



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

(11) PI 1009842-9 B1



(22) Data do Depósito: 25/03/2010

(45) Data de Concessão: 05/01/2021

(54) Título: USO DE AGONISTA DE TLR9 E AGONISTA DE TLR2/6 NA PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA TRATAMENTO, INIBIÇÃO OU ATENUAÇÃO DE UMA INFECÇÃO MICROBIANA, BEM COMO COMPOSIÇÃO FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL COMPREENDENDO OS REFERIDOS AGONISTAS

(51) Int.Cl.: C12N 15/117; A61K 38/06; A61K 45/06; C07K 14/705; A61P 31/04; (...).

(30) Prioridade Unionista: 18/05/2009 US 61/179,246; 25/03/2009 US 61/163,137.

(73) Titular(es): THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM.

(72) Inventor(es): BURTON DICKEY; MICHAEL TUVIM; SCOTT EVANS.

(86) Pedido PCT: PCT US2010028658 de 25/03/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/111485 de 30/09/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 26/09/2011

(57) Resumo: USO DE AGONISTA DE TLR9 E AGONISTA DE TLR2/6 NA PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA TRATAMENTO, INIBIÇÃO OU ATENUAÇÃO DE UMA INFECÇÃO MICROBIANA, BEM COMO COMPOSIÇÃO FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL COMPREENDENDO OS REFERIDOS AGONISTAS. Modalidades da invenção são direcionadas a métodos de tratamento, inibição ou atenuação de uma microbiana em um indivíduo que tem ou está em risco de desenvolver tal infecção, compreendendo a etapa de administrar uma quantidade eficaz de um agonista de TLR2/6 e um agonista de TLR9 ao indivíduo.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"USO DE AGONISTA DE TLR9 E AGONISTA DE TLR2/6 NA PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA TRATAMENTO, INIBIÇÃO OU ATENUAÇÃO DE UMA INFECÇÃO MICROBIANA, BEM COMO COMPOSIÇÃO FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL COMPREENDENDO OS REFERIDOS AGONISTAS"**.

[0001] Esse pedido reivindica prioridade para o Pedido de Patente Provisório de série US 61/163.137, depositado em 25 de Março de 2009 e para o Pedido de Patente Provisório de série US 61/179.246, depositado em 18 de Maio de 2009, cada um dos quais está incorporado aqui por referencia em sua totalidade.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

I. CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] A presente invenção se refere de modo geral aos campos da microbiologia, imunologia e farmacoterapia antimicrobiana. Mais particularmente, as composições e métodos da invenção se referem à modulação da imunidade inata nos pulmões de um indivíduo para o tratamento ou atenuação de infecção ou invasão microbiana usando composições de molécula pequena.

II. ANTECEDENTES

[0003] A suscetibilidade dos pulmões à infecção surge a partir das necessidades arquitetônicas de troca gasosa. Para manter a ventilação, os humanos expõem continuamente 100 m² da área superficial pulmonar ao ambiente externo. Os pulmões são expostos não apenas ao ar, mas também a partículas, gotículas e patógenos que estão suspensos nele. Diferente das superfícies cutâneas que são revestidas pela pele impermeável ou o trato gastrointestinal com uma espessa cobertura adsorvente de muco, os pulmões apresentam uma grande interface ambiental com uma barreira de defesa mínima. Uma barreira mais substancial é impossibilitada pela demanda da difusão gasosa

desimpedida.

[0004] Apesar de sua vulnerabilidade estrutural, os pulmões geralmente se defendem com sucesso contra infecções, através de uma variedade de mecanismos mecânicos, humorais e celulares (Knowles *et al.*, 2002; Martin and Frevert, 2005; Rogan, *et al.*, 2006; Travis, *et al.*, 2001); (Mizgerd, 2008; Bals and Hiemstra, 2004; Bartlett *et al.*, 2008; Hiemstra, 2007; Hippenstiel *et al.*, 2006; Schutte and McCray, 2002). A maioria dos patógenos microbianos inalados falha em penetrar nos alvéolos devido ao seu impacto contra as paredes das vias aéreas, onde eles são capturados pelo muco e depois expelidos através do sistema transportador mucociliar (Knowles *et al.*, 2002). Para aqueles patógenos que escapam desse destino, a presença constitutiva de peptídeos antimicrobianos no fluido que reveste a via respiratória limita seu crescimento (Rogan, *et al.*, 2006; Travis, *et al.*, 2001). Os macrófagos alveolares que residem nos espaços aéreos mais distais são capazes de ingerir esses organismos, dessa maneira protegendo os pulmões de uma infecção em potencial.

[0005] Embora frequentemente consideradas como barreiras a troca de gás passiva, as vias aéreas e o epitélio alveolar suplementam as defesas basais do pulmão pela sujeição a alterações locais estruturais e funcionais notáveis quando estímulos patogênicos são encontrados. Em resposta a inflamação viral, fúngica ou alérgica, as células secretórias das vias aéreas rapidamente aumentam sua altura e preenchem seu citoplasma apical com grânulos secretórios, um processo denominado metaplasia inflamatória (Evans *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2006). Na presença de patógenos, o epitélio alveolar ativa seus sistemas de plasmalema e o maquinário secretório, recrutando dessa maneira os leucócitos para a proteção pulmonar (Evans *et al.*, 2005). Talvez o mais importante, as interações microbianas com os receptores de reconhecimento do padrão epitelial

respiratório induzam numerosos produtos microbicidas a serem expressos no fluido de revestimento das vias aéreas, incluindo defensas, catelicidinas, lisozima e espécies reativas ao oxigênio (Rogan *et al.*, 2006; Forteza *et al.*, 2005; Akinbi *et al.*, 2000; Bals and Hiemstra, 2004; Bals and Hiemstra, 2006). É digno de nota que a pneumonia (bacteriana ou viral) seja a principal causa de morte por infecção em todo o mundo.

[0006] Há uma necessidade de métodos e composições adicionais para inibir e/ou tratar as infecções microbianas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0007] A presente invenção fornece composições que estimulam a resistência inata (Resistência Inata Estimulada (StIR)) e métodos para o uso de tais composições para estimular a StIR. Em certas modalidades a StIR é StIR pulmonar. Um aspecto da invenção fornece um índice ou proporção de terapêutica/toxicidade maior. Modalidades da invenção incluem composições, formulações e métodos para a intensificação das defesas biológicas de um indivíduo mamífero, por exemplo, um humano, contra a infecção, por exemplo, da imunidade do indivíduo contra a infecção. Em certos aspectos, as composições da invenção são depositadas em uma quantidade eficaz nos pulmões de um indivíduo. Aspectos da invenção fornecem uma intensificação ou aumento rápido e temporário das defesas biológicas contra a infecção microbiana. A intensificação da imunidade em um indivíduo atenua as infecções microbianas. A atenuação pode ser por inibição, tratamento ou prevenção da infecção ou do crescimento ou sobrevivência microbiana. Aspectos da invenção intensificam as defesas dos pulmões e do trato respiratório de um indivíduo.

[0008] Em certos aspectos, são contemplados métodos para o tratamento, inibição ou atenuação de uma infecção microbiana em um indivíduo que tem ou está em risco de desenvolver tal infecção, os

métodos compreendendo administrar uma quantidade eficaz de uma composição StIR que compreenda um ou mais ligantes para um ou mais receptores inatos. Vários receptores inatos têm sido identificados, incluindo, mas não limitados a receptor semelhante à Toll (TLR), receptores de lectina tipo C (CLRs) e receptores semelhantes a domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo (receptores semelhantes à Nod ou NLRs). TLRs é uma classe de proteínas que desempenham um papel importante no sistema imune inato. Eles são receptores não catalíticos que abrangem uma única membrana que reconhecem moléculas estruturalmente conservadas derivadas de micróbios. Sempre que esses micróbios estão presentes na pele ou no trato gastrointestinal, pulmões e mucosa geniturinária, eles são reconhecidos pelos TLRs, que ativam as respostas celulares imunes. Interessantemente, vários desses agonistas de TLR não induzem StIR quando administrados sozinhos. Tipicamente, um indivíduo ou paciente a ser tratado usando os métodos aqui descritos foi exposto a um micróbio patogênico ou está em risco de tal exposição.

[0009] Certas modalidades são direcionadas para composições capazes de serem administradas ao trato respiratório compreendendo 1, 2, 3, 4 ou mais agonistas de TLR, assim como métodos para usar tais composições. Os agonistas de TLR são selecionados entre agonista de TLR2/1, TLR2/6, TLR3, TLR4, TLR5, TLR9, ou TLR7. Em certos aspectos, os agonistas de TLR são selecionados entre os agonistas TLR9 e TLR 2/6. Em um aspecto adicional, os agonistas de TLR são selecionados a partir do agonista TLR5. Em um aspecto adicional, um agonista de TLR5 pode ser usado em combinação com um agonista de TLR2/6, TLR4, TLR9 ou TLR7. Em certos aspectos, um agonista de TLR9 pode ser usado em combinação com TLR2/6, TLR4, TLR5, ou TLR7. Em certos aspectos, um agonista de TLR 2/6 pode ser usado em combinação com um agonista de TLR4, TLR5, TLR9 ou TLR7. Em um

aspecto adicional, um agonista de TLR7 pode ser usado em combinação com um agonista de TLR2/6, TLR4, TLR5 ou TLR9. Em um aspecto adicional, qualquer uma dessas combinações duplas pode incluir um terceiro, quarto ou quinto agonista de TLR selecionado entre os agonistas de TLR2/6, TLR4, TLR5, TLR9 ou TLR7.

[00010] Certas modalidades são direcionadas para métodos para o tratamento, inibição ou atenuação de uma infecção microbiana, compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um agonista de TLR9 e um agonista de TLR2/6 a um indivíduo que tem ou está em risco de desenvolver ou adquirir uma infecção microbiana. Em certos aspectos, o agonista de TLR2/6 é PAM2CSK4. Em um aspecto adicional, o agonista de TLR9 é um oligodesoxinucleotídeo tipo C (ODN). O ODN tipo C pode incluir, mas não é limitado a ODN2395 ou ODNM362 ou ODN10101 ou outro tipo de ODN tipo C ou seu análogo. Em certos aspectos, o indivíduo já foi expostos ou está em risco de exposição a um micróbio patogênico. O micróbio pode ser um vírus, uma bactéria ou um fungo.

[00011] Em outros aspectos, o agonista de TLR9 e o agonista de TLR2/6 são administrados em uma formulação para nebulização. O agonista de TLR9 e/ou o agonista de TLR2/6 podem ser administrados em uma quantidade entre cerca de 0,1, 1, 5, 10, 50 µg ou mg/kg a cerca de 5, 10, 50, 100 µg or mg/kg do peso corporal do indivíduo, incluindo todos os valores e faixas nesse intervalo.

[00012] Certas modalidades são dirigidas para uma composição farmacologicamente aceitável que compreende um agonista de TLR9 e um agonista de TLR2/6, um agente antiinflamatório e um ou mais excipientes farmacêuticos, em que a dita composição é estéril e essencialmente livre de micróbios patogênicos. Em certos aspectos, o agonista de TLR2/6 é PAM2CSK4. Em um aspecto adicional, o agonista de TLR9 é um oligodesoxinucleotídeo tipo C (ODN). O ODN tipo C pode

incluir, mas não é limitado a ODN2395 ou ODNM362 ou ODN10101.

[00013] Em certos aspectos, a composição StIR compreende um polipeptídeo de flagelina que compreende 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, ou 22 aminoácidos consecutivos do peptídeo QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA (SEQ ID NO:2) que é conhecido como um agonista de TLR5 ou um segmento ou derivado desse. Um polipeptídeo da invenção também pode compreender uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 70, 80 ou 90%, incluindo todos os valores e faixas nesse intervalo, idêntica a SEQ ID NO:2. Em outros aspectos, a flagelina é um polipeptídeo ou peptídeo de flagelina sintetizado e/ou purificado. A expressão “purificado” ou “isolado” significa que o componente foi previamente isolado ou purificado entre outras proteínas ou reagentes de síntese ou subprodutos e que o componente está pelo menos 95% puro antes de ser formulado na composição. Em certas modalidades, o componente purificado ou isolado tem cerca de ou tem pelo menos cerca de 80, 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5% ou mais de pureza, ou qualquer faixa derivável dessa. tal componente purificado pode então ser misturado com outros componentes para formar uma composição como aqui descrita.

[00014] 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 faixas nesse intervalo, de SEQ ID NO:2 ou de outros polipeptídeos de flagelina. Esses 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 de outros polipeptídeos de flagelina. Em certos aspectos, o polipeptídeo ou segmento de flagelina é pelo menos 75% idêntico a sequência de SEQ ID NO:2. Em outro aspecto, o polipeptídeo ou

segmento de flagelina é pelo menos 80% idêntico a sequência de SEQ ID NO:2. Em outro aspecto, o polipeptídeo ou segmento de flagelina é pelo menos 85% idêntico a sequência de SEQ ID NO:2. Em outro aspecto, o polipeptídeo ou segmento de flagelina é pelo menos 90% idêntico a sequência de SEQ ID NO:2. Em outro aspecto, o polipeptídeo ou segmento de flagelina é pelo menos 95% idêntico a sequência de SEQ ID NO:2. Derivados ou variantes de flagelina ou de seus segmentos incluem inserções, deleções e mutações pontuais de SEQ ID NO:2. Uma mutação por inserção particular é uma proteína de fusão que compreende uma sequência de aminoácidos exógena para a flagelina na terminação carboxi ou amino. Várias proteínas flagelina são conhecidas na técnica e incluem, mas não são limitadas a uma flagelina que possui 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), cada uma das quais está incorporada aqui por referencia em sua totalidade a partir da data de prioridade desse pedido.

[00015] Modalidades da invenção podem ser administradas através do trato respiratório. Métodos da invenção incluem a administração de uma composição por inalação ou outros métodos de administração ao trato respiratório superior e/ou inferior. Em certos aspectos, a administração é por inalação. Em certos aspectos, a composição StIR é administrada em uma formulação nebulizada ou aerossolizada. Em um aspecto adicional, a composição é aerossolizada ou nebulizada ou em uma forma que possa ser inalada ou instilada em um indivíduo. A composição pode ser administrada por inalação ou inspiração. A composição StIR, incluindo o agonista de TLR individualmente ou como

um agregado, pode ser administrada em uma quantidade entre 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 or mg/kg do peso corporal do indivíduo. Em outros aspectos, um indivíduo pode ser tratado com 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 de TLR individualmente ou todos os agonistas de TLR no total. O indivíduo pode estar em risco de exposição ou exposto a um vírus, bactéria ou fungo inalado. Outras modalidades ainda incluem métodos onde a composição é administrada antes; depois; durante; antes e depois; antes e durante; durante e depois; antes, depois e durante a exposição ou suspeita de exposição ou risco elevado de exposição ao organismo. O indivíduo pode ser exposto a uma arma biológica ou a um patógeno oportunista. Em aspectos particulares, o indivíduo está comprometido imunologicamente, tal como um paciente com câncer ou um paciente com AIDS.

[00016] Em outra modalidade, a presente invenção está direcionada a uma composição farmacologicamente aceitável que compreende um ou mais agonistas de TLR; um agente antiinflamatório; um agente antimicrobiano; e/ou um ou mais excipientes farmacêuticos. Tipicamente tais composições são estéreis e essencialmente livre de micróbios patogênicos.

[00017] Em certos aspectos, o micróbio patogênico ou potencialmente patogênico a ser tratado ou evitado é um vírus, uma bactéria e/ou um fungo. Em certos aspectos, um micróbio é um vírus. O vírus pode ser da família de vírus de Adenoviridae, Coronaviridae, Filoviridae, Flaviviridae, Hepadnaviridae, Herpesviridae, Orthomyxoviridae, Paramyxovirinae, Pneumovirinae, Picornaviridae, Poxviridae, Retroviridae, ou Togaviridae; e/ou Parainfluenza, Influenza, H5N1, Marburg, Ebola, coronavírus da

Síndrome Respiratória Aguda Severa, vírus da febre amarela, vírus Sincicial respiratório Humano, Hantavirus, ou vírus da Vacinia.

[00018] Em um aspecto adicional, o micróbio patogênico ou potencialmente patogênico a ser tratado ou evitado é uma bactéria. A bactéria pode ser uma bactéria intracelular, gram-positiva ou gram-negativa. Em um aspecto adicional, a bactéria inclui, mas não está limitada a uma bactéria *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Francisella* ou *Yersinia*. Em um aspecto adicional, a bactéria é *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, ou *Staphylococcus aureus*. Em certas modalidades, a bactéria é *Bacillus anthracis* e/ou *Staphylococcus aureus*. Em um aspecto adicional, a bactéria é uma bactéria resistente ao fármaco, tal como um *Staphylococcus aureus* resistente a múltiplos fármacos (MRSA). Bacilos Gram-negativos relevantes clinicamente 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*. Bactérias Gram-positivas representativas incluem, mas não são limitadas a *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Actinobactéria*, *Clostridium* e *Mycoplasma*, que carece das paredes celulares e não pode ser corado por Gram, incluindo aquelas bactérias que são derivadas de tais formas.

[00019] Em outro aspecto ainda, o micróbio patogênico ou potencialmente patogênico a ser tratado ou evitado é um fungo, tal como os membros da família *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, *Pneumocystis*, ou *Zygomycetes*. Em modalidades adicionais, um fungo inclui, mas não está limitado a *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, ou *Pneumocystis carinii*. A

família dos zigomicetos inclui Basidiobolales (Basidiobolaceae), Dimargaritales (Dimargaritaceae), Endogonales (Endogonaceae), Entomophthorales (Ancylistaceae, Completoriaceae, Entomophthoraceae, Meristacraceae, Neozygitaceae), Kickxellales (Kickxellaceae), Mortierellales (Mortierellaceae), Mucorales, e Zoopagales. A família *Aspergillus* inclui, mas não está limitada a *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. A família da *Candida* inclui, mas não está limitada a *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.

[00020] Em certos aspectos, a bactéria patogênica é uma bactéria intracelular, gram positiva ou gram negativa. Em certas modalidades, a bactéria é *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Francisella*, ou *Yersinia*. Em aspectos adicionais, a bactéria é *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, e/ou *Burkholderia cepacia*.

[00021] As expressões “atenuar”, “inibir”, “reduzir” ou “prevenir” ou qualquer variação dessas expressões, quando usadas nas reivindicações e/ou no pedido, inclui qualquer diminuição mensurável ou a inibição completa para atingir um resultado desejado, por exemplo, redução na carga ou no crescimento microbiano depois da exposição.

[00022] O uso das palavras “um” ou “uma” quando usadas em conjunto com a expressão “compreendendo” nas reivindicações e/ou no pedido pode significar “um”, mas também é consistente com o significado de “um ou mais”, “pelo menos um” e “um ou mais do que um”.

[00023] É contemplado que qualquer modalidade aqui discutida pode

ser implementada com relação a qualquer método ou composição da invenção e vice versa. Adicionalmente, as composições e kits da invenção podem ser usadas para obter os métodos da invenção.

[00024] Ao longo desse pedido, a expressão “cerca de” é usada para indicar que um valor inclui o desvio padrão do erro para o dispositivo ou método a ser empregado para determinar o valor.

[00025] O uso da expressão “ou” nas reivindicações é usada para significar “e/ou” a menos que explicitamente indicado referir-se a alternativas apenas ou as alternativas são mutuamente exclusivas, embora a descrição apóie uma definição que se refere apenas a alternativas e “e/ou”. Em certas listas que incluem e/ou, ou, ou e um ou mais dos membros relacionados pode ser especificamente excluído da lista.

[00026] Como usado nessa especificação e nas reivindicações, as palavras “compreendendo” (e qualquer forma de compreendendo, tal como “compreendem” e “compreende”), “possuindo” (e qualquer forma de possuindo, tal como “possuem” e “possui”), “incluindo” (e qualquer forma de incluindo, tal como “incluem” e “inclui”) ou “contendo” (e qualquer forma de contendo, tal como “contêm” e “contém”) são inclusivas ou não limitadas e não excluem etapas adicionais, elementos não relacionados ou métodos.

[00027] Outros objetivos, aspectos e vantagens da presente invenção ficarão aparentes a partir da descrição detalhada a seguir. Deve ser compreendido, entretanto que a descrição detalhada e os exemplos específicos, embora indicando modalidades da invenção, são dados apenas como meio de ilustração, já que várias alterações e modificações dentro do espírito e do escopo da invenção ficarão evidentes para aqueles versados na técnica a partir dessa descrição detalhada.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[00028] As figuras a seguir fazem parte do presente pedido e estão incluídas para demonstrar adicionalmente certos aspectos da presente invenção. A invenção pode ser melhor compreendida pela referencia a uma ou mais dessas figuras com a descrição detalhada das modalidades específicas aqui apresentadas.

[00029] **Figura 1.** Endotoxina natural (um agonista de TLR4) induz StIR discreta. Camundongos Swiss-Webster de tipo selvagem (10/grupo) foram inoculados com *S. pneumoniae* (5×10^{10} CFU/mL) 24 h depois do tratamento com o lisado de NTHi (“NTHi sup”), a concentração de LPS avaliada estar no lisado de NTHi (“Endotoxina 1x”), dez vezes o LPS considerado estar no lisado (“Endotoxina 10x”) ou sem tratamento.

[00030] **Figura 2.** Lipídeo A hexacilado sintético (agonista de TLR4) não induz StIR. Camundongos Swiss-Webster de tipo selvagem (8/grupo) foram tratados com suspensões de lipídeo A sintético ou PBS 24 h antes da inoculação com *P. aeruginosa*.

[00031] **Figura 3.** É mostrado um experimento representativo de camundongos Swiss-Webster (8/grupo) tratados com uma dose alta ou baixa de imiquimod (agonista de TLR7) ou PBS 24 h antes da inoculação infecciosa com *P. aeruginosa*.

[00032] **Figura 4.** A estimulação com TLR9 sozinho induz proteção mínima. Camundongos Swiss-Webster de tipo selvagem (8/grupo) foram tratados com PBS ou ODN2395 24 h antes da infecção com *P. aeruginosa* inalada.

[00033] **Figura 5.** Tratamento com altas doses de agonista de TLR2/6 induz StIR. Camundongos Swiss-Webster de tipo selvagem foram tratados com doses alta e baixa de Pam2CSK4 o PBS 24 h antes da infecção com *P. aeruginosa*.

[00034] **Figura 6.** Uma combinação de agonistas de TLR induz StIR maior do que cada um sozinho. Camundongos Swiss-Webster de tipo

selvagem foram tratados com ODN2395 (20 µg/mL, 8 camundongos), Pam2CSK4 (20 µg/mL, 8 camundongos), ambos os agonistas (10 camundongos), ou PBS (10 camundongos).

[00035] **Figura 7.** Fragmento sintético de flagelina (agonista de TLR5) induz StIR. Um segmento altamente conservado com 22 aminoácidos de flagelina ou PBS foi aerossolizado em camundongos Swiss-Webster de tipo selvagem 24 h antes da infecção com *P. aeruginosa*.

[00036] **Figura 8.** Efeito da infecção pulmonar por aerossol de um pool de influenza A/HK 11-29-05 sobre o peso corporal: Um Tratamento com Aerossol 30 min; Dose do Vírus Influenza: ~100 TCID₅₀/camundongo. O peso diminui inicialmente conforme a infecção progride, refletindo a severidade da doença, depois aumenta durante a recuperação.

[00037] **Figura 9.** Efeito da infecção pulmonar por aerossol de um pool de influenza A/HK 11-29-05 sobre a sobrevivência: Um Tratamento com Aerossol 30 min; Dose do Vírus Influenza: ~100 TCID₅₀/camundongo.

[00038] **Figura 10.** Ilustra o efeito de um pré-tratamento com aerossol de ODN/PAM2/PolyIC 30min sobre a sobrevivência de camundongos infectados com aerossol de influenza A/HK; dose viral ~130 TCID₅₀/ camundongo.

[00039] **Figura 11.** Efeito da infecção pulmonar por aerossol de um pool de influenza A/HK 11-29-05 sobre o peso corporal: Um Tratamento com Aerossol 30 min; Dose do Vírus Influenza: ~100 TCID₅₀/camundongo. O peso diminui inicialmente conforme a infecção progride, refletindo a severidade da doença, depois aumenta durante a recuperação.

[00040] **FIGs. 12A e 12B.** A sinalização de MyD88, mas não de TRIF, é necessária para a resistência à pneumonia induzida pelo lisado

bacteriano. Figura 12A. Camundongos *Myd88*^{-/-} e de tipo selvagem foram inoculados por inalação com *P. aeruginosa* com ou sem tratamento 24 h antes com um lisado aerossolizado de *H. influenzae* não tipa do (NTHi). *Esquerda*, sobrevida (N = 10 camundongos/grupo, *p<0,0001). *Direita*, sobrecarga pulmonar bacteriana imediatamente após a infecção (direita, N = 3 camundongos/grupo, **p<0,004, †p=0.39 vs. controle de tipo selvagem). Figura 12B. Inoculação de *P. aeruginosa* em *Trif*^{-/-} camundongos com ou sem pré-tratamento com o lisado bacteriano. *Esquerda*, sobrevida (N = 10 camundongos/grupo, *p<0.0001). *Direita*, sobrecarga pulmonar bacteriana imediatamente após a infecção (N = 3 camundongos/grupo, *p<0,0001).

[00041] **Figura 13. A morte induzida do patógenos não está prejudicada em camundongos deficientes de receptor de interleucina-1.** Camundongos *Il1r*^{-/-} e de tipo selvagem foram tratados com PBS em aerossol ou com um lisado de *Haemophilus influenzae* não tipado (NTHi) 24 h antes da inoculação com *P. aeruginosa*. É mostrada a sobrecarga bacteriana dos homogenatos pulmonares imediatamente depois da infecção. (N = 3 camundongos/grupo, *p=0,001 vs. tipo selvagem+ PBS, **p=0,01 vs. *Il1r*^{-/-} , †p=0,66 vs. tipo selvagem+ PBS, ‡p=0,89 vs. tipo selvagem+ NTHi)

[00042] **Figura 14. Contagem de leucócitos no fluido do lavado bronco-alveolar depois do tratamento com ligantes de TLR sintéticos isolados.** Camundongos foram submetidos à BAL 24 h depois do tratamento com PBS ou um dos seguintes ligantes de TLR: Pam3CSK4 (agonista de TLR2/1, 1 µg/mL, 3µg/mL, 10µg/mL), Pam2CSK4 (agonista de TLR2/6, 1 µg/mL, 3 µg/mL, 10 µg/mL), Poly(I:C) (agonista de TLR3, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL), lipídeo A sintético (MPLA, agonista de TLR4, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL), Flg22 (22-mer de flagelina sintética, agonista de 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 de TLR9, 2 µg/mL, 20 µg/mL). São mostradas as contagens de neutrófilos (barras pretas) e macrófagos (barras cinza) no fluido de BAL.

[00043] **FIGs. 15A - 15G.** Tratamento com aerossol de ligantes individuais sintéticos de TLR não induz um alto nível de resistência contra a pneumonia. Camundongos de tipo selvagem foram inoculados com *P. aeruginosa* depois do tratamento com PBS (8 mL nebulizados durante 20 min) ou com os seguintes ligantes sintéticos de TLR 24 h antes: Figura 15A. Agonista de TLR2/1, Pam3CSK4 100 µg/mL, Figura 15B. Agonista de TLR2/6, Pam2CSK4 10 µg/mL, Figura 15C. Agonista de TLR3, poli (I:C) 100 µg/mL, Figura 15D. Agonista de TLR4, MPLA 100 µg/mL, Figura 15E. Agonista de TLR5, Flg22 100 µg/mL, Figura 15F. Agonista de TLR7 e TLR8, imiquimod 1 mg/mL, ou Figura 15G. Agonista de TLR9, ODN 2395 20 µg/mL. As curvas de sobrevivência são representativas de pelo menos três experimentos distintos para camundongos tratados e não tratados (N = 8 camundongos/grupo, *p=0,5, **p=1,0, †p=0,47, ‡p=0,2).

[00044] **FIGs. 16A - 16C.** Agonistas de TLR2/6 TLR9 cooperam para induzir a resistência contra a pneumonia bacteriana. Figura 16A. *Esquerda*, sobrevivência de camundongos inoculados com *P. aeruginosa* 24 h depois do tratamento com PBS, Pam2CSK4 10 µg/mL, ODN 2395 20 µg/mL, a combinação ou a combinação em dose dupla (N = 6 camundongos/grupo, ‡p=0,008 vs. PBS). *Direita*, Sobrecarga bacteriana de homogenatos pulmonares imediatamente depois da infecção com *P. aeruginosa* (N = 3 camundongos/grupo, #p=0,045 vs. PBS, ###p=0,030 vs. PBS). Figura 16B. *Esquerda*, sobrevivência de camundongos inoculados com *S. pneumoniae* 24 h depois do tratamento com PBS, Pam2CSK4 10 µg/mL, ODN 2395 20 µg/mL, a combinação ou a combinação em dose dupla (N = 10 camundongos/grupo, ‡p<0,0001 vs. Tratados com PBS). *Direita*,

Sobrecarga bacteriana de homogenatos pulmonares imediatamente depois da infecção com *S. pneumoniae* 2×10^{10} (N = 3 camundongos/grupo, †p<0,001, ‡p<0,0001). Figura 16C. Contagem celular em BAL de camundongos 4 ou 24 h depois do tratamento com PBS, Pam2CSK4 10 µg/mL, ODN 2395 20 µg/mL, ou a combinação de Pam2CSK4 e ODN2395 (N = 3 camundongos/grupo, *p=0,016 vs. PBS, **p<0,0001 vs. PBS, †p=0,041 vs. Pam2 isolado).

[00045] **FIGs. 17A - 17F.** Nem todas as combinações de agonistas de TLR fornecem proteção significativa contra a pneumonia. Camundongos de tipo selvagem foram inoculados com *P. aeruginosa* depois do tratamento com PBS ou depois das combinações de agonistas de TLR 24 h antes: Figura 17A. Pam2CSK4 e poli (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 sobrevida são exemplos representativos de pelo menos três experimentos distintos (N = 8 camundongos/grupo, *p=0.20, **p=0.08, †p=1.0, ‡p=0.5).

