaram-se diluições em série, plaquearam-se numa placa de ágar-ágar TSA, incubaram-se durante 16 h a 37 °C e contaram-se CFU.

**Microscopia de imunofluorescência.** Cultivaram-se células A549 em lâminas de câmara Lab-Tek II (Nunc, Rochester, NY) em RPMI-1640 suplementado com FCS inactivado por calor a 10% e penicilina/estreptomicina a 1% (Invitrogen) durante 48 h, seguidamente trataram-se com um volume de 20 µl de ODN 2395 marcado com vermelho do Texas (20 µg/ml, Invivogen), Pam2CSK4 marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (10 µg/ml, Invivogen) ou ambos em RPMI-1640 contendo FCS inactivado pelo calor a 10%. Após 2 h, aspirou-se o meio, destacaram-se as câmaras e lavaram-se as células três vezes com PBS gelado. Fixaram-se então as células com paraformaldeído a 4%, parou-se com glicina, lavaram-se três vezes com PBS, efectuou-se contra-coloração nuclear com 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI; 0,1 µg/ml) e analisaram-se por microscopia de fluorescência (microscópio Olympus BX-60, Melville, NY) usando óptica adequada (Vermelho do Texas: excitação = 540 nm; emissão = 620 nm; FITC: excitação = 495 nm, emissão = 520 nm; DAPI: excitação = 360 nm; emissão = 460 nm). As imagens foram recolhidas sequencialmente numa câmara Spot RT controlada por computador (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI) e montadas em Photoshop CS3 (Adobe, San Jose, CA). A sobreposição de fluorescência vermelha e verde têm uma aparência amarela.

**Análise estatística.** Efectuou-se análise estatística usando o utilitário SAS/STAT (versão 8.2, SAS Institute). Usou-se o teste t de Student para comparar títulos bacterianos ou víricos do pulmão entre grupos. A percentagem de ratinhos que sobrevivem a provocações com patogénio foi comparada usando o teste exacto de Fisher e usou-se o teste de log-rank

para comparar a distribuição de sobrevivência estimada pelo método de Kaplan-Meier. Usou-se o teste de ANOVA a um factor teste post-hoc de Dunnett para comparar as contagens diferenciais de fluido BAL entre animais tratados e não tratados.

### **Resultados**

**MyD88, mas não TRIF, é necessário para a indução de resistência a pneumonia por um lisado bacteriano em aerossol.** A estimulação do epitélio pulmonar por um lisado em aerossol de NTHi induz um nível elevado de resistência a uma vasta gama de patogénios microbianos (Clement et al., 2008; Clement et al., 2009; Evans et al., 2010; Tuvim et al., 2009). Para ensaiar se é necessária sinalização TLR para protecção induzida por lisado, provocaram-se por inalação ratinhos deficientes em sinalização TLR através de adaptadores TIR com *P. aeruginosa*. Os ratinhos de tipo selvagem e deficientes em TRIF (*Trif<sup>-/-</sup>*) foram completamente protegidos contra provocações com *P. aeruginosa* letal por pré-tratamento com o lisado bacteriano em aerossol, enquanto não foi possível induzir resistência em ratinhos deficientes em MyD88 (*Myd88<sup>-/-</sup>*; figura 12A e 12B, painéis da esquerda). A protecção está estritamente relacionada com uma indução de morte rápida de patogénio nos pulmões (figura 12A e 12B, painéis da direita). O receptor IL-1 também sinaliza através de MyD88 (Adachi et al., 1998; Medzhitov et al., 1998), mas responde à sinalização de citocina do hospedeiro, em vez de responder aos produtos microbianos directamente. A morte de patogénios foi completamente conservada em ratinhos deficientes em receptor IL-1 (*Il1r<sup>-/-</sup>*; figura 13) estimulados pelo lisado bacteriano em aerossol. Esta constatação indica que nem todos os receptores que sinalizam através de MyD88 são necessários para protecção induzida por lisado e sugere que a sinalização microbiana directa através de TLR é mais importante do que a sinalização indirecta através das citocinas do hospedeiro para resistência epitelial indutível.

**Agonistas TLR individuais induzem um baixo nível de resistência a pneumonia.** Dada a necessidade de sinalização MyD88, os inventores ensaiaram se qualquer dos agonistas TLR sintéticos individuais poderia induzir resistência semelhante

à proporcionada pelo lisado bacteriano em aerossol. Dado que TLR1 e TLR6 são expressos como heterodímeros com TLR2 e dado que ambos TLR7 e TLR8 reconhecem imiquimod, os TLR 1 a 9 de ratinhos poderiam todos ser estimulados pelos seguinte sete ligandos sintéticos: Pam3CSK4 (agonista TLR2/1), Pam2CSK4 (agonista TLR2/6), Poly(I:C) (agonista TLR3), lípido A sintético (MPLA, agonista TLR4), Flg22 (22 mero sintético de flagelina, agonista TLR5), imiquimod (TLR7 e TLR8) ou ODN2395 (agonista TLR9).

A dose de aerossol adequada para estes agonistas era desconhecida, pelo que se formulou uma estratégia para identificar uma dose adequada para entrega aos pulmões para evitar um erro de tipo II ( ). Para cada um dos agonistas TLR sintéticos usados, há uma concentração relatada para a qual é estimulada a excreção de citocina máxima pelas células dendríticas ([DCmax]) (Yamamoto *et al.*, 2003; Aliprantis *et al.*, 1999; Buwitt-Beckmann *et al.*, 2005; Hayashi *et al.*, 2001; Krug *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2003). Com base nos cálculos de entrega eficaz às vias respiratórias de compostos em aerossol (Clement *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2004), os inventores determinaram as concentrações de fluido nebulizador necessárias para atingir [DCmax] na superfície epitelial das vias respiratórias. Embora a resistência induzida por lisado em aerossol não dependa do influxo de leucócitos, o fenómeno de protecção está estreitamente relacionado com o tempo e grandeza da neutrofilia de pulmão induzida (Clement *et al.*, 2008). Assim, para identificar doses suficientes de agonista TLR para ensaio, os inventores começaram à [DCmax] reportada para cada ligando e aumentaram as concentrações nebulizadas de forma logarítmica até se atingir infiltração de leucócitos.

Tal como apresentado na figura 14, em ratinhos tratados com PBS, o número de neutrófilos em fluido BAL é de  $0,1 \times 10^3 \pm 0,2$  células/ml. Apenas Pam2CSK4 demonstrou um aumento significativo de neutrófilos a DCmax, embora todos, excepto poly(I:C) e Flg22, tenham apresentado aumentos significativos dos níveis de neutrófilos nas concentrações de 1 a 2 logaritmos acima de DCmax. Por outro lado, tanto poly(I:C), como Flg22 induziram influxo significativo de macrófagos em BAL 24 h após tratamento. Cada um de Flg22 e imiquimod

apresentaram uma concentração de ligando acima da qual ocorre uma diminuição da infiltração de neutrófilos. Pam2CSK4 induziu um nível de neutrofilia cerca de 5 vezes maior do que Pam3CSK4 e 15 vezes maior do que qualquer outro ligando.

A concentração seleccionada para cada ligando foi a dose mais baixa que induziu um aumento de 10 vezes de neutrófilos/ml ou que induziu a duplicação dos macrófagos (nenhum fez ambos). Embora alguns dos ligandos tenham induzido infiltração celular robusta, nenhum dos agonistas sintéticos proporcionou protecção robusta contra pneumonia por *P. aeruginosa* letal (figura 15). Ocorreu uma tendência para protecção com Pam2CSK4, Flg22 e imiquimod embora estes não tenham atingido significância estatística com experiências individuais ou na média de experiência múltiplas. Os ratinhos tratados com MPLA apresentaram uma tendência não significativa para aumento da mortalidade após provoção com patogénio.

**Uma combinação de agonistas TLR2/6 e TLR9 induz um elevado nível de resistência contra pneumonia.** Embora os agonistas sintéticos sozinhos tenham proporcionado apenas protecção moderada, é possível que a estimulação simultânea de múltiplos PRR seja necessária para induzir um elevado nível de resistência (Clement et al., 2008; Evans et al., 2010). Para determinar se as combinações de agonistas TLR poderiam induzir resistência, os inventores testaram permutações emparelhadas dos sete ligandos sintéticos.

Notavelmente, o tratamento simultâneo com Pam2CSK4 e ODN2395 (ODN + Pam2) resultou numa sobrevivência de 100% dos ratinhos numa provoção de outra forma letal com *P. aeruginosa* gram-negativa (figura 16A, esquerda) e uma sobrevivência de 80% numa provoção letal com *S. pneumoniae* gram-positiva (figura 16B, esquerda). Duplicando a concentração de ambos os ligandos no tratamento com aerossol resultou em 90% de sobrevivência na provoção com *S. pneumoniae* (figura 16B). A protecção de ratinhos com provocações infecciosas letais foi associada a morte sinérgica dos patogénios nos pulmões (figura 16A e 16B, direita) e a duplicação da concentração dos ligandos foi associada com uma tendência para morte mais extensa do patogénio. Foram também verificadas interacções sinérgicas entre Pam2CSK4 e ODN2395 no

recrutamento de leucócitos nos pulmões às 4 e 24 h (figura 16C). Estes resultados indicam que os ligandos para TLR2/6 e TLR9 induzem activação sinérgica de respostas de efector antimicrobiano, incluindo as respostas para morte de patogénio e recrutamento de leucócitos, que resultam num nível sinérgico de protecção contra pneumonia. De modo semelhante à cinética de resistência induzida por lisado NTHi, esteve presente protecção às 4 h após tratamento.

**Nem todas as combinações de agonistas TLR produzem protecção robusta contra infecção.** Os inventores ensaiaram as seguintes combinações de agonistas TLR: Pam2 + Poly (I:C), Pam2 + Flg22, Pam2 + Imiquimod, ODN + Poly (I:C), ODN + Flg 22 e ODN + Pam3. Os inventores verificaram que estas combinações foram menos eficazes na protecção contra uma provação com *P. aeruginosa* (figuras 17A-F), comparativamente à combinação Pam2-ODN (figura 16). Estes resultados sugerem que nem todas as combinações de agonistas TLR conferem a mesma estimulação imunitária de Pam2-ODN.

**TLR2 é suficiente para promover sinergia protectora Pam2CSK4 e ODN2395, mas não é necessária para resistência induzida.** A detecção de efeitos sinérgicos dos ligandos TLR Pam2CSK4 e ODN2395, que têm especificidades de receptor bem definidas, proporciona presumíveis evidências da participação de TLR2/6 e TLR9. Os inventores procuraram evidência adicional usando ratinhos knockout e ligandos adicionais.

Os inventores compararam a sobrevivência de ratinhos de tipo selvagem e deficientes em TLR2 pré-tratados com Pam2-ODN ou PBS antes de provação com *P. aeruginosa*. Enquanto os ratinhos de tipo de selvagem foram completamente protegidos por Pam2-ODN, não houve qualquer sobrevivente quer no grupo de tipo selvagem, quer no grupo *Tlr2<sup>-/-</sup>* com tratamento simulado (figura 18A, painel esquerdo), confirmando a necessidade de TLR2 em protecção induzida por Pam2-ODN. A perda de protecção nos ratinhos *Tlr2<sup>-/-</sup>* foi estreitamente relacionada com a perda de morte de patogénio intrapulmonar induzida por Pam2-ODN (figura 18A, painel direito).

Dado que Pam2CSK4 e Pam3CSK4 discriminam entre TLR2/6 e TLR2/1, e Pam2CSK4, mas não Pam3CSK4, produz um forte efeito

protector sinérgico quando combinado com ODN2395, os heterodímeros TLR2/6 podem ser necessários para induzir resistência epitelial pulmonar. Os inventores também provocaram ratinhos *Tlr2<sup>-/-</sup>* e de tipo selvagem após tratamento com lisado NTHi e não verificaram nem perda de protecção (figura 18B, painel esquerdo), nem um defeito na morte bacteriana induzida por lisado (figura 18B, painel direito). Conjuntamente estes resultados sugerem que TLR2/6 é suficiente para actuar sinergicamente com TLR9, mas não é necessário para toda a resistência epitelial pulmonar induzida.

**Os CpG ODN de classe C, mas não de classe A ou B, interactuam sinergicamente com Pam2CSK4 para induzir resistência a pneumonia bacteriana.** Os inventores procuraram avaliar adicionalmente se TLR9 é necessário para interacção sinérgica de Pam2-ODN. Dado que não estavam disponíveis ratinhos *Tlr9<sup>-/-</sup>*, os inventores ensaiaram o envolvimento de TLR9 usando um ODN aleatório que se sabe que não se liga a TLR9. Enquanto o pré-tratamento com Pam2-ODN resultou em 90% de sobrevivência de ratinhos provocados com *P. aeruginosa*, nenhum sobreviveu quando foram pré-tratados com Pam2CSK4 e com ODN de controlo (figura 19A), indicando que a ligação de TLR9 a ODN é necessária para a protecção sinérgica.

Para explorar adicionalmente a especificidade da interacção Pam2-ODN, os inventores trataram ratinhos de tipo selvagem com Pam2CSK4 e diferentes classes de CpG ODN antes de provação com *P. aeruginosa*. A combinação de um ODN de classe A (ODN 1585 ou ODN 2216) ou um ODN de classe B (ODN 2006-G5) com Pam2SCK4 não conferiu qualquer protecção, enquanto a combinação de Pam2CSK4 com um ODN de classe C (ODN M362 ou ODN 2395) promoveu resistência significativa contra pneumonia que de outra forma era letal (figura 19B). Estes resultados indicam que, não só os ligandos TLR2/6 e TLR9 têm interacção sinérgica, como são ligandos específicos que interactuam mais favoravelmente do que outros.

**Pam2CSK4 e ODN2395 induzem morte bacteriana por células epiteliais in vitro.** As células epiteliais de pulmão sofrem indução para matarem bactérias *in vitro* quando estimuladas com lisado NTHi (Clement et al., 2009; Evans et al., 2010). Dado que Pam2-ODN reproduziu o efeito de imuno-estimulação do

lisado bacteriano *in vivo*, os inventores testaram também se a combinação poderia induzir morte de patogénio por células epiteliais de pulmão isoladas *in vitro*. O pré-tratamento de células epiteliais respiratórias MLE-15 murinas durante 4 h com Pam2-ODN reduziu significativamente as CFU bacterianas em meio de cultura celular após inoculação com *B. anthracis* (figura 20A). De igual modo, o tratamento de células A549 humanas com Pam2-ODN resultou em diminuições significativas em CFU de *P. aeruginosa* 4 h após infecção (figura 20C). Demonstrando que a morte de patogénio ocorre através de estimulação de células epiteliais e não através de efeitos directos de Pam2-ODN como antibiótico, as bactérias cresceram em número igual em poços que não continham quaisquer células epiteliais, quer fossem tratadas com Pam2-ODN, quer com PBS (figuras 20B e 20D).

Assim, o efeito antimicrobiano é induzido em células epiteliais tanto murinas, como humanas e resulta e morte de patogénios bacterianos tanto gram-positivos, como gram-negativos. Estes dados mimetizam a morte bacteriana verificada *in vivo* após tratamento com Pam2-ODN. Os aumentos em série da dose de Pam2-ODN até 32 vezes mais alta do que a aqui indicada não aumentou significativamente a morte de patogénio.

**Pam2CSK4 e ODN2395 co-localizam-se intracelularmente *in vitro*.** O mecanismo pelo qual Pam2CSK4 e ODN2395 interactuam para induzir sinergia permanece não resolvido. Dado que é relatado que TLR2/6 se localiza na membrana plasmática e é relatado que TLR9 se localiza nos endossomas (Beutler, 2009; Dostert *et al.*, 2008), não seria de prever interacção física dos ligandos. No entanto, dado que TLR4 pode necessitar de internalização de modo a sinalizar (Kagan *et al.*, 2008), os inventores investigaram se os dois ligandos foram internalizados por células epiteliais. Cultivaram-se células A549 em monocamada em lâminas de cultura celular, seguidamente trataram-se com Pam2CSK4 marcado com FITC (10 µg/ml) e ODN2395 marcado com vermelho de Texas (20 µg/ml) nas mesmas concentrações usadas em experiências de morte de patogénio. Após 2 horas, lavaram-se as células, marcaram-se os núcleos com DAPI e sujeitaram-se as lâminas a microscopia de fluorescência. Tanto Pam2CSK4, como ODN2395 foram

internalizados pelas células epiteliais. Além disso, Pam2CSK4 e ODN2395 co-localizam-se no compartimento citoplasmático, presumivelmente dentro de endossomas. Estes resultados sugerem que Pam2CSK4 e ODN2395 podem co-localizar-se dentro de endossomas.

O pré-tratamento com a combinação de Pam2CSK4, um agonista TLR2/6, e um ODN de classe C (2395, 10101 ou M362), agonistas TLR9, induz níveis elevados de resistência a infecção pulmonar com *Bacillus anthracis* e vírus influenza. Os ratinhos foram pré-tratados com ligandos TLR em aerossol, tal como indicado, um dia antes de provação intranasal com esporos de antraz ou provação em aerossol com vírus influenza. Monitorizou-se a sobrevivência dos ratinhos.

### **REFERÊNCIAS**

- Patente U.S. 5 268 376
- Patente U.S. 5 346 905
- Patente U.S. 5 352 784
- Patente U.S. 5 389 640
- Patente U.S. 5 389 640
- Patente U.S. 5 389 640
- Patente U.S. 5 395 937
- Patente U.S. 5 458 135
- Patente U.S. 5 482 936
- Patente U.S. 5 494 916
- Patente U.S. 5 525 612
- Patente U.S. 6 039 969
- Patente U.S. 6 110 929
- Patente U.S. 6 110 929
- Patente U.S. 6 194 425
- Patente U.S. 6 331 539
- Patente U.S. 6 331 539
- Patente U.S. 6 451 810
- Patente U.S. 6 488 953
- Patente U.S. 6 737 045
- Patente U.S. 6 794 357
- Patente U.S. 6 797 258
- Pedido de patente U.S. 11/830 622
- Publicação de patente U.S. 20030225016
- Publicação de patente U.S. 2004/0162309

- Publicação de patente U.S. 2004/0171086  
Patente U.S. Nº de série 10/844 933  
Abuchowski et al., *J. Biol. Chem.*, 252:582, 1977.  
Adachi et al., *Immunity*, 9:143-150, 1998.  
Akinbi et al., *J. Immunol.*, 165(10):5760-6, 2000.  
Akira et al., *Biochem. Soc. Trans.*, 31(Pt 3):637-42, 2003.  
Akira et al., *Cell*, 124:783-801, 2006.  
Alexopoulou et al., *Nature*, 413:732-738, 2001.  
Aliprantis et al., *Science*, 285:736-739, 1999.  
Aliprantis et al., *Science*, 285:736-739, 1999.  
Bals e Hiemstra, *Curr. Drug Targets*, 7(6):743-50, 2006.  
Bals e Hiemstra, *Eur. Respir. J.*, 23(2):327-33. 20, 2004.  
Bals e Hiemstra, *Eur. Respir. J.*, 23:327-333, 2004.  
Barker et al., *J. Med. Chem.*, 35:2040-2048, 1992.  
Bartlett et al., *Microbiol.*, 15:147-163, 2008.  
Beauchamp et al., *Anal. Biochem.*, 131:25, 1983.  
Beutler, *Blood*, 113:1399-1407, 2009.  
Biological Approaches to the Controlled Delivery of Drugs,  
R. L. Juliano, New York Academy of Sciences, 1988.  
Buwitt-Beckmann et al., *FEBS J.*, 272:6354-6364, 2005.  
Chen et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 660:293, 1981.  
Clement et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 177:1322-  
1330, 2008.  
Clement et al., *Respir. Res.*, 10:70, 2009.  
Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al.  
(Ed.), 1987.  
Dennis et al., *JAMA*, 285:2763-2773, 2001.  
Dostert et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 60:830-840, 2008.  
Edwards et al., *Cancer Res.*, 62:4671-4677, 2002.  
Pedido europeu EP 0237507  
Evans et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 31(4):382-  
94, 2004.  
Evans et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 32(6): 490-  
7, 2005.  
Evans et al., *Am. J. Respir. Cell Molec. Biol.*, 42:40-50,  
2010.  
Evans et al., *Annu. Rev. Physiol.*, (72) 413-35, 2010.  
Fanger et al., *J. Leukocyte Biology*, 66:231-236, 1999.  
Forteza et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 32(5):462-  
9, 2005.  
Gorden et al., *J. Immunol.*, 174:1259-1268, 2005.  
Hayashi et al., *Nature*, 410:1099-1103, 2001.

- Hiemstra, *Exp. Lung Res.*, 33:537-542, 2007.
- Hippenstiel et al., *Respir. Res.*, 7:97, 2006.
- Hruby et al., *Biochem J.*, 268:249-262, 1990.
- Hydrolysis in Drug e Prodrug Metabolism: Chemistry, Biochemistry, and Enzymology, Bernard Testa, Vch Verlagsgesellschaft Mbh, 2003.
- Ishii et al., *Cell Host Microbe.*, 3:352-363, 2008.
- Janeway, Jr. e Medzhitov, *Annu. Rev. Immunol.*, 20:197-216, 2002.
- Kagan et al., *Nat. Immunol.*, 9:361-368, 2008.
- Kaisho et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1589(1):1-13, 2002.
- Keamey et al., *Immunity*, 1:327, 1994.
- Kellner et al., *Biol. Chem.* 373:1:51-5, 1992.
- Kita et al., *Drug Des. Delivery*, 6:157, 1990.
- Knauf et al., *J. Biol. Chem.*, 263:15064, 1988.
- Knowles et al., *J. Clin. Invest.*, 109(5):571-7, 2002.
- Krug et al., *Eur. J. Immunol.*, 31:2154-2163, 2001.
- Kyte e Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.
- Lee et al., *J. Lipid Res.*, 44:479-486, 2003.
- Lee et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:6646-6651, 2003.
- Martin e Frevert, *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 2(5):403-11, 2005.
- Martin et al., *Infect. Immun.*, 71:2498-2507, 2003.
- Medzhitov e Janeway, Jr., *Curr. Opin. Immunol.*, 9(1):4-9, 1997.
- Medzhitov e Janeway, Jr., *Trends Microbiol.*, 8(10):452-456, 2000.
- Medzhitov et al., *Mol. Cell*, 2(2):253-8, 1998.
- Mizgerd, *N. Engl. J. Med.*, 358:716-727, 2008.
- Moghaddam et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 38:629-638, 2008.
- Mondino et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(6):2245-52, 1996.
- Morgan e Gainor, *Ann. Rep. Med. Chem.*, 24:243-252, 1989.
- Nagase et al., *J Immunol.*, 171(8):3977-82, 2003.
- O' Neill e Bowie, *Nat. Rev. Immunol.*, 7:353-364, 2007.
- Or et al., *J. Org. Chem.*, 56:3146-3149, 1991.
- Pedido PCT WO 00/76518
- Pedido PCT WO 02/46189
- Pedido PCT WO 02/46192
- Pedido PCT WO 02/46193