[00046] **FIGs. 18A - 18B.** TLR2 é suficiente para promover a sinergia protetora de Pam2CSK4 e ODN2395, mas não é necessário para a resistência induzida. Figura 18A. *Esquerda*, sobrevida de camundongos *Tlr2*^{-/-} e de tipo selvagem inoculados com *P. aeruginosa* com ou sem tratamento com ODN2395 e Pam2CSK4 24 h antes (N = 8 camundongos/grupo, *p<0,0002). *Direita*, Sobrecarga bacteriana de homogenatos pulmonares imediatamente depois da infecção com *P. aeruginosa* (N = 4 camundongos/grupo, **p<0,0001 vs. tipo selvagem+ PBS, †p=0,59 vs. *Tlr2*^{-/-} + PBS) Figura 18B. *Esquerda*, sobrevida de camundongos *TLR2*^{-/-} e de tipo selvagem inoculados com *P. aeruginosa* com ou sem tratamento 24 h antes com um lisado aerossolizado de *H. influenzae* não tipado (NTHi) (N = 10 camundongos/grupo, *p<0,0002). *Direita*, Sobrecarga bacteriana de homogenatos pulmonares

imediatamente depois da infecção com *P. aeruginosa* (N = 3 camundongos/grupo, ‡p=0,03 vs. tipo selvagem+ PBS, #p=0,002 vs. *Tlr2^{-/-}* + PBS).

[00047] **FIGs. 19A - 19B.** Ligação de TLR9 a ODNs de CpGs Classe C, mas não a Classe A ou B, interage sinergicamente com Pam2CSK4 para induzir a resistência à pneumonia bacteriana. Figura 19A. Sobrevida de camundongos tipo selvagem tratados com Pam2CSK4 e ODN2395 ou Pam2CSK4 e uma ODN de controle aleatória 24 h antes da inoculação com *P. aeruginosa* (N = 10 camundongos/grupo, *p<0,0001). Figura 19B. Sobrevida de camundongos tipo selvagem tratados com *P. aeruginosa* 24 h depois do tratamento com PBS ou Pam2CSK4 combinado com ODNs de CpG Classe A (ODN1585 ou ODN2216), a ODNs de CpG Classe B (ODN 2006-G5) ou ODNs de CpG Classe C (M362 ou ODN2395) (N = 10 camundongos/grupo, *p=0,01 vs. PBS, **p=0,0001 vs. PBS; †p=0,3 vs. Pam2 + ODN2395).

[00048] **FIGs. 20A - 20D.** Agonistas de TLR2/6 e TLR9 cooperam para induzir a morte bacteriana por células do epitélio respiratório de murino e humano *in vitro*. Figura 20A. Células MLE-15 foram tratadas com Pam2CSK4 (10 µg/mL) e/ou ODN2395 (20 µg/mL) por 4 h antes da infecção com *B. anthracis* (1000 esporos). São mostradas CFU bacterianas 4 h depois da infecção (*p=0,05 vs. PBS, **p=0,016 vs. PBS, #p>0,05 vs. qualquer agonista isolado). Figura 20B. Meio de cultura MLE (sem células) foi tratado com ODN2395 e Pam2CSK4, infectado com *B. anthracis* (1000 esporos), e cultivado depois de 4 h (†p=1,0). Figura 20C. Células A549 foram tratadas com ODN2395 e Pam2CSK4 por 4 h antes da infecção com *P. aeruginosa* (2700 CFU). São mostradas CFU bacterianas 4 h depois da infecção (*p=0,01 vs. PBS, **p=0,003 vs. PBS, ***p=0,001 vs. PBS, #p=>0,05 vs. qualquer agonista isolado). Figura 20D. Meio de cultura MLE (sem células) foi tratado com ODN2395 e Pam2CSK4, infectado com *P. aeruginosa*

(4000 CFU), e cultivado depois de 4 h ($\pm p=0.58$).

[00049] **Figura 21.** Sobrevida de camundongos Swiss-Webster imunizados com vários agonistas de TLR sintéticos e inoculados por via intranasal com 5 LD₅₀ de *Bacillus anthracis* Ames Spores (MD-10-013). Camundongos foram pré-tratados com agonistas de TLR em aerossol como indicado 24 horas antes da inoculação do antraz. ALIIS = lisado bacteriano de NTHi, 2395 = ODN2395, 10101 = ODN10101, M362 = ODN-M362. 1x = ODN 40 µg/mL e Pam2 20 µg/mL.

[00050] **Figura 22.** Efeito do pré-tratamento com aerossol de ODNs/Pam2 ou lisado de NTHi sobre a sobrevida de camundongos infectados com influenza A/HK. Um tratamento com aerossol de 30 min; Dose do Vírus Influenza: ~100 TCID₅₀/camundongo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00051] O sistema imune é o sistema de células e órgãos especializados que protegem um organismos de influencias biológicas externas. Quando o sistema imune está funcionando apropriadamente, ele protege o corpo contra infecções bacterianas e destrói células cancerosas e substancias estranhas. Se o sistema imune enfraquece, sua habilidade de defender o corpo também enfraquece, permitindo que patógenos cresçam no corpo.

[00052] O sistema imune é frequentemente dividido em: (a) imunidade inata compreendida pelos componentes que fornecem uma “primeira linha” de defesa para bloquear continuamente os patógenos e (b) imunidade adaptativa (adquirida) que compreende a fabricação de anticorpos e a produção ou a estimulação de células T designadas especificamente para atingir patógenos em particular. Usando a imunidade adaptativa, o corpo pode desenvolver ao longo do tempo uma imunidade específica para patógenos em particular. Essa resposta leva dias para se desenvolver e portanto não é eficaz na prevenção de uma invasão inicial, mas ela normalmente evitará qualquer infecção

subseqüente e também auxiliará na limpeza depois de infecções de longa duração.

[00053] Em resposta a certos estímulos inflamatórios, as células secretórias do epitélio das vias aéreas de camundongos e humanos sofrem rapidamente uma alteração notável na estrutura denominada metaplasia inflamatória. A maioria das alterações estruturais pode ser relacionada à produção aumentada de mucinas secretadas que formam gel, enquanto que macromoléculas adicionais com funções na secreção da mucina, more microbiana ou sinalização inflamatória também são reguladas positivamente. A função fisiológica dessa resposta é considerada ser o aumento das defesas locais contra patógenos microbianos, embora essa hipótese tenha recebido apenas um teste formal limitado. Paradoxalmente, a produção e a secreção excessivas de mucinas que formam géis é uma causa principal de obstrução do fluxo de ar em doenças inflamatórias comuns das vias aéreas tais como a asma, fibrose cística e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). A estimulação da imunidade inata sem a produção de mucina fornecerá um método adicional de atenuação da infecção do trato respiratório pela prevenção e/ou tratamento de um indivíduo.

[00054] Modalidades da invenção incluem a estimulação das vias aéreas de um indivíduo com uma composição que compreenda 1, 2, 3, 4 ou mais agonistas de TLR, incluindo segmentos ou derivados ou análogos desses. Um indivíduo tratado com uma composição da invenção está suprido com uma resposta terapêutica, profilática ou terapêutica e profilática a um organismo potencialmente infectante. Em aspectos particulares, uma composição é aerossolizada e administrada através do trato respiratório. A composição é usada para induzir ou fazer surgir de outra maneira um efeito protetor, por exemplo, pela ativação ou aumento da imunidade inata dos pulmões.

[00055] Certos aspectos da invenção incluem moléculas pequenas

e/ou agonistas de TLR derivados de vários microrganismos ou sintetizados pelo homem. Tipicamente, a molécula pequena e/ou o agonista de TLR não induzem uma produção aumentada de mucinas secretadas. Modalidades da invenção podem ser usadas como uma terapêutica preventiva e antecipada contra, por exemplo, armas biológicas, micróbios neo-virulentos ou micróbios oportunistas.

I. COMPOSIÇÕES StIR

A. Compostos e porções heterólogas

[00056] Várias moléculas não hospedeiras ou heterólogas podem estimular, intensificar ou contribuir para a produção de uma resposta imune. Essas porções incluem agonistas de receptores inatos e/ou componentes microbianos.

1. Ligantes de receptor inato

[00057] Receptores de reconhecimento padrão ou PRRs (receptores inatos) são proteínas expressas pelas células do sistema imune inato para identificar padrões moleculares associados à patógenos ou PAMPs, que estão associados à patógenos microbianos ou estresse celular. PAMPs incluem, mas não estão limitados a carboidratos bacterianos (por exemplo, lipopolissacarídeo ou LPS, manose), ácidos nucleicos (por exemplo, DNA ou RNA bacteriano ou viral), peptídeoglicanos e ácidos lipotecóicos (de bactérias Gram positivas), N-formilmetionina, lipoproteínas, glicanos fúngicos e semelhantes.

[00058] PRRs são classificados tipicamente de acordo com sua especificidade ao ligante, função, localização e/ou relacionamentos evolutivos. Com base na função, PRRs podem ser divididos em PRRs endocíticos ou PRRs de sinalização. PRRs de sinalização incluem as grandes famílias dos receptores semelhantes à Toll ligados a membrana e receptores semelhantes à NOD citoplasmáticos. Os PRRs endocíticos promovem o acoplamento, englobamento e a destruição de microrganismos por fagócitos, sem a transmissão de um sinal

intracelular. Esses PRRs reconhecem carboidratos e incluem os receptores de manose de macrófagos, receptores de glicano presentes sobre todos os fagócitos e receptores scavenger que reconhecem ligantes carregados, são encontrados em todos os fagócitos e mediam a remoção de células apoptóticas.

[00059] Vários receptores inatos têm sido identificados incluindo, mas não limitados a receptor semelhante à Toll (TLR), receptor de lectina tipo C (CLRs) e receptor semelhante a domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo (receptores semelhantes à Nod ou NLRs). TLRs é uma classe de proteínas que desempenham um papel importante no sistema imune inato. Eles são receptores não catalíticos que abrangem uma única membrana que reconhecem moléculas estruturalmente conservadas derivadas de micróbios. Sempre que esses micróbios estão presentes na pele ou no trato gastrointestinal, pulmões e mucosa geniturinária, eles são reconhecidos pelos TLRs, que ativam as respostas celulares imunes. Interessantemente, vários desses agonistas de TLR não induzem StIR quando administrados sozinhos. Tipicamente, um indivíduo ou paciente a ser tratado usando os métodos aqui descritos foi exposto a um micróbio patogênico ou está em risco de tal exposição.

a. Agonista do receptor semelhante à Toll (TLR)

[00060] Receptores semelhantes a Toll (TLRs) são os PRRs melhor caracterizados (Ishii et al., 2008). Eles são proteínas transmembrana altamente conservadas, consistindo de um ectodomínio com múltiplas repetições ricas em leucina para o padrão de reconhecimento, uma hélice α que atravessa a membrana e um domínio do receptor de interleucina-1 (TIR)/Toll para a sinalização intracelular. Pelo menos 13 TLRs de mamífero já foram identificados, cada um se localizando especificamente ou na membrana plasmática ou nas membranas endossomais e cada um detecta um complemento único de PAMPs

(Akira *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2006). Depois do reconhecimento de PAMP, ocorre a transdução do sinal através do recrutamento específico para TLR de combinações de proteína adaptadora para TIR citosólico. De acordo com um ou mais dos quatro outros adaptadores, a proteína adaptadora de TIR, MyD88, é requisitada para a sinalização da maioria dos TLRs. Os eventos de sinalização independentes de MyD88 observados entre TLR3 e TLR4 requerem o adaptador TRIF (também conhecido como TICAM-1) de TIR, com ou sem a participação de TRAM (Yamamoto *et al.*, 2003). A cascata de sinalização do adaptador de TIR específico para TLR ativa os fatores da transcrição específicos para o receptor, tais como NF- κ B, que ativam a proteína-1 e fatores regulatórios de interferon (IRFs), levando a expressão de genes inflamatórios e anti-microbianos (Akira *et al.*, 2006; O'Neill, L.A., and Bowie, 2007; Takeda, K., e Akira, 2004).

[00061] Um agonista de TLR é qualquer composto que funcione para ativar um TLR, por exemplo, para induzir um evento de sinalização mediado por uma via de transdução de sinal de TLR. Agonistas de TLR adequados incluem os agonistas de TLR1, agonistas de TLR2, agonistas de TLR3, agonistas de TLR4, agonistas de TLR5, agonistas de TLR6, agonistas de TLR7, agonistas de TLR8, e agonistas de TLR9.

[00062] Agora é amplamente reconhecido que a geração de imunidade protetora depende não apenas da exposição ao antígeno, mas também do contexto no qual o antígeno é encontrado. Existem numerosos exemplos nos quais a introdução de um novo antígeno em um hospedeiro, em um contexto inflamatório, gera mais tolerância imunológica do que imunidade a longo prazo, enquanto que a exposição ao antígeno na presença de um agente inflamatório (adjuvante) induz a imunidade (Mondino *et al.*, 1996; Pulendran *et al.*, 1998; Jenkins *et al.*, 1994; e Keamey *et al.*). Já que isso pode significar a diferença entre tolerância e imunidade, grandes esforços se dirigiram para a

constatação dos “adjuvantes” presentes dentro dos agentes infecciosos que estimulam as vias moleculares envolvidas na criação do contexto imunogênico apropriado da apresentação do antígeno. Agora é sabido que boa parte da atividade adjuvante é devida a interações de produtos microbianos e virais com diferentes membros dos Receptores Semelhantes a Toll (TLRs) expressos sobre as células imunes (Beutler *et al.*, 2004; Kaisho, 2002; Akira *et al.*, 2003; e Takeda and Akira, 2004). Os TLRs são denominados por sua homologia com uma molécula de *Drosophila*, chamada Toll, que funciona no seu desenvolvimento e está envolvida na imunidade anti-microbiana (Lernaitre *et al.*, 1996; e Hashimoto *et al.*, 1988).

[00063] Estudos anteriores mostraram que homólogos a Toll de mamíferos e moléculas da via de Toll eram críticos para a habilidade das células do sistema imune inato de responder a infecções microbianas e sub-produtos microbianos (Medzhitov *et al.*, 1997; Medzhitov *et al.*, 1998; Medzhitov *et al.*, 2000; and Janeway *et al.*, 2002). Desde a identificação de LPS como um agonista de TLR4 (Politorak *et al.*, 1998), numerosos outros TLRs têm sido descritos, tais como polipeptídeos triacila de múltiplos tipos de HPV (TLR1), peptidoglicano, ácido lipoteicóico e Pam₃Cys (TLR2), dsRNA (TLM), flagelina (TLR5), polipeptídeos diacila de múltiplos tipos de HPV tal como Malp-2 (TLR6), imidazoquinolinas e RNA de fita simples (TLR7,8), DNA bacteriano, sequências não metiladas de CpG DNA, e até complexos de anticorpo de DNA genômico humano (TLR9) (Takeuchi *et al.*, 2001; Edwards *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2003; Nagase *et al.*, 2003).

[00064] A expressão “agonista”, como usada aqui, se refere a um composto que pode se combinar com um receptor (por exemplo, um TLR) para produzir uma atividade celular. Um agonista pode ser um ligante que se liga diretamente ao receptor. Alternativamente, um agonista pode combinar com um receptor indiretamente, por exemplo,

pela (a) formação de um complexo com outra molécula que se ligue diretamente ao receptor ou, (b) resulte de outra maneira na modificação do outro composto tal que o outro composto se liga diretamente ao receptor. Um agonista pode ser referido como um agonista de um TLR em particular (por exemplo, um agonista de TLR7) ou de uma combinação particular de TLRs (por exemplo, um agonista de TLR7/8—um agonista de ambos, TLR7 e TLR8).

[00065] As expressões “CpG-ODN”, “ácido nucleico de CpG”, “polinucleotídeo de CpG” e “oligonucleotídeo de CpG”, usadas aqui alternativamente, se referem a um polinucleotídeo que compreende pelo menos uma porção 5'-GG-3' e, em várias modalidades, compreende uma porção 5'-GG-3' não metilada. Em geral, um ácido nucleico de CpG é um polinucleotídeo de DNA ou RNA de fita simples ou dupla que possui pelo menos seis bases de nucleotídeo que podem compreender ou consistir de um nucleotídeo modificado ou de uma sequência de nucleosídeos modificados. Em algumas modalidades, a porção 5'-GG-3' do ácido nucleico de CpG é parte de uma sequência de nucleotídeos palindrômica. Em algumas modalidades, a porção 5'-GG-3' do ácido nucleico de CpG é parte de uma sequência de nucleotídeos não palindrômica.

[00066] Agonistas de TLR adequados incluem agonistas de TLR isolados, que ocorrem naturalmente; e agonistas de TLR sintéticos. Os agonistas de TLR isolados de uma fonte de agonistas de TLR que ocorre naturalmente são geralmente purificados, por exemplo, o agonista de TLR 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 do que 99% puro. Os agonistas de TLR sintéticos são preparados por métodos padronizados 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 do que 99% puros.

[00067] Agonistas de TLR adequados incluem os agonistas de TLR que não estão acoplados a qualquer outro composto. Agonistas de TLR adequados incluem agonistas de TLR que estão acoplados, covalentemente ou não covalentemente, a um segundo composto. Em algumas modalidades, um agonista de TLR está acoplado a outro composto diretamente. Em outras modalidades, um agonista de TLR está acoplado a outro composto através de um ligante. O composto ao qual um agonista de TLR está acoplado inclui um veículo, um arcabouço, um suporte insolúvel, uma micro-partícula, uma micro-esfera e semelhantes. Veículos incluem polipeptídeos terapêuticos; polipeptídeos que fornecem solubilidade aumentada; polipeptídeos que aumentam a meia vida do agonista de TLR em um meio fisiológico (por exemplo, soro ou outro fluido corporal); e semelhantes. Em algumas modalidades, um agonista de TLR estará conjugado, diretamente ou através de um ligante, a um segundo agonista de TLR.

[00068] Em algumas modalidades, o agonista de TLR é uma versão de pró-fármaco de um agonista de TLR. Pró-fármacos são compostos por uma porção de pró-fármaco ligada covalentemente a um agente terapêutico ativo. Pró-fármacos são capazes de serem convertidos em fármacos (agentes terapêuticos ativos) *in vivo* por certas modificações químicas ou enzimáticas de sua estrutura. Exemplos de porções de pró-fármaco são bem conhecidos na técnica e podem ser encontrados nas seguintes referencias: 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); and Prodrugs: Topical and Ocular Drug Delivery, Kenneth Sloan, Marcel Dekker; (1992). Exemplos de porções de pró-fármaco são peptídeos, por exemplo, peptídeos que direcionam o ligante de TLR para o local de

ação e um peptídeo que possua dois ou mais ácidos carboxílicos livres e não acoplados em sua terminação amino. Outras porções de pró-fármaco cliváveis exemplificadoras incluem grupos de éster, grupos de éter, grupos acila, grupos alquila, grupos fosfato, grupos sulfonato, N-óxidos e grupos ter-butoxi-carbonila.

[00069] Em algumas modalidades, o agonista de TLR é um agonista de TLR monomérico. Em outras modalidades, o agonista de TLR é multimérico, por exemplo, o agonista de TLR é polimérico. Em algumas modalidades, o agonista de TLR multimerizado é homofuncional, por exemplo, é composto por um tipo de agonista de TLR. Em outras modalidades, o agonista de TLR multimerizado é um agonista de TLR heterofuncional.

[00070] Em algumas modalidades, um ligante de TLR é um ligante de TLR quimérico (também referido aqui como um ligante de TLR “heterofuncional”). Em algumas modalidades, um agonista de TLR compreende uma porção de um agonista de TLR9 e uma porção de agonista de TLR2. Os exemplos a seguir são exemplos não limitantes de agonistas de TLR heterofuncionais.

[00071] Em algumas modalidades, um ligante de TLR quimérico tem a seguinte fórmula: $(X)_n-(Y)_m$, onde X é um agonista de TLR1, agonista de TLR2, agonista de TLR3, agonista de TLR4, agonista de TLR5, agonista de TLR6, agonista de TLR7, agonista de TLR8 e agonista de TLR9 e onde Y é um agonista de TLR2, agonista de TLR3, agonista de TLR4, agonista de TLR5, agonista de TLR6, agonista de TLR7, agonista de TLR8 e agonista de TLR9 e n e m são independentemente um número inteiro entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais, incluindo todos os valores e faixas nesse intervalo. Em certas modalidades, X ou Y é TLR9 e X ou Y é TLR2/6.

[00072] **Agonistas de TLR2.** Agonistas de TLR2 incluem agonistas de TLR2 isolados que ocorrem naturalmente; e agonistas de TLR2

sintéticos. Agonistas de TLR2 isolados de uma fonte de agonistas de TLR2 que ocorre naturalmente são geralmente purificados, por exemplo, o agonista de TLR2 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 do que 99% puro. Agonistas de TLR2 sintéticos são preparados por meios padronizados 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 do que 99% puros.

[00073] Os agonistas de TLR2 incluem agonistas de TLR2 que não estão acoplados a qualquer outro composto. Os agonistas de TLR2 incluem agonistas de TLR2 que estão acoplados, covalentemente ou não covalentemente, a um segundo composto. Em algumas modalidades, um agonista de TLR2 está acoplado a outro composto diretamente. Em outras modalidades, um agonista de TLR2 está acoplado a outro composto através de um ligante.

[00074] Agonistas de TLR2 incluem lipopeptídeos triacilados e diacilados sintéticos. Um exemplo não limitante de um ligante de TLR2 é FSL-1 (uma lipoproteína sintética derivada de *Mycoplasma salivarium* 1), Pam₃Cys (tripalmitoil-S-gliceril cisteína) ou S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-(2R,S)-propil]-N-palmitoil-(R)-cisteína, onde "Pam₃" é "tripalmitoil-S-gliceril") (Aliprantis *et al.*, 1999). Derivados de Pam₃Cis também são agonistas de TLR2 adequados, onde os derivados incluem, mas não são limitados a, hidroxitri-hidrocloreto de S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-(2-R,S)-propil]-N-palmitoil-(R)-Cis-(S)-Ser-(Lis)₄; Pam₃Cis-Ser-Ser-Asn-Ala; Pam₃Cis-Ser-(Lis)₄; Pam₃Cis-Ala-Gli; Pam₃Cis-Ser-Gli; Pam₃Cis-Ser; Pam₃Cis-OMe; Pam₃Cis-OH; PamCAG, palmitoil-Cis((RS)-2,3-di(palmitoiloxi)-propil)-Ala-Gli-OH; e semelhantes. Outro exemplo não limitante de um agonista de TLR2 adequado é Pam₂CSK₄ Pam₂CSK₄

(dipalmitoil-S-gliceril cisteína-serina-(lisina)₄; ou Pam₂Cis-Ser-(Lis)₄) é um lipopeptídeo diacilado sintético. Agonistas de TLRs sintéticos estão descritos na literatura. Veja, por exemplo, Kellner *et al.* (1992); Seifer *et al.* (1990); Lee *et al.* (2003).

[00075] **Agonistas de TLR3.** Agonistas de TLR3 incluem agonistas de TLR3 isolados que ocorrem naturalmente; e agonistas de TLR3 sintéticos. Agonistas de TLR3 isolados de uma fonte de agonistas de TLR3 que ocorre naturalmente são geralmente purificados, por exemplo, o agonista de TLR3 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 do que 99% puro. Agonistas de TLR3 sintéticos são preparados por meios padronizados 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 do que 99% puros.

[00076] Os agonistas de TLR3 incluem agonistas de TLR3 que não estão acoplados a qualquer outro composto. Os agonistas de TLR3 incluem agonistas de TLR3 que estão acoplados, covalentemente ou não covalentemente, a um segundo composto. Em algumas modalidades, um agonista de TLR3 está acoplado a outro composto diretamente. Em outras modalidades, um agonista de TLR3 está acoplado a outro composto através de um ligante.

[00077] Agonistas de TLR3 incluem RNA de fita simples ou dupla (dsRNA) que ocorre naturalmente; ds RNA sintético; e análogos de dsRNA sintético; e semelhantes (Alexopoulou *et al.*, 2001). Um exemplo não limitante de análogo de dsRNA sintético é poly(I:C).

[00078] **Agonistas de TLR4.** Agonistas de TLR4 incluem agonistas de TLR4 isolados que ocorrem naturalmente; e agonistas de TLR4 sintéticos. Agonistas de TLR4 isolados de uma fonte de agonistas de

TLR4 que ocorre naturalmente são geralmente purificados, por exemplo, o agonista de TLR4 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 do que 99% puro. Agonistas de TLR4 sintéticos são preparados por meios padronizados 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 do que 99% puros.

[00079] Os agonistas de TLR4 incluem agonistas de TLR4 que não estão acoplados a qualquer outro composto. Os agonistas de TLR4 adequados incluem agonistas de TLR4 que estão acoplados, covalentemente ou não covalentemente, a um segundo composto. Em algumas modalidades, um agonista de TLR4 está acoplado a outro composto diretamente. Em outras modalidades, um agonista de TLR4 está acoplado a outro composto através de um ligante. Compostos adequados aos quais um agonista de TLR4 está ligado incluem um veículo, um arcabouço e semelhantes.

[00080] Agonistas de TLR4 incluem lipopolissacarídeos que ocorrem naturalmente (LPS), *por exemplo*, LPS de uma grande variedade de bactérias Gram negativas; derivados de LPS que ocorrem naturalmente; LPS sintético; proteína-60 de bactérias de choque térmico (Hsp60); polímeros de ácido manurônico; flavolipinas; ácidos teicurônicos; pneumolisina de *S. pneumoniae*; fímbrias bacterianas, proteína de revestimento do vírus sincicial respiratório; e semelhantes. Agonista de TLR4 também inclui monofosforil lipídeo A sintético (MPLAs, Invivogen) e Phosphorylated HexaAcyl Disaccharide (PHAD, Avanti Polar Lipids), assim como outros agonistas sintéticos de TLR4.

[00081] **Agonistas de TLR5.** Agonistas de TLR5 incluem agonistas de TLR5 isolados que ocorrem naturalmente; e agonistas de TLR5

sintéticos. Agonistas de TLR5 isolados de uma fonte de agonistas de TLR5 que ocorre naturalmente são geralmente purificados, por exemplo, o agonista de TLR5 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 do que 99% puro. Agonistas de TLR5 sintéticos são preparados por meios padronizados 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 do que 99% puros.

[00082] Os agonistas de TLR5 incluem agonistas de TLR5 que não estão acoplados a qualquer outro composto. Os agonistas de TLR5 adequados incluem agonistas de TLR5 que estão acoplados, covalentemente ou não covalentemente, a um segundo composto. Em algumas modalidades, um agonista de TLR5 está acoplado a outro composto diretamente. Em outras modalidades, um agonista de TLR5 está acoplado a outro composto através de um ligante. Compostos adequados aos quais um agonista de TLR5 está ligado incluem um veículo, um arcabouço e semelhantes.

[00083] Os agonistas de TLR5 incluem um segmento com 22 aminoácidos altamente conservado de flagelina, assim como a flagelina de extensão completa e outros segmentos dessa.

[00084] **Agonistas de TLR7.** Agonistas de TLR7 incluem agonistas de TLR7 isolados que ocorrem naturalmente; e agonistas de TLR7 sintéticos. Agonistas de TLR7 isolados de uma fonte de agonistas de TLR7 que ocorre naturalmente são geralmente purificados, por exemplo, o agonista de TLR7 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 do que 99% puro. Agonistas de TLR7 sintéticos são preparados por meios

padronizados 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 do que 99% puros.

[00085] Os agonistas de TLR7 incluem agonistas de TLR7 que não estão acoplados a qualquer outro composto. Os agonistas de TLR7 adequados incluem agonistas de TLR7 que estão acoplados, covalentemente ou não covalentemente, a um segundo composto. Em algumas modalidades, um agonista de TLR7 está acoplado a outro composto diretamente. Em outras modalidades, um agonista de TLR7 está acoplado a outro composto através de um ligante.

[00086] Ligantes de TLR7 incluem compostos de imidazoquinolina; análogos de guanosina; compostos de pirimidinona, tais como análogos de bropirimina e bropirimina; e semelhantes. Os compostos de imidazoquinolina que funcionam como ligantes de TLR7 incluem, mas não são limitados a imiquimod, (também conhecido como Aldara, R-837, S-26308), e R-848 (também conhecido como resiquimod, S-28463; que possui a estrutura química: 4-amino-2-etoximetil- α , α -dimetil-1H-imidazol[4,5-c]quinolono-1-etanol). Agentes de imidazoquinolina adequados incluem aminas de imidazoquinolina, aminas de imidazopiridina, aminas de cicloalquilimidazopiridina 6,7-fundidas e aminas de 1,2 imidazoquinolina ligadas. Esses 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. Espécies particulares de agentes de imidazoquinolina que são adequados para uso no método em questão incluem R-848 (S-28463); 4-amino-2-etoximetil- α , α -dimetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolino-s-i-etanol; e 1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina (R-837 ou Imiquimod). Também adequado para uso é o composto 4-amino-2-(etoximetil)- α ,

hidrato de α -dimetil-6,7,8,9-tetra-hidro-1H-imidazo[4,5-c]quinolino-1-etanol (veja por exemplo, BM-003 em Gorden *et al.* (2005).

[00087] Compostos adequados incluem aqueles que possuem uma 2-aminopiridina fundida com um anel heteocíclico com cinco membros contendo nitrogênio. Tais compostos incluem, por exemplo, amins de imidazoquinolina incluindo, mas não limitadas a amins de imidazoquinolina substituídas tais como, por exemplo, amins de imidazoquinolina substituídas por amida, amins de imidazoquinolina substituídas por sulfonamida, amins de imidazoquinolina substituídas por uréia, amins de imidazoquinolina substituídas por éter de arila, amins de imidazoquinolina substituídas por éter heterocíclico, amins de imidazoquinolina substituídas por amido éter, amins de imidazoquinolina substituídas por sulfonamido éter, éteres de imidazoquinolina substituídos por uréia, amins de imidazoquinolina substituídas por tioéter e amins de imidazoquinolina substituídas por 6-, 7-, 8- ou 9-arila ou heteroarila; amins de tetra-hidroimidazoquinolina incluindo, mas não limitadas a amins de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas por amida, amins de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas por sulfonamida, amins de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas por uréia, amins de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas por éter de arila, amins de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas por éter heterocíclico, amins de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas por amido éter, amins de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas por sulfonamido éter, éteres de tetra-hidroimidazoquinolina substituídos por uréia, amins de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas por tioéter; amins de imidazopiridina incluindo, mas não limitadas a amins de imidazopiridina substituídas por amida, amins de imidazopiridina substituídas por sulfonamida, amins de imidazopiridina substituídas por uréia, amins de imidazopiridina substituídas por éter arila, amins

de imidazopiridina substituídas por éter heterocíclico, amins de imidazopiridina substituídas por amido éter, amins de imidazopiridina substituídas por sulfonamido éter, éteres de imidazopiridina substituídos por uréia e amins de imidazopiridina substituídas por tioéter; amins de imidazoquinolina 1,2-ligadas; amins de cicloalquilimidazopiridina 6,7-fundidas; amins de imidazonaftiridina; amins de tetra-hidroimidazonaftiridina; amins de oxazoloquinolina; amins de tiazoloquinolina; amins de oxazolopiridina; amins de tiazolopiridina; amins de oxazolonaftiridina; amins de tiazolonaftiridina; e dímeros 1H-imidazo fundidos a amins de piridina, amins de quinolina, amins de tetra-hidroquinolina, amins de naftiridina e amins de tetra-hidronaftiridina.

[00088] Compostos incluem uma amina de imidazoquinolina substituída, uma amina de tetra-hidroimidazoquinolina, uma amina de imidazopiridina, uma amina de imidazoquinolina 1,2-ligada, uma amina de cicloalquilimidazopiridina 6,7-fundida, 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.

[00089] Como usado aqui, uma amina de imidazoquinolina substituída se refere a uma amina de imidazoquinolina substituídas por amida, amina de imidazoquinolina substituídas por sulfonamida, amina de imidazoquinolina substituídas por uréia, amina de imidazoquinolina substituídas por éter de arila, amina de imidazoquinolina substituídas por éter heterocíclico, amina de imidazoquinolina substituídas por amido éter, amina de imidazoquinolina substituídas por sulfonamido éter, éter de imidazoquinolina substituídos por uréia, amina de imidazoquinolina substituídas por tioéter e amina de imidazoquinolina substituídas por 6-, 7-,8- ou 9-arila ou heteroarila.

[00090] Análogos de guanosina que funcionam como ligantes de TLR7 incluem certos ribonucleotídeos e desoxirribonucleotídeos de guanina C8 substituídos e N7,C8-di-substituídos incluindo, mas não limitados a Loxoribine (7-alil-8-oxoguanosina), 7-tio-8-oxo-guanosina (TOG), 7-deazoguanosina, e 7-deazodeoxiguanosina (Lee *et al.*, 2003). Análogos de bropirimina (PNU-54461), 5-halo-6-fenil-pirimidinona, e bropirimina estão descritos na literature e também são adequados para uso. Veja, *por exemplo*, Vroegop *et al.* (1999). Exemplos adicionais de guanosinas C8-substituídas incluem, mas não são limitados a 8-mercaptoguanosina, 8-bromoguanosina, 8-metilguanosina, 8-oxo-7,8-di-hidroguanosina, C8-arilamino-2'-deoxiguanosina, C8-propinil-guanosina, ribonucleosídeos C8- e N7-substituídos de guanina tais como 7-alil-8-oxoguanosina (loxoribine) e 7-metil-8-oxoguanosina, 8-aminoguanosina, 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, e 8-hidroxiguanosina.

[00091] Em algumas modalidades, um ligante de TLR7 substituído por guanina é monomérico. Em outras modalidades, um ligante de TLR7 substituído por guanina é multimérico. Portanto, em algumas modalidades, um ligante de TLR7 tem a fórmula (B)_q, onde B é um ligante de TLR7 substituído por guanina e q é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. Os monômeros individuais de ligante de TLR7 em um ligante de TLR7 multimérico estão ligados, covalentemente ou não covalentemente, tanto diretamente um ao outro quanto através de um ligante. Agonistas de TLR7 adequados incluem um ligante de TLR7 como descrito na Publicação de Patente U.S. 2004/0162309.

[00092] Em algumas modalidades, um agonista de TLR7 é um agonista de TLR7 seletivo, por exemplo, o agonista modula a atividade celular através de TLR7, mas não modula a atividade celular através de TLR8. Agonistas seletivos de TLR7 incluem aqueles mostrados na Publicação de Patente U.S. 2004/0171086. Tais compostos agonistas seletivos de TLR7 incluem, mas não são limitados a N¹-{4-[4-amino-2-(2-

metoxietil)- 6,7,8,9-tetra-hidro- 1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]butil]-4-fluor-1-benzenosulfonamida, N¹-[4-(4-amino-2-(2-metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butil]-4-fluor-benzenosulfonamida, N-[4-(4-amino-2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butil]metanosulfonamida, 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]etoxi}etil)-N-metilmetanosulfonamida, 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]ciclopentanocarboxamida, 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-ciclohexiluréia, 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]metanosulfonamida, 1-[6-(metanosulfonil)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-metiheptan-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}metanosulfonamida, 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 etila de ácido 4-[3-(4-amino-6,7-dimetil-2-propil-

1H-imidazo[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-(metanesulfonilamino)hexiloxi]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il}-1,1-dimetiletil)metanosulfonamida, N-(6-{[4-amino-2-etoximetil-1-(2-metanosulfonilamino-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, [3-(4-amino-2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)propoxi]amida de ácido ciclopropanocarboxílico, éster 4-amino-2-(2-metoxietil)-1-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-7-ila de ácido Isopropilcarbâmico, 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-(metanosulfonilamino)hexiloxi]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il}-1,1-dimetiletil)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-ciclohexilmetil-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}metanosulfonamida, e/ou N,N-dimetil-4-(4-amino-2-etoximetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butano-1-sulfonamida.

[00093] Agonistas seletivos de TLR7 adicionais incluem, mas não são limitados a 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-metilbenzenosulfonamida (Patente U.S. 6.331.539); e N-[4-(4-amino-2-etil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butil]ciclo-hexanecar-boxamida (Publicação de Patente U.S. 2004/0171086 (IRM8)). Também adequada para uso é o agonista seletivo de TLR7 N-[4-(4-amino-2-etil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butil]-metanosulfon-amida (Gorden *et al.*, 2005).

[00094] **Agonistas de TLR8.** Agonistas de TLR8 adequados incluem agonistas de TLR8 isolados que ocorrem naturalmente; e agonistas de TLR8 sintéticos. Agonistas de TLR8 isolados de uma fonte de agonistas de TLR8 que ocorre naturalmente são geralmente purificados, por exemplo, o agonista de TLR8 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 do que 99% puro. Agonistas de TLR8 sintéticos são preparados por meios padronizados 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 do que 99% puros.

[00095] Os agonistas de TLR8 incluem agonistas de TLR8 que não estão acoplados a qualquer outro composto. Os agonistas de TLR8 adequados incluem agonistas de TLR8 que estão acoplados, covalentemente ou não covalentemente, a um segundo composto. Em algumas modalidades, um agonista de TLR8 está acoplado a outro composto diretamente. Em outras modalidades, um agonista de TLR8 está acoplado a outro composto através de um ligante.

[00096] Agonistas de TLR8 incluem, mas não são limitados a compostos tais como R-848 e seus derivados e análogos. Agonistas de TLR8 adequados incluem compostos que possuem uma 2-aminopiridina fundida a um anel heterocíclico com cinco membros que contêm nitrogênio. Tais compostos incluem, por exemplo, aminas de imidazoquinolina incluindo, mas não limitados a aminas de imidazoquinolina substituídas tais como, por exemplo, aminas de imidazoquinolina substituídas por amida, aminas de imidazoquinolina substituídas por sulfonamida, aminas de imidazoquinolina substituídas por uréia, aminas de imidazoquinolina substituídas por éter de arila, aminas de imidazoquinolina substituídas por éter heterocíclico, aminas de imidazoquinolina substituídas por amido éter, aminas de imidazoquinolina substituídas por sulfonamido éter, éteres de imidazoquinolina substituídos por uréia, aminas de imidazoquinolina substituídas por tioéter e aminas de imidazoquinolina substituídas por 6-, 7-, 8- ou 9-arila ou heteroarila; aminas de tetra-hidroimidazoquinolina incluindo, mas não limitadas a aminas de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas por amida, aminas de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas por sulfonamida, aminas de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas por uréia, aminas de tetra-hidroimidazoquinolina

substituídas por éter de arila, amins de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas por éter heterocíclico, amins de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas por amido éter, amins de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas por sulfonamido éter, éteres de tetra-hidroimidazoquinolina substituídos por uréia, amins de tetra-hidroimidazoquinolina substituídas por tioéter; amins de imidazopiridina incluindo, mas não limitadas a amins de imidazopiridina substituídas por amida, amins de imidazopiridina substituídas por sulfonamida, amins de imidazopiridina substituídas por uréia, amins de imidazopiridina substituídas por éter arila, amins de imidazopiridina substituídas por éter heterocíclico, amins de imidazopiridina substituídas por amido éter, amins de imidazopiridina substituídas por sulfonamido éter, éteres de imidazopiridina substituídos por uréia e amins de imidazopiridina substituídas por tioéter; amins de imidazoquinolina 1,2-ligadas; amins de cicloalquilimidazopiridina 6,7-fundidas; amins de imidazonaftiridínea; amins de tetra-hidroimidazonaftiridina; amins de oxazoloquinolina; amins de tiazoloquinolina; amins de oxazolopiridina; amins de tiazolopiridina; amins de oxazolonaftiridina; amins de tiazolonaftiridina; e dímeros 1H-imidazo fundidos a amins de piridina, amins de quinolina, amins de tetra-hidroquinolina, amins de naftiridina e amins de tetra-hidronaftiridina.

[00097] Em uma modalidade particular, o agonista de TLR8 é uma amina de imidazoquinolina substituída por amida. Em uma modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de imidazoquinolina substituída por sulfonamida. Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de imidazoquinolina substituída por uréia. . Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de imidazoquinolina substituída por tioéter. . Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de

imidazoquinolina substituída por 6-, 7-, 8- ou 9-arila ou heteroarila.

[00098] Em uma modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de tetra-hidroimidazoquinolina substituída por amida. Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de tetra-hidroimidazoquinolina substituída por sulfonamida. Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de tetra-hidroimidazoquinolina substituída por uréia.

[00099] Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de tetra-hidroimidazoquinolina substituída por éter de arila. Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de tetra-hidroimidazoquinolina substituída por éter heterocíclico. Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de tetra-hidroimidazoquinolina substituída por amido éter. Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de tetra-hidroimidazoquinolina substituída por sulfonamido éter. Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de tetra-hidroimidazoquinolina substituída por uréia. Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de tetra-hidroimidazoquinolina substituída por tioéter.

[000100] Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de imidazopiridina substituída por amida. Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de imidazopiridina substituída por sulfonamida. Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de imidazopiridina substituída por uréia. Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de imidazopiridina substituída por éter de arila. Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de imidazopiridina substituída por éter heterocíclico. Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de imidazopiridina substituída por amido éter. Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina

de imidazopiridina substituída por sulfonamido éter. Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é um éter de imidazopiridina substituída por uréia. Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de imidazopiridina substituída por tioéter.

[000101] Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de imidazoquinolina 1,2-ligada. Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de cicloalquilimidazopiridina 6,7-fundida.

[000102] Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de imidazonaftiridina. Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de tetra-hidroimidazonaftiridina. Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de oxazoloquinolina. Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de tiazoloquinolina. Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de oxazolopiridina. Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de tiazolopiridina. Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de oxazolonaftiridina. Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é uma amina de tiazolonaftiridina.

[000103] Em outra modalidade alternativa, o agonista de TLR8 é um dímero de 1H-imidazo fundido com uma amina de piridina, amina de quinolina, amina de tetra-hidroquinolina, amina de naftiridina ou amina de tetra-hidronaftiridina.

[000104] Em algumas modalidades, o agonista de TLR8 é um agonista seletivo de TLR8, por exemplo, agonistas que modulam a atividade celular através de TLR8, mas não modulam a atividade celular através de TLR7. Agonistas seletivos de TLR8 incluem aqueles da Publicação de Patente U.S. 2004/0171086. Tais compostos agonistas seletivos de TLR8 incluem, mas não são limitados aos compostos mostrados na Publicação de Patente U.S. 2004/0171086 que inclui N-

{4-[4-amino-2-(2-metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-yl]butil}quinolin-3-carboxamida, N-{4-[4-amino-2-(2-metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-yl]butil}quinoxolino-2-carboxamida, e N-[4-(4-amino-2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-yl)butil]morfolino-4-carboxamida.

[000105] Outros agonistas seletivos de TLR8 incluem, mas não são limitados a 2-propiltiazolo[4,5-c]quinolin-4-amina (Patente U.S. 6.110.929); N¹-[2-(4-amino-2-butil-1H-imidazo[4,5-c][1,5]naftiridin-1-il)etil]-2-amino-4-metilpentanomida (Patente U.S. 6.194.425); N¹-[4-(4-amino-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butil]-2-fenoxi-benzamida (Patente U.S. 6.451.810); N¹-[2-(4-amino-2-butil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)etil]-1-propanosulfonamida (Patente U.S. 6.331.539); N-{2-[2-(4-amino-2-etil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)etioxi]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- α,α -dimetil-2-metoxietil-1H-imidazo[4,5-c]quinoli-no-1-etanol (Patente U.S. 5.389.640). Incluídos para uso como agonistas seletivos de TLR8 estão os compostos da Publicação de Patente U.S. No. 2004/0171086. O composto 2-propiltiazolo-4,5-c]quinolin-4-amina também é adequado para uso (Gorden *et al.*, 2005 *supra*).

[000106] **Agonistas de TLR9.** Agonistas de TLR9 adequados incluem agonistas de TLR9 isolados que ocorrem naturalmente; e agonistas de TLR9 sintéticos. Agonistas de TLR9 isolados de uma fonte de agonistas de TLR9 que ocorre naturalmente são geralmente purificados, por exemplo, o agonista de TLR9 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 do que 99%

puro. Agonistas de TLR9 sintéticos são preparados por meios padronizados 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 do que 99% puros.

[000107] Os agonistas de TLR9 incluem agonistas de TLR9 que não estão acoplados a qualquer outro composto. Os agonistas de TLR9 adequados incluem agonistas de TLR9 que estão acoplados, covalentemente ou não covalentemente, a um segundo composto. Em algumas modalidades, um agonista de TLR9 está acoplado a outro composto diretamente. Em outras modalidades, um agonista de TLR9 está acoplado a outro composto através de um ligante.

[000108] Exemplos de agonistas de TLR9 (também referido aqui como “ligantes de TLR9”) incluem os ácidos nucleicos que compreendem a sequência 5’-CG-3’ (um “ácido nucleico de CpG”), em certos aspectos C não é metilado. As expressões “polinucleotídeo” e “ácido nucleico”, quando usadas aqui alternativamente no contexto de moléculas ligantes de TLR9, se referem a um polinucleotídeo de qualquer extensão e abrangem, entre outros, oligonucleotídeos de fita simples e dupla (incluindo desoxirribonucleotídeos, ribonucleotídeos ou ambos), oligonucleotídeos modificados e oligonucleosídeos, isolados ou como parte de um construto de ácido nucleico maior ou como parte de um conjugado com uma molécula de um ácido não nucleico tal como um polipeptídeo. Portanto, um ligante de TLR9 pode ser, por exemplo, DNA de fita simples (ssDNA), DNA de fita dupla (dsDNA), RNA de fita simples (ssRNA) ou RNA de fita dupla (dsRNA). Ligantes de TLR9 também abrangem RNA ou DNA bacteriano (por exemplo, micobacteriano) sem toxina, bruto, assim como plasmídeos enriquecidos para um ligante de TLR9. Em algumas modalidades, um “plasmídeo enriquecido com ligante de TLR9” se refere a um plasmídeo linear ou circular que

compreende ou é manipulado para compreender um grande número de motivos CpG do que normalmente encontrado no DNA de mamífero.

[000109] Exemplos não limitantes de plasmídeos enriquecidos com ligantes de TLR9 estão descritos em Roman *et al.* (1997). As modificações de oligonucleotídeos incluem, mas não são limitadas a modificações do grupo 3'OH ou 5'OH, modificações da base de nucleotídeo, modificações do componente açúcar e modificações do grupo fosfato.

[000110] Um ligante de TLR9 pode compreender pelo menos um nucleosídeo que compreenda um L-açúcar. O L-açúcar pode ser desoxirribose, ribose, pentose, desoxipentose, hexose, desoxihexose, glicose, galactose, arabinose, xilose, lixose ou um grupo ciclopentila “análogo” de açúcar. O L-açúcar pode estar na forma piranosil ou furanosil.

[000111] Os ligantes de TLR9 geralmente não fornecem, nem há qualquer necessidade que eles forneçam, a expressão de uma sequência de aminoácidos codificada pelo polinucleotídeo e, portanto, a sequência de um ligante de TLR9 pode ser, e geralmente é, não codificador. Os ligantes de TLR9 podem compreender uma molécula linear de fita dupla ou simples, uma molécula circular ou pode compreender ambos os segmentos linear e circular. Os ligantes de TLR9 podem ser de fita simples ou podem ser completamente ou parcialmente de fita dupla.

[000112] Em algumas modalidades, um ligante de TLR9 para uso em um método em questão é um oligonucleotídeo, por exemplo consiste de uma sequência com cerca de 5 nucleotídeos a cerca de 200 nucleotídeos, com cerca de 10 nucleotídeos a cerca de 100 nucleotídeos, com cerca de 12 nucleotídeos a cerca de 50 nucleotídeos, com cerca de 15 nucleotídeos a cerca de 25 nucleotídeos, com 20 nucleotídeos a cerca de 30 nucleotídeos, com cerca de 5 nucleotídeos

a cerca de 15 nucleotídeos, com cerca de 5 nucleotídeos a cerca de 10 nucleotídeos, ou com cerca de 5 nucleotídeos a cerca de 7 nucleotídeos de extensão. Em algumas modalidades, um ligante de TLR9 que é menor do que cerca de 15 nucleotídeos, menor do que cerca de 12 nucleotídeos, menor do que cerca de 10 nucleotídeos ou menor do que cerca de 8 nucleotídeos de extensão está associado a uma molécula maior.

[000113] Em algumas modalidades, um ligante de TLR9 não fornece a expressão de um peptídeo ou polipeptídeo em uma célula eucariótica, por exemplo, a introdução de um ligante de TLR9 em uma célula eucariótica não resulta na produção de um peptídeo ou polipeptídeo, por que o ligante de TLR9 não fornece a transcrição de um mRNA que codifica um peptídeo ou polipeptídeo. Nessas modalidades, o ligante de TLR9 carece de regiões promotoras e outros elementos regulatórios necessários para a transcrição em uma célula eucariótica.

[000114] Um ligante de TLR9 pode ser isolado de uma bactéria, por exemplo, separado de uma fonte bacteriana; produzido por métodos sintéticos (por exemplo, produzido por métodos padronizados de síntese química de polinucleotídeos); produzido por métodos recombinantes padronizados, depois isolados de uma fonte bacteriana; ou uma combinação dos precedentes. Em várias modalidades, um ligante de TLR9 é purificado, por exemplo, é pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99%, ou mais, por exemplo, 99,5%, 99,9%, ou mais, puro. Em várias modalidades, o ligante de TLR9 é quimicamente sintetizado e depois purificado.

[000115] Em outras modalidades, um ligante de TLR9 é parte de um construto de nucleotídeo maior (por exemplo, um vetor de plasmídeo, um vetor viral ou outro de tais construtos). Uma grande variedade de vetor de plasmídeo e viral é conhecida na técnica e não precisam ser

elaborados. Um grande número de tais vetores está descrito em várias publicações incluindo, por exemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (1987 e atualizações).

[000116] Em geral, um ligante de TLR9 usado em uma composição em questão compreende pelo menos um motivo CpG não metilado. A posição relativa de qualquer sequência CpG em um polinucleotídeo em certas espécies de mamífero (por exemplo, roedores) é 5'-CG-3' (isto é, o C na posição 5' em relação ao G na posição 3').

[000117] Em algumas modalidades, um ligante de TLR9 compreende uma sequência de núcleo palindrômica que compreende pelo menos uma sequência de CpG, onde a sequência de núcleo palindrômica contém um arcabouço de fosfodiéster e onde a sequência de núcleo palindrômica é flanqueadas em um ou ambos os lados por sequências de guanossina que contêm um arcabouço de fosforotioato.

[000118] Em outras modalidades, um ligante de TLR9 compreende uma ou mais sequências TCG na ou próximo da extremidade 5' do ácido nucleico; e pelo menos dois dinucleotídeos CG adicionais. Em algumas dessas modalidades, os pelo menos dois dinucleotídeos adicionais são espaçados por três nucleotídeos, dois nucleotídeos ou um nucleotídeo. Em algumas dessas modalidades, pelo menos dois dinucleotídeos CG são contíguos um ao outro. Em algumas dessas modalidades, o ligante de TLR9 compreende (TCG)_n, onde $n = 1$ a 3 , na extremidade 5' do ácido nucleico. Em outras modalidades, o ligante de TLR9 compreende (TCG)_n, onde $n = 1$ a 3 e onde a sequência (TCG)_n é flanqueada por um nucleotídeo, dois nucleotídeos, três nucleotídeos, quatro nucleotídeos ou cinco nucleotídeos na extremidade 5' da sequência (TCG)_n.

[000119] Motivos CpG consenso exemplificadores de ligante de TLR9 úteis na invenção incluem, mas não são necessariamente limitados a: 5'-Purina-Purina-(C)-(G)-Pirimidina-Pirimidina-3', no qual o ligante de

TLR9 compreende um motivo CpG flanqueado por pelo menos dois nucleotídeos de purina (por exemplo, GG, GA, AG, AA, II, etc.) pelo menos dois nucleotídeos de pirimidina (CC, TT, CT, TC, UU, etc.); 5'-Purina-TCG-Pirimidina-Pirimidina-3'; 5'-TCG-N-N-3'; onde N é qualquer base; 5'-Nx(CG)nNy, onde N é qualquer base, onde x e y são independentemente qualquer número inteiro entre 0 a 200, por exemplo, 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 igual a 1 ou maior, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou maior. 5'-Nx(TCG)nNy, onde N é qualquer base, onde x e y são independentemente qualquer número inteiro entre 0 a 200, *por exemplo*, 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; n é qualquer número inteiro igual a 1 ou maior, *por exemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou maior. 5'-(TCG)n-3', onde n é qualquer número inteiro igual a 1 ou maior, *por exemplo*, para fornecer um ligante de TLR9 baseado em TCG (*por exemplo*, onde n=3, o polinucleotídeo compreende a sequência 5'-TCGNNTCGNNTCG-3'; SEQ ID NO:3); 5'-Nm-(TCG)n-Np-3', onde N é qualquer nucleotídeo, onde m é zero, um, dois ou três, onde n é qualquer número inteiro igual a 1 ou maior, e onde p é um, dois, três ou quatro; 5'-Nm-(TCG)n-Np-3', onde N é qualquer nucleotídeo, onde m é zero a 5, e onde n é qualquer número inteiro igual a 1 ou maior, onde p é quatro ou mais, e onde a sequência N-N-N-N compreende pelo menos dois dinucleotídeos CG que são contíguos um ao outro ou são separados por um nucleotídeo, dois nucleotídeos ou três nucleotídeos; e 5'-Purina-Purina-CG-Pirimidina-TCG-3'.

[000120] Onde um ligante de ácido nucleico de TLR9 compreende a sequência da fórmula: 5'-Nm-(TCG)n-Np-3', onde N é qualquer nucleotídeo, onde m é zero a 5, e onde n é qualquer número inteiro igual a 1 ou maior, onde p é quatro ou mais, e onde a sequência N-N-N-N compreende pelo menos dois dinucleotídeos CG que são contíguos um

ao outro ou são separados por um nucleotídeo, dois nucleotídeos ou três nucleotídeos, ligantes de TLR9 úteis na invenção incluem, mas não são necessariamente limitados a: (1) uma sequência da fórmula na qual $n=2$, e N_p é NNCGNNCG; (2) uma sequência da fórmula na qual $n=2$, e N_p is AACGTTTCG; (3) uma sequência da fórmula na qual $n=2$, e N_p is TTCGAACG; (4) uma sequência da fórmula na qual $n=2$, e N_p é TACGTACG; (5) uma sequência da fórmula na qual $n=2$, e N_p é ATCGATCG; (6) uma sequência da fórmula na qual $n=2$, e N_p é CGCGCGCG; (7) uma sequência da fórmula na qual $n=2$, e N_p é GCCGGCCG; (8) uma sequência da fórmula na qual $n=2$, e N_p é CCCGGGCG; (9) uma sequência da fórmula na qual $n=2$, e N_p é GGCGCCCG; (10) uma sequência da fórmula na qual $n=2$, e N_p é CCCGTTTCG; (11) uma sequência da fórmula na qual $n=2$, e N_p é GGCGTTTCG; (12) uma sequência da fórmula na qual $n=2$, e N_p é TTCGCCCG; (13) uma sequência da fórmula na qual $n=2$, e N_p é TTCGGGCG; (14) uma sequência da fórmula na qual $n=2$, e N_p é AACGCCCG; (15) uma sequência da fórmula na qual $n=2$, e N_p é AACGGGCG; (16) uma sequência da fórmula na qual $n=2$, e N_p é CCCGAACG; e (17) uma sequência da fórmula na qual $n=2$, e N_p é GGCGAACG; e onde, em qualquer uma de 1 a 17, m =zero, um, dois ou três.

[000121] Onde um ligante de ácido nucleico de TLR9 compreende a sequência da fórmula: $5'Nm-(TCG)_n-N_p-3'$, onde N é qualquer nucleotídeo, onde m é zero, um, dois ou três, onde n é qualquer número inteiro igual a 1 ou maior, onde p é um, dois, três ou quatro, ligantes de TLR9 exemplificadores úteis na invenção incluem, mas não são necessariamente limitados a: (1) uma sequência da fórmula onde m =zero, $n=1$, e N_p é T-T-T; (2) uma sequência da fórmula onde m =zero, $n=1$, e N_p é T-T-T-T; (3) uma sequência da fórmula onde m =zero, $n=1$, e N_p é C-C-C-C; (4) uma sequência da fórmula onde m =zero, $n=1$, e N_p

é A-A-A-A; (5) uma sequência da fórmula onde $m=0$, $n=1$, e N_p é A-G-A-T; (6) uma sequência da fórmula onde N_m é T, $n=1$, e N_p é T-T-T; (7) uma sequência da fórmula onde N_m é A, $n=1$, e N_p é T-T-T; (8) uma sequência da fórmula onde N_m é C, $n=1$, e N_p é T-T-T; (9) uma sequência da fórmula onde N_m é G, $n=1$, e N_p é T-T-T; (10) uma sequência da fórmula onde N_m é T, $n=1$, e N_p é A-T-T; (11) uma sequência da fórmula onde N_m é A, $n=1$, e N_p é A-T-T; e (12) uma sequência da fórmula onde N_m é C, $n=1$ e N_p é A-T-T.

[000122] A estrutura do núcleo de um ligante de TLR9 útil na invenção pode ser flanqueada a montante e/ou a jusante por qualquer número ou composição de nucleotídeos ou nucleosídeos. Em algumas modalidades, a sequência do núcleo de um ligante de TLR9 tem pelo menos 6 bases ou 8 bases de extensão e o ligante de TLR9 completo (sequências do núcleo mais as sequências flanqueadoras 5', 3' ou ambas) tem geralmente entre 6 bases ou 8 bases a até cerca e 200 bases de extensão.

[000123] Ligantes de TLR9 baseados em DNA úteis na invenção incluem, mas não necessariamente são limitados a polinucleotídeos que compreendem uma ou mais das seguintes sequências de nucleotídeos: AGCGCT, AGCGCC, AGCGTT, AGCGTC, AACGCT, AACGCC, AACGTT, AACGTC, GGCGCT, GGCGCC, GGCGTT, GGCGTC, GACGCT, GACGCC, GACGTT, GACGTC, GTCGTC, GTCGCT, GTCGTT, GTCGCC, ATCGTC, ATCGCT, ATCGTT, ATCGCC, TCGTCG, e TCGTCGTCG.

[000124] Ligantes de TLR9 adicionais baseados em DNA úteis na invenção incluem, mas não necessariamente são limitados a polinucleotídeos que compreendem uma ou mais das seguintes sequências de nucleotídeos: TCGXXXX, TCGAXXX, XTCGXXX, XTCGAXX, TCGTCGA, TCGACGT, TCGAACG, TCGAGAT, TCGACTC, TCGAGCG, TCGATTT, TCGCTTT, TCGGTTT, TCGTTTT,

TCGTCGT, ATCGATT, TTCGTTT, TTCGATT, ACGTTCG, AACGTTC, TGACGTT, TGTCGTT, TCGXXX, TCGAXX, TCGTCG, AACGTT, ATCGAT, GTCGTT, GACGTT, TCGXX, TCGAX, TCGAT, TCGTT, TCGTC, TCGA, TCGT, TCGX, e TCG (onde “X” é qualquer nucleotídeo).

[000125] Ligantes de TLR9 adicionais baseados em DNA úteis na invenção incluem, mas não necessariamente são limitados a polinucleotídeos que compreendem as seguintes sequências de nucleotídeos octaméricas: AGCGCTCG, AGCGCCCG, AGCGTTCG, AGCGTCCG, AACGCTCG, AACGCCCG, AACGTTCG, AACGTCCG, GGCGCTCG, GGCGCCCG, GGCGTTCG, GGCGTCCG, GACGCTCG, GACGCCCG, GACGTTCG, e GACGTCCG.

[000126] Um ligante de TLR9 útil na realização do método em questão pode compreender um ou mais dos motivos CpG acima. Por exemplo, um ligante de TLR9 útil na invenção pode compreender uma única ocorrência ou múltiplas ocorrências (por exemplo, 2, 3, 4, 5 ou mais) do mesmo motivo CpG. Alternativamente, um ligante de TLR9 pode compreender múltiplos motivos CpG (por exemplo, 2, 3, 4, 5 ou mais), onde pelo menos dois dos múltiplos motivos CpG possuem sequências consenso diferentes ou onde todos os motivos CpG no ligante de TLR9 possuem sequências consenso diferentes.

[000127] Um ligante de TLR9 útil na invenção pode ou não incluir regiões palindrômicas. Se presentes, um palíndromo pode se estender apenas até o motivo CpG, se presente, no núcleo da sequência hexamérica ou octamérica ou pode abranger mais do que a sequência hexamérica ou octamérica, assim como as sequências de nucleotídeos flanqueadoras.