- Pedido PCT WO 94/06498  
Pedido PCT WO 94/08552  
Pedido PCT WO 94/16970  
Pedido PCT WO 97/25086  
Pedido PCT WO 98/16427  
Pedido PCT WO 98/35888  
Pedido PCT WO 98/55495  
Poltorak et al., *Science*, 282(5396):2085-8, 1998.  
Prodrugs: Topical and Ocular Drug Delivery, Kenneth Sloan, Marcel Dekker; 1992.  
Pulendran et al., *J. Exp. Med.*, 188(11):2075-82, 1998.  
Rogan et al., *Respir. Res.*, 7:29, 2006.  
Roman et al., *Nat. Med.*, 3(8):849-54, 1997.  
Schutte e McCray, *Annu. Rev. Physiol.*, 64:709-748, 2002.  
Seifer et al., *Biochem. J.*, 26:795-802, 1990.  
Shi et al., *J. Biol. Chem.*, 284:20540-20547, 2009.  
Takeda e Akira, *J. Dermatol. Sci.*, 34(2):73-82, 2004.  
Takeda e Akira, *Semin. Immunol.*, 16:3-9, 2004.  
Takeuchi et al., *Int. Immunopharmacol.*, 1(4):625-35, 2001.  
Travis et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 13(1):89-95, 2001.  
Tsutsumi et al., *J. Controlled Rel.*, 33:447, 1995.  
Tuvim et al., *PLoS ONE*, 4:e4176, 2009.  
Vroegop et al., *Intl. J. Immunopharmacol.*, 21:647-662, 1999.  
Williams et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 34(5):527-36. 10, 2006.  
Yamamoto et al., *Science*, 301:640-643, 2003.

### **LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS**

<110> DICKEY, BURTON  
TUVIM, MICHAEL  
EVANS, SCOTT  
<120> COMPOSIÇÕES PARA ESTIMULAÇÃO DA RESISTÊNCIA  
IMUNITÁRIA INATA DE MAMÍFEROS CONTRA PATOGÉNIOS  
<130> TAMK:252WO  
<140> DESCONHECIDO  
<141> 2010-03-25  
<150> 61/163,137  
<151> 2009-03-25  
<150> 61/179,246  
<151> 2009-05-18

<160> 3  
<170> PatentIn versão 3.5  
<210> 1  
<211> 1651  
<212> PRT  
<213> Enterococcus faecalis  
<400> 1

Met Lys Lys Lys Thr Phe Ser Phe Val Met Leu Ser Ile Leu Leu Ala  
1 5 10 15

Gln Asn Phe Gly Phe Ala Val Asn Ala Tyr Ala Val Thr Thr Thr Glu  
20 25 30

Ala Gln Thr Glu Thr Thr Asp Thr Ala Lys Lys Glu Ala Glu Leu Ser  
35 40 45

Asn Ser Thr Pro Ser Leu Pro Leu Ala Thr Thr Thr Ser Glu Met  
50 55 60

Asn Gln Pro Thr Ala Thr Thr Glu Ser Gln Thr Thr Glu Ala Ser Thr  
65 70 75 80

Thr Ala Ser Ser Asp Ala Ala Thr Pro Ser Glu Gln Gln Thr Thr Glu  
85 90 95

Asp Lys Asp Thr Ser Leu Asn Glu Lys Ala Leu Pro Asp Val Gln Ala  
100 105 110

Pro Ile Thr Asp Glu Leu Leu Asp Ser Met Ser Leu Ala Pro Ile Gly  
115 120 125

Gly Thr Glu Tyr Ser Gln Thr Glu Val His Arg Glu Leu Asn Thr Thr  
130 135 140

Pro Val Thr Ala Thr Phe Gln Phe Ala Val Gly Asn Thr Gly Tyr Ala  
145 150 155 160

Pro Gly Ser Val Tyr Thr Val Gln Leu Pro Glu His Leu Gly Tyr Ser  
165 170 175

Thr Val Ser Gly Glu Val Thr Gly Ile Gly Ala Thr Trp Ala Val Asp  
180 185 190

Ala Ala Thr Lys Thr Leu Ser Ile Thr Phe Asn Gln Arg Val Ser Asp  
195 200 205

Thr Ser Phe Lys Val Glu Leu Lys Ser Tyr Leu Thr Thr Glu Ala Glu  
210 215 220

Pro Leu Ile Lys Ile Glu Thr Pro Gly Lys Asn Lys Lys Thr Tyr Ser  
225 230 235 240

Phe Asp Leu Tyr Glu Gln Val Glu Pro Ile Gln Tyr Asn Glu Arg Thr  
245 250 255

Arg Thr Thr Gly Leu Asp Gly Glu Ile Phe Tyr Asn Leu Asp Arg Thr  
260 265 270

Leu Thr Gly Asn Gln Thr Leu Glu Leu Leu Thr Thr Glu Thr Pro Gly  
275 280 285

Ala Val Phe Gly Lys Gln Asp Asn Leu Glu Pro Gln Val Phe Ser Tyr  
290 295 300

Asp Val Asp Ile Asn Gly Gln Ile Leu Pro Glu Thr Gln Thr Leu Leu  
305 310 315 320

Thr Pro Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Asp Asn Ser Leu Gly Arg Ile  
325 330 335

Ala Val Thr Val Pro Asn Met Asn Gln Gln Lys Ala Tyr Ser Leu Ser  
340 345 350

Ile Asn Arg Thr Ile Tyr Leu Glu Ser Ala Ser Asp Tyr Asn Tyr Leu  
355 360 365

Tyr Ser Gln Gln Tyr Pro Thr Thr Lys Ile Gly Ser Ile Ser Leu Lys  
370 375 380

Ser Thr Thr Gly Thr Lys Gln Thr Thr Asp Phe Thr Ala Lys Thr Ser  
385 390 395 400

Gln Thr Ser Lys Val Ile Ala Asp Arg Glu Met Arg Ser Met Ser Tyr  
405 410 415

Ile Ser Phe Gln Ser Lys Gly Lys Tyr Tyr Val Thr Ile Tyr Gly Thr  
420 425 430

Leu Thr Glu Thr Lys Val Gly Gln Gln Ile Val Leu Glu Ser Thr Asn  
435 440 445

Gly Gln Glu Ile Lys Asn Pro Lys Phe Thr Ala Tyr Gly Pro Leu Tyr  
450 455 460

Glu Asn Val Lys Leu Glu Asp Tyr Phe Asp Ile Lys Thr Glu Gly Gly  
465 470 475 480

Lys Leu Thr Leu Thr Ala Thr Lys Asp Ser Tyr Leu Arg Ile Asn Ile  
485 490 495

Ser Asp Leu Thr Met Asp Phe Asp Lys Lys Asp Ile Asn Leu Ser Leu  
500 505 510

Ser Thr Pro Val Ile Gly Pro Asn Lys Ala Ile Gln Leu Val Ser Asp  
515 520 525

Gln Tyr Ile Glu Pro Ile Ser Val Val Asn Pro Leu Asn Ala Glu Thr  
530 535 540

Ala Trp Gly Asn Tyr Asp Gln Asn Gly Ala Tyr Ser Ser Arg Thr Thr  
545 550 555 560

Val Ser Val Met Gly Ser Lys Glu Lys Pro Ile Gln Asn Leu Glu Ile  
565 570 575

Lys Val Lys His Pro Asn Tyr Leu Ser Leu Arg Ala Thr Lys Glu Ile  
580 585 590

Tyr Phe Tyr Tyr Lys Leu Gly Thr Asp Tyr Thr Val Thr Pro Thr Ser  
595 600 605

Asp Gly Ser Val Ile Lys Phe Thr Thr Pro Ile Thr Asn Glu Ile Gln  
610 615 620

Ile Pro Ile Gly Phe Asn Tyr Val Pro Asp Ser Leu Pro Lys Asp Lys  
625 630 635 640

Ser Ile Pro Val Asp Thr Ile Pro Ile Thr Met Ser Ala Glu Gly Leu  
645 650 655

Thr Pro Val Asp Thr Thr Val Thr Thr Asn Ser Lys Arg Gly Ser Glu  
660 665 670

Arg Thr Leu Gln Ser Ser Lys Asn Gln Phe Leu Val Asn Ala Arg Asn  
675 680 685

Asp Ser Phe Asp Ser Leu Ser Val Arg Thr Lys Ile Pro Ala Gly Ala  
690 695 700

Asp Val Leu Phe Asp Ile Tyr Asp Val Ser Asn Asp Gln Val Asp Ser  
705 710 715 720

Ile Tyr Pro Gln Tyr Trp Asp Arg Gly Gln Tyr Phe Asp Lys Pro Met  
725 730 735

Thr Pro Asn Ser Pro Gly Tyr Pro Thr Ile Thr Phe Asp Glu Asn Thr  
740 745 750

Asn Ser Tyr Thr Phe Asp Phe Gly Lys Thr Asn Lys Arg Tyr Ile Ile  
755 760 765

Glu Tyr Lys Asn Ala Asn Gly Trp Ile Asp Val Pro Thr Leu Tyr Ile  
770 775 780

Thr Gly Thr Ala Lys Glu Pro Gln Ser Asn Asn Asn Glu Gly Ser Ala  
785 790 795 800

Ser Val Ser Val Gln Asn Glu Ala Leu Asp Ile Leu Ser Ala Thr Gln  
805 810 815

Ala Ala Asn Pro Thr Leu Lys Asn Val Thr Lys Thr Thr Val Thr Thr  
820 825 830

Lys Asn Ile Asp Asn Lys Thr His Arg Val Lys Asn Pro Thr Ile Glu  
835 840 845

Leu Thr Pro Lys Gly Thr Thr Asn Ala Gln Ile Asp Leu Asn Ser Ile  
850 855 860

Thr Val Lys Gly Val Pro Glu Asp Ala Tyr Ser Leu Glu Lys Thr Thr  
865 870 875 880

Asn Gly Ala Lys Val Ile Phe Lys Asp Tyr Thr Leu Thr Glu Asn Ile  
885 890 895

Thr Ile Glu Tyr Asn Thr Val Ser Ala Asn Ala Gly Gln Ile Tyr Thr  
900 905 910

Glu Thr Thr Ile Asp Ser Glu Thr Leu Asn Gln Met Ser Ala Ser Lys

915

920

925

Lys Lys Val Thr Thr Ala Pro Ile Thr Leu Lys Phe Ser Glu Gly Asp  
930 935 940

Ala Glu Gly Ile Val Tyr Leu Ala Thr Ala Thr Phe Tyr Thr His Asn  
945 950 955 960