[000128] **Ligantes de TLR9 Multiméricos.** Em algumas modalidades, o ligante de TLR9 é multimérico. Um ligante de TLR9 multimérico compreende dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais

ligantes de ácido nucleico de TLR9 individuais (monoméricos), como descrito acima, ligados através de ligações não covalentes, ligados através de ligações covalentes e ligados diretamente um ao outro ou ligados através de um ou mais espaçadores. Espaçadores adequados incluem moléculas de ácido nucleico e de ácido não nucleico, desde que elas sejam biocompatíveis. Em algumas modalidades, um ligante de TLR9 multimérico compreende um arranjo linear de ligantes de TLR9 monoméricos. Em outras modalidades, um ligante de TLR9 multimérico é um arranjo ramificado ou dendrimérico de ligantes de TLR9 monoméricos.

[000129] Em algumas modalidades, um ligante de TLR9 multimérico tem a estrutura geral $(X_1)_n(X_2)_n$ onde X é um ligante de ácido nucleico de TLR9 como descrito acima e possui uma extensão entre cerca de 6 nucleotídeos a cerca de 200 nucleotídeos, por exemplo, entre cerca de 6 nucleotídeos a cerca de 8 nucleotídeos, entre cerca de 8 nucleotídeos a cerca de 10 nucleotídeos, entre cerca de 10 nucleotídeos a cerca de 12 nucleotídeos, entre cerca de 12 nucleotídeos a cerca de 15 nucleotídeos, entre cerca de 15 nucleotídeos a cerca de 20 nucleotídeos, entre cerca de 20 nucleotídeos a cerca de 25 nucleotídeos, entre cerca de 25 nucleotídeos a cerca de 30 nucleotídeos, entre cerca de 30 nucleotídeos a cerca de 40 nucleotídeos, entre cerca de 40 nucleotídeos a cerca de 50 nucleotídeos, entre cerca de 50 nucleotídeos a cerca de 60 nucleotídeos, entre cerca de 60 nucleotídeos a cerca de 70 nucleotídeos, entre cerca de 70 nucleotídeos a cerca de 80 nucleotídeos, entre cerca de 80 nucleotídeos a cerca de 90 nucleotídeos, entre cerca de 90 nucleotídeos a cerca de 100 nucleotídeos, entre cerca de 100 nucleotídeos a cerca de 125 nucleotídeos, entre cerca de 125 nucleotídeos a cerca de 150 nucleotídeos, entre cerca de 150 nucleotídeos a cerca de 175

nucleotídeos, ou entre cerca de 175 nucleotídeos a cerca de 200 nucleotídeos; e onde n é qualquer número entre um a cerca de 100, por exemplo, n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, entre 10 a cerca de 15, entre 15 a cerca de 20, entre 20 a cerca de 25, entre 25 a cerca de 30, entre 30 a cerca de 40, entre 40 a cerca de 50, entre 50 a cerca de 60, entre 60 a cerca de 70, entre 70 a cerca de 80, entre 80 a cerca de 90, ou entre 90 a cerca de 100. Nessas modalidades, X e X2 diferem em sequência de nucleotídeos entre um e outro por pelo menos um nucleotídeo, e podem diferir em sequência de nucleotídeos entre um e outro por duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais bases.

[000130] Como observado acima, um ligante de TLR9 multimérico em questão compreende um ligante de TLR9 separado do ligante de TLR9 adjacente por um espaçador. Em algumas modalidades, um espaçador é um ácido nucleico de um não ligante de TLR9. Em outras modalidades, o espaçador é uma porção de ácido não nucleico. Espaçadores adequados incluem aqueles descritos na Publicação de Patente U.S. 20030225016. Um ligante de TLR9 é multimerizado por qualquer método conhecido.

[000131] **Modificações de ligante de TLR9.** Um ligante de TLR9 adequado para uso na composição em questão pode ser modificado por uma variedade de meios. Por exemplo, um ligante de TLR9 pode compreender modificações no grupo fosfato do arcabouço (por exemplo, ligações inter-nucleotídeos de metilfosfonato, fosforotioato, fosforoamidato e fosforoditioato), cujas modificações podem, por exemplo, podem intensificar sua estabilidade in vivo, tornando-os particularmente úteis em aplicações terapêuticas. Uma modificação de grupo fosfato particularmente útil é a conversão das formas fosforotioato ou fosforoditioato de um ácido nucleico de ligante de TLR9. Fosforotioatos e fosforoditioatos são mais resistentes a degradação in vivo do que seus equivalentes de oligonucleotídeo não modificado,

aumentando as meias-vidas dos ligantes de TLR9 e tornando-os mais disponíveis para o indivíduo a ser tratado.

[000132] Outros ligantes de TLR9 modificados abrangidos pela presente invenção incluem ligantes de TLR9 que possuem modificações na extremidade 5', na extremidade 3' ou em ambas as extremidades 5' e 3'. Por exemplo, a extremidade 5' e/ou 3' podem estar covalentemente ou não covalentemente associadas com uma molécula (um ácido nucleico, ácido não nucleico ou ambos), por exemplo, para aumentar a bio-disponibilidade do ligante de TLR9, aumentar a eficiência da absorção onde desejável, facilidade de liberação para células de interesse e semelhantes. As moléculas para conjugação a um ligante de TLR9 incluem, mas não são necessariamente limitadas a colesterol, fosfolipídeos, ácidos graxos, esteróis, oligossacarídeos, polipeptídeos (por exemplo, imunoglobulinas), peptídeos, antígenos (por exemplo, peptídeos, moléculas pequenas, etc.), moléculas de ácido nucleico lineares ou circulares (por exemplo, um plasmídeo), suportes insolúveis, polipeptídeos terapêuticos e semelhantes. Polipeptídeos terapêuticos que são adequados para o acoplamento com um agonista de TLR9 incluem, mas não são limitados a um fator de crescimento de célula dendrítica (por exemplo, GM-CSF); uma citocina; um interferon (por exemplo, IFN- α , IFN- β , etc.); antagonista de TNF- α ; e semelhantes.

[000133] Um ligante de TLR9 está, em algumas modalidades, ligado (por exemplo, conjugado, covalentemente ligado, não covalentemente associado com ou adsorvido sobre) um suporte insolúvel. Um exemplo não limitante de um suporte insolúvel é poli(D,L-lactide-co-glicolide) catiônico.

[000134] Conjugados de ligante de TLR9 adicionais e métodos para fazê-los são conhecidos na técnica e estão descritos, por exemplo, no WO 98/16427 e WO 98/55495. Portanto, a expressão "ligante de TLR9" inclui conjugados que compreendem um ácido nucleico de ligante de

TLR9.

[000135] Um polipeptídeo, por exemplo, um polipeptídeo terapêutico, pode ser conjugado diretamente ou indiretamente, por exemplo, através de uma molécula ligante, a um ligante de TLR9. Uma grande variedade de moléculas ligantes são conhecidas na técnica e podem ser usadas nos conjugados. A ligação do peptídeo ao oligonucleotídeo pode ser através de uma cadeia lateral reativa do peptídeo ou de uma terminação N ou C do peptídeo. A ligação do oligonucleotídeo ao peptídeo pode ser tanto na terminação 3' ou 5' ou interna. Um ligante pode ser uma molécula orgânica, inorgânica ou semi-orgânica e pode ser um polímero de uma molécula orgânica, uma molécula inorgânica ou um co-polímero que compreenda ambas as moléculas inorgânica e orgânica.

[000136] Se presente, as moléculas ligantes têm geralmente uma extensão suficiente para permitir que os oligonucleotídeos e/ou polinucleotídeos e um polipeptídeo ligado obtenham algum movimento flexível entre o oligonucleotídeo e o polipeptídeo. As moléculas ligantes têm geralmente cerca de 6 a 50 átomos de extensão. As moléculas ligantes também podem ser, por exemplo, oligômeros de acetileno de arila, etileno glicol contendo 2 a 10 unidades monoméricas, diaminas, diácidos, aminoácidos ou suas combinações. Outras moléculas ligantes que podem se ligar aos oligonucleotídeos podem ser usadas à luz dessa descrição.

b. Agonistas do Receptor Semelhante a NOD (NLR)

[000137] Os receptores semelhantes a NOD (NLRs) são proteínas citoplasmáticas que podem ter uma variedade de funções na regulação das resposta inflamatória e apoptótica. Aproximadamente 20 dessas proteínas foram encontradas no genoma de mamífero e incluem duas subfamílias principais chamadas NODs e NALPs, o transativador MGC Classe C (CIITA) e algumas outras moléculas (por exemplo, IPAF e BIRC1). O conhecimento atual sugere que algumas dessas proteínas

reconhecem moléculas endógenas ou microbianas ou respostas ao estresse e formam oligômeros que ativam as caspases inflamatórias (por exemplo caspase 1) induzindo a clivagem e a ativação de importantes citocinas inflamatórias tais como IL-1 e/ou ativam a via de sinalização de NF- κ B para induzir a produção de moléculas inflamatórias. A família de NLR é conhecida por vários nomes diferentes, incluindo a família CATERPILLER (ou CLR) ou NOD-LRR.

[000138] Os ligantes são atualmente conhecidos para NOD1 e NOD2. BOD1 reconhece uma molécula chamada meso-DAP, que é um peptídeoglicano constituinte de apenas bactérias Gram negativas. As proteínas NOD2 reconhecem MDP intracelular (dipeptídeo de muramil), que é um peptídeoglicano constituinte de ambas as bactérias Gram positivas e Gram negativas. NODs transduzem sinais na via de NF- κ B e MAP quinases através da serina-treonina quinase chamada RIP2. As proteínas NOD são assim chamadas por que elas contêm um domínio de oligomerização que se liga ao nucleotídeo que se liga ao trifosfato de nucleotídeo. O sinal de NODs através de domínios CARD N-terminais para ativar eventos de indução de gene a jusante e interagem com moléculas microbianas por meio de uma região de repetição rica em leucina C terminal (LRR).

[000139] Como NODs, as proteínas NALP contêm LRRs C terminais, que parecem atuar como um domínio regulatório e podem estar envolvidas no reconhecimento de patógenos microbianos. Também como NODs, essas proteínas também contêm um sítio de ligação ao nucleotídeo (NBS) para trifosfatos de nucleotídeo. A interação com outras proteínas (por exemplo, a molécula adaptadora ASC) é mediada através do domínio pirin N terminal (PYD). Existem 14 membros dessa subfamília em humanos (chamados NALP1 a NALP14). As mutações em NALP13 são responsáveis pelas doenças auto-inflamatórias, síndrome auto-inflamatória familiar relacionada ao frio, síndrome de

Muckle-Wells e doença inflamatória de múltiplos sistemas de início neonatal. Ativadores de NALP3 incluem dipeptídeo de muramyl, DNA bacteriano, ATP, toxinas, RNA de fita dupla, paramixovírus e cristais de ácido úrico.

[000140] Outros NLRs, tais como IPAF e NAIP5/Birc 1e, também foram mostrados ativar a caspase-1 em resposta a *Salmonella* e *Legionella*.

[000141] Agonistas de NLR incluem, mas não são limitados a GM-tripeptídeo (*Shigella flexneri*), Meso-lantionina (*Helicobacter pylori*), meso-DAP, γ -D-Glu-DAP (iEDAP) (*Escherichia coli* Enteroinvasiva), D-lactil-L-ala- γ -Glu-meso-DAP-Gly (FK156) (*Pseudomonas*), Heptanolil- γ -Glu-meso-DAP-D-ala (FK565) (*Chlamydia*, *Listeria monocytogenes*), MDP (*Listeria monocytogenes*), MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys (M-TRILys) (*Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella flexneri*), Flagelina, RNA Bacteriano, ATP, Nigericina, Maitotoxina, cristais de ácido úrico, Aerolisina e toxina letal do Antraz.

c. Agonista do Receptor Semelhante a RIG (RLR)

[000142] Várias células no corpo são capazes de absorver vírus infecciosos e iniciar reações coletivamente conhecidas como respostas inatas antivirais. Essas respostas incluem a produção de citocinas antivirais tais como o interferon tipo 1 (IFN) e a síntese subsequente de enzimas antivirais, que são responsáveis pela falha da replicação viral e promoção de respostas imunes adaptativas. Receptores semelhantes a RIG (gene induzível pelo ácido retinóico) absorvem moléculas de RNA viral que desencadeiam componentes do sistema imune inato. Ligantes para RLRs incluem, mas não são limitados a ssRNA, dsRNA, ácido poliinosino-policitidílico ("poli(rl:rC)", um análogo sintético de RNA de fita dupla (dsRNA) e outros ácidos nucléicos virais – incluindo porções genômicas de RNA viral (por exemplo, vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus da estomatite vesicular (VSV), vírus influenza, vírus da

Dengue, vírus do Oeste do Nilo, Reovírus e vírus da encefalomiocardite (EMCV)) – e seus análogos. Um segmento de RNA ou análogo pode ter pelo menos 20, 25, 30, 35, 40 ou mais nucleotídeos ou pares de nucleotídeos ou o equivalente. Em certos aspectos, o RNA é um 5' trifosfato de RNA.

d. Agonista de Receptor semelhante a Imunoglobulina de Leucócito (LIR)

[000143] A clonagem de oito moléculas relacionadas a LIR-1 (veja Fanger *et al.*, 1999 e referências desse), com 63-84% de identidade de aminoácido com LIR-1, estabeleceu a nova família de imuno-receptores (LIRs). Os LIRs podem ser agrupados de acordo com sua estrutura. Cinco dos LIRs (1, 2, 3, 5 e 8) possuem domínios citoplasmáticos contendo dois, três ou quatro sequências semelhantes ao motivo inibitório baseado em tirosina (ITIM). Embora dois dos motivos baseados em tirosina (motivos nos. 2 e 3; I/VxYxxL/V) se ajustem com a sequência consenso original de ITIM, alguns desses LIRs contêm motivos baseados em tirosina com um resíduo de asparagina (motivo no. 1: NxYxxL/V) ou um resíduo de serina (motivo no. 4; SxYxxL/V) situam-se dois aminoácidos a montante da tirosina. Em contraste com os LIRs que contêm ITIM, três dos LIRs (6a, 6b e 7) contêm regiões citoplasmáticas curtas e um resíduo de arginina positivamente carregado no domínio transmembrana.

[000144] Membros da família LIR se ligam a moléculas MHC 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 classe I não clássica de HLA-G1. A especificidade de ligação de LIR-1 e LIR-2, portanto, é distinta daquela dos KIRs, que reconhecem subgrupos relativamente restritos de alelos de MHC classe I assim como CD94/NKG2A. A última molécula reconhece HLA-E cujos bolsos de ligação estão ocupados por peptídeos derivados da sequência de sinal

de antígenos MHC classe I específicos.

2. Componentes microbianos

a. EF2505

[000145] Em certos aspectos, são contemplados métodos para tratar, inibir ou atenuar uma infecção bacteriana em um indivíduo que tem ou está em risco de desenvolver tal infecção, os métodos compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um peptídeo StIR, por exemplo, a proteína EF2505 de *Enterococcus faecalis* (SEQ ID NO:1) ou um fragmento ou derivado dessa ao dito indivíduo. Tipicamente, o indivíduo ou sujeito já foi exposto a um micróbio patogênico ou está em risco de tal exposição. Em certos aspectos, o peptídeo StIR é um polipeptídeo ou peptídeo purificado ou isolado. A expressão “purificado” ou “isolado” significam que o componente foi previamente isolado ou purificado entre outras proteínas e que o componente é pelo menos cerca de 70, 75, 80, 90, 95, 97 ou 99% puro antes de ser formulado na composição. Em certas modalidades, o componente purificado ou isolado é cerca de ou pelo menos cerca de 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5% puro ou mais ou qualquer faixa derivada dessa. Tal componente purificado pode ser misturado com outros componentes para formar uma composição como aqui descrita.

[000146] Uma proteína recombinante StIR, por exemplo, EF2505 ou um fragmento ou segmento dessa ou um análogo dessa compreende pelo menos, no máximo, 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, incluindo todos os valores e faixas nesse intervalo, de SEQ ID NO:1. Em certos aspectos, um fragmento ou um análogo dessa inclui pelo menos ou no máximo ou cerca de uma sequência de aminoácidos entre o 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 faixas nesse intervalo. Em um aspecto adicional, um fragmento de polipeptídeo ou um análogo desse inclui, mas não está limitado a uma sequência de aminoácidos que compreende pelo menos, no máximo, cerca de os aminoácidos 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 até os aminoácidos 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450 de SEQ ID NO:1. Em certos aspectos, um segmento ou fragmento de polipeptídeo ou seu análogo incluem, mas não são limitados a uma sequência de aminoácidos que compreende pelo menos ou no máximo ou cerca de os 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, até os aminoácidos 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450 de SEQ ID NO:1, incluindo todos os valores e faixas nesse intervalo. Ainda em um aspecto adicional, um fragmento de polipeptídeo ou seu análogo compreendem uma sequência de aminoácidos que compreende 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 faixas nesse intervalo. Derivados ou variantes da proteína StIR ou de seus segmentos incluem mutações por deleção, inserção ou pontuais. Uma mutação insercional particular é uma proteína de fusão que compreende uma sequência de aminoácidos exógena à proteína EF2505 na terminação carboxi ou amino.

[000147] Em certos aspectos, a proteína StIR ou seu fragmento ou seu segmento ou seu derivado, é administrada em uma formulação nebulizada ou aerossolizada. A composição pode ser administrada por inalação ou inspiração. StIR ou um fragmento de seu derivado podem ser administrados em uma quantidade entre 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 or mg/kg do peso corporal do indivíduo. Em outros aspectos, um indivíduo pode ser tratado com 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 polipeptídeo ou peptídeo StIR ou uma variante ou derivado ou análogo desse. Baseado na descrição, uma pessoa versada na técnica será capaz de determinar prontamente segmentos, fragmentos ou derivados úteis de um polipeptídeo StIR, por exemplo, a proteína EF2505 de *Enterococcus faecalis*. Em um aspecto preferido, o fragmento, segmento ou derivado é pelo menos 75% idêntico a uma sequência de SEQ ID NO:1. Em um aspecto preferido, o fragmento, segmento ou derivado é pelo menos 80% idêntico a uma sequência de SEQ ID NO:1. Em um aspecto preferido, o fragmento, segmento ou derivado é pelo menos 85% idêntico a uma sequência de SEQ ID NO:1. Em um aspecto preferido, o fragmento, segmento ou derivado é pelo menos 90% idêntico a uma sequência de SEQ ID NO:1. Em um aspecto preferido, o fragmento, segmento ou derivado é pelo menos 95% idêntico a uma sequência de SEQ ID NO:1.

[000148] Em outra modalidade, a presente invenção é direcionada a uma composição farmacologicamente aceitável que compreende um ou mais polipeptídeos de StIR (por exemplo, a proteína EF2505 de *Enterococcus faecalis*) ou um fragmento ou um segmento ou um derivado ou um análogo desse; um agente anti-inflamatório; um agente anti-microbiano; e/ou um ou mais excipientes farmacêuticos.

Tipicamente tais composições são estéreis e essencialmente livres de micróbios patogênicos.

b. Flagelina

[000149] Em certos aspectos, a composição de StIR compreende um polipeptídeo de flagelina que compreende 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, ou 22 aminoácidos consecutivos do peptídeo QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA (SEQ ID NO:2), que é conhecido como um agonista de TLR5 ou um segmento ou derivado desse. Um polipeptídeo da invenção pode compreender também uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 70, 80 ou 90%, incluindo todos os valores e faixas nesse intervalo, idêntica a SEQ ID NO:2. Em outros aspectos, a flagelina é um polipeptídeo ou peptídeo sintetizado e/ou purificado ou isolado de flagelina. A expressão “purificado” ou “isolado” significa que o componente foi previamente isolado ou purificado a partir de outras proteínas ou reagentes de síntese ou sub-produtos e que o componente tem pelo menos cerca de 95% de pureza antes de ser formulado na composição. Em certas modalidades, o componente purificado ou isolado tem cerca de ou pelo menos cerca de 80, 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5% ou mais de pureza ou qualquer faixa derivada dessa. Tal componente purificado pode então ser misturado com outros componentes para formar uma composição como aqui descrita.

[000150] 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 faixas nesse intervalo, de SEQ ID NO:2 ou de outros polipeptídeos de flagelina. Esses 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 de outros polipeptídeos de flagelina. Em certos aspectos, o

polipeptídeo ou segmento de flagelina é pelo menos 75% idêntico a sequência de SEQ ID NO:2. Em outro aspecto, o polipeptídeo ou segmento de flagelina é pelo menos 80% idêntico a sequência de SEQ ID NO:2. Em outro aspecto, o polipeptídeo ou segmento de flagelina é pelo menos 85% idêntico a sequência de SEQ ID NO:2. Em outro aspecto, o polipeptídeo ou segmento de flagelina é pelo menos 90% idêntico a sequência de SEQ ID NO:2. Em outro aspecto, o polipeptídeo ou segmento de flagelina é pelo menos 95% idêntico a sequência de SEQ ID NO:2. Derivados ou variantes de flagelina ou de seus segmentos incluem inserções, deleções e mutações pontuais de SEQ ID NO:2. Uma mutação por inserção particular é uma proteína de fusão que compreende uma sequência de aminoácidos exógena para a flagelina na terminação carboxi ou amino. Várias proteínas flagelina são conhecidas na técnica e incluem, mas não são limitadas a uma flagelina que possui 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), cada uma das quais está incorporada aqui por referência em sua totalidade a partir da data de prioridade desse pedido.

c. Lisado microbiano

[000151] Modalidades da invenção também incluem composições farmacêuticamente aceitáveis que compreendem um lisado de um micróbio não patogênico, um agente anti-inflamatório e um ou mais excipientes farmacêuticos, em que a dita composição é estéril e essencialmente livre de micróbios patogênicos. Um lisado microbiano é tipicamente sonificado; homogeneizado; irradiado; lisado por métodos barométricos, pneumáticos, com detergentes ou enzimaticamente ou

combinações desses. Em um aspecto particular, o lisado microbiano é irradiado com UV antes, durante ou depois da lise. O lisado microbiano pode incluir, mas não está limitado a um lisado bacteriano, fúngico ou viral. Em certas modalidades, o lisado microbiano é um lisado bacteriano. O microrganismo a partir do qual o lisado é preparado não precisa ser um microrganismo virulento e tipicamente não será de um microrganismo virulento. Aspectos da invenção incluem um lisado derivado de bactérias que possua um efeito limitado sobre a saúde do indivíduo. Efeito limitado se refere a produção de reações adversas mínimas e dano não substancial na 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.

[000152] As composições da invenção não precisam ser derivadas diretamente de um organismo virulento a partir do qual a proteção ou terapia é desejada. As bactérias podem ser do gênero *Haemophilus*, mas não são limitadas ao *Haemophilus*. Bactérias que representam uma ameaça mínima de efeitos adversos em um indivíduo podem ser identificadas. Em certos aspectos, a bactéria é *Haemophilus influenzae*, particularmente *Haemophilus influenzae* não tipado (NTHi) (Clement *et al.*, 2008; Clement *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2010; Tuvim *et al.*, 2009).

[000153] 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 faixas nesse intervalo. Em certos aspectos, o lisado microbiano pode ter uma concentração de proteína de pelo menos cerca de, cerca de ou no máximo cerca de 10 mg/mL.

[000154] Modalidades da invenção incluem um lisado microbiano que pode ser administrado através do trato respiratório. Em certos aspectos, a administração é por inalação, Em um aspecto adicional, a composição é aerossolizada ou está em uma forma que pode ser inalada por um

indivíduo. Em certas modalidades, uma composição de lisado compreende um agente anti-inflamatório, que inclui anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais (NSAIDs). Para detalhes adicionais, veja o Pedido de Patente U.S. 11/830.622 “Compositions and methods for stimulation of lung innate immunity” Dickey *et al.*, que está incorporado aqui por referencia em sua totalidade.

B. Componentes do hospedeiro ou autólogos

[000155] Várias das moléculas derivadas de células e tecidos de um indivíduo ou hospedeiro podem estimular, intensificar ou contribuir para a produção de uma resposta imune. Essas porções são referidas como porções ou componentes do hospedeiro ou autólogas e incluem moléculas pequenas liberadas de células lesionadas, estressadas ou mortas; componentes envolvidos na morte ou neutralização celular; citocinas; e macromoléculas liberadas das células ou tecidos.

1. Compostos de molécula pequena do hospedeiro

[000156] As moléculas pequenas são associadas ou liberadas pelas células que estão lesionadas, estressadas ou mortas, tal como adenosina 5'-trifosfato (ATP), ácido úrico (urato) e adenosina. Os receptores para várias dessas moléculas e as vias pelas quais elas modulam a inflamação são bem definidos. A inflamação é uma das primeiras respostas do sistema imune à infecção ou irritação. A inflamação é estimulada pelos fatores químicos liberados pelas células lesionadas e serve para estabelecer uma barreira física contra a disseminação da infecção e para promover a cicatrização de qualquer tecido danificado depois da depuração de patógenos. Fatores químicos produzidos durante a inflamação (histamina, bradicinina, serotonina, leucotrienos e também prostaglandinas) sensibilizam os receptores da dor, induzem a vasodilatação dos vasos sanguíneos no local e atraem fagócitos, especialmente neutrófilos. Os neutrófilos desencadeiam outras partes do sistema imune pela liberação de fatores que adicionam

outros leucócitos e linfócitos.

[000157] Componentes de molécula pequena do hospedeiro que podem ser incluídos nas composições de StIR da invenção incluem ATP, adenosina, histamina, bradicinina, serotonina, leucotrienos, prostaglandinas.

2. Porções extracelulares do hospedeiro

[000158] As proteínas extracelulares do hospedeiro possuem um papel na morte microbiana direta e/ou na sinalização, tal como o complemento, pentraxinas, defensinas e catelicidinas. Essas moléculas estão geralmente presentes constitutivamente, mas não sinalizam até que elas se tornem ativadas pela ligação aos produtos microbianos ou sejam proteoliticamente clivadas ou por algum outro mecanismo de ativação. Adicionalmente, sua produção pode ser aumentada. Em certos aspectos, essas proteínas estão também na forma ativada (tanto pela ativação *in vitro* ou processamento quanto pela manipulação da proteína).

[000159] O sistema do complemento é uma cascata bioquímica que auxilia a depurar patógenos de um organismo. Ele é parte de um sistema imune maior que não é adaptável e não se altera ao longo da vida do indivíduo; como tal, ele pertence ao sistema imune inato. Entretanto, ele pode ser recrutado e posto em ação pelo sistema imune adaptativo.

[000160] O sistema do complemento consiste em várias proteínas pequenas encontradas no sangue, que circulam normalmente como zimogênios inativos. Quando estimuladas por um de vários fatores desencadeantes, as proteases no sistema clivam proteínas específicas para liberar as citocinas e iniciar uma cascata de amplificação de clivagens adicionais. O resultado final dessa cascata de ativação é a amplificação maciça da resposta e a ativação do complexo de ataque a membrana que mata a célula. Mais de 20 proteínas e fragmentos de

proteína constituem o sistema do complemento, incluindo proteínas séricas, proteínas serosas e receptores da membrana celular. Essas proteínas são sintetizadas principalmente no fígado e elas são responsáveis por cerca de 5% da fração globulina do soro sanguíneo.

[000161] Os componentes do sistema do complemento que podem ser incluídos em uma composição de StIR incluem, mas não são limitados ao complexo C1 (C1q, C1r, C1s e C1qr2s2), C1r2s2, C4, C2, C4a, C4b, C2a, C2b C3-convertase (complexo C4b2a), C3a, C3b; C5 convertase (complexo C4bC2aC3b), Fator de aceleração da degradação (DAF), fator B, C3bB, fator D, Ba, Bb, C3bBb, C3bBbC3b, C5, C5a, C5b, C6, C7, C8, C9, e complexo de ataque a membrana (MAC) (C5b6789).

[000162] As Pentraxinas são de uma família de proteínas que tipicamente possuem uma ligação de ligante dependente de cálcio e uma estrutura plana β -jellyroll similar aquela das lectinas de legume. As pentraxinas “curtas” incluem um componente Amilóide Sérico P (SAP) e a proteína C reativa (CRP). As pentraxinas “longas” incluem PTX3 (uma molécula modulada por citocina) e várias pentraxinas neuronais.

[000163] Defensinas são proteínas catiônicas pequenas ricas em cisteína encontradas em vertebrados e invertebrados. Elas são ativas contra bactérias, fungos e vários vírus envelopados e não envelopados. Elas consistem em 18 a 45 aminoácidos incluindo seis (em vertebrados) a 8 resíduos de cisteína conservados. Células do sistema imune contêm esses peptídeos para auxiliar na morte das bactérias fagocitadas, por exemplo, granulócitos neutrófilos e quase todas as células epiteliais. A maioria das defensinas funciona pela ligação à membrana celular microbiana e, uma vez embebidas, formam defeitos na membrana semelhantes a poros que permitem o efluxo de íons essenciais e nutrientes.

[000164] Defensinas que podem ser incluídas em composições de

StIR da invenção incluem, mas não são limitadas a α -defensinas (DEFA1, DEFA1A3, DEFA3, e/ou DEFA4), β -defensinas (DEFB1, DEFB4, DEFB103A/DEFB103B a DEFB107A/DEFB107B, DEFB110 a DEFB133), e/ou θ -defensinas (DEFT1P).

[000165] O peptídeo antimicrobiano de catelicidina é de uma família de polipeptídeos encontrados em lisossomas em leucócitos polimorfonucleares (PMNs). Membros da família catelicidina de polipeptídeos antimicrobianos são caracterizados por uma região altamente conservada (domínio da catelina) e um domínio altamente variável de peptídeo de catelicidina. Os peptídeos de catelicidina têm sido isolados a partir de várias espécies diferentes de mamíferos. As catelidinas foram encontradas originalmente em neutrófilos, mas também têm sido encontradas em várias outras células incluindo células epiteliais e macrófagos ativados por bactérias, vírus, fungos ou o hormônio 1,25-D. A família da catelicidina compartilha homologia de sequência primária com a família da catepsina dos inibidores de cisteína proteinase, embora os resíduos de aminoácidos considerados serem importantes em tal inibição de protease estejam geralmente ausentes.

3. Citocinas

[000166] As citocinas são de uma categoria de moléculas de sinalização que são usadas amplamente na comunicação celular. Elas são proteínas, peptídeos ou glicoproteínas. A expressão citocina abrange uma grande e diversificada família de reguladores de polipeptídeo que são amplamente produzidos através do corpo pelas células de diversas origens embriológicas. A ação das citocinas pode ser autócrina, parácrina e endócrina. As citocinas são críticas para o desenvolvimento e funcionamento de ambas as respostas imunes inata e adaptativa, embora não limitada só ao sistema imune. Elas são geralmente secretadas pelas células imunes que tenham encontrado um patógeno, ativando e recrutando dessa maneira as células imunes

para aumentar a resposta do sistema ao patógeno.

[000167] Citocinas que estimulam as defesas antimicrobianas de células imunes inatas, em particular células epiteliais, tais como IL-17, IL-22, IFN- γ . Em alguns casos, isso representa uma amplificação da inflamação inata pelo sistema imune inato adaptativo, como quando IL-17 é produzida pelas células Th 17. Em outros casos, as citocinas são liberadas pelas células que não fazem parte do sistema imune adaptativo, por exemplo, pelas células epiteliais, células mesenquimais ou células dendríticas.

[000168] Citocinas que podem ser incluídas nas composições de StIR da invenção incluem a superfamília 1 de IL-1 ((IL-1Ra), IL-18, IL-33); a família que utiliza gp130 semelhante a IL-6 (IL-6, IL-11, IL-27, IL-30, IL-31, Oncostatina M, Fator inibitório de leucemia, Fator neurotrópico ciliar, Cardiotrofina 1); a família de IL-10 (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26); Interferon tipo III (IL-28, IL-29); Família comum da cadeia γ (IL-2/15, IL-3, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-21); a família de 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 de TNF (ligante) (ligante 4-1BB, fator de ativação de célula B, ligante de FAS, Linfotóxina, OX40L, RANKL, TRAIL); Cluster de citocinas de diferenciação (CD70, CD153, CD154); Interferons (IFN-I alfa (2a Peguilada, 2b Peguilada), IFN-Ibeta (1a, 1b)), IFN-II γ , e IFN-III.

4. Porções macromoleculares do hospedeiro

[000169] Macromoléculas ou seus fragmentos que podem ser

liberadas da matriz extracelular, da superfície celular ou do interior da célula e ativar a sinalização imune inata, tal como dectina, versican, HMGB-1, DNA e RNA. Tipicamente, essas macromoléculas estão normalmente ocultas dos receptores-alvo, tanto dentro do interior da célula quanto mascaradas pelas interações intramoleculares ou intermoleculares. Elas são liberadas para interagir com os receptores-alvo depois da ruptura da célula ou depois da proteólise da superfície celular da matriz para revelar a porção de sinalização ou outro mecanismo similar.

II. COMPOSIÇÕES DE POLIPEPTÍDEO E PEPTÍDEO

[000170] Em certas modalidades, a presente invenção se refere a pelo menos um polipeptídeo ou peptídeo (por exemplo, um segmento de polipeptídeo) ou derivado ou variante desse. Como usado aqui, uma “proteína”, “polipeptídeo”, “peptídeo”, “composição de polipeptídeo ou peptídeo” ou “composto de polipeptídeo ou peptídeo” se refere, geralmente, mas não é limitado a uma proteína ou polipeptídeo de pelo menos cinco aminoácidos ou análogos de aminoácidos (coletivamente uma molécula amino, veja abaixo). Todas as expressões “polipeptídeo ou peptídeo” descritas acima podem ser usadas alternativamente.

[000171] Em certas modalidades, o tamanho de pelo menos uma molécula de polipeptídeo ou peptídeo pode compreender, mas não está limitado a uma molécula que possui 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 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 faixa derivados desse intervalo. A invenção inclui aquelas extensões de aminoácidos contíguos ou análogos desses de qualquer sequência aqui discutida.

[000172] Segmentos ou fragmentos de um polipeptídeo ou peptídeo incluem aminoácidos 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, a aminoácidos 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600 aminoácidos de seqüências descritas ou referenciadas aqui, incluindo todos os valores e faixas dentro desse intervalo.

[000173] Como usada aqui, uma “molécula amino” se refere a qualquer aminoácido, derivado de aminoácido ou mimético de aminoácido como conhecida por aquele versado na técnica.

[000174] Como usada aqui, uma “molécula amino” se refere a qualquer aminoácido, derivado de aminoácido ou mimético de aminoácido como conhecido por aquele versado na técnica. Em certas modalidades, os resíduos da molécula de polipeptídeo ou peptídeo são seqüenciais, sem qualquer outra molécula não amino interrompendo a seqüência de resíduos de molécula amino. Em outras modalidades, a seqüência pode compreender uma ou mais porções de molécula não amino. Em certas modalidades, a seqüência de resíduos da molécula de polipeptídeo ou peptídeo pode ser interrompida por uma ou mais porções de moléculas não amino.

[000175] Consequentemente, a expressão “composição de polipeptídeo ou peptídeo” abrange seqüências de moléculas amino que compreendem pelo menos um dos 20 aminoácidos comuns nas proteínas naturalmente sintetizadas ou pelo menos um aminoácido modificado ou incomum.

[000176] Em certas modalidades, a composição de polipeptídeo ou peptídeo compreende pelo menos uma proteína, polipeptídeo ou peptídeo. Em métodos que envolvem uma composição agonista de TLR, um polipeptídeo ou peptídeo pode ter toda ou parte da seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo de flagelina, tal como a SEQ ID NO:2 ou polipeptídeos homólogos. Em certas modalidades, composições que contêm proteína, polipeptídeo ou peptídeo terão geralmente proteínas ou peptídeos ou proteínas sintéticas ou peptídeos

essencialmente livres de toxinas, patógenos e imunógenos prejudiciais. Em certos aspectos, o polipeptídeo é uma sequência de aminoácidos recombinante ou sintética.

[000177] Composições de polipeptídeo ou peptídeo podem ser feitas por qualquer método conhecido por aqueles versados na técnica, incluindo a expressão de proteínas, polipeptídeos ou peptídeos através de técnicas de biologia molecular padronizadas, o isolamento de polipeptídeos ou peptídeos a partir de fontes naturais ou a síntese química de materiais de polipeptídeo ou peptídeo. As regiões codificadoras desses polipeptídeos ou peptídeos podem ser amplificadas e/ou expressas usando as técnicas aqui descritas ou como são conhecidas por aqueles com habilidade comum a técnica. Alternativamente, várias preparações comerciais de proteínas, polipeptídeos e peptídeos são conhecidas por aqueles versados na técnica.

[000178] Em certas modalidades, um composto de polipeptídeo ou peptídeo pode ser purificado. Geralmente, “purificado” referir-se-á a uma composição de proteína, polipeptídeo ou peptídeo ou a uma composição específica que tenha sido submetida ao fracionamento para remover várias outras proteínas, polipeptídeos, peptídeos e outras moléculas e compostos e cuja composição retém substancialmente sua atividade, como pode ser avaliada, por exemplo, por ensaios para proteínas, como conhecidos por aqueles com habilidade comum na técnica para a proteína, polipeptídeo ou peptídeo específicos ou desejados.

[000179] É contemplado que, virtualmente, qualquer componente que contenha proteína, polipeptídeo ou peptídeo pode ser usado nas composições e métodos aqui descritos. Em certas modalidades, é previsto que a formação de um aerossol ou de um nebulizado ou composição aerossolizável ou nebulizável possa permitir que a

composição seja precisamente ou facilmente aplicada aos sistema respiratório por inalação, inspiração ou semelhantes.

A. Variantes e derivados de polipeptídeo ou peptídeo

[000180] Variantes ou derivados de sequências de aminoácidos das proteínas, polipeptídeos e peptídeos da presente invenção podem ser variantes por substituição, inserção ou deleção, assim como por inclusão de derivados ou análogos de aminoácidos. Variantes por deleção carecem de um ou mais resíduos da proteína nativa que não são essenciais para a função ou atividade imunogênica. Outro tipo comum de variante por deleção é aquela que carece de sequências de sinal secretório ou sequências de sinal que direcionam a proteína para se ligarem a uma parte particular da célula ou de regiões que atravessam a membrana ou outras sequências funcionais não necessárias para atividade objetivada *in vivo*. Os mutantes por inserção envolvem, tipicamente, a adição de material em um ponto não terminal no polipeptídeo. Isso pode incluir a inserção de um epítipo imuno-reativo ou simplesmente de um resíduo isolado. Adições terminais, chamadas proteínas de fusão, são discutidas abaixo.

[000181] Variantes por substituição contêm tipicamente a troca de um aminoácido por outro aminoácido em um ou mais sítios dentro de um polipeptídeo ou peptídeo e podem ser planejadas para modular uma ou mais propriedades, tais como a estabilidade contra a clivagem proteolítica, sem perda de outras funções ou propriedades. As substituições desse tipo preferivelmente são conservativas, ou seja, um aminoácido é substituído por outro de forma e carga similares. As substituições conservativas são bem conhecidas na técnica e incluem, por exemplo, as trocas de: alanina por serina; arginina por lisina; asparagina por glutamina ou histidina; aspartato por glutamato; cisteína por serina; glutamina por asparagina; glutamato por aspartato; glicina por prolina; histidina por asparagina ou glutamina; isoleucina por leucina

ou valina; leucina por valina ou isoleucina; lisina por arginina; metionina por leucina ou isoleucina; fenilalanina por tirosina, leucina ou metionina; serina por treonina; treonina por serina; triptofano por tirosina; tirosina por triptofano ou fenilalanina; e valina por isoleucina ou leucina.

[000182] A expressão “equivalente biologicamente funcional” é bem compreendida na técnica e é definida, adicionalmente, em detalhes aqui. Consequentemente, um equivalente biologicamente funcional terá uma sequência cerca de 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99% de aminoácidos idênticos ou funcionalmente equivalentes aos aminoácidos de um polipeptídeo ou peptídeo ou variante ou análogo ou derivado desses e fornece uma atividade/resposta biológica similar a flagelina ou outro agonista de TLR.

[000183] A discussão a seguir é baseada na substituição de aminoácidos de um polipeptídeo ou peptídeo para criar uma molécula de segunda geração equivalente ou até aperfeiçoada. Por exemplo, certos aminoácidos podem ser substituídos por outros aminoácidos em um polipeptídeo ou peptídeo sem perda apreciável de uma atividade em particular tal como a intensificação da resposta imunológica. Como a capacidade interativa e a natureza de um polipeptídeo ou peptídeo é que tipicamente define a atividade funcional da proteína, certas substituições de aminoácidos podem ser feitas em uma sequência de polipeptídeo ou peptídeo e na sua sequência de DNA codificadora subjacente e, não obstante, produzir uma proteína com propriedades semelhantes. Portanto, é considerado pelos inventores que várias alterações podem ser feitas nas sequências de DNA que codificam os polipeptídeos ou peptídeos da invenção sem perda apreciável de sua utilidade ou atividade biológica, como discutidas abaixo.

[000184] Na realização de tais alterações, o índice hidropático dos aminoácidos pode ser considerado. A importância do índice hidropático dos aminoácidos na concessão da função biológica interativa de uma

proteína é geralmente compreendida na técnica (Kyte & Doolittle, 1982). É aceito que o caráter hidropático relativo do aminoácido contribui para a estrutura secundária da proteína resultante, o que por sua vez define a interação da proteína com outras moléculas, células, tecidos e semelhantes, por exemplo, enzimas, substratos, receptores, DNA, anticorpos, antígenos, sistemas e células imunológicas e semelhantes.

[000185] Também é compreendido na técnica que a substituição de aminoácidos semelhantes pode ser feita efetivamente com base na hidrofiliabilidade. A Patente U.S. 4.554.101, incorporada aqui por referência, estabelece que a maior hidrofiliabilidade local média de uma proteína, controlada pela hidrofiliabilidade de seus aminoácidos adjacentes, se correlaciona com a propriedade biológica da proteína. Como detalhado na Patente U.S. 4.554.101, os seguintes valores de hidrofiliabilidade têm sido designados para os 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).

[000186] Também é entendido que um aminoácido pode ser substituído por outro que possui um valor de hidrofiliabilidade similar e ainda produzir uma proteína biologicamente equivalente e imunologicamente equivalente. Em tais alterações, a substituição de aminoácidos cujos valores de hidrofiliabilidade estão dentro de ± 2 é preferida, aqueles que estão dentro de ± 1 são particularmente preferidos e aqueles dentro de $\pm 0,5$ são até mais particularmente preferidos.

[000187] Como delineado acima, as substituições de aminoácidos geralmente são baseadas na similaridade relativa dos substituintes da cadeia lateral do aminoácido, por exemplo, sua hidrofobicidade,

hidrofilicidade, carga, tamanho e semelhantes. Substituições exemplificadoras que levam em consideração as várias características precedentes são bem conhecidas por aqueles versados na técnica e incluem: arginina e lisina; glutamato e aspartato; serina e treonina; glutamina e asparagina; e valina, leucina e isoleucina.

[000188] Pode-se também modificar os aminoácidos internos e/ou as terminações amino e/ou carboxi de compostos de polipeptídeo ou peptídeo da invenção para produzir outros compostos da invenção, isto é, derivados de polipeptídeo ou peptídeo. Modificações da terminação amino incluem a metilação (por exemplo, $--NHCH_3$ ou $--N(CH_3)_2$), acetilação (por exemplo, com ácido acético ou seu derivado halogenado tal como ácido α -cloroacético, ácido α -bromoacético, ou ácido α -iodoacético), adição de um grupo benziloxicarbonila (Cbz) ou bloqueando a terminação amino com qualquer grupo de bloqueio que contenha uma funcionalidade carboxilato definida por $RCOO--$ ou funcionalidade sulfonila definida por $R--SO_2--$, onde R é selecionado entre alquila, arila, heteroarila, alquil arila e semelhantes e grupos similares. Também pode-se incorporar um ácido desamino na terminação N (tal que não haja grupo amino terminal) para diminuir a suscetibilidade a proteases ou para restringir a conformação do composto de polipeptídeo ou peptídeo.

[000189] Modificações da terminação carboxi incluem a substituição do ácido livre por um grupo carboxamida ou a formação de uma lactama cíclica na terminação carboxi para introduzir restrições estruturais. Pode-se também ciclizar os peptídeos da invenção ou incorporar um resíduo desamino ou descarboxi nas terminações do peptídeo, tal que não haja grupo amino ou carboxi terminais, para diminuir a suscetibilidade a proteases ou para restringir a conformação do peptídeo. Grupos funcionais C terminais dos compostos da presente invenção incluem amida, amida de alquila inferior, amida de di(alquila

inferior), alcoxila inferior, hidroxí, e carboxi e os derivados éster inferior desses e seus sais farmaceuticamente aceitáveis.

[000190] Pode-se substituir as cadeias laterais dos 20 aminoácidos geneticamente codificados (ou os D aminoácidos estereoisoméricos) por outras cadeias laterais, por exemplo, com grupos alquila, alquila inferior, alquil cíclico com 4, 5, 6 ou 7 membros, amida, amida de alquila inferior, amida de di(alquila inferior), alcoxila inferior, hidroxí, e carboxi e os derivados éster inferior desses e com heterocíclicos com 4, 5, 6 a 7 membros. Em particular, os análogos de prolina nos quais o tamanho do anel do resíduo de prolina é alterado de 5 membros para 4, 6 ou 7 membros podem ser empregados. Os grupos cíclicos podem ser saturados e, se insaturados, podem ser aromáticos e não aromáticos. Os grupos heterocíclicos contêm preferivelmente um ou mais heteroátomos de nitrogênio, oxigênio e/ou enxofre. Exemplos de tais grupos incluem furazanila, furila, imidazolidinila, imidazolila, imidazolinila, isotiazolila, isoxazolila, morfolinila (por exemplo morfolino), oxazolila, piperazinila (por exemplo, 1-piperazinila), piperidila (por exemplo, 1-piperidila, piperidino), piranila, pirazinila, pirazolidinila, pirazolinila, pirazolila, piridazinila, piridila, pirimidinila, pirrolidinila (por exemplo, 1-pirrolidinila), pirrolinila, pirrolila, tiadiazolila, tiazolila, tienila, tiomorfolinila (por exemplo, tiomorfolino), e triazolila. Esses grupos heterocíclicos podem ser substituídos ou não substituídos. Onde um grupo é substituído, o substituinte pode ser alquila, alcoxila, halogênio, oxigênio ou fenila substituída ou não substituída.

[000191] Pode-se modificar prontamente os polipeptídeos ou peptídeos pela fosforilação e outros métodos (por exemplo, como descrito em Hruby *et al.* (1990).

[000192] Os compostos de peptídeo da invenção também servem como modelos estruturais para compostos não peptídicos com atividade biológica similar. Aqueles versados na técnica reconhecem que uma

variedade de técnicas estão disponíveis para construir os compostos com a atividade biológica desejada igual ou similar como o composto de peptídeo principal, mas com uma atividade mais favorável do que o principal com relação a solubilidade, estabilidade e suscetibilidade à hidrólise e proteólise (veja, Morgan e Gainor, 1989). Essas técnicas incluem substituir o arcabouço do peptídeo por um arcabouço composto por fosfonatos, amidatos, carbamatos, sulfonamidas, aminas secundárias e ácidos N-metilamino.

[000193] Adicionalmente, os compostos da presente invenção podem conter uma ou mais ligações disulfeto intramoleculares. Em uma modalidade, um monomero ou dímero de peptídeo compreende pelo menos uma ligação disulfeto intramolecular. Em modalidades preferidas, o dímero de peptídeo compreende duas ligações disulfeto intramoleculares. Tais ligações disulfeto podem ser formadas pela oxidação dos resíduos de cisteína da sequência do núcleo do peptídeo. Em uma modalidade, o controle da formação de ligação de cisteína é exercido pela escolha de um agente oxidante do tipo e concentração eficazes para otimizar a formação do isômero desejado. Por exemplo, a oxidação de um dímero de peptídeo para formar duas ligações disulfeto intramoleculares (uma em cada cadeia de peptídeo) é preferencialmente obtida (além da formação de ligações disulfeto intermoleculares) quando o agente oxidante é DMSO. Em certas modalidades, a formação de ligações de cisteína é controlada pelo uso seletivo de grupos protetores tiol durante a síntese do peptídeo.

[000194] Outras modalidades dessa invenção fornecem análogos desses derivados de disulfeto nos quais um dos enxofres tenha sido substituído por um grupo CH₂ ou outro isótero de enxofre. Esses análogos podem ser preparados a partir dos compostos da presente invenção, em que cada sequência do núcleo contenha pelo menos um resíduo de Cys (C) ou de homocisteína e um ácido α-amino-γ-butiúrico

no lugar do segundo resíduo de C, através de um deslocamento intramolecular ou intermolecular, usando métodos conhecidos na técnica (veja, por exemplo, Barker *et al.*, 1992 e Or *et al.*, 1991)

[000195] Aquele versado na técnica reconhecerá prontamente que esse deslocamento também pode ocorrer usando outros homólogos de ácido α -amino- γ -butírico e homocisteína.

[000196] Em adição as estratégias de ciclização precedentes, outras estratégias de ciclização de peptídeo não disulfeto podem ser empregadas. Tais estratégias de ciclização alternativas incluem, por exemplo, estratégias de ciclização de amida assim como aquelas que envolvem a formação de ligações de tio-éter. Portanto, os compostos da presente invenção podem existir em uma forma ciclizada com ligação amida intramolecular ou ligação tio-éter intramolecular. Por exemplo, um peptídeo pode ser sintetizado no qual uma cisteína da sequência do núcleo é substituída por uma lisina e a segunda cisteína é substituída por ácido glutâmico. Posteriormente, pode ser formado um monômero cíclico através de uma ligação amida entre as cadeias laterais desses dois resíduos. Alternativamente, um peptídeo pode ser sintetizado no qual uma cisteína da sequência do núcleo é substituída por lisina. Um monômero cíclico pode então ser formado através de uma ligação tio-éter entre as duas cadeias laterais do resíduo de lisina e o segundo resíduo de cisteína da sequência do núcleo. Como tal, em adição as estratégias de ciclização de disulfeto, as estratégias de ciclização de amida e as estratégias de ciclização de tio-éter podem ser prontamente usadas para ciclar os compostos da presente invenção. Alternativamente, a terminação amino do peptídeo pode ser revestida com um ácido α -acético substituído, em que o substituinte α é um grupo de partida, tal como um ácido α -haloacético, por exemplo, ácido α -cloroacético, ácido α -bromoacético e ácido α -iodoacético.

[000197] Incluída com a descrição abaixo, o pedido de patente U.S.

No. de série 10/844.933, depositado em 12 de Maio de 2004, está incorporado por referencia em sua totalidade. Polímeros solúveis em água, tais como polietileno glicol (PEG), podem ser usados para a modificação covalente dos polipeptídeos ou peptídeos de importância terapêutica. O acoplamento de tais polímeros é considerado intensificar a atividade biológica, aumentar a solubilidade aquosa e intensificar a resistência a digestão por protease. Por exemplo, o acoplamento covalente de PEG a polipeptídeos terapêuticos tais como interleucinas (Knauf, *et al.*, 1988; 15064; Tsutsumi *et al.*, 1995), interferons (Kita *et al.*, 1990), catalase (Abuchowski *et al.*, 1977, superóxido dismutase (Beauchamp *et al.*, 1983, e adenosina deaminase (Chen *et al.*, 1981) tem sido relatado para prolongar suas meias-vidas *in vivo* e/ou reduzir sua imunogenicidade e antigenicidade.

[000198] os compostos da invenção podem compreender, adicionalmente, uma ou mais porções de polímero solúveis em água. Preferivelmente, esses polímeros estão covalentemente acoplados aos compostos. O polímero solúvel em água pode ser, por exemplo, polietileno glicol (PEG), co-polímeros de etileno glicol/propileno glicol, carboximetilcelulose, dextran, álcool polivinil, polivinil pirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, co-polímero de etileno/anidrido maleico, poliaminoácidos (ou homopolímeros ou co-polímeros aleatórios), poli(n-vinil pirrolidona)polietileno glicol, homopolímeros de propileno glicol, co-polímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno e polióis polioxietilados.

[000199] os compostos da invenção podem ser acoplados a polímeros solúveis em água (por exemplo, PEG) usando qualquer uma de uma variedade de químicas para ligar os polímeros solúveis em água a porção ligante do receptor da molécula (por exemplo, peptídeo + espaçador). Uma modalidade típica emprega uma junção de acoplamento única para o acoplamento covalente dos polímeros

solúveis em água a porção de ligação do receptor; entretanto, em modalidades alternativas podem ser usadas junções de acoplamento múltiplas, incluindo variações adicionais nas quais diferentes espécies de polímero solúvel em água são acopladas a porção de ligação ao receptor em junções de acoplamento distintas, que podem incluir junções de acoplamento covalentes para o espaçador e/ou para uma ou ambas cadeias de peptídeo.

[000200] Reagentes de PEG incluem, mas não são limitados a mPEG2-NHS, mPEG2-ALD, multi-Arm PEG, mPEG(MAL)₂, mPEG2(MAL), mPEG-NH₂, mPEG-SPA, mPEG-SBA, tio-ésteres de mPEG, Ésteres Duplos de mPEG-, mPEG-BTC, mPEG-ButyrALD, mPEG-ACET, PEGs hetero-funcionais (NH₂-PEG-COOH, Boc-PEG-NHS, Fmoc-PEG-NHS, NHS-PEG-VS, NHS-PEG-MAL), acrilatos de PEG (ACRL-PEG-NHS), PEG-fosfolipídeos (por exemplo, mPEG-DSPE), PEGs com múltiplos braços da série SUNBRITE incluindo a série GL de PEGs baseados em glicerina ativados por uma química escolhida por aqueles versados na técnica, qualquer um dos PEGs ativados SUNBRITE (incluindo, mas não limitados a carboxil-PEGs, p-NP-PEGs, Tresil-PEGs, aldeídos de PEGs, acetal-PEGs, amino-PEGs, tiol-PEGs, maleimido-PEGs, hidroxil-PEG-amina, amino-PEG-COOH, hidroxil-PEG-aldeído, PEG tipo anidrido carboxílico, PEG-fosfolipídeo funcionalizado, e outros PEGs similares e/ou reativos adequados selecionados por aqueles versados na técnica para aplicação e utilização particulares.

[000201] O número de moléculas de polímero acopladas pode variar; por exemplo, um, dois, três ou mais polímeros podem ser acoplados a um polipeptídeo ou peptídeo da invenção. Os múltiplos polímeros acoplados podem ser porções químicas iguais ou diferentes (por exemplo, PEGs de diferentes pesos moleculares). Em alguns casos, o grau de acoplamento do polímero (o número de porções de

polímero acopladas a um peptídeo e/ou o número total de peptídeos ao qual um polímero está acoplado) pode ser influenciado pela proporção de moléculas de polímero versus moléculas de peptídeo em uma reação de acoplamento, assim como pela concentração total de cada um na mistura de reação. Em geral, a proporção ótima de polímero versus peptídeo (em termos de eficiência de reação para não fornecer excesso de peptídeos e/ou de polímeros não reagidos) será determinada pelos fatores tais como o grau desejado de acoplamento de polímero (por exemplo, mono, di-, tri-, etc.), o peso molecular do polímero selecionado, se o polímero é ramificado ou não ramificado e as condições de reação para um método de acoplamento em particular.

[000202] Em outros aspectos, um composto da invenção pode ser derivatizado pela adição de polímeros insolúveis em água. Polímeros solúveis em água representativos incluem, mas não são limitados a polifosfazinas, alcoóis de poli(vinil), poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, poliacrilamidas, polialquileno glicolis, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, éteres de polivinila, ésteres de polivinila, haletos de polivinila, polivinilpirrolidona, poliglicolideos, polisiloxanas, poliuretanas, metacrilato de poli(metila), metacrilato de poli(etila), metacrilato de poli(butila), metacrilato de poli(isobutila), metacrilato de poli(hexila), metacrilato de poli(isodecila), metacrilato de poli(lauril), metacrilato de poli(fenila), acrilato de poli(metila), acrilato de poli(isopropila), acrilato de poli(isobutila), acrilato de poli(octadecila), polietileno, polipropileno, poli(etileno glicol), poli(óxido de etileno), tereftalato de poli(etileno), acetato de poli(vinila), cloreto de polivinila, poliestireno, polivinil pirrolidona, pluronics e polivinilfenol e seus co-polímeros.

[000203] Polímeros naturais sinteticamente modificados para uso nos derivados da invenção incluem, mas não são limitados a alquil celulosas, hidroxialquil celulosas, éteres de celulose, ésteres de

celulose e nitroceluloses. Membros das grandes classes de polímeros naturais sinteticamente modificados incluem, mas não são limitados a metil celulose, etil celulose, hidroxipropil celulose, hidroxipropil metil celulose, hidroxibutil metil celulose, acetato de celulose, propionato de celulose, acetato de butirato de celulose, acetato de ftalato de celulose, carboximetil celulose, triacetato de celulose, sal de sulfato de sódio de celulose, e polímeros de ésteres acrílico e metacrílico e ácido algínico.

[000204] Em certos aspectos, um polipeptídeo ou peptídeo da invenção pode ser modificado ou derivatizado pela adição de grupos de sacarídeo ou açúcares modificados. A presente invenção fornece derivados de polipeptídeo ou peptídeo que contêm açúcares modificados, nucleotídeos de açúcar modificado e conjugados de açúcares modificados. Nos compostos de açúcar modificado da invenção, a porção açúcar é preferivelmente um sacarídeo, um desoxi-sacarídeo, um amino-sacarídeo ou um N-acil sacarídeo. A expressão sacarídeo e seus equivalentes, “sacaril”, “açúcar” e “glicosila” se refere a monômeros, dímeros, oligômeros e polímeros. A porção açúcar também pode ser funcionalizada com um grupo modificador. O grupo modificador é conjugado a porção de açúcar, tipicamente, através da conjugação com uma porção amina, sulfidril ou hidroxila, por exemplo, hidroxila primária, sobre o açúcar. Em uma modalidade, o grupo modificador é acoplado através de uma porção de amina sobre o açúcar, por exemplo, através de uma amida, um uretano ou uréia que é formada através da reação da amina com um derivado reativo do grupo modificador.

[000205] Qualquer açúcar pode ser utilizado como o açúcar para os conjugados da invenção. Tais açúcares incluem, mas não são limitados a glicose, galactose, manose, fucose e ácido siálico. Outros açúcares úteis incluem amino açúcares tais como glicosamina, galactosamina, manosamina, o análogo 5-amino de ácido siálico e semelhantes. O

açúcar pode ser uma estrutura encontrada na natureza ou ele pode ser modificado para fornecer um sítio para a conjugação de um grupo modificador adicional.

[000206] Aqueles com habilidade na técnica reconhecerão que as estruturas e composições descritas são geralmente aplicáveis através dos gêneros dos grupos de sacarídeos, grupos de sacarídeos modificados, grupos de sacarídeos modificados ativados e conjugados de grupos de sacarídeos modificados.

III. ESTIMULAÇÃO DAS DEFESAS PULMONARES

[000207] Os inventores usaram um camundongo como modelo para a infecção microbiana do pulmão. Em certos estudos, os camundongos não tratados tiveram uma mortalidade de 100%, mas os camundongos tratados estavam altamente protegidos. Sem estar preso a qualquer mecanismo ou teoria em particular, acredita-se que a proteção é devida a ativação de defesas locais ou a imunidade inata. Os efeitos da exposição única e repetitiva de um indivíduo a uma composição da invenção foi determinado e nenhuma patologia óbvia, tal como morte prematura, perda de peso ou alterações de comportamento foram observadas.

[000208] Um benefício não limitante da presente invenção é poder ser liberada e ter efeito rapidamente e facilmente. As composições também pode ser produzidas economicamente em grandes quantidades e facilmente armazenadas, assim como facilmente transportadas por uma pessoa fora do ambiente hospitalar. Tipicamente, a administração das composições inventivas e os métodos da invenção resultam em pelo menos alguma morte ou inibição dos patógenos invasores mesmo antes da entrada na célula. No caso em que alguns patógenos entram nas células dos pulmões tanto por escapar da morte extracelular ou por que as composições são administradas depois da exposição ao patógeno (curativamente) ao invés de antes da exposição ao patógeno

(preventivamente), é contemplado que as composições e métodos relacionados promovem a morte intracelular que resulta das respostas locais intensificadas ou aumentadas nos pulmões. As composições e métodos relacionados são contempladas possuir ou produzir respostas protetoras ou terapêuticas contra uma variedade de patógenos respiratórios.