Val Glu Asp Glu Asn Gln Ala Ile Ala Lys Val Ser Phe Glu Leu Ile  
965 970 975

Asp Asn Val Thr His Thr Ala Thr Glu Phe Thr Thr Asp Glu Lys Gly  
980 985 990

Gln Tyr Ser Phe Asp Ala Ile Met Thr Gly Asp Tyr Thr Leu Arg Val  
995 1000 1005

Thr Asn Val Pro Gln Glu Tyr Ser Val Asp Glu Glu Tyr Leu Thr  
1010 1015 1020

Gly Lys Ala Ile Lys Leu Val Lys Gly Asp Asn Gln Leu Lys Ile  
1025 1030 1035

Pro Leu Thr Lys Thr Ile Asp His Ser Arg Leu Gln Val Lys Asp  
1040 1045 1050

Ser Thr Ile Tyr Val Gly Asp Ser Trp Lys Pro Glu Glu Asn Phe  
1055 1060 1065

Val Ser Ala Thr Asp Lys Thr Gly Gln Asp Val Pro Phe Glu Lys  
1070 1075 1080

Ile Thr Val Ser Gly Gln Val Asp Asn Thr Lys Ala Gly Val Tyr  
1085 1090 1095

Pro Ile Ile Tyr Ser Asp Glu Gly Lys Glu Glu Thr Ala Tyr Val  
1100 1105 1110

Thr Val Lys Pro Asp Gln Ser Lys Leu Glu Val Lys Asp Thr Thr  
1115 1120 1125

Ile Tyr Val Gly Asp Ser Trp Lys Pro Glu Asp Asn Phe Val Ser  
1130 1135 1140

Ala Thr Asp Lys Thr Gly Gln Asp Val Pro Phe Glu Lys Ile Asp  
1145 1150 1155

Val Gln Gly Thr Val Asn Val Asp Lys Ile Gly Asp Tyr Glu Ile  
1160 1165 1170

Val Tyr Lys Asn Gly Lys Lys Glu Ala Lys Ala Ile Val His Val  
1175 1180 1185

Arg Asp Asp Ser Gln Leu Glu Val Lys Asp Thr Thr Ile Tyr Val  
1190 1195 1200

Gly Asp Ser Trp Lys Pro Glu Asp Asn Phe Val Ser Ala Thr Asp  
1205 1210 1215

Lys Thr Gly Gln Asp Val Pro Phe Glu Lys Ile Thr Val Ser Gly  
1220 1225 1230

Gln Val Asp Thr Ser Lys Ala Gly Val Tyr Pro Ile Val Tyr Ser  
1235 1240 1245

Tyr Glu Gly Lys Glu Glu Thr Ala Asn Val Thr Val Lys Pro Asp  
1250 1255 1260

Gln Ser Lys Leu Glu Val Lys Asp Thr Thr Ile Tyr Val Gly Asp  
1265 1270 1275

Lys Trp Glu Pro Glu Asp Asn Phe Val Ser Ala Thr Asp Lys Thr  
1280 1285 1290

Gly Gln Asp Val Pro Phe Glu Lys Ile Asp Val Gln Gly Thr Val  
1295 1300 1305

Asn Val Asp Lys Ile Gly Asp Tyr Glu Ile Val Tyr Lys Asn Gly  
1310 1315 1320

Thr Lys Glu Ala Lys Ala Ile Val His Val Arg Asp Asp Ser Gln  
1325 1330 1335

Leu Glu Val Lys Asp Thr Thr Ile Tyr Val Gly Asp Lys Trp Glu  
1340 1345 1350

Ala Glu Asp Asn Phe Val Ser Ala Thr Asp Lys Thr Gly Gln Asp  
1355 1360 1365

Val Pro Phe Glu Lys Ile Asp Val Gln Gly Thr Val Asn Val Asp  
1370 1375 1380

Lys Ile Gly Asp Tyr Glu Ile Val Tyr Lys Asn Gly Thr Lys Glu  
1385 1390 1395

Ala Lys Ala Ile Val His Val Arg Asp Asp Ser Arg Leu Gln Val  
1400 1405 1410

Lys Asp Thr Thr Ile Tyr Val Gly Asp Ser Trp Lys Pro Glu Glu  
 1415 1420 1425

Asn Phe Val Ser Ala Thr Asp Lys Thr Gly Gln Asp Val Pro Phe  
 1430 1435 1440

Glu Lys Ile Thr Val Ser Gly Gln Val Asp Thr Ser Lys Ala Gly  
 1445 1450 1455

Val Tyr Pro Ile Ile Tyr Ser Tyr Glu Gly Lys Glu Glu Thr Ala  
 1460 1465 1470

His Val Ala Val Lys Pro Asp Gln Ser Lys Leu Glu Val Lys Asp  
 1475 1480 1485

Thr Thr Ile Tyr Val Gly Asp Ser Trp Lys Pro Glu Asp Asn Phe  
 1490 1495 1500

Val Ser Ala Thr Asp Arg Asp Gly His Ala Ile Ser Phe Asp Lys  
 1505 1510 1515

Val Gln Val Lys Gly Glu Val Asp Thr Lys Lys Thr Gly Glu Tyr  
 1520 1525 1530

Gln Ile Ser Tyr Thr Thr Glu Pro Val Asn Glu Thr Lys Pro Ala  
 1535 1540 1545

Val Gln Ser Arg Leu Phe Ser Met Phe Ser Asn Glu Thr Pro Arg  
 1550 1555 1560

Gln Leu Thr Thr Val Ala Thr Val His Val Ile Asp Arg Asn Pro  
 1565 1570 1575

Thr Pro Leu Pro Asp Lys Asn Glu Asn Asn Gln Thr Ser Ser Ser  
 1580 1585 1590

Thr Asn Gln Thr Thr Ile Lys Ser Ser Gln Tyr Val Thr His Ile  
 1595 1600 1605

Val Lys Pro Asp Lys Gln Gly Arg Tyr Pro Lys Thr Gly Glu Gln  
 1610 1615 1620

Thr Asn Gly Leu Tyr Arg Val Leu Gly Leu Val Val Leu Leu Ile  
 1625 1630 1635

Val Ile Ile Ser Gly Ile Val Ile Lys Lys Lys Arg Lys  
 1640 1645 1650

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 2

Gln Arg Leu Ser Thr Gly Ser Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala  
1 5 10 15

Ala Gly Leu Gln Ile Ala  
20

<210> 3

<211> 13

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador sintético

<220>

<221> misc\_feature

<222> (4) .. (5)

<223> n é a, c, g ou t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (9) .. (10)

<223> n é a, c, g ou t

<400> 3

tcgnntcgnn tcg 13

Lisboa, 2015-03-31

REIVINDICAÇÕES

1. Agonista TLR9 para uso num método de tratar, inibir ou atenuar uma infecção microbiana compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um agonista TLR9 e de um agonista TLR2/6 a um indivíduo que tem, ou está em risco de desenvolver ou contrair uma infecção microbiana; em que o referido agonista TLR2/6 é um lipopolipéptido diacilado sintético.

2. Agonista TLR2/6 para uso num método de tratar, inibir ou atenuar uma infecção microbiana compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um agonista TLR9 e de um agonista TLR2/6 a um indivíduo que tem, ou está em risco de desenvolver ou contrair uma infecção microbiana; em que o referido agonista TLR2/6 é um lipopolipéptido diacilado sintético.

3. Composição farmaceuticamente aceitável compreendendo um agonista TLR9 e um agonista TLR2/6 para uso num método de tratar, inibir ou atenuar uma infecção microbiana compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um agonista TLR9 e de um agonista TLR2/6 a um indivíduo que tem, ou está em risco de desenvolver ou contrair uma infecção microbiana; em que o referido agonista TLR2/6 é um lipopolipéptido diacilado sintético.

4. Agonista ou composição para uso de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, em que o agonista TLR2/6 é PAM2CSK4.

5. Agonista ou composição para uso de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, em que o agonista TLR9 é um oligodesoxinucleótido (ODN) do tipo C.

6. Agonista ou composição para uso da reivindicação 5, em que o ODN de tipo C é ODN2395 ou ODNM362 ou ODN10101.

7. Agonista ou composição para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o indivíduo foi exposto a um micróbio patogénico.

8. Agonista ou composição para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o micróbio é um vírus, uma bactéria ou um fungo.

9. Agonista ou composição para uso da reivindicação 8, em que:

(a) o vírus é Adenoviridae, Coronaviridae, Filoviridae, Flaviviridae, Hepadnaviridae, Herpesviridae, Orthomyxoviridae, Paramyxovirinae, Pneumovirinae, Picornaviridae, Poxyiridae, Retroviridae, Togaviridae, Parainfluenza, Influenza, H5N1, Marburg, ébola, coronavírus da síndrome respiratória aguda grave, febre amarela, vírus sincicial respiratório humano, Hantavírus ou vírus Vaccinia;

(b) a bactéria é *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureas*, *Staphylococcus pneumonia*, *Staphylococcus maltophilia*, *Burholderia* spp. ou *Moraxella* spp; ou

(c) o fungo é um *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, *Zygometes* ou *Pneumocystis*.

10. Agonista ou composição para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o agonista TLR9 e o agonista TLR2/6 são administrados numa formulação nebulizada.

11. Agonista ou composição para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a quantidade eficaz do agonista TLR9 e do agonista TLR2/6 é depositada nos pulmões do indivíduo.

12. Agonista ou composição para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o agonista TLR9 e o agonista TLR2/6 é administrado numa quantidade de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal do indivíduo.

13. Composição farmaceuticamente aceitável compreendendo um agonista TLR9 e um agonista TLR2/6, um agente anti-inflamatório e um ou mais excipientes farmacêuticos, em que a referida composição é estéril e essencialmente isenta de micróbios patogénicos; em que o referido agonista TLR2/6 é um lipopolipéptido diacilado sintético.

14. Composição da reivindicação 13, em que a composição é formulada para nebulização.

15. Composição da reivindicação 13, em que o agonista TLR2/6 é PAM2CSK4; ou em que o agonista TLR9 é um oligodesoxinucleórido (ODN) de tipo C, de preferência ODN2395 ou ODN M362 ou ODN10101.

Lisboa, 2015-03-31

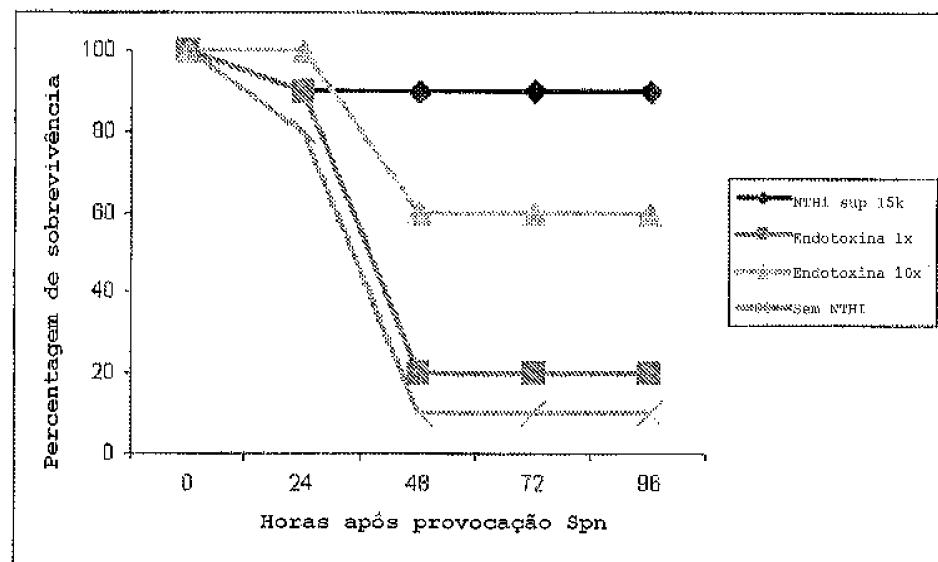


FIG. 1

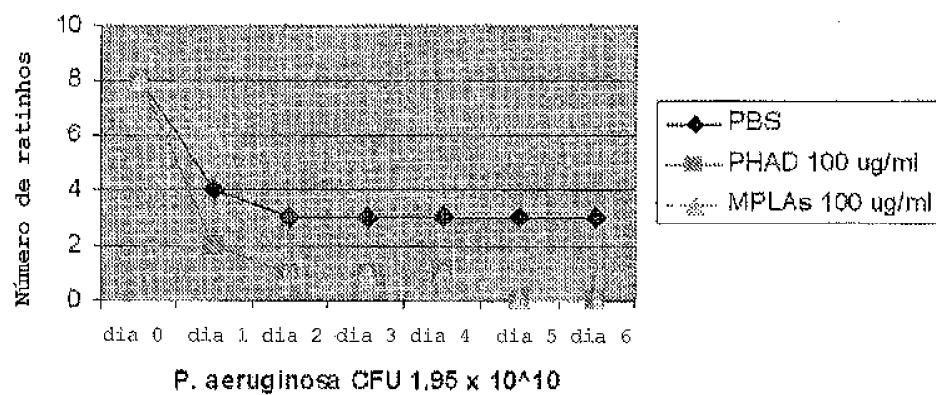
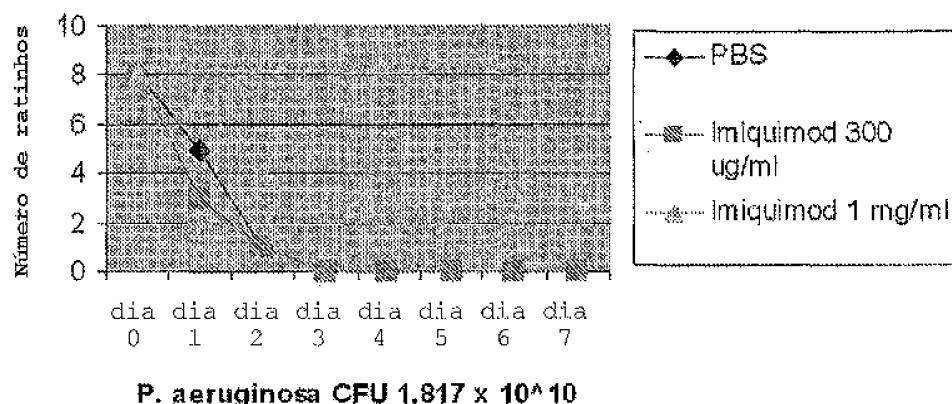
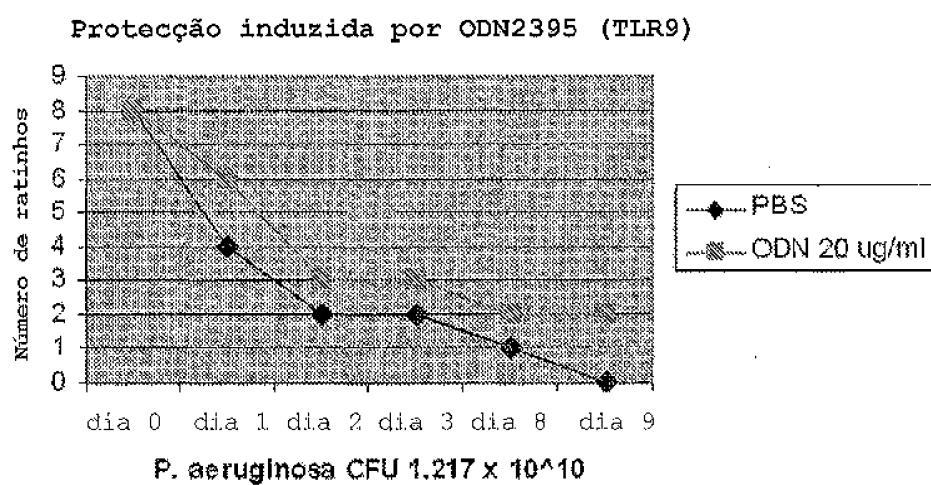
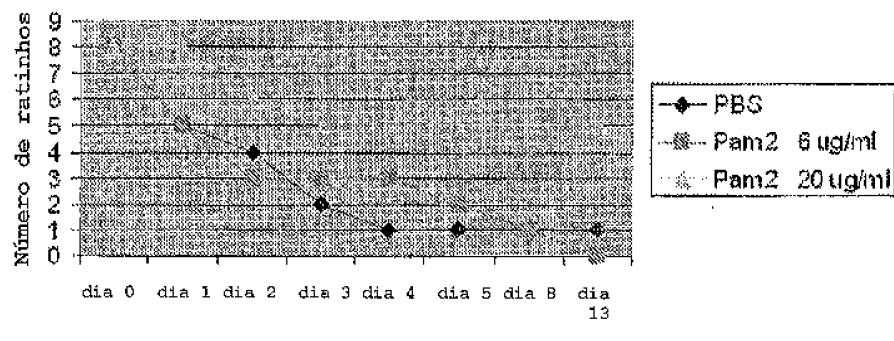
Protecção de PHAD/MPLA contra *P. aeruginosa*

FIG. 2

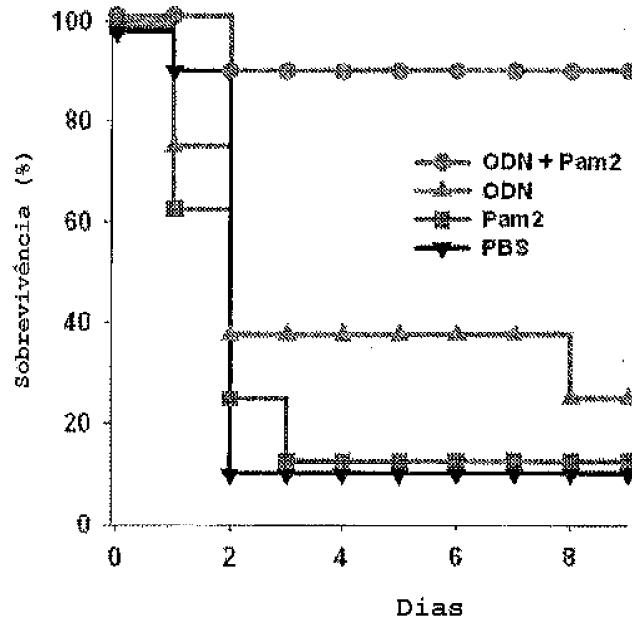
**Protecção de imiquimod contra *P. aeruginosa*****FIG. 3****FIG. 4**

**Protecção induzida por Pam2CSK4 (TLR2/6, 2/1)**



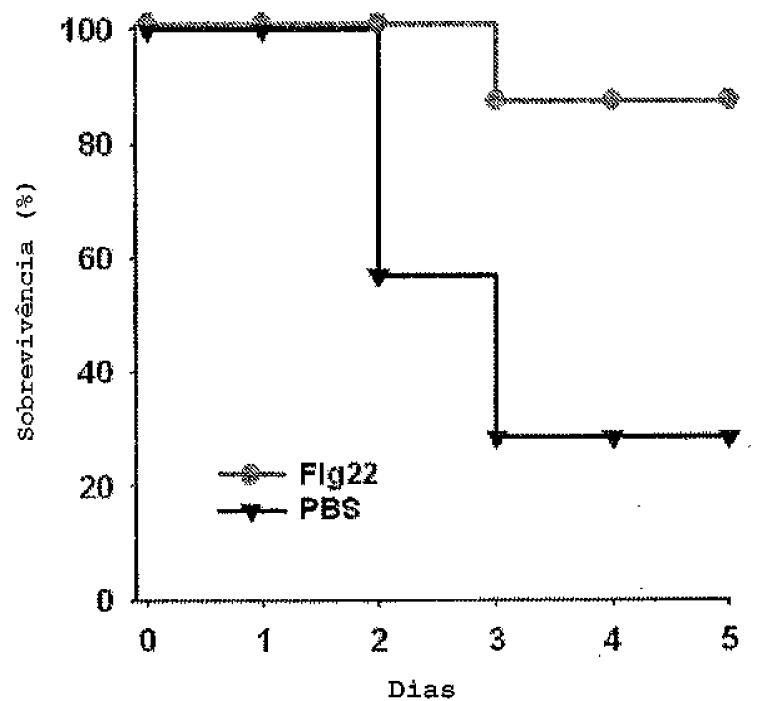
***P. aeruginosa CFU*  $8.75 \times 10^9$**

**FIG. 5**



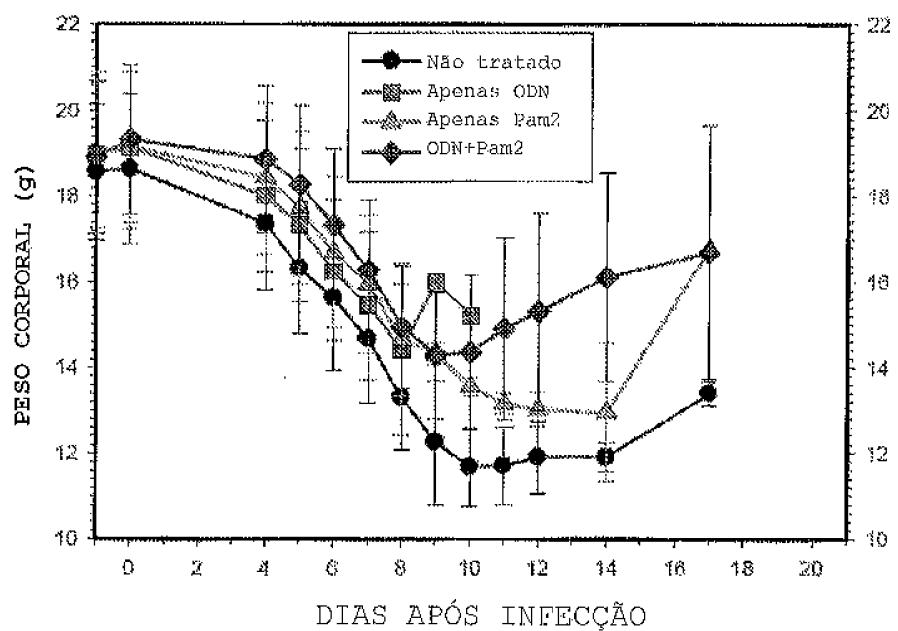
Ratinhos Swiss-Webster provocados com *P. aeruginosa* ( $2 \times 10^{10}$  CFU/ml)