[000209] A proteção ou terapia fornecida a um indivíduo por uma composição StIR pode ser estendida a classes adicionais de patógenos microbianos incluindo bactérias gram negativas, bactérias intracelulares, fungos e vírus devido a ampla atividade dos mecanismos anti-microbianos do trato respiratório. Um agente tal como aquele descrito nesse pedido poderá simplificar as contramedidas de armazenamento de matéria-prima e distribuição. As composições e métodos da invenção também poderão eliminar a dificuldade de identificar rapidamente um patógeno específico durante um ataque com armas biológicas ou outra exposição ou evento de exposição em potencial.

[000210] Adicionalmente, as vantagens econômicas de produção e aquisição de um agente com aplicabilidade em múltiplos ambientes civis e de bio-defesa são significativas. O aumento de mecanismos epiteliais locais é particularmente atrativo em indivíduos que frequentemente têm neutropenia ou função imune adaptativa prejudicada, por exemplo, indivíduos imuno-comprometidos. Os métodos atual localmente mais do que sistemicamente e fornecem efeitos amplos contra múltiplos patógenos. Os efeitos são rápidos e são atrativos no cenário da bio-defesa, médico e epidêmico.

[000211] O aumento das capacidades da defesa inata dos pulmões em hospedeiros normais poderá ser valioso durante epidemias de influenza ou virais respiratórias emergentes para as quais as vacinas imunes adaptativas não estão disponíveis. Surtos bacterianos com

organismos emergentes ou resistentes a fármacos poderiam ser situações nas quais o reforço das defesas pulmonares inatas poderiam ser úteis. Similarmente, a proteção de profissionais de saúde durante uma epidemia poderá facilitar o cuidado com os doentes enquanto limita a disseminação.

[000212] Várias pessoas na comunidade vivem com as defesas cronicamente comprometidas contra a infecção, tal como pacientes com diabetes e pacientes que tomam fármacos imunossupressores para doenças auto-imunes ou para evitar a rejeição de transplante. Essas pessoas poderiam se beneficiar, particularmente, do aumento das defesas pulmonares durante epidemias ou períodos onde o potencial para a exposição a micróbios é elevado. Até mais visivelmente, pacientes com câncer que se submetem a quimioterapia que possuem defesas imunes transitória, mas severamente comprometidas, podem se beneficiar da proteção transitória. A pneumonia é uma ocorrência comum nesses pacientes e é a causa principal de morte por infecção. Vários fármacos quimioterápicos, tais como agentes alquilantes e análogos de nucleosídeos, induzem neutropenia transitória. Inicialmente, os pacientes com neutropenia são suscetíveis a pneumonia bacteriana a partir de organismos vistos em hospedeiros normais, assim como bactérias com virulência baixa tais com *Stenotrophomonas maltophilia*. Com a neutropenia prolongada, os pacientes tornam-se suscetíveis a infecção por fungos de baixa virulência, particularmente da espécie *Aspergillus*.

[000213] As defesas do pulmão podem ser estimuladas para fornecer proteção transitória durante períodos prolongados de neutropenia. Outros pacientes com câncer, tais como aqueles que recebem fludarabina ou anticorpos anti-linfócito ou aqueles que recebem inibidores da calcineurina e esteróides depois do transplante de célula-tronco hematopoiética, possuem imunidade adaptativa prejudicada.

Esses pacientes também podem se beneficiar da estimulação episódica da imunidade pulmonar para proteger contra a invasão por fungos e bactérias que tenham colonizado as vias aéreas ou proteger contra vírus epidêmicos. Surtos comunitários de vírus da “gripe” respiratória sazonal tal como parainfluenza e RSV podem causar pneumonia fatal nesses pacientes comprometidos e a infecção por vários desses vírus pode ser rapidamente identificada a partir de lavados nasais.

[000214] Depois da infecção, o reconhecimento dos microrganismos é mediado primeriamente por um conjunto de moléculas codificadas pela linhagem germinativa sobre células imunes inatas que são referidas como receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (Medzhitov e Janeway, 1997). Esses receptores de reconhecimento padrão são expressos tanto como proteínas ligadas a membrana quanto solúveis que reconhecem estruturas moleculares que não variam, chamadas de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) (Janeway e Medzhitov, 2002).

[000215] A maioria dos organismos multicelulares possui um “sistema imune inato” que não se altera durante a vida do organismo. Ao contrário, a imunidade adaptativa é a resposta aos patógenos que se altera e desenvolve durante a vida o indivíduo. Organismos que possuem imunidade adaptativa também possuem uma imunidade inata e com vários dos mecanismos entre os sistemas sendo comuns, nem sempre é possível delimitar uma fronteira sólida e rápida entre os componentes individuais envolvidos em cada um, apesar da clara diferença de funcionamento. Vertebrados superiores e todos os mamíferos possuem um sistema imune inato e um adaptativo.

A. Sistema imune inato

[000216] O sistema imune adaptativo pode levar dias ou semanas depois da infecção inicial para ter um efeito. Entretanto, vários organismos estão sob o assalto constante de patógenos que devem ser

mantidos sob observação pelo sistema imune inato que atua mais rápido. A imunidade inata defende contra patógenos pelas respostas rápidas coordenadas através de mecanismos “inatos” que reconhecem um amplo espectro de componentes patogênicos conservados. A maioria dos estudos da imunidade inata tem focalizado os leucócitos, tais como neutrófilos, macrófagos e células natural killer. Entretanto, as células epiteliais desempenham papéis nas defesas inatas que incluem o fornecimento de uma barreira mecânica a entrada microbiana, sinalizando para os leucócitos e matando os patógenos diretamente. Importaneamente, todas essas defesas são altamente induzíveis em resposta a sensibilização de produtos microbianos ou do hospedeiro. Em pulmões saudáveis, o nível de função epitelial imune inata está abaixo da linha de base. Isso é indicado pelos baixos níveis de morte microbiana espontânea e liberação de citocina, refletindo a pouca estimulação constitutiva no trato respiratório inferior quase estéril quando os mecanismos de depuração muco-ciliares estão efetivamente funcionando. Isso contrasta com o cólon, onde as bactérias estão continuamente presentes e as células epiteliais são constitutivamente ativadas. Ainda que a área superficial dos pulmões apresente um grande alvo para a invasão microbiana, as células epiteliais ativadas do pulmão, que estão intimamente apostas a patógenos depositados, estão idealmente posicionadas para a morte microbiana. (Veja, Evans *et al.*, 2010). As plantas e vários animais inferiores não possuem um sistema imune adaptativo e contam com a imunidade inata. As substâncias de ambas as fontes microbianas e não microbianas são capazes de estimular as respostas imunes inatas.

[000217] O sistema imune inato, quando ativado, tem um grande arranjo de células e mecanismos efetores. Existem diferentes tipos de células fagocíticas diferentes, que ingerem e destroem patógenos invasivos. Os fagócitos mais comuns são os neutrófilos, macrófagos e

células dendríticas. Outro tipo de células, as células natural killer, são especialmente adaptadas na destruição de células infectadas por vírus. Outro componente do sistema imune inato é conhecido como o sistema do complemento. As proteínas do complemento são normalmente componentes inativos do sangue. Entretanto, quando ativadas pelo reconhecimento de um patógeno ou anticorpo, as várias proteínas são ativadas para recrutar as células inflamatórias, revestir os patógenos para torná-los mais facilmente fagocitados e para fazer poros destruidores nas superfícies dos patógenos.

[000218] A defesa de “primeira linha” inclui as barreiras física e química a infecção, tal como o revestimento de pele e muco do intestino e vias aéreas, evitando fisicamente a interação entre o hospedeiro e o patógeno. Patógenos que penetram essas barreiras encontram moléculas anti-microbianas expressas constitutivamente (por exemplo, lisozima) que restringem a infecção. A defesa de “segunda linha” inclui as células fagocíticas (macrófagos e granulócitos neutrófilos) que podem englobar (fagocitose) as substâncias estranhas.

[000219] A fagocitose envolve a quimiotaxia, onde as células fagocíticas são atraídas para os microrganismos por meio de químicos quimiotáticos tais como produtos microbianos, complemento, células danificadas e fragmentos de células sanguíneas brancas. A quimiotaxia é seguida pela adesão, onde o fagócito se adere ao microrganismo. A adesão é intensificada pela opsonização, onde as opsoninas semelhantes a proteínas são revestidas sobre a superfície da bactéria. Isso é seguido pela ingestão, na qual o fagócito estende projeções, formando pseudópodos que englobam o organismo estranho. Finalmente, o patógeno é digerido pelas enzimas no lisossoma, envolvendo espécies reativas a oxigênio e proteases.

[000220] Adicionalmente, as proteínas anti-microbianas podem ser ativadas se um patógeno passa através de uma barreira física. Existem

várias classes de proteínas anti-microbianas, tal como as proteínas da fase aguda (por exemplo, proteína C reativa, que intensifica a fagocitose e ativa o complemento quando ele se liga a proteína C do *S. pneumoniae*), lisozima e o sistema do complemento).

[000221] O sistema do complemento é um grupo muito complexo de proteínas séricas, que é ativado em forma de cascata. Tres vias diferentes estão envolvidas na ativação do complemento: (a) uma via clássica que reconhece complexos antígeno-anticorpo. (b) uma via alternativa que é ativada espontaneamente em contato com superfícies celulares patogênicas e (c) a via de lectina que se liga a manose que reconhece açúcares de manose, que tendem a aparecer apenas sobre superfícies celulares patogênicas. Uma cascata de atividade de proteína acompanha a ativação do complemento; essa cascata pode resultar em uma variedade de efeitos, incluindo a opsonização do patógeno, a destruição do patógeno pela formação e ativação do complexo de ataque a membrana e a inflamação.

[000222] Interferons também são proteínas anti-microbianas. Essas moléculas são proteínas que são secretadas pelas células infectadas por vírus. Essas proteínas se difundem rapidamente pelas células da vizinhança, induzindo as células a inibir a disseminação da infecção viral. Essencialmente, essas proteínas anti-microbianas atuam para prevenir a proliferação de célula para célula dos vírus.

B. Sistema imune adaptativo

[000223] O sistema imune adaptativo, também chamado de “sistema imune adquirido”, assegura que a maioria dos mamíferos que sobrevivem a infecção inicial pelo patógeno tornem-se geralmente imunes a doença posterior, causada pelo mesmo patógeno. O sistema imune adaptativo é baseado em células imunes dedicadas denominadas leucócitos (células sanguíneas brancas) que são produzidas pelas células-tronco na medula óssea e amadurecem no

timo e/ou linfonodos. Em várias espécies, incluindo os mamíferos, o sistema imune adaptativo pode ser dividido em: (a) sistema imune humoral que atua contra bactérias e vírus nos líquidos corporais (por exemplo, sangue) por meio de proteínas, chamadas imunoglobulinas (também conhecidas como anticorpos), que são produzidas pelas células B; e (b) um sistema imune celular que destrói as células infectadas pelo vírus (entre outras obrigações) com as células T (também chamadas de “linfócitos T”; T significa que elas se desenvolvem no timo). O sistema imune adaptativo é tipicamente direcionado para um patógeno específico, por exemplo, vacinação.

IV. ORGANISMOS MICROBIANOS

[000224] Modalidades da invenção incluem composições e métodos relacionados para uma ampla proteção contra uma variedade de patógenos ou patógenos em potencial (por exemplo, patógenos Categoria A, B, C da NIAID). Por exemplo, a pneumonia bacteriana em hospedeiros normais ocorre em uma taxa de 1/100 pessoas/ano, principalmente em adultos idosos e crianças e pode ser causada por uma variedade de organismos. Ela é mais comumente causada pelo *Streptococcus pneumoniae*, seguido em frequência pelo *Haemophilus influenzae* encapsulado. Outras bactérias tais como gram negativas entéricas, anaeróbios e *Staphylococcus aureus* são causas significativas de pneumonia em ambientes específicos, tais como instalações hospitalares. *Mycobacterium tuberculosis* é altamente infecciosa e historicamente foi uma causa importante de mortalidade em todo mundo. Ele é controlado principalmente com antibióticos no mundo desenvolvido, embora cepas resistentes a múltiplos fármacos continuem a causar problemas e são classificadas com agentes biológicos Categoria C. *Legionella pneumophila* foi identificada inicialmente durante um surto na Philadelphia em 1978, embora ela agora seja reconhecida ocorrendo amplamente em uma taxa endêmica

baixa relacionada a fontes ambientais. As infecções fúngicas dos pulmões podem causar doença sintomática em hospedeiros normais. *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatidis* e *Cryptococcus neoformans* podem todos causar pneumonia relacionada a exposição local a concentrações ambientais altas. A pneumonia devida a esses fungos patogênicos é geralmente auto-limitada em hospedeiros normais. Alguns microrganismos “atípicos” adicionais, tais como micoplasmas, são responsáveis por uma fração substancial de pneumonias em hospedeiros normais. É contemplado que a composição da presente invenção pode fornecer uma proteção rápida, temporária contra um espectro de agentes que podem causar, por exemplo, pneumonia ou outros estados de doença. Em certos aspectos, a presente invenção pode ser usada em combinação com um regime de vacinação para fornecer uma proteção adicional para um indivíduo que pode ou está exposto a um ou mais organismos patogênicos ou potencialmente patogênicos.

[000225] Em aspectos particulares da invenção, as composições e métodos da invenção podem ser usadas para prevenir, reduzir o risco ou tratar a infecção ou exposição a uma arma biológica/micróbio oportunista ou a exposição de um indivíduo a um agente infeccioso inalado. O único agente microbiano patogênico que foi usado como uma arma terrorista na era moderna é o *Bacillus anthracis*, que tem uma taxa de casos fatais de 75% quando a infecção ocorre pela via respiratória, mesmo com o uso de antibióticos apropriados. *Francisella tularensis* é um cocobacilo aeróbico, gram negativo que é um patógeno intracelular facultativo. É altamente infecciosa, altamente patogênica e sobrevive sob condições ambientais desfavoráveis, tornando-a uma séria ameaça pelo bio-terrorismo mesmo que pouquíssimo transmissível de pessoa para pessoa (Dennis, 2001). Uma vacina está disponível, mas é apenas parcialmente protetora. A Organização Mundial de Saúde avalia que a

dispersão por aerossol de 50 kg de *Francisella tularensis* sobre uma área metropolitana com 5 milhões de habitantes resultaria em 250.000 ocorrências incapacitantes, incluindo 19.000 mortes; os Centers for Disease Control (CDC) avaliaram o custo econômico de tal ataque como sendo de \$5,4 bilhões para cada 100.000 pessoas expostas (Dennis, 2001).

[000226] Outros agentes de bio-terrorismo Classe A que podem ser transmitidos por aerossol são *Yersinia pestis*, vírus da varíola e os vírus da febre hemorrágica. Adicionalmente, múltiplos agentes da Classe B e C podem ser efetivamente liberados pela via respiratória. Juntos, esses organismos compreendem bactérias gram-positivas, gram-negativas, intracelulares e extracelulares, assim como uma variedade de classes virais. Devido a dificuldade potencial de identificar inicialmente um agente de bio-terrorismo específico, a complexidade local de estocagem de matéria-prima para vacinas imunes adaptativas e antibióticos direcionados para agentes específicos, e a acentuada virulência dos organismos, tais como *Bacillus anthracis* apesar do tratamento apropriado, a estimulação das capacidades de defesa inata dos pulmões que poderiam evitar ou prevenir ou atenuar a infecção por um agente de bio-terrorismo liberado pela via respiratória, tal efeito poderá ter um grande valor em saúde pública.

A. Micróbios Patogênicos ou Potencialmente Patogênicos

[000227] Existem numerosos micróbios que são considerados patogênicos ou potencialmente patogênicos sob certas condições (isto é, patógenos/micróbios oportunistas). Em certos aspectos, a patogenicidade é determinada em relação a infecção através dos pulmões. Micróbios bacterianos incluem, mas não são limitados a várias espécies de *Bacillus*, *Yersinia*, *Francisella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, Micobactérias, gênero *Burkholderia* de

bactérias. Espécies particulares de bactérias, das quais um indivíduo deve ser protegido incluem, mas não se limitam a *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *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. malmoeense*, *M. ulcerans*, *M. smegmatis*, *M. wolinskyi*, *M. goodii*, *M. thermoresistibile*, *M. neoaurum*, *M. vaccae*, *M. palustre*, *M. elephantis*, *M. bohemica* e *M. septicum*.

B. Vírus

[000228] Existem numerosos vírus e cepas virais que são consideradas patogênicas ou potencialmente patogênicas sob certas condições. Os vírus podem ser classificados em um dos sete grupos a seguir: Grupo I: Vírus de DNA de fita dupla. Grupo II: Vírus de DNA de fita simples, Grupo III: Vírus de RNA de fita dupla; Grupo IV: Vírus de RNA de fita simples senso positivo; Grupo V: Vírus de RNA de fita simples senso negativo; Grupo VI: Vírus de RNA de fita simples diplóides com transcrição reversa; Grupo VII: Vírus de DNA circular de fita dupla com transcrição reversa. Os vírus incluem as famílias *Adenoviridae*, *Arenaviridae*, *Caliciviridae*, *Coronaviridae*, *Filoviridae*, *Flaviviridae*, *Hepadnaviridae*, *Herpesviridae* (*Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, *Gammaherpesvirinae*), *Nidovirales*, *Papillomaviridae*, *Paramyxoviridae* (*Paramyxovirinae*, *Pneumovirinae*), *Parvoviridae* (*Parvovirinae*, *Picornaviridae*), *Poxviridae* (*Chordopoxvirinae*), *Reoviridae*, *Retroviridae* (*Orthoretrovirinae*), e/ou *Togaviridae*. Esses vírus incluem, mas não são limitados a várias cepas

de influenza, tal como a gripe aviária (por exemplo, H5N1). Vírus particulares a partir dos quais um indivíduo deve ser protegido incluem, mas não são limitados ao Citomegalovírus, Vírus sincicial respiratório e semelhantes.

[000229] Exemplos de vírus patogênicos incluem, mas não estão limitados a Influenza A, H5N1, Marburg, Ebola, Dengue, coronavírus da síndrome respiratória aguda severa, vírus da febre amarela, vírus sincicial respiratório humano, vírus da varicela e semelhantes.

C. Fungos

[000230] Existem numerosas espécies de fungos que são considerados patogênicos ou potencialmente patogênicos sob certas condições. A proteção pode ser fornecida contra, mas não está limitada a *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, or *Pneumocystis carinii*, e/ou *Blastomyces dermatitidis*.

V. FORMULAÇÕES E ADMINISTRAÇÃO

[000231] As composições farmacêuticas aqui descritas podem ser administradas através do sistema respiratório do indivíduo. Em certos aspectos, as composições são depositadas nos pulmões por métodos e dispositivos conhecidos na técnica. As composições StIR podem ser preparadas em água adequadamente misturada com um tensoativo, tal como hidroxipropilcelulose. As dispersões também podem ser preparadas em glicerol, polietileno glicóis líquidos e suas misturas e em óleos. Sob condições comuns de armazenamento e uso, essas preparações contêm um conservante para evitar o crescimento de microrganismos, As formas farmacêuticas adequadas incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões estéreis inaláveis. Em todos os casos, a forma é tipicamente estéril e capaz de ser inalada diretamente ou através de algum processo ou dispositivo intermediários.

Ela deve ser estável sob condições de fabricação e armazenamento e deve ser preservada contra a ação conatminante de microrganismos, tais como bactérias e fungos. O veículo pode ser um solvente ou um meio de dispersão que contenha, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol líquidos e semelhantes), misturas adequadas desses e/ou óleos vegetais. A prevenção da ação de microrganismos pode ser oferecida por vários agentes anti-bacterianos e anti-fúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal e semelhantes.

[000232] Alguma variação na dosagem ocorrerá necessariamente dependendo da condição do indivíduo a ser tratado e das circunstancias particulares que envolvem a exposição ou a exposição em potencial. A pessoa responsável pela administração determinará, em qualquer circunstancia, a dose apropriada para o paciente individual. Além disso, para a administração a humanos, as preparações devem atingir padrões de esterilidade, pirogenicidade, segurança geral e pureza como requeridos pelos padrões do FDA Office of Biologics ou outras organizações similares.

[000233] Composições estéreis são preparadas pela incorporação dos componentes ativos na quantidade necessária no solvente apropriado com vários outros ingredientes enumerados acima, como necessário, seguidida, por exemplo, pela esterilização por filtração. Geralmente, as dispersões são preparadas pela incorporação de vários ingredientes ativos esterilizados em um veículo estéril que contém o meio de dispersão básico e os outros ingredientes requeridos a partir daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de composições estéreis, alguns métodos de preparação são as técnicas de secagem a vácuo e liofilização que fornecem um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução previamente filtrada estéril.

[000234] A liberação pulmonar/respiratória de um fármaco pode ser implementada por diferentes abordagens, incluindo nebulizadores de líquido, inaladores dosimetrados baseados em aerossol (MDIs), pulverizadores, dispositivos para a dispersão de pó seco e semelhantes. Tais métodos e composições são bem conhecidos daqueles versados na técnica, como indicado pelas Patentes U.S. 6.797.258, 6.794.357, 6.737.045, e 6.488.953, todas incorporadas aqui por referência. De acordo com a invenção, pelo menos uma composição farmacêutica pode ser liberada por qualquer um de uma variedade de dispositivos para inalação ou nasais conhecidos na técnica de administração de um agente terapêutico por inalação. Outros dispositivos adequados para o direcionamento pulmonar ou administração nasal também são conhecidos na técnica. Tipicamente, para a administração pulmonar, pelo menos uma composição farmacêutica é liberada com um tamanho de partícula eficaz para atingir as vias aéreas inferiores dos pulmões ou seios paranasais. Alguns exemplos específicos de dispositivos para inalação comercialmente disponíveis, adequados para a prática dessa invenção 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 dosimetrado Ventolin® (Glaxo), o inalador de pó Spinhaler® (Fisons), ou semelhantes.

[000235] Todos esses dispositivos para inalação podem ser usados para a administração de uma composição farmacêutica em um aerossol. Tais aerossóis podem compreender tanto soluções (aquosas ou não aquosas) quanto partículas sólidas. Os inaladores dosimetrados usam tipicamente um gás propelente e requerem ativação durante a inspiração. Veja, por exemplo, WO 98/35888; WO 94/16970. Inaladores com pó seco usam a ativação pela respiração de um pó misturado. Veja,

Patentes U.S. 5.458.135; 4.668.218; Publicação PCT WO 97/25086; WO 94/08552; WO 94/06498; e pedido europeu EP 0237507, todos incorporados aqui por referencia em sua totalidade. Nebulizadores produzem aerossóis a partir de soluções, enquanto que os inaladores dosimetrados, inaladores de pó seco e semelhantes geram aerossóis de partícula pequena. Formulações adequadas para administração incluem, mas não são limitados a spray nasal ou gotas nasais e podem incluir soluções aquosa ou oleosas de uma composição StIR.

[000236] Um spray que compreenda uma composição farmacêutica da presente invenção pode ser produzido pelo forçamento de uma suspensão ou solução de uma composição através de um bocal sob pressão. O tamanho e a configuração do bocal, a pressão aplicada e a taxa de alimentação de líquido podem ser escolhidos para obter a emissão e o tamanho da partícula desejados. Um eletrospray pode ser produzido, por exemplo, por uma campo elétrico em conexão com um capilar ou bocal alimentador.

[000237] Uma composição farmacêutica da presente invenção pode ser administrada por um nebulizador, tal como um nebulizador de jato ou um nebulizador ultrassônico. Tipicamente, em um nebulizador de jato, uma fonte de ar comprimido é usada para criar um jato de ar com alta velocidade através de um orifício. Como o gás se expande além do bocal, é criada uma região de baixa pressão, que direciona a composição através de um tubo capilar conectado a um reservatório de líquido. O fluxo de líquido do tubo capilar é cisalhado em filamentos instáveis e gotículas conforme ele sai do tubo, criando o aerossol. Uma gama de configurações, taxas de fluxo e tipos de defletores pode ser empregada para se obter as características de desempenho de um dado nebulizador de jato. Em um nebulizador ultrassônico, a energia elétrica de alta frequência é usada para criar energia mecânica, vibratória, empregando tipicamente um transdutor piezoelétrico. Essa energia é

transmitida à composição criando um aerossol.

[000238] Em uma inalador dosimetrado (MDI), um propelente, uma composição e quaisquer excipientes ou outros aditivos estão contidos em uma bomba como uma mistura com um gás comprimido. A ativação da válvula calibrada libera a mistura como um aerossol.

[000239] As composições farmacêuticas para uso com um dispositivo inalador dosimetrado geralmente incluirão um pó finamente dividido contendo uma composição da invenção como uma suspensão em um meio não aquoso, por exemplo, suspensa em um propelente com o auxílio de um tensoativo. O propelente pode ser qualquer material convencional empregado para esse propósito tal como clorofluorcarbono, um hidroclorofluorcarbono, hidrofluorcarbono ou um hidrocarboneto incluindo triclorofluormetano, diclorodifluormetano, diclorotetrafluoretanol e 1,1,1,2-tetrafluoretano, HFA-134a (difluoralcano-134a), HFA-227 (difluoralcano-227) ou semelhantes.

[000240] Como usado aqui, “veículo” inclui qualquer um e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, diluentes, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e que retardam a absorção, tampões, soluções de transporte, suspensões, colóides e semelhantes. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmacêuticas ativas é bem conhecido na técnica. Exceto quando qualquer agente ou meio convencional é incompatível com o ingrediente ativo, seu uso na composição terapêutica é contemplado. Ingredientes ativos suplementares também podem ser incorporados nas composições.

[000241] A frase “farmaceuticamente aceitável” se refere a entidades moleculares e composições que não produzem uma reação desagradável alérgica ou similar quando administradas a um indivíduo. A preparação de uma composição aquosa que contenha um polipeptídeo ou peptídeo como ingrediente ativo é bem conhecida na

técnica.

VI. TRATAMENTOS DE COMBINAÇÃO

[000242] As composições e métodos da presente invenção podem ser usadas no contexto de várias aplicações terapêuticas e profiláticas. A fim de aumentar a eficácia de um tratamento com as composições da presente invenção ou de aumentar a proteção de outra terapia (terapia secundária), por exemplo, vacinação ou terapia antimicrobiana, pode ser desejável combinar essas composições e métodos com outros agentes e métodos eficazes no tratamento, redução de risco de infecção ou prevenção de doenças e condições patológicas, por exemplo, tratamentos antibacterianos, antivirais e/ou antifúngicos.

[000243] Várias combinações podem ser empregadas; por exemplo, uma composição de sTIR é “A” e a terapia secundária é “B”:

A/B/A B/A/B B/B/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

[000244] A administração de uma composição da presente invenção a um indivíduo seguirá protocolos comuns para a administração através do sistema respiratório e os protocolos comuns para a administração de uma terapia secundária em particular também serão seguidos, levando em consideração a toxicidade, se houver, do tratamento. É esperado que os ciclos de tratamento sejam repetidos conforme necessário. Também é contemplado que várias terapias padronizadas, assim como a vacinação, possam ser aplicadas em combinação com as terapias descritas.

A. Antivirais

[000245] Em certos aspectos da invenção, um agente antiviral pode ser usado em combinação com uma composição de StIR. Fármacos antivirais são uma classe de medicamentos usados especificamente para tratar infecções virais e eles devem ser distinguidos dos virícidias,

que desativam ativamente partículas virais fora do corpo. A maioria dos antivirais atualmente disponíveis são designados para auxiliar o tratamento de HIV, vírus do herpes, vírus das hepatites B e C e vírus A e B da influenza. Agentes antivirais úteis na invenção incluem, mas não são limitados a imunoglobulinas, amantadina, interferons, análogos de nucleotídeos e inibidores de protease.

[000246] Uma estratégia antiviral é interferir com a habilidade do vírus de infiltrar uma célula alvo. Esse estágio de replicação viral pode ser inibido pelo uso de agentes que mimetizam a proteína associada ao vírus (VAP) e se ligam aos receptores celulares. Ou pelo uso de agentes que mimetizam o receptor celular e se ligam a VAP. Isso inclui anticorpos anti-VAP, anticorpos idiotípicos anti-receptor, receptor estranho e miméticos sintéticos de receptor. Dois de tais “bloqueadores da entrada”, amantadina e rimantadina, foram introduzidos no combate a influenza.

[000247] Uma segunda abordagem para a terapia antiviral é atingir o processo que sintetiza o componente do vírus depois que o vírus invade a célula. Uma maneira de fazer isso é desenvolver análogos de nucleotídeo ou de nucleosídeo que se assemelham aos blocos de construção de RNA ou DNA, mas desativando as enzimas que sintetizam o RNA ou DNA uma vez que o análogo esteja incorporado. Análogos de nucleotídeo incluem, mas não são limitados a ribivirina, vidarabina, aciclovir, ganciclovir, zidovudina, didanosina, zalcitabina, estavudina e lamivudina.

[000248] Outra técnica antiviral é um conjunto de fármacos baseados em ribozima, que são enzimas que clivam o RNA ou DNA viral em sítios selecionados. Em seu curso natural, as ribozimas são usadas como parte da sequência de fabricação viral, mas essas ribozimas sintéticas são designadas para clivar o RNA e o DNA em sítios que irão inativá-los.

[000249] Alguns vírus incluem uma enzima conhecida como uma

protease que cliva cadeias de proteína viral tal que elas possam ser montadas em sua configuração final. O HIV inclui uma protease e uma pesquisa considerável foi realizado para encontrar “inibidores de protease” para atacar o HIV naquela fase de seu ciclo de vida. Os inibidores de protease tornaram-se disponíveis em 1990 e provaram ser eficazes, embora eles possam ter efeitos colaterais incomuns, por exemplo induzindo o acúmulo de gordura em locais incomuns. Inibidores de protease aperfeiçoados estão agora em desenvolvimento.

[000250] O estágio final do ciclo de vida de um vírus é a liberação de vírus completos a partir da célula hospedeira e essa etapa também está sendo objetivada pelos desenvolvedores de fármaco antiviral. Dois fármacos denominados zanamivir (RELENZA™) e oseltamivir (TAMIFLU™) foram introduzidos para tratar a influenza evitando a liberação de partículas virais pelo bloqueio de uma molécula denominada neuraminidase que é encontrada na superfície de vírus da gripe e também parece ser constante através de uma ampla faixa de cepas de gripe.

[000251] Os agentes anti-virais incluem, mas não são limitados a abacavir; acemanan; aciclovir; aciclovir sódico; adefovir; alovudina; alvircept sudotox; hidrocloreto de amantadina; amprenavir; arantotina; arildone; mesilato de atevirdina; avaridina; cidofovir; cipamfilina; hidrocloreto de citarabina; mesilato de delavirdina; desciclovir; didanosina; disoxaril; edoxudina; efavirenz; enviroxime; famciclovir; hidrocloreto de famotina; fiacitabina; fialuridina; fosarilato; fosfonoformato trisódico; fosfonet sódico; ganciclovir; ganciclovir sódico; idoxuridina; indinavir; quetoxal; lamivudina; lobucavir; hidrocloreto de memotina; metisazona; nelfinavir; nevirapina; penciclovir; pirodavar; ribavirina; hidrocloreto de rimantadina; ritonavir; mesilato de saquinavir; hidrocloreto de somantadina; sorivudina; estatolon; estavudine; hidrocloreto de tilorone; trifluridina; hidrocloreto de valaciclovir;

vidarabina; fosfato de vidarabina; fosfato sódico de vidarabina; viroxima; zalcitabina; zidovudina; zinviroxima, interferon, ciclovir, alfa-interferon, e/ou beta globulina.

[000252] Em certas modalidades, um antiviral é a ribavirina e ribavirina em altas doses. A ribavirina é um fármaco antiviral que é ativo contra vários vírus DNA e RNA. Ela é um membro dos fármacos anti-metabolito de nucleosídeo que interferem com a duplicação de material genético viral. Embora não eficaz contra todos os vírus, a ribavirina tem um amplo espectro de atividade, incluindo atividades importantes contra influenza, flavivirus e agentes de várias febres hemorrágicas.

[000253] Tipicamente, a forma oral da ribavirina é usada no tratamento da hepatite C, em combinação com fármacos de interferon peguilado. A forma em aerossol foi usada no passado para tratar doenças relacionadas com o vírus sincicial respiratório em crianças. Entretanto, sua eficácia tem sido questionada em múltiplos estudos e a maioria das instituições não a usa mais.

B. Antibacterianos

[000254] Exemplos de antibacterianos incluem, mas não são limitados a antibióticos β -lactamas, penicilinas (tais como penicilinas naturais, aminopenicilinas, penicilinas resistentes a penicilinase, carboxi penicilinas, ureido penicilinas), cefalosporinas (cefalosporinas de primeira geração, segunda geração e terceira geração), e outras β -lactamas (tais como imipenem, monobactamas), inibidores da β -lactamase, vancomicina, aminoglicosídeos e espectinomicina, tetraciclina, cloramfenicol, eritromicina, lincomicina, clindamicina, rifampina, metronidazol, polimixinas, sulfonamidas e trimetoprim, e quinolonas. Anti-bacterianos também incluem, mas não são limitados a: Acedapsona, Acetosulfona Sódica, Alamecina, Alexidina, Amdinocilina, Amdinocilina Pivoxil, Amiciclina, Amifloxacina, Mesilato de Amifloxacina, Amicacina, Sulfato de Amicacina, ácido Aminosalicílico, Aminosalicilato

de sódio, Amoxicilina, Amfomicina, Ampicilina, Ampicilina Sódica, Apalcilina Sódica, Apramicina, Aspartocina, Sulfato de Astromicina, Avilamicina, Avoparcina, Azitromicina, Azlocilina, Azlocilina Sódica, Hidroclorato de Bacampicilina, Bacitracina, Disalicilato de Metileno Bacitracina, Bacitracina Zinco, Bambermicinas, Benzoilpas Calcico, Beritromicina, Sulfato de Betamicina, Biapenem, Biniramicina, Hidroclorato de Bifenamina, Bispiritona Magsulfex, Butikacin, Sulfato de Butirosina, Sulfato de Capreomicina, Carbadox, Carbenicilina Disódica, Indanil Carbenicilina Sódica, Fenil Carbenicilina Sódica, Carbenicilina Potássica, Carumonam Sódico, Cefaclor, Cefadroxil, Cefamandol, Nafato de Cefamandole, Cefamandol Sódico, Cefaparole, Cefatrizina, Cefazaflur Sódico, Cefazolina, Cefazolina Sódica, Cefbuperazona, Cefdinir, Cefepima, Hidroclorato de Cefepime, Cefetecol, Cefixima, Hidroclorato de Cefinenoxime, Cefinetazol, Cefinetazol Sódico, Cefonicid Monosódico, Cefonicid Sódico, Cefoperazone Sódico, Ceforanide, Cefotaxima Sódica, Cefotetan, Cefotetan Disódico, Hidroclorato de Cefotiam, Cefoxitin, Cefoxitin Sódico, Cefpimizol, Cefpimizol Sódico, Cefpiramida, Cefpiramida Sódica, Sulfato de Cefpirome, Cefpodoxima Proxetil, Cefprozil, Cefroxadina, Cefsulodina Sódica, Ceftazidima, Ceftibuten, Ceftizoxima Sódica, Ceftriaxona Sódica, Cefuroxima, Cefuroxima Axetil, Cefuroxima Pivoxetil, Cefuroxima Sódica, Cefacetil Sódica, Cefalexina, Hidroclorato de Cefalexina, Cefaloglicina, Cefaloridina, Cefalotina Sódica, Cefapirina Sódica, Cefradina, Hidroclorato de Cetociclina, Cetofenicol, Cloramfenicol, Palmitato de Cloramfenicol, Complexo de Pantoteniato de Cloramfenicol, Succinato de Cloramfenicol Sódico, Fosfoanilato de Clorhexidina, Cloroxilenol, Bisulfato de Clortetraciclina, Hidroclorato de Clortetraciclina, Cinoxacin, Ciprofloxacino, Hidroclorato de Ciprofloxacino, Cirolemicina, Claritromicina, Hidroclorato de Clinafloxacino, Clindamicina, Hidroclorato de Clindamicina, Palmitato de

Hidrocloreto de Clindamicina, Fosfato de Clindamicina, Clofazimina, Cloxacilina Benzatine, Cloxacilina Sódica, Cloxiquina, Colistimetata Sódica, Sulfato de Colistina, Coumermicina, Coumermicina Sódica, Ciclacilina, Cicloserina, Dalfopristina, Dapsona, Daptomicina, Demeclocicina, Hidrocloreto de Demeclocicina, Demeciclina, Denofungin, Diaveridina, Dicloxacilino, Dicloxacilino Sódico, Sulfato de Di-hidroestreptomicina, Dipiritione, Diritromicina, Doxíciclina, Doxíciclina Cálcica, Doxíciclina Fosfatex, Hiclato de Doxíciclina, Droxacina Sódica, Enoxacina, Epicilina, Hidrocloreto de Epite-traciclina, Eritromicina, Acistrato de Eritromicin, Estolato de Eritromicina, Etilsuccinato de Eritromicina, Gluceptato de Eritromicina, Lactobionato de Eritromicina, Propionato de Eritromicina, Estearato de Eritromicin, Hidrocloreto de Etambutol, Etionamida, Fleroxacina, Floxacilina, Fludalanina, Flumequina, Fosfomicina, Fosfomicina Trometamina, Fumoxicilina, Cloreto de Furazolio, Tartrato de Furazolio, Fusidato Sódico, Ácido Fusídico, Sulfato de Gentamicina, Gloximonam, Gramicidina, Haloprogina, Hetacilina, Hetacilina Potássica, Hexedina, Iba-floxacina, Imipenem, Isoconazol, Isepamicina, Isoniazida, Josamicina, Sulfato de Canamicina, Kitasamicina, Levofuraltadona, Levopropilcilina Potássica, Lexitromicina, Lincomicina, Hidrocloreto de Lincomicina, Lomefloxacin, Hidrocloreto de Lomefloxacina, Mesilato de Lomefloxacina, Loracarbef, Mafenide, Meclociclina, Sulfosalicilato de Meclociclina, Fosfato Potássico de Megalomicina, Mequidox, Meropenem, Metaciclina, Hidrocloreto de Metaciclina, Metenamina, Hipurato de Metenamina, Mandelato de Metenamina, Meticilina Sódica, Metioprim, Hidrocloreto de Metronidazol, Fosfato de Metronidazol, Mezlocilina, Mezlocilina Sódica, Minociclina, Hidrocloreto de Minociclina, Hidrocloreto de Mirincamicina, Monensina, Monensina Sódica, Nafcilina Sódica, Nalidixato Sódico, Ácido Nalidixico, Natamicina, Nebramicina, Palmitato de Neomicina, Sulafto de Neomicina, Undecilinato de Neomicina,

Sulfato de Netilmicina, Neutramicina, Nifuradene, Nifuraldezona, Nifuratel, Nifuratrone, Nifurdazil, Nifurimida, Nifurpirinol, Nifurquinazol, Nifurtiazol, Nitrociclina, Nitrofurantoina, Nitromida, Norfloxacin, Novobiocina Sódica, Ofloxacin, Ormetoprim, Oxacilina Sódica, Oximonam, Oximonam Sódica, Ácido Oxolinico, Oxitetraciclina, Oxitetraciclina Cálcica, Hidroclorato de Oxitetraciclina, Paldimicina, Paraclorofenol, Paulomicina, Pefloxacin, Mesilato de Pefloxacin, Penamecilin, Penicilina G Benzatina, Penicilina G Potássica, Penicilina G Procaina, Penicilina G Sódica, Penicilina V, Penicilina V Benzatina, Penicilina V Hidrabamina, Penicilina V Potássica, Pentizidona Sódica, Fenil Aminosalicilato, Piperacilina Sódica, Pirbenicilina Sódica, Piridicilina Sódica, Hidroclorato de Pirlimicina, Hidroclorato de Pivampicilina, Pamoato de Pivampicilina, Probenato de Pivampicilina, Sulfato de Polimixina B, Porfiromicina, Propicacina, Pirazinamida, Piritona Zinco, Acetato de Quindecamina, Quinupristin, 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 Sódica, Estearato de Rosaramicina, Rosoxacina, Roxarsone, Roxitromicina, Sanciclina, Sanfetrinam Sódico, Sarmoxicilina, Sarpicilina, Escopafungina, Sisomicina, Sulfato de Sisomicina, Esparfloxacin, Hidroclorato de Espectinomicina, Espiramicina, Hidroclorato de Estalimicina, Steffimicin, Sulfato de Estreptomicina, Estreptonicozide, Sulfabenz, Sulfabenzamida, Sulfacetamida, Sulfacetamida Sódica, Sulfacitina, Sulfadiazina, Sulfadiazina Sódica, Sulfadoxina, Sulfalene, Sulfamerazina, Sulfameter, Sulfametazina, Sulfametizol, Sulfametoxazol, Sulfamonometoxina, Sulfamoxol, Sulfanilato Zinco, Sulfanitran, Sulfasalazina, Sulfasomizol, Sulfatiazol, Sulfazamet, Sulfisoxazol, Sulfisoxazol Acetil, Sulfisoxazol Diolamina,

Sulfomixina, Sulopenem, Sultamicilina, Suncilina Sódica, Hidrocloreto de Talampicilin, Teicoplanina, Hidrocloreto de Temafloxacina, Temocilina, Tetraciclina, Hidrocloreto de Tetraciclina, Complexo de Tetraciclina Fosfato, Tetroxoprim, Tiamfenicol, Tifencilina Potássica, Ticarcilina Cresil Sódica, Ticarcilina Disódica, Ticarcilina Monosódica, Ticlatone, Cloreto de Tiodonio, Tobramicina, Sulfato de Tobramicina, Tosufloxacina, Trimetoprim, Sulfato de Trimetoprim, Trisulfapirimidinas, Troleandomicina, Sulfato de Trospectomicina, Tirotricina, Vancomicina, Hidrocloreto de Vancomicina Virginiamicina, e/ou Zorbamicina.

B. Antifúngicos

[000255] Agentes antifúngicos incluem, mas não são limitados a azóis, imidazóis, polienos, posaconazol, fluconazol, itraconazol, amfotericina B, 5-fluorocitosina, miconazol, cetoconazol, Myambutol (Hidrocloreto de Etambutol), Dapsone (4,4'-diaminodifenilsulfona), Grânulos de Paser (grânulos de ácido aminosalicílico), rifapentina, Pirazinamida, Isoniazida, Rifadina IV, Rifampina, Pirazinamida, Sulfato de Estreptomicina e Trecator-SC (Etionamida) e/ou voriconazol (Vfend™).

C. Outros Agentes

[000256] Em certos aspectos da invenção, um agente anti-inflamatório pode ser usado em combinação com uma composição de StIR.

[000257] Anti-inflamatórios esteroidais para uso nesse incluem, mas não são limitados a fluticasona, beclometasona, e derivados farmaceuticamente aceitáveis desses e qualquer combinação desses. Como usado aqui, um derivado farmaceuticamente aceitável inclui qualquer sal, éster, éster de enol, ácido, base, solvato ou hidrato desses. Tais derivados podem ser preparados por aqueles versados na técnica usando métodos conhecidos para tal derivatização.

[000258] **Fluticasona** – Propionato de fluticasona é um corticosteróide sintético e tem a fórmula empírica $C_{25}H_{31}F_3O_5S$. Ela tem o nome químico de S-(fluormetil)6 α ,9-difluor11 β -17-di-hidroxi-16 α -metil-

3-oxoandrosta-1,4-dieno-17 β -carbotioato,17-propionato. Propionato de fluticasona é um pó quase branco com peso molecular de 500.6 e é praticamente insolúvel em água, livremente solúvel em dimetil sulfóxido e dimetilformamida, e levemente solúvel em metanol e etanol 95%.

[000259] Em uma modalidade, as formulações da presente invenção podem compreender um anti-inflamatório esteroideal (por exemplo, propionato de fluticasona).

[000260] **Beclometasona** – Em certos aspectos, o anti-inflamatório esteroideal pode ser o dipropionato de beclometasona e seu monoidrato. O dipropionato de beclometasona tem o nome químico 9-cloro-11b,17,21-tri-hidroxi-16b-metilpregna-1,4-dieno-3,20-diona17,21-dipropionato. O composto pode ser um pó branco com um peso molecular de 521,25; é muito pouco solúvel em água (Physicians' Desk Reference), muito solúvel em clorofórmio e livremente solúvel em acetona e álcool.

[000261] O fornecimento de anti-inflamatórios esteroidais de acordo com a presente invenção pode intensificar as composições e métodos da invenção, por exemplo, pela atenuação de qualquer inflamação inesperada. Exemplos de outros anti-inflamatórios esteroidais para uso nesse incluem, mas não se limitam a betametasona, triamcinolona, dexametasona, prednisona, mometasona, flunisolida e budesonida.

[000262] De acordo com outro aspecto da invenção, o agente anti-inflamatório não esteroideal pode incluir aspirina, salicilato de sódio, acetaminofen, fenacetina, ibuprofeno, cetoprofeno, indometacina, flurbiprofeno, diclofenaco, naproxeno, piroxicam, tebufelone, etodolac, nabumetona, tenidap, alcofenaco, antipirina, amimopirina, dipirona, animopirina, fenilbutazona, clofezona, oxifenbutazona, prexazona, apazona, benzidamina, bucolome, cinchopen, clonixin, ditrazol, epirizol, fenoprofeno, floctafenin, ácido flufenamico, glafenina, indoprofeno, ácido meclofenamico, ácido mefenamico, ácido niflumico, salidifamidas,

sulindac, suprofen, tolmetin, nabumetona, tiaramida, proquazona, bufexamac, flumizol, tinoridina, timegadina, dapsona, diflunisal, benorilato, fosfosal, fenclofenaco, etodolac, fentiazac, tilomisol, carprofena, fenbufena, oxaprozin, ácido tiaprofenico, pirprofeno, feprazone, piroxicam, sudoxicam, isoxicam, celecoxib, Vioxx®, e/ou tenoxicam.

VII. KITS

[000263] Qualquer uma das composições aqui descritas pode ser compreendida em um kit. Em um exemplo não limitante, os reagentes para a produção e/ou liberação de uma composição de StIR estão incluídos em um kit. Em certos aspectos, o kit é portátil e pode ser transportado do mesmo modo que uma inalador para asma é transportado. O kit pode incluir ainda um detector de patógeno. O kit também pode conter um gás ou propelente mecânico para as composições da invenção.

[000264] Os componentes dos kits podem ser embalados tanto em forma aquosa, em pó ou liofilizada. Os meios de contenção dos kits incluirão geralmente pelo menos um inalador, uma bomba, um frasco, um tubo de teste, frasco, garrafa, seringa e outros meios de contenção, nos quais um componente pode ser colocado e, preferivelmente, adequadamente aliquotado. Onde houver mais do que um componente no kit (segundo agente, etc.), o kit também conterá um segundo, terceiro ou outro recipiente adicional no qual os componentes podem ser separadamente colocados. Entretanto, várias combinações de componentes podem ser compreendidos em um frasco, uma bomba ou inalador. Um recipiente da invenção pode incluir uma bomba ou inalador que pode ser colocado em um cinto ou facilmente transportado no bolso, mochila ou outro recipiente de armazenamento. Os kits da presente invenção também incluirão tipicamente um recipiente para as composições descritas ou suas variações e quaisquer recipientes para

outros reagentes em íntimo confinamento para venda comercial. Tais recipientes podem incluir recipientes de plástico moldado por sopro ou injeção nos quais os frascos desejados estão contidos.

[000265] Quando as soluções do kit são fornecidos em uma ou mais soluções líquidas, por exemplo, a solução líquida é uma solução aquosa, uma solução aquosa estéril é particularmente preferida, mas não necessária. Entretanto, os componentes do kit podem ser fornecidos como pós secos. Quando os reagentes e/ou componentes são fornecidos como um pó seco, o pó pode ser reconstituído pela adição de um solvente adequado ou administrado em uma forma pulverizada. É previsto que um solvente possa ser fornecido também em outro meio de contenção.

[000266] Um kit também incluirá instruções para o emprego dos componentes do kit assim como o uso de qualquer outro reagente não incluído no kit. As instruções também podem incluir variações que podem ser implementadas.

[000267] É contemplado que tais reagentes sejam modalidades de kits da invenção. Tais kits, entretanto, não estão limitados a itens particulares identificados acima e podem incluir qualquer reagente usado diretamente ou indiretamente na detecção de microrganismos patogênicos ou administração de uma composição StIR da invenção.

VIII. EXEMPLOS

[000268] Os exemplos a seguir são dados com o propósito de ilustrar várias modalidades da invenção e não são pretendidos limitar a presente invenção em qualquer aspecto. Aquele versado na técnica apreciará prontamente que a presente invenção está bem adaptada para realizar os objetivos e obter as finalidades e vantagens mencionadas, assim como aqueles objetivos, finalidades e vantagens inerentes a esse. Os presentes exemplos, junto com os métodos descritos aqui são representativos de certas modalidades e não são

pretendidos como limitações do escopo da invenção. Alterações e outros usos que estão abrangidos dentro do espírito da invenção como definido pelas reivindicações em anexo, ocorrerão para aqueles versados na técnica.

EXEMPLO 1

[000269] **Inoculação de *P. aeruginosa*.** A cepa PA103 foi obtida da ATCC e armazenada como um concentrado congelado (1×10^8 CFU/mL) em glicerol 20% em meio LB (Bio 101 Systems). Um mL de concentrado foi incubado por 16 h em 100 mL de meio LB a 37°C em 5% CO₂, depois diluído em 1L de caldo fresco e cultivado a 37°C por 6-7 h até OD600 de 0.3, fornecendo $\sim 3 \times 10^{10}$ CFU. A suspensão foi centrifugada, lavada, re-suspensa e inoculada aerossolizada e as concentrações de bactérias foram determinadas pelas diluições seriadas plaqueadas sobre placas de agar trípico de soja (Becton Dickinson). Para a aerossolização, 10 mL da suspensão foram colocados em um nebulizador AeroMist CA-209 (CIS-US) calibrado para 10 L/min de CO₂ 5% em ar para promover a ventilação profunda. Depois de 30 min, outros 5 mL foram adicionados, com um total de 10 mL de suspensão aerossolizada durante os 60 min completos.

[000270] **Tratamento com Ligante de TLR.** Antes das inoculações infecciosas, os camundongos foram tratados com aerossóis de ligantes de TLR, sozinhos ou em combinação ou com PBS (controle negativo). Todos os tratamentos foram liberados 18 h antes da inoculação da infecção usando um nebulizador AeroMist CA-209 calibrado para 10 L/min com CO₂ 5% em ar para promover a ventilação. Para cada tratamento, 10 mL de suspensão de ligante de TLR ou PBS foram colocados no nebulizador e foram administrados durante 20 min. Para experimentos usando combinações de ligantes de TLR, ambos os ligantes foram suspensos na mesma suspensão com 10 mL e foram liberados simultaneamente. Para cada ligante, a dosagem inicial do

aerossol foi determinada pela concentração mínima da suspensão na qual a infiltração neutrofílica do pulmão é induzida, como determinado pelas contagens totais de células brancas sanguíneas e neutrófilos no fluido do lavado bronco-alveolar 24 h depois do tratamento.

[000271] **Ligantes de TLR4.** Diferente do lipídeo A que ocorre naturalmente e contém uma mistura de 5, 6 e 7 grupos acila, o monofosforil lipídeo A sintético (MPLAS, Invitrogen) é um sintético puro que contém 6 grupos acila graxos. Suspensões de MPLAS foram liberadas a 100 µg/mL. Outro lipídeo A sintético com 6 grupos acila graxos, Dissacarídeo HexaAcila Fosforilado (PHAD, Avanti Polar Lipids), foi liberado a 100 µg/mL.

[000272] **Ligantes de TLR2/6.** Pam2CSK4 e FSL-1 (ambos da Invivogen) são lipopeptídeos diacilados sintéticos conhecidos por sinalizar através de heterodímeros de TLR2 e TLR6. Pam2CSK4 foi liberado em 6 ou 20 µg/mL, como indicado, e FSL-1 foi liberado em 20 µg/mL.

[000273] **Ligante de TLR 9.** ODN 2395 (Invivogen) é um oligonucleotídeo de CpG tipo C com alta afinidade para TLR9 humano e de murino. ODN 2395 foi aerossolizado em 20 µg/mL.

[000274] **Ligante de TLR 7.** Imiquimod (R837, Invivogen) é um análogo de imidazoquinolina amina guanosina que estimula TLR7, e possivelmente TLR8. Imiquimod foi liberado por aerossol em 1 ou 300 µg/mL, como indicado.

[000275] **Ligante de TLR 5 ligand.** Um segment altamente conservado com 22 aminoácidos de flagelina, um conhecido ligante de TLR5, foi identificado. Esse segment de aminoácidos foi submetido a síntese no Cell Essentials, Inc., Boston, MA. O peptide foi confirmado ser >95% puro baseado em HPLC e espectrometria de massa Maldi-TOF, e sua solubilidade em PBS foi confirmada. O fragment sintético de Flg22 foi liberado em 100 µg/mL.

EXEMPLO 2

Material e Métodos

[000276] **Animais e Reagentes.** Todos os reagentes comuns foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO) exceto quando indicado. Todos os camundongos foram manuseados de acordo com as políticas do Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Texas M. D. Anderson Cancer Center. Camundongos fêmeas Swiss-Webster (Charles River, Wilmington, MA) com cinco a oito semanas de idade foram usados para os experimentos de proteção e contagem celular. Como indicado, camundongos fêmeas MyD88^{-/-} com cinco a oito semanas de idade, fornecidos por Shizuo Akira (1998), camundongos Trif^{-/-} (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) e camundongos TLR2^{-/-} (Jackson) foram usados para comparação com camundongos tipo selvagem C57BL/6J (Jackson).

[000277] **Tratamentos aerossolizados.** Concentrado congelado de *Haemophilus influenzae* (NTHi) não tipado foi cultivado em agar chocolate (Remel, Lenexa, KS), expandido em caldo de infusão de cérebro-coração (Acumedia, Baltimore, MD) suplementado com 3,5 µg/mL de NAD, e rompido com EmulsiFlex C5 (Avestin, Mannheim, Alemanha), como descrito (Clement *et al.*, 2008; Evans *et al.*, 2010; Moghaddam *et al.*, 2008). A concentração de protein foi ajustada para 2,5 mg/mL em salina pelo ensaio bicinchonínico (Pierce, Rockford, IL), e o lisado foi congelado em alíquotas de 10 mL a -80°C. Para o tratamento, uma alíquota descongelada foi colocado em nebulizador AeroMist CA-209 (CIS-US) calibrado para 10 l/min de ar suplementado com CO₂ 5% (para promover a ventilação profunda) por 20 min. O nebulizador foi conectado pelo tubo de polietileno (30 cm x 22 mm) a uma camara de exposição de polietileno com 10 litros e com um tubo para o efluxo identico com um filtro de resistencia microbiana baixo, (BB50T, Pall, East Hills, NY) em sua extremidade descarregada em uma

capela de biossegurança.

[000278] Pam3CSK4, Pam2CSK4, Poly (I:C), MPLA, Imiquimod, e ODN 2395 foram adquiridos da InvivoGen (San Diego, California). Uma Fgl22 com 22-mer, o domínio mais conservado de flagelina (QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA), foi sintetizado por Cell Essentials (Boston, MA) Para tratar os animais, agonistas sintéticos de TLR foram reconstituídos em água sem endotoxina, suspensos em 8 mL de PBS estéril nas concentrações indicadas e aerossolizados para os animais por 20 min usando a mesma técnica usada para o tratamento com lisado de NTHi.

[000279] **Inoculações infecciosas *in vivo*.** Como descrito previamente (Clement *et al.*, 2008; Clement *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2010), os camundongos foram inoculados por inalação com um inóculo bacteriano dosado a LD₈₀ – LD₁₀₀. A cepa PA103 de *P. aeruginosa* foi obtida da ATCC e armazenada como um concentrado congelado (1 x 10⁸ CFU/mL) em glicerol 20% em meio LB (Bio 101 Systems). Um mL do concentrado foi incubado por 16 h em 100 mL de meio LB a 37°C em CO₂ 5%, depois diluído em 1 l de caldo fresco e cultivado a 37°C por 6-7 h até OD₆₀₀ de 0,3, fornecendo 1-4 x 10¹⁰ CFU/mL. *S. pneumoniae* sorotipo 4 foi armazenado como um concentrado congelado (1 x 10⁹ CFU) em glicerol 20% em caldo de Todd-Hewett (Becton Dickinson). Um mL do concentrado descongelado foi incubado por 16 h em 150 mL de caldo Todd-Hewitt a 37°C em CO₂ 5%, depois diluído em 1,5 l de caldo fresco e cultivado em fase logarítmica por 6 a 7 h até uma OD₆₀₀ de 0,3, fornecendo 2-6 x 10¹¹ CFU/mL. As suspensões bacterianas foram centrifugadas, lavadas, re-suspensas em 10 mL de PBS e aerossolizadas durante um período de 60 min usando um sistema idêntico aquele usado para os tratamentos. As concentrações bacterianas foram determinadas pelas diluições seriadas em lotes sobre placas de agar triptico de soja (Becton Dickinson).

[000280] Quantificação da sobrecarga pulmonar de patógeno.

Como previamente descrito (Clement *et al.*, 2008; Clement *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2010), imediatamente depois da infecção com patógenos bacterianos, os camundongos foram anestesiados e seus pulmões foram retirados e homogeneizados em 1 mL de PBS utilizando um triturador de tecido de 2 mL (Kontes, Vineland, NJ). Diluições seriadas dos homogenatos foram plaqueadas em places de agar trípico de soja (TSA), incubadas a 37 °C por 16 h, e as colônias bacterianas foram contadas.

[000281] Análise do fluido do lavado bronco-alveolar.

Como previamente descrito (Clement *et al.*, 2008; Clement *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2010), o fluido do lavado bronco-alveolar (BAL) foi obtido pela instilação e coleta de duas alíquotas de 1 mL cada de PBS através de uma cânula adaptadora luer-stub (Becton Dickinson) inserida através dos anéis da traquéia exposta em pontos de tempo indicados. A contagem de leucócitos totais foi determinada com um hemacimetro (Hauser Scientific, Horsham, PA) e a contagem diferencial por citocentrifugação de 300 µl de fluido de BAL a 2.000 rpm por 5 min, seguida pela coloração de Wright-Giemsa.

[000282] Ensaio de morte *in vitro*.

Como previamente descrito (Clement *et al.*, 2008; Clement *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2010), células MLE-15 cells e A549 foram cultivadas em placas de 6 poços em RPMI-1640 suplementado com FCS 10% inativado pelo calor e penicilina/estreptomicina 1% (Invitrogen). Quando crescidas até ~80% de confluência, as células foram lavadas com PBS, supridas com meio fresco sem antibiótico com com FCS 10% inativado pelo calor e tratadas com PBS 20 µl ou um volume de 20 µl de ODN 2395 (20 µg/mL), Pam2CSK4 (10 µg/mL), ou ambos em RPMI-1640 contendo com FCS 10% inativado pelo calor. Depois de 4 h, 1000 esporos da cepa Sterne de *Bacillus anthracis* ou 2000 CFU da cepa PA103 de *P. aeruginosa*

foram adicionados a todos os poços. Quatro horas depois da infecção, 20 µl do sobrenadante de cada poço foram aspirados, diluídos seriadamente, plaqueados sobre placas de agar TSA, incubados por 16 h a 37 °C, e as CFUs foram contadas.

[000283] **Microscopia de imunofluorescência.** Células A549 foram cultivadas em laminas de cultura Lab-Tek II (Nunc, Rochester, NY) em RPMI-1640 suplementado com FCS 10% inativado pelo calor e penicilina/estreptomicina 1% (Invitrogen) por 48 h, depois tratadas com um volume de 20 µl de ODN 2395 marcada com Texas Red (20 µg/mL, Invivogen), Pam2CSK4 marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (10 µg/mL, Invivogen), em ambos em RPMI-1640 contendo FCS 10% inativado pelo calor. Depois de 2 h, o meio foi aspirado, as câmaras foram desacopladas e as células foram lavadas três vezes com PBS gelado. As células foram fixadas com paraformaldeído 4%, paralisadas com glicina, lavadas três vezes com PBS, contra-coloração nuclear com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 0,1 µg/mL), e examinadas com microscópio de fluorescência (Olympus BX-60 microscope, Melville, NY) usando os ópticos apropriados (Texas Red: excitação = 540 nm; emissão = 620 nm; FITC: excitação = 495 nm, emissão = 520 nm; DAPI: excitação = 360 nm; emissão = 460 nm). As imagens foram coletadas sequencialmente com uma Camera Spot RT regulada por computador (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI) e montadas em Photoshop CS3 (Adobe, San Jose, CA). A fluorescência vermelha e verde superposta aparecia em amarelo.