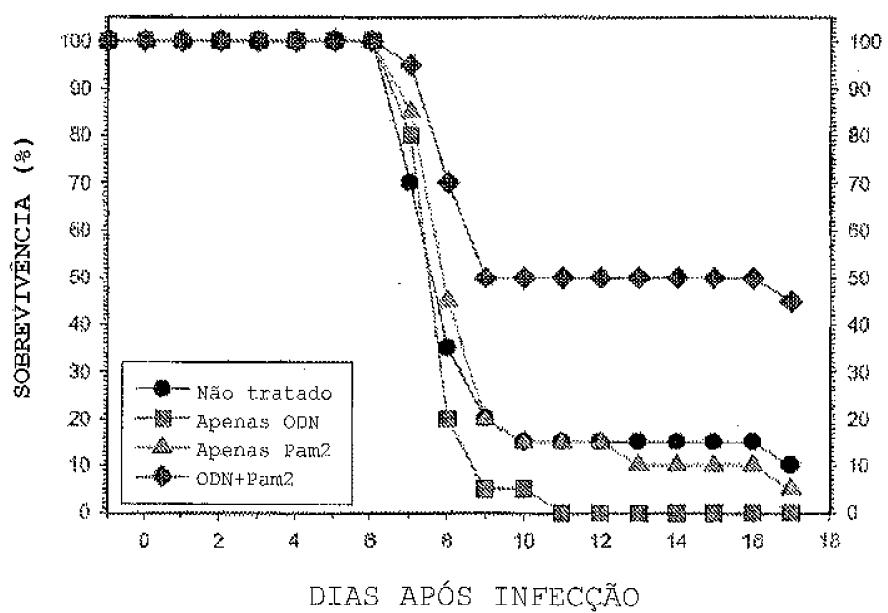
**FIG. 6**



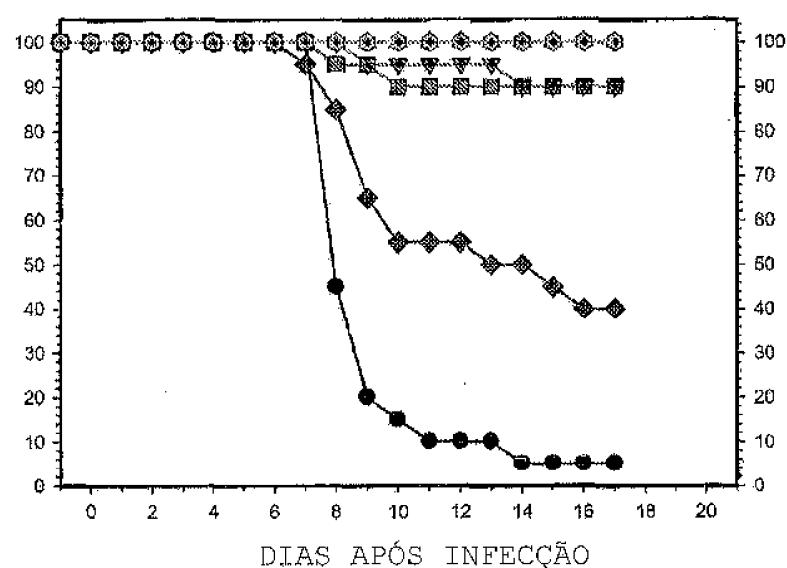
Provocação com *P. aeruginosa* ( $2 \times 10^{10}$  CFU/ml)

**FIG. 7**

**FIG. 8**

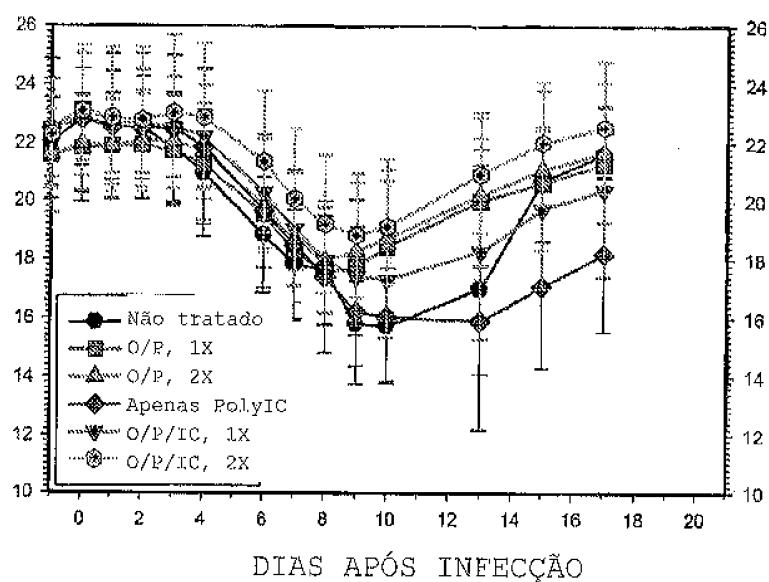
**FIG. 9**

Exp. 3 Efeito de um pré-tratamento de aerossol de 30 min (D-1) com ODN/Pam2/PolyIC na sobrevivência de ratinhos infectados com aerossol de Influenza A/HK; Dose de vírus: ~130 TCID<sub>50</sub>/ratinho



**FIG. 10**

Exp. 3 Efeito de um pré-tratamento de aerossol de 30 min (D-1) com ODN/Pam2/PolyIC no peso de ratinhos infectados com aerossol de Influenza A/HK; Dose de vírus: ~130 TCID<sub>50</sub>/ratinho



**FIG. 11**

FIGS. 12A-B

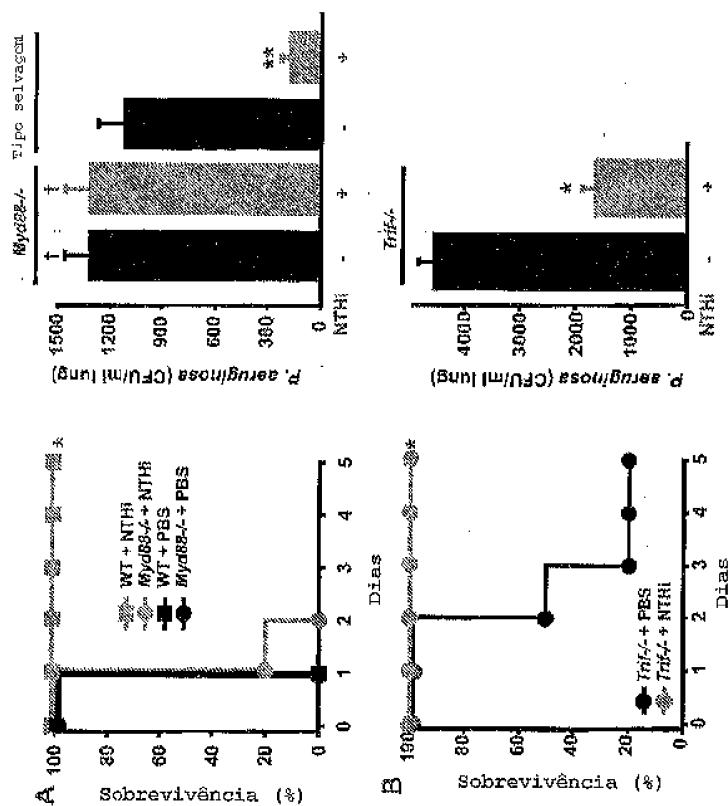


FIG. 13

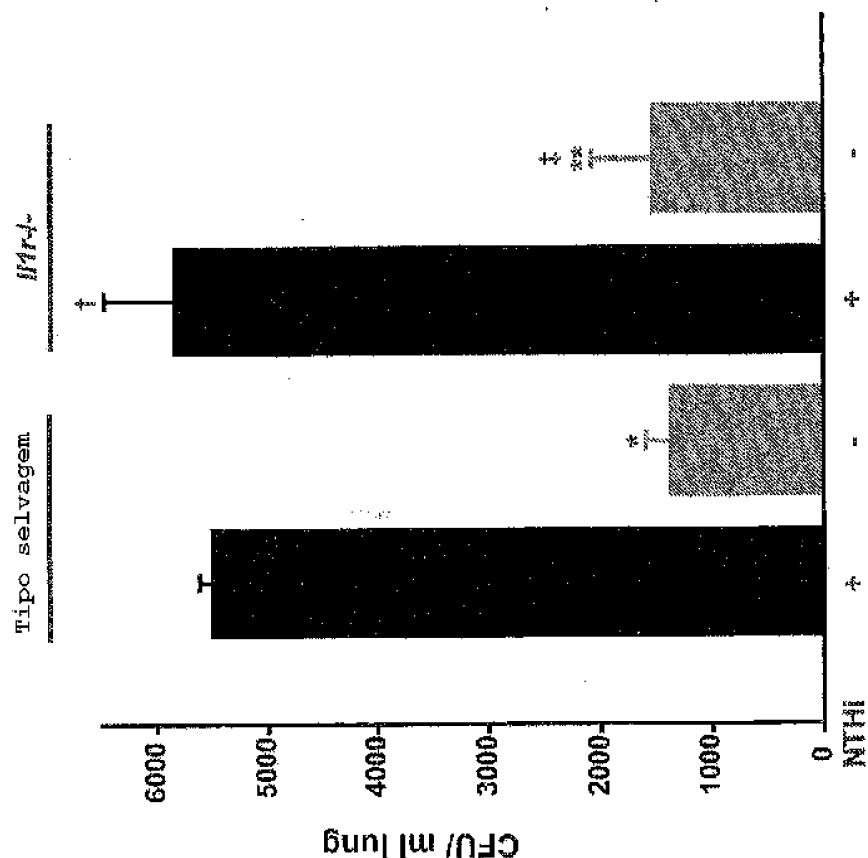


FIG. 14

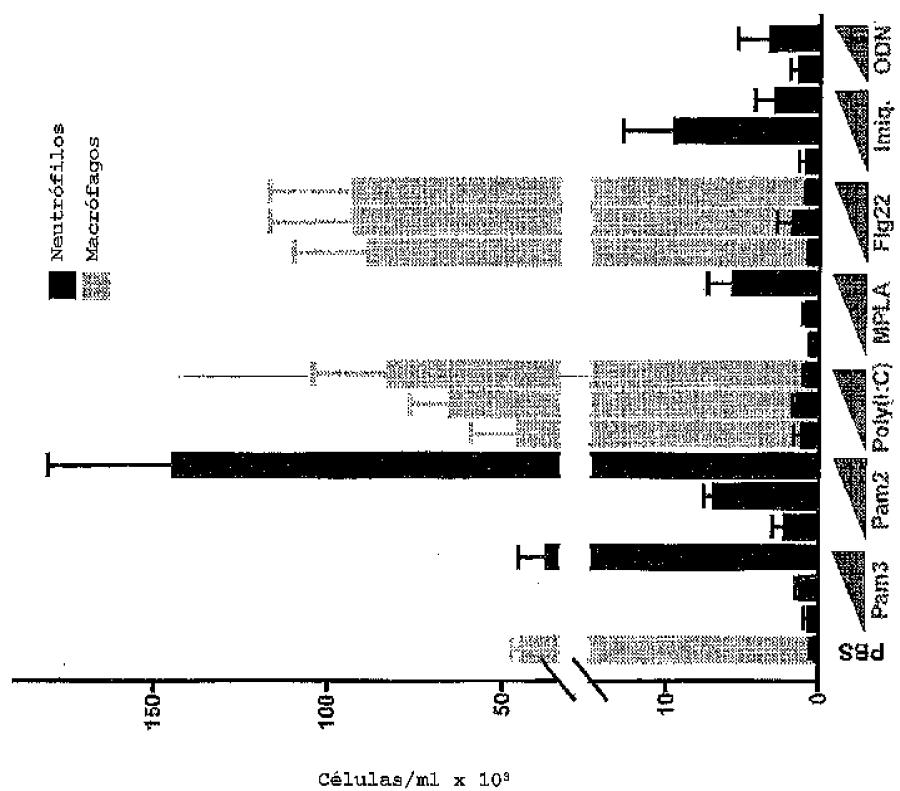
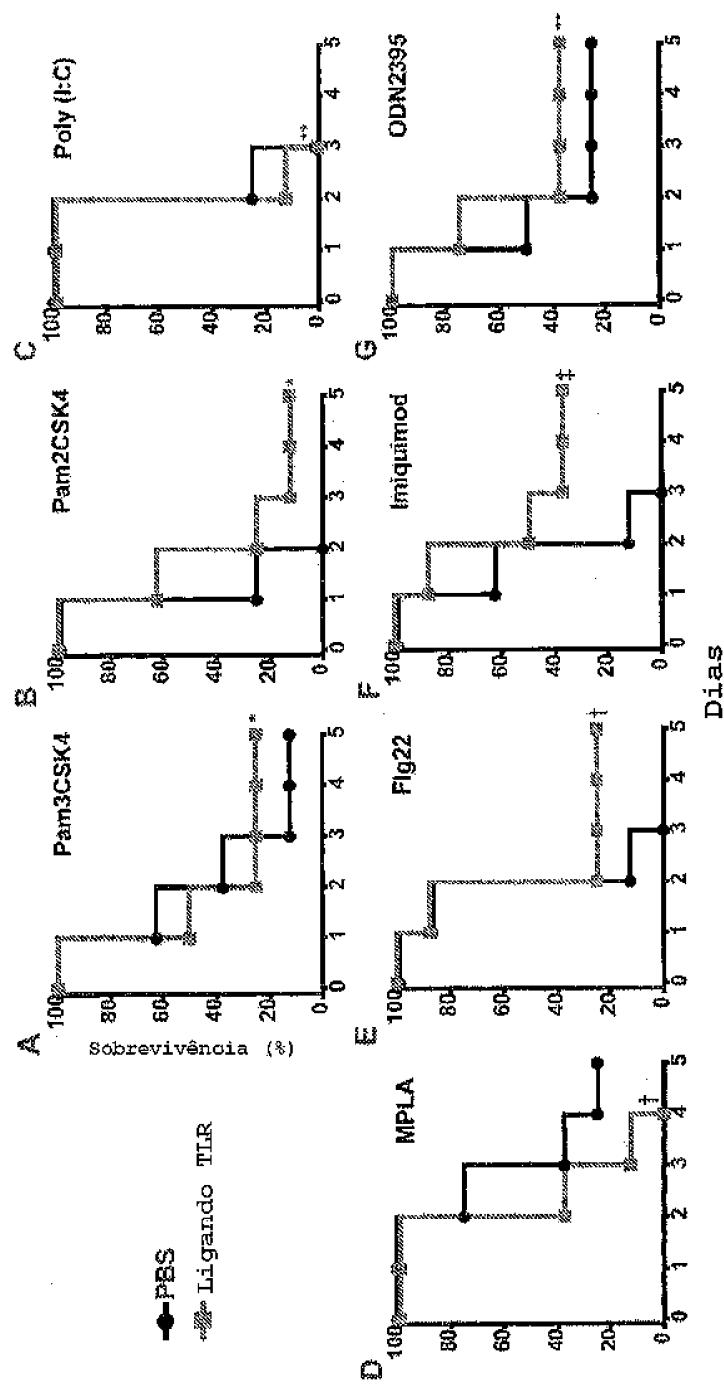
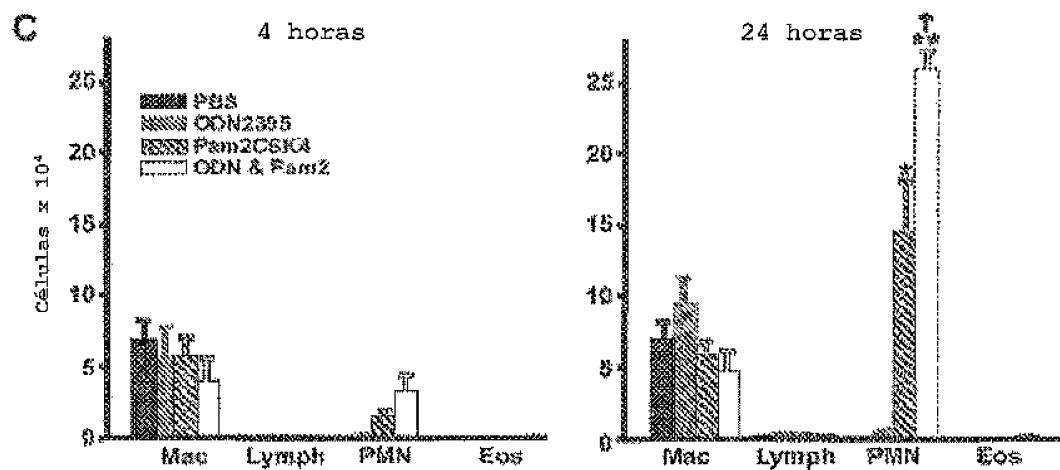
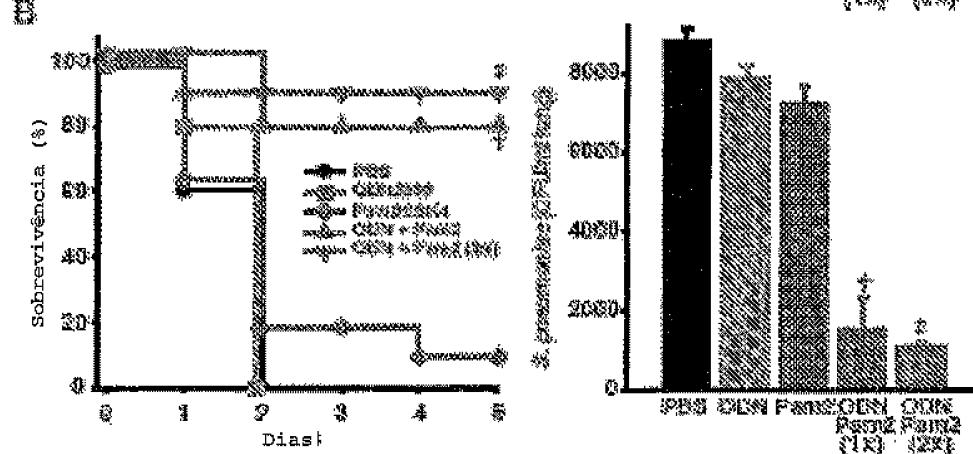
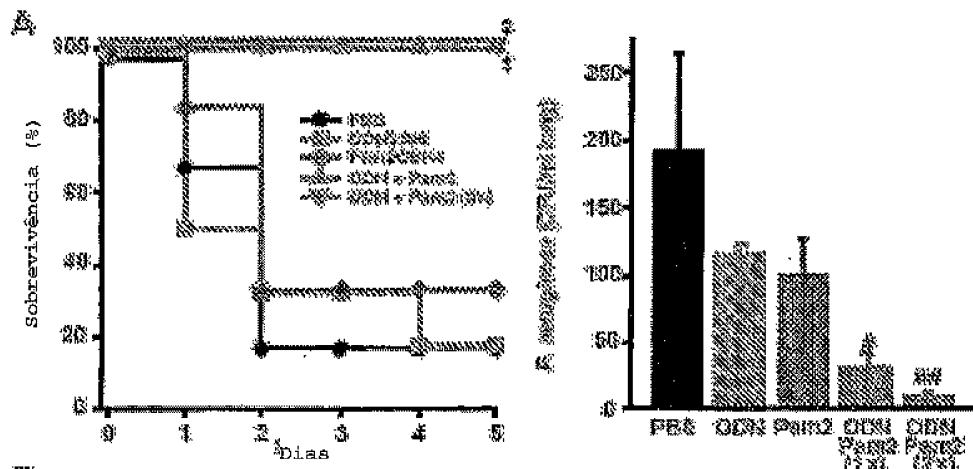


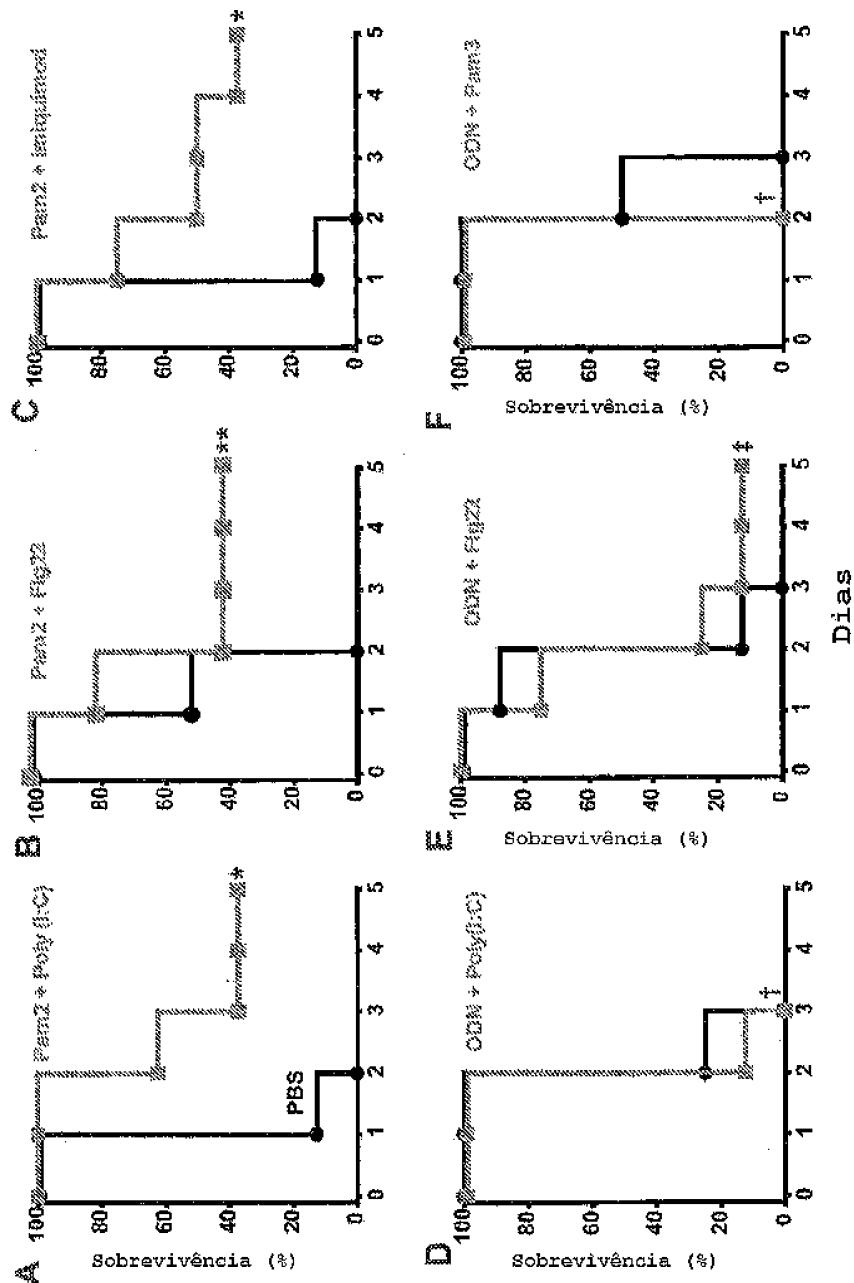
FIG. 15



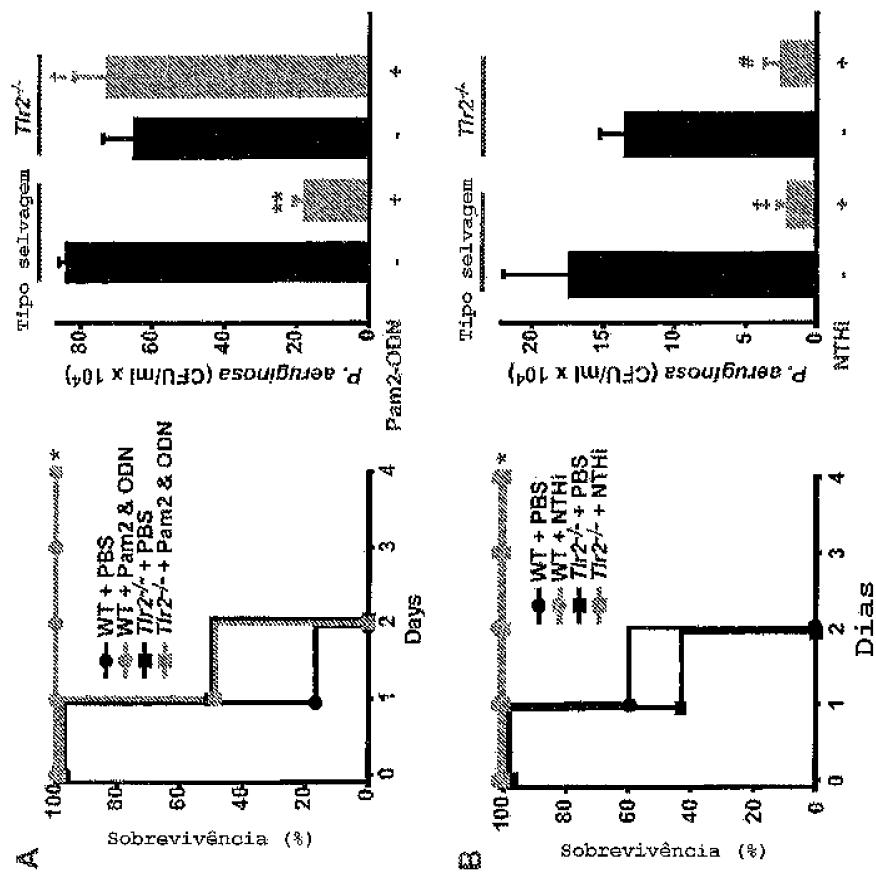
FIGS. 16A-C



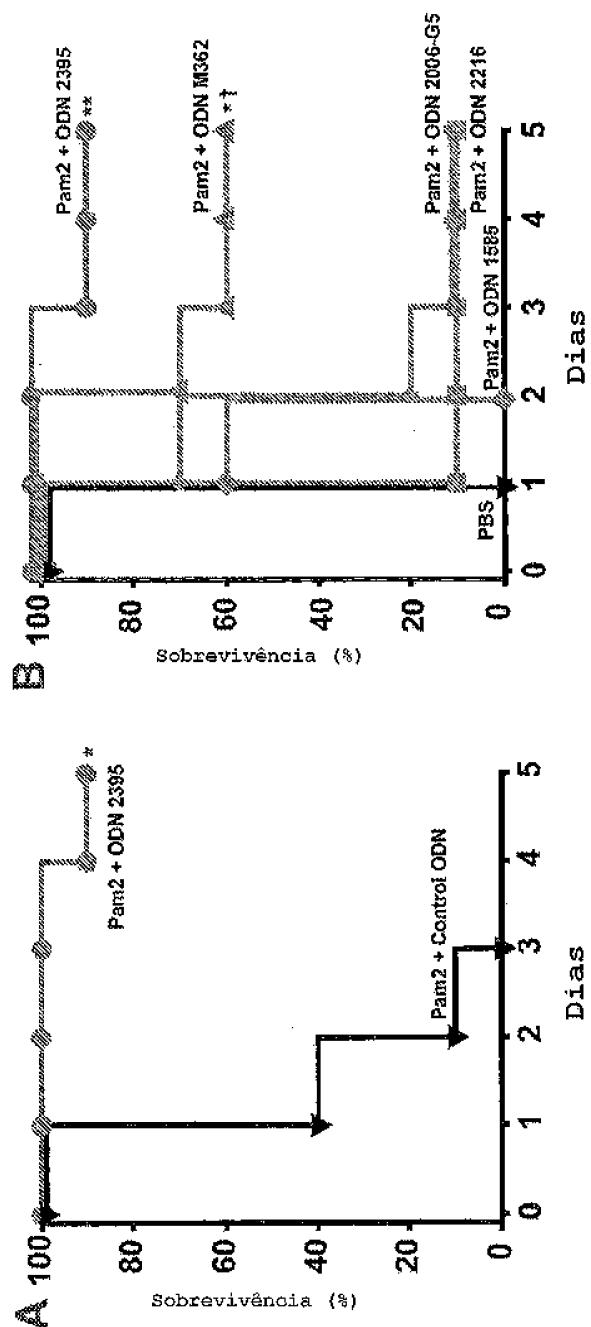
FIGS. 17A-F



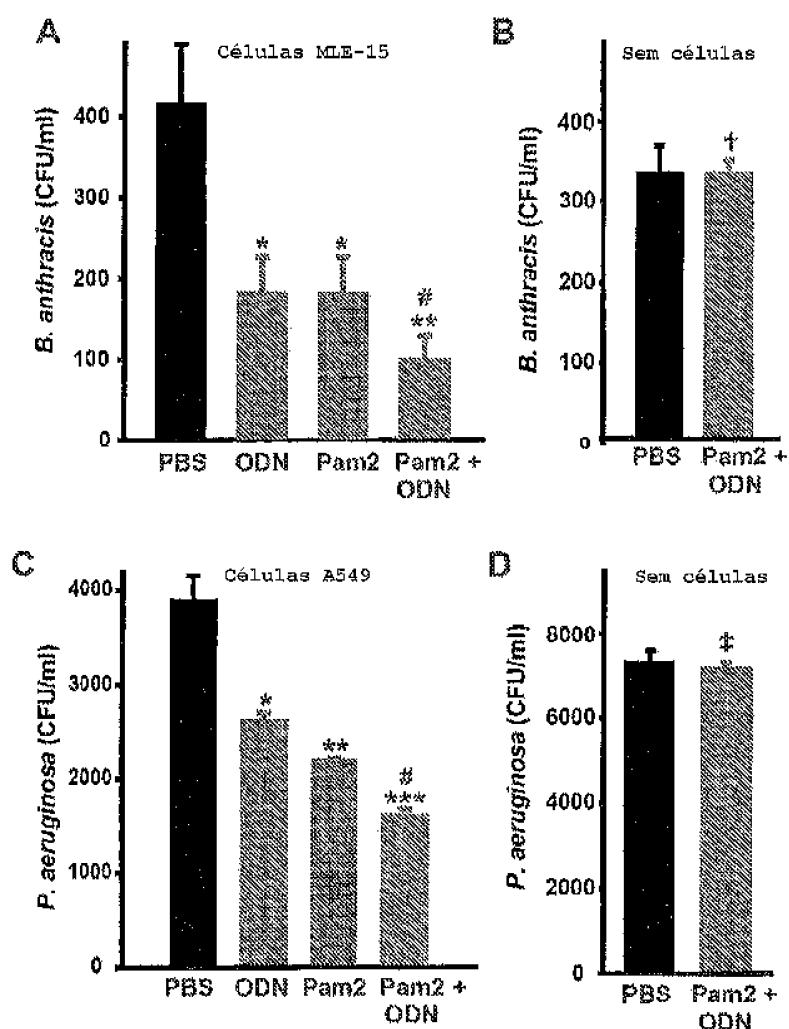
FIGS. 18A-B



FIGS. 19A-B



FIGS. 20A-D



**FIG. 21**  
 Sobrevivência de ratinhos Swiss-Webster imunizados com vários  
 agonistas TLR sintéticos e provocados intranasalmente com 5 ID<sub>50</sub>  
 de esporos de *Bacillus anthracis* Ames (MD=1.0-013)

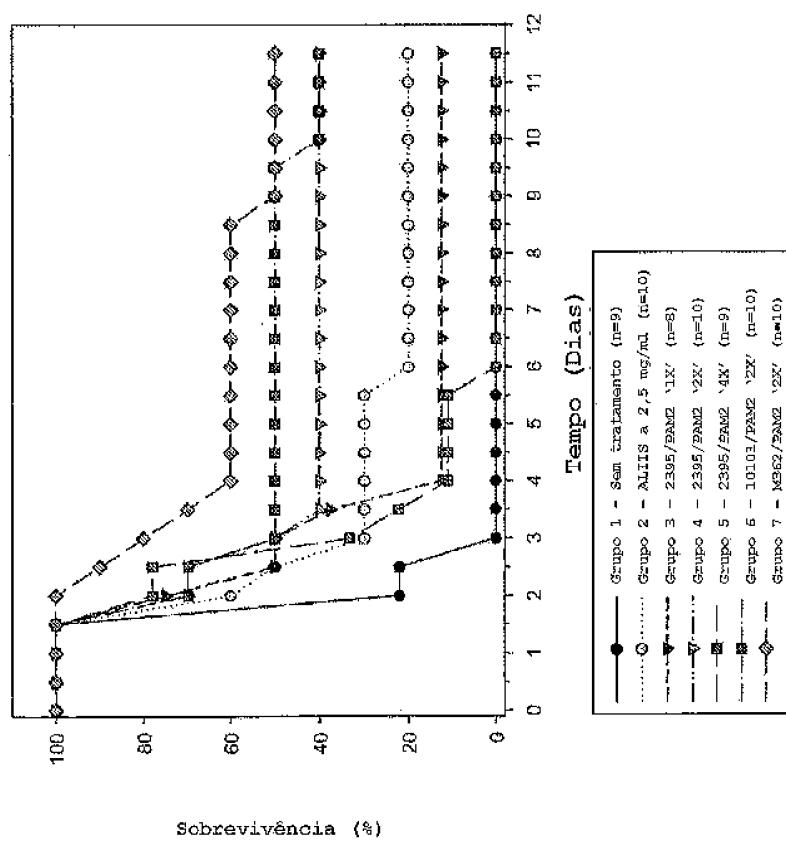


FIG. 22