[000284] **Análise Estatística.** A análise estatística foi realizada usando o programa SAS/STAT (versão 8.2, SAS Institute). O teste t de Student foi usado para comparar os títulos bacterianos ou virais pulmonares entre os grupos. O percentual de camundongos que sobreviveu a inoculação dos patógenos foi comparado usando o teste exato de Fisher, e o teste log-rank foi usado para comparar a

distribuição da sobrevida avaliada pelo método de Kaplan-Meier. One-way ANOVA com o teste post hoc de Dunnett foi usado para comparar as contagens diferenciais do fluido de BAL entre os animais tratados e não tratados.

Resultados

[000285] **MyD88, mas não TRIF, é necessário para a indução de resistência a pneumonia por lisado bacteriano aerossolizado.** A estimulação do epitélio pulmonar por um lisado bacteriano de NTHi induz um alto nível de resistência a uma grande variedade de patógenos microbianos (Clement *et al.*, 2008; Clement *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2010; Tuvim *et al.*, 2009). Para testar se a sinalização de TLR é necessária para a proteção induzida pelo lisado, camundongos deficientes na sinalização de TLR através de adaptadores de TIR foram inoculados por inalação com *P. aeruginosa*. Camundongos de tipo selvagem e deficientes em TRIF (*Trif*^{-/-}) estavam completamente protegidos contra as inoculações com *P. aeruginosa* letal pelo pré-tratamento com o lisado bacteriano aerossolizado, enquanto que a resistência não pode ser induzida em camundongos deficientes em MyD88 (*Myd88*^{-/-}; Figura 12A e 12B, painéis a esquerda). A proteção se correlacionou intimamente com a indução rápida da morte do patógeno nos pulmões (Figura 12A e 12B, painéis a direita). O receptor de IL-1 também sinaliza através de MyD88 (Adachi *et al.*, 1998; Medzhitov *et al.*, 1998), mas responde com a sinalização de citocina do hospedeiro, mais do que a produtos microbianos diretamente. A destruição do patógeno estava totalmente preservada em camundongos deficientes em receptor de IL-1 (*Il1r*^{-/-}; Figura 13) estimulado pelo lisado bacteriano aerossolizado. Esse achado indica que a sinalização de todos os receptores através de MyD88 não é necessária para a proteção induzida pelo lisado e sugere que a sinalização direta através de TLR é mais importante do que a sinalização indireta através das citocinas do

hospedeiro para a resistência epitelial induzível.

[000286] **Agonistas de TLR induzíveis induzem um baixo nível de resistência à pneumonia.** A vista da necessidade da sinalização de MyD88, os inventores testaram se quaisquer agonistas de TLR individuais sintéticos poderiam induzir resistência similar àquela fornecida pelo lisado bacteriano aerossolizado. Como TLR1 e TLR6 são expressos como heterodímeros com TLR2 e como TLR7 e TLR8 são, ambos, reconhecidos por imiquimod, TLRs 1 a 9 de camundongo poderiam ser estimuladas com os seguintes sete ligantes sintéticos: Pam3CSK4 (agonista de TLR2/1), Pam2CSK4 (agonista de TLR2/6), Poly(I:C) (agonista de TLR3), lipídeo A sintético (MPLA, agonista de TLR4), Flg22 (22-mer sintético de flagelina, agonista de TLR5), imiquimod (TLR7 e TLR8), ou ODN2395 (agonista de TLR9).

[000287] A dose aerossolizada apropriada desses agonistas não era conhecida, tal que a estratégia foi formulada para identificar uma dose adequada para a liberação para os pulmões para evitar um erro tipo II (β). Cada um dos agonistas de TLR sintéticos usados tinha uma concentração relatada na qual a secreção máxima de citocina é estimulada a partir das 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). Baseados em cálculos da liberação efetiva para as vias aéreas de compostos aerossolizados (Clement *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2004), os inventores determinaram as concentrações do fluido nebulizador necessárias para obter [DCmax] na superfície epitelial das vias aéreas. Apesar da resistência induzida pelo lisado aerossolizado não depender do influxo de leucócito, o fenômeno protetor está estreitamente correlacionado com o ritmo e a magnitude da neutrofilia pulmonar induzida (Clement *et al.*, 2008). Portanto, para identificar as doses de agonista de TLR suficientes para o teste, os inventores partiram da

[DCmax] relatada para cada ligante e aumentaram as concentrações nebulizadas logaritmicamente até que a infiltração leucocitária fosse obtida.

[000288] Como mostrado na Figura 14, em camundongos tratados com PBS, o número de neutrófilos no fluido de BAL é de $0,1 \times 10^3 \pm 0,2$ células/mL. Apenas Pam2CSK4 demonstrou um aumento significativo dos neutrófilos na DCmax, embora todos, menos poly(I:C) e Flg22, mostrassem aumentos significativos nos níveis de neutrófilos em concentrações um a dois logs acima da DCmax. Por outro lado, ambos, poly(I:C) e Flg22, induziram um influxo significativo de neutrófilos no BAL 24 h depois do tratamento. Flg22 e imiquimod tinham, cada um, uma concentração de ligante acima da qual houve uma redução na infiltração neutrofílica. Pam2CSK4 induziu um nível de neutrofilia aproximadamente 5 vezes maior do que Pam3CSK4 e 15 vezes maior do que qualquer outro ligante.

[000289] A concentração escolhida para cada ligante era a menor dose que induzisse um aumento de 10 vezes em neutrófilos/mL ou induzisse a duplicação de macrófagos (nenhum fez tanto). Enquanto alguns dos ligantes induziu uma infiltração celular robusta, nenhum dos agonistas sintéticos forneceu uma proteção robusta contra a pneumonia por *P. aeruginosa* letal (Figura 15). Houve uma tendência em direção a proteção com Pam2CSK4, Flg22 e imiquimod, embora esses não atingissem significância estatística em experimentos individuais ou na média de múltiplos experimentos. Camundongos tratados com MPLA mostraram uma tendência não significativa em direção a mortalidade aumentada depois da inoculação do patógeno.

[000290] **Uma combinação de agonistas de TLR2/6 e TLR9 induz um alto nível de resistência contra pneumonia.** Embora agonistas de TLR sintéticos isolados forneçam apenas proteção moderada, é possível que a estimulação simultânea de múltiplos PRRs seja

necessária para induzir um alto nível de resistência (Clement *et al.*, 2008; Evans *et al.*, 2010). Para determinar se as combinações de agonistas de TLR poderiam induzir resistência, os inventores testaram permutas pareadas dos sete ligantes sintéticos.

[000291] Notavelmente, o tratamento simultâneo com Pam2CSK4 e ODN2395 (ODN + Pam2) resultou na sobrevida de 100% dos camundongos de uma inoculação que seria letal de outra maneira, com *S. pneumoniae* (Figura 16B, esquerda) Gram positivo. A duplicação da concentração de ambos os ligantes no tratamento com aerossol resultou em sobrevida de 90% com o inóculo de *S. pneumoniae* (Figura 16B). A proteção dos camundongos contra inoculações infecciosas letais estava associada com a morte sinérgica dos patógenos dentro dos pulmões (Figura 16A e 16B, direita) e a duplicação da concentração dos ligantes estava associada com uma tendência na direção de maior destruição do patógeno. As interações sinérgicas de Pam2CSK4 e ODN2395 também foram observadas no recrutamento de leucócitos para os pulmões com 4 e 14 h (Figura 16C). Esses resultados indicam que os ligantes para TLR2/6 e TLR9 induzem a ativação sinérgica de respostas efetoras anti-microbianas, incluindo aquelas para a morte do patógeno e recrutamento de leucócitos, que resulta em um nível sinérgico de proteção contra pneumonia. Similar a cinética da resistência induzida pelo lisado de NTHi, a proteção estava presente 4 h depois do tratamento.

[000292] **Nem todas as combinações de agonista de TLR produzem proteção robusta contra a infecção.** Os inventores testaram as seguintes combinações de agonistas de TLR: Pam2 + Poly(I:C), Pam2 + Flg22, Pam2 + Imiquimod, ODN + Poly (I:C), ODN + Flg 22, e ODN + Pam3. Os inventores verificaram que essas combinações eram menos eficazes na proteção contra a inoculação com *P. aeruginosa* (Figura 17A-F), quando comparadas com a combinação de Pam2-ODN

(Figura 16). Esses resultados sugerem que nem todas as combinações de agonistas de TLR conferem a mesma estimulação imune como Pam2-ODN.

[000293] **TLR2 é suficiente para promover a sinergia protetora de Pam2CSK4 e ODN2395, mas não necessária para a resistência induzida.** A detecção de efeitos sinérgicos dos ligantes de TLR, Pam2CSK5 e ODN2395, que possuem especificidades de receptor bem definidas, fornece uma evidencia presumível da participação de TLR2/6 e TLR9. Os inventores procuraram evidencias adicionais usando camundongos knockout e ligantes adicionais.

[000294] Os inventores compararam a sobrevivência de camundongos tipo selvagem e deficiente em TLR2 pré-tratados com Pam2-ODN ou PBS antes da inoculação com *P. aeruginosa*. Embora os camundongos tipo selvagem estivessem totalmente protegidos por Pam2-ODN, não houve sobreviventes no grupo de tipo selvagem nem no grupo *Tlr2*^{-/-} (Figura 18A, painel esquerdo) tratado com placebo, confirmando a necessidade de TLR2 na proteção induzida por Pam2-ODN. A perda da proteção nos camundongos *Tlr2*^{-/-} correlacionou-se intimamente com a perda da morte intra-pulmonar do patógeno induzida por Pam2-ODN (Figura 18A), painel direito).

[000295] Como Pam2CSK4 e Pam3CSK4 discriminam entre TLR2/6 e TLR2/1 e Pam2CSK4, mas não Pam3CSK4, produz um efeito protetor sinérgico acentuado quando combinado com ODN2395, heterodímeros de TLR2/6 podem ser necessários para induzir a resistência epitelial pulmonar. Os inventores também inocularam camundongos *Tlr2*^{-/-} e de tipo selvagem depois do tratamento com o lisado de NTHi e não encontraram nem perda de proteção (Figura 18B, painel esquerdo) nem um defeito na morte bacteriana induzida pelo lisado (Figura 18B, painel direito). Juntos, esses resultados sugerem que TLR2/6 é suficiente para interagir sinergicamente com TLR9, mas não é necessário para toda a

resistência epitelial pulmonar induzida.

[000296] **ODNs de CpG Classe C, mas não Classe A ou B, interagem sinergicamente com Pam2CSK4 para induzir a resistência a pneumonia bacteriana.** Os inventores procuraram avaliar adicionalmente se TLR9 é necessário para a interação sinérgica de Pam2-ODN. Como camundongos *Tlr9^{-/-}* não estavam disponíveis, os inventores testaram o envolvimento de TLR9 usando uma ODN misturada conhecida por não se ligar a TLR9. Enquanto o pré-tratamento com Pam2-ODN resultou em sobrevivência de 90% dos camundongos inoculados com *P.aeruginosa*, nenhum sobreviveu quando pré-tratado com Pam2CSK4 e ODN de controle (Figura 19A), indicando que a ligação de TLR9 por ODN é necessária para a proteção sinérgica.

[000297] Para explorar adicionalmente a especificidade da interação de Pam2-ODN, os inventores trataram camundongos tipo selvagem com Pam2CSK4 e diferentes classes de ODNs de CpG antes da inoculação com *P.aeruginosa*. A combinação de uma ODN Classe A (ODN 1585 ou ODN 2216) ou uma ODN Classe B (ODN 2006-G5) com Pam2CSK4 não conferiu proteção, enquanto que a combinação de Pam2CSK4 com uma ODN Classe C (ODN M362 ou ODN 2395) promoveu resistência significativa contra pneumonia letal (Figura 19B). Esses resultados indicaram que, não apenas os ligantes de TLR2/6 e TLR9 atuam em sinergia, mas que existem ligantes específicos que interagem mais favoravelmente do que outros.

[000298] **Pam2CSK4 e ODN2395 induzem morte bacteriana pelas células epiteliais *in vitro*.** As células epiteliais pulmonares são induzidas a matar bactérias *in vitro* quando estimuladas com o lisado de NTHi (Clement *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2010). Como Pam2-ODN reproduziram o efeito imuno-estimulante do lisado bacteriano *in vivo*, os inventores testaram se a combinação poderia induzir também a morte

do patógeno pelas células epiteliais pulmonares isoladas *in vitro*. O pré-tratamento de células epiteliais respiratórias MLE-15 de murino por 4 h com Pam2-ODN reduziu significativamente as CFUs bacterianas no meio de cultura depois da inoculação com *B. anthracis* (Figura 20A). Similarmente, o tratamento de células A549 humanas com Pam2-ODN resultou em reduções significativas de CFUs de *P. aeruginosa* CFUs 4 h depois da infecção (Figura 20C). Demonstrando que a morte do patógeno ocorre através da estimulação das células epiteliais mais do que através dos efeitos diretos antibióticos de Pam2-ODN, as bactérias cresceram em igual número em poços contendo células epiteliais, tanto tratadas com Pam2-ODN quanto com PBS (Figura 20B e 20D).

[000299] Portanto, o efeito anti-microbiano é induzido em ambas as células epiteliais humanas e de murino e resulta na morte de ambos os patógenos Gram-positivos e Gram-negativos. Esses dados mimetizam a morte bacteriana observada *in vivo* depois do tratamento com Pam2-ODN. Aumentos seriados na dosagem de Pam2-ODN até 32 vezes maiores do que o indicado não aumentaram significativamente a morte do patógeno.

[000300] **Pam2CSK4 e ODN2395 co-localizam-se intracelularmente *in vitro*.** O mecanismo pelo qual Pam2CSK4 e ODN2395 interagem para induzir a sinergia permanece sem resolução. Como TLR2/6 é relatado se localizar na membrana plasmática e TLR9 é relatado se localizar nos endossomas (Beutler, 2009; Dostert *et al.*, 2008), não se pode prever a interação física dos ligantes. Entretanto, como TLR4 pode requerer a internalização a fim de (Kagan *et al.*, 2008), os inventores investigaram se os dois ligantes eram internalizados pelas células epiteliais. Células A549 foram cultivadas em monocamadas sobre lamina de cultura, depois tratadas com Pam2CSK4 marcado com FITC (10 µg/mL) e ODN2395 marcado com Texas Red (20 µg/mL) nas mesmas concentrações usadas nos experimentos de morte do patógeno. Depois de 2 horas, as células

foram lavadas, os núcleos foram marcados com DAPI e as lamínas foram submetidas a microscopia de fluorescência. Ambos, Pam2CSK4 e ODN2395 foram internalizados pelas células epiteliais. Adicionalmente, Pam2CSK4 e ODN2395 co-localizam-se no compartimento citoplasmático, presumivelmente nos endossomas. Esses resultados sugerem que Pam2CSK4 e ODN2395 podem co-localizar dentro dos endossomas.

[000301] O pré-tratamento com a combinação de Pam2CSK4, um agonista de TLR2/6 e um ODN Classe C (2395, 10101 ou M362), agonistas de TLR9, induz altos níveis de resistência a infecção pulmonar por *Bacillus anthracis* e o vírus influenza. Os camundongos foram pré-tratados com ligantes de TLR aerossolizados como indicado, um dia antes da inoculação intranasal com esporos de antraz ou a inoculação por aerossol de vírus influenza. A sobrevivência dos camundongos foi monitorizada.

REFERENCIAS

[000302] As referências a seguir, a medida que elas fornecem detalhes exemplificadores de procedimentos suplementares aqueles aqui descritos, estão especificamente incorporadas aqui por referência.

Patente U.S.4.554.101

Patente U.S.4.668.218

Patente U.S.4.689.338

Patente U.S.4.929.624

Patente U.S.5.238.944

Patente U.S.5.266.575

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. Ser. 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 and Hiemstra, *Curr. Drug Targets*, 7(6):743-50, 2006.
- Bals and Hiemstra, *Eur. Respir. J.*, 23(2):327-33. 20, 2004.
- Bals and 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.* (Eds.), 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.
- European Appln. 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 and Prodrug Metabolism: Chemistry, Biochemistry, and Enzymology, Bernard Testa, Vch Verlagsgesellschaft MbH, 2003.
- Ishii *et al.*, *Cell Host Microbe.*, 3:352-363, 2008.
- Janeway, Jr. and 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 and 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 and Frevert, *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 2(5):403-11, 2005.
- Martin *et al.*, *Infect. Immun.*, 71:2498-2507, 2003.
- Medzhitov and Janeway, Jr., *Curr. Opin. Immunol.*, 9(1):4-9, 1997.
- Medzhitov and 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 and Gainor, *Ann. Rep. Med. Chem.*, 24:243-252, 1989.
- Nagase *et al.*, *J Immunol.*, 171(8):3977-82, 2003.
- O'Neill and Bowie, *Nat. Rev. Immunol.*, 7:353-364, 2007.
- Or *et al.*, *J. Org. Chem.*, 56:3146-3149, 1991.
- PedidoWO 00/76518
- PedidoWO 02/46189
- PedidoWO 02/46192
- PedidoWO 02/46193
- PedidoWO 94/06498
- PedidoWO 94/08552
- PedidoWO 94/16970
- PedidoWO 97/25086
- PedidoWO 98/16427
- PedidoWO 98/35888
- PedidoWO 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 and 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 and Akira, *J. Dermatol. Sci.*, 34(2):73-82, 2004.

- Takeda and 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.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma quantidade eficaz de um agonista de TLR9 e um agonista de TLR2/6, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma composição farmacêutica para tratamento, inibição ou atenuação de uma infecção microbiana em um indivíduo que tem ou está em risco de desenvolver ou adquirir uma infecção microbiana, sendo que o referido agonista de TLR2/6 é um lipopolipeptídeo sintético diacilado.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agonista de TLR2/6 é PAM2CSK4.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agonista de TLR9 é um oligodesoxinucleotídeo tipo C (ODN).

4. Uso, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o ODN tipo C é ODN2395 ou ODNM362 ou ODN10101.

5. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tenha sido exposto a um micróbio patogênico.

6. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o micróbio patogênico é um vírus, uma bactéria ou um fungo.

7. Uso, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que:

(a) o vírus é um vírus Adenoviridae, Coronaviridae, Filoviridae, Flaviviridae, Hepadnaviridae, Herpesviridae, Orthomyxoviridae, Paramyxovirinae, Pneumovirinae, Picornaviridae, Poxviridae, Retroviridae, Togaviridae, Parainfluenza, Influenza, H5N1, Marburg, Ebola, coronavírus da Síndrome respiratória aguda severa, Febre amarela, Sincicial respiratório humano, Hantavirus, ou Varíola;

(b) a bactéria é *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pneumoniae*, *Staphylococcus maltophilia*, *Burkholderia*

spp. ou *Moraxella* spp.

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

8. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agonista de TLR9 e o agonista de TLR2/6 são administrados em uma formulação nebulizada.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz do agonista de TLR9 e agonista de TLR2/6 é depositada nos pulmões do indivíduo.

10. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agonista de TLR9 e o agonista de TLR2/6 são administrados em uma quantidade entre 0,1 mg/kg a 100 mg/kg do peso corporal do indivíduo.

11. Composição farmaceuticamente aceitável, caracterizada pelo fato de que compreende um agonista de TLR9 e um agonista de TLR2/6, um agente anti-inflamatório e um ou mais excipientes farmacêuticos, em que a dita composição é estéril e essencialmente livre de micróbios patogênicos.

12. Composição, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que a composição é formulada para nebulização.

13. Composição, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que o agonista de TLR2/6 é PAM2CSK4; ou o agonista de TLR9 é um oligodesoxinucleotídeo tipo C (ODN), preferencialmente em que o ODN tipo C é ODN2395 ou ODN M362 ou ODN10101.

14. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 13, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento, inibição ou atenuação de uma infecção microbiana em um indivíduo que tem ou está em risco de desenvolver ou adquirir uma

infecção microbiana, em que o referido agonista de TLR2/6 é um lipopolipeptídeo sintético diacilado.

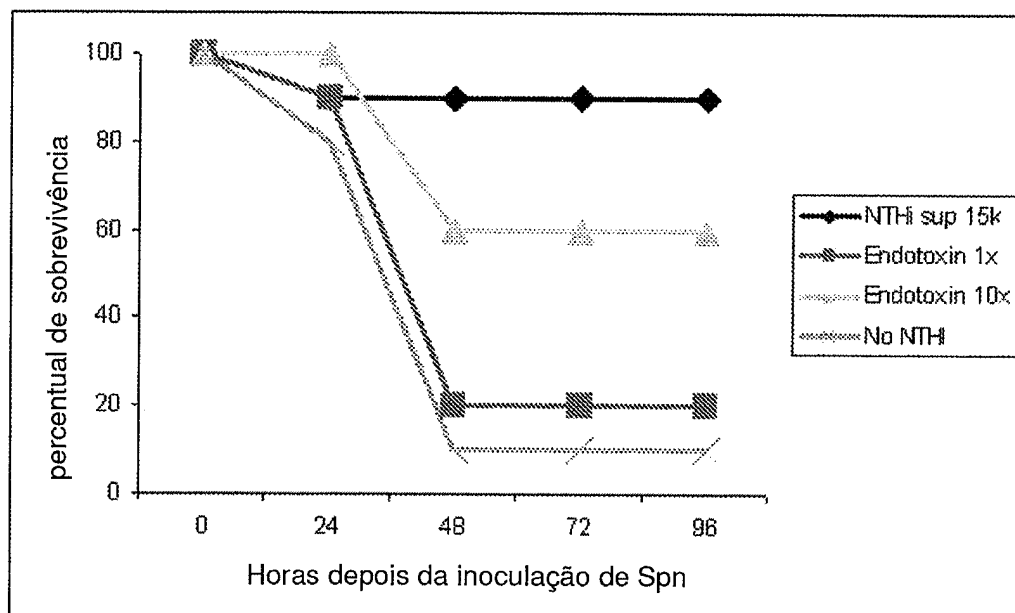


FIG. 1

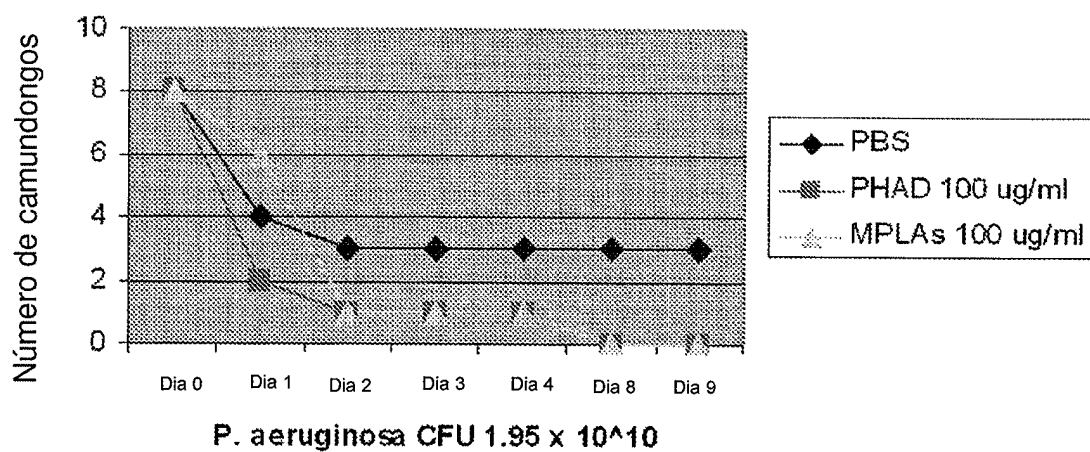
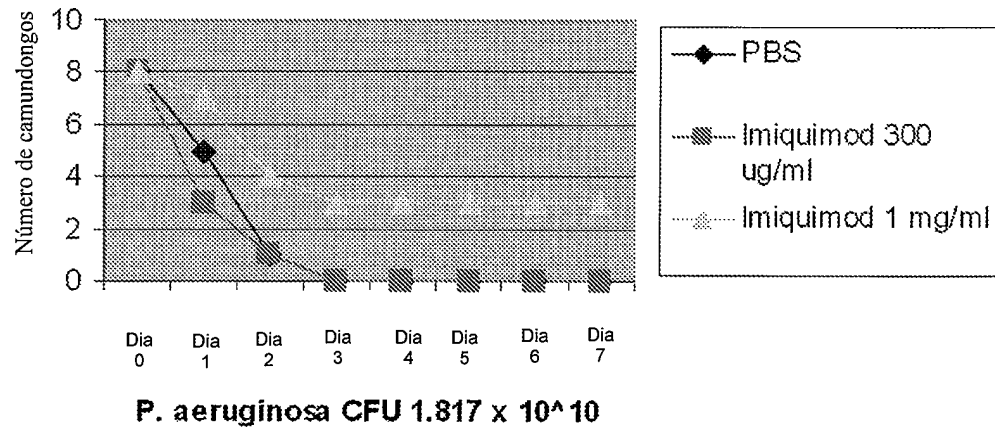
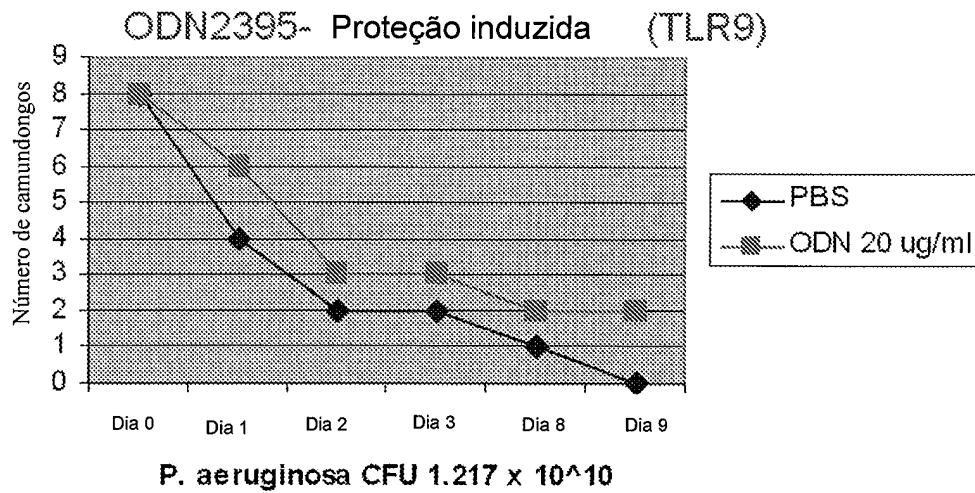
PHAD/MPLAs- *P. aeruginosa*

FIG. 2

Imiquimod- *P. aeruginosa* Proteção**FIG. 3****FIG. 4**

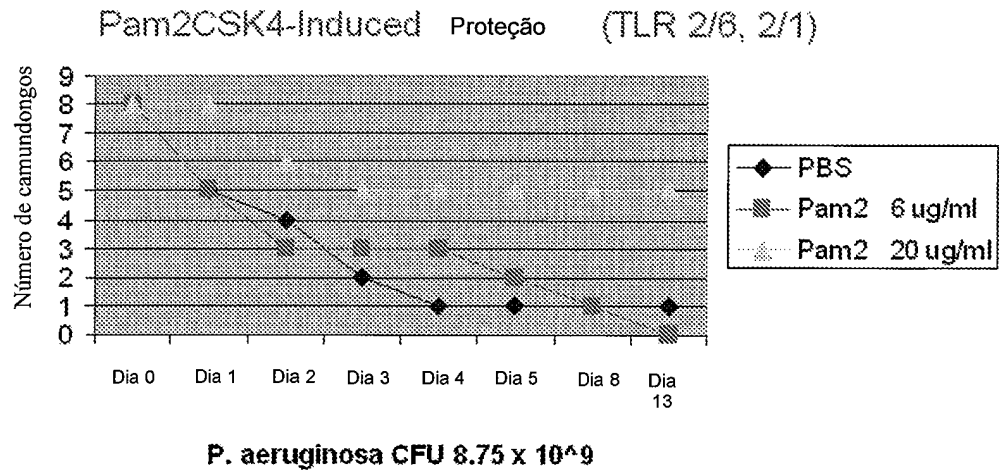
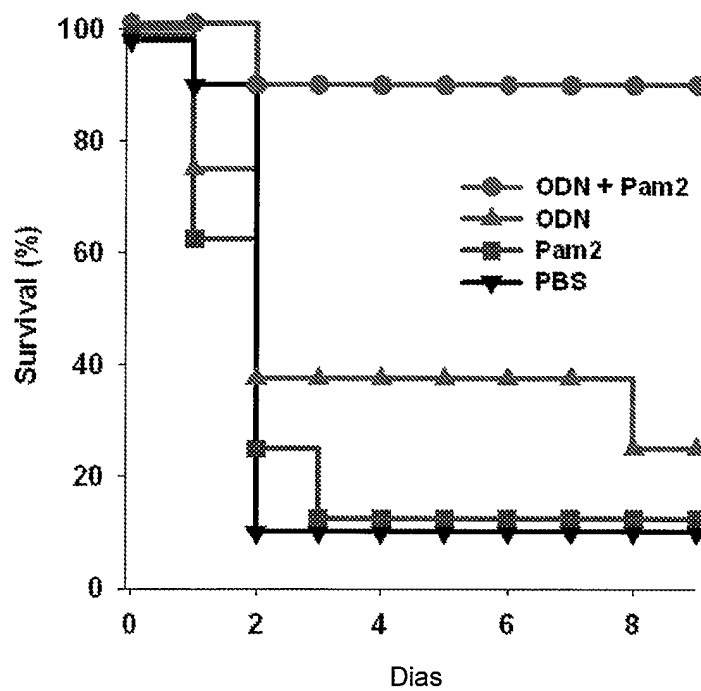
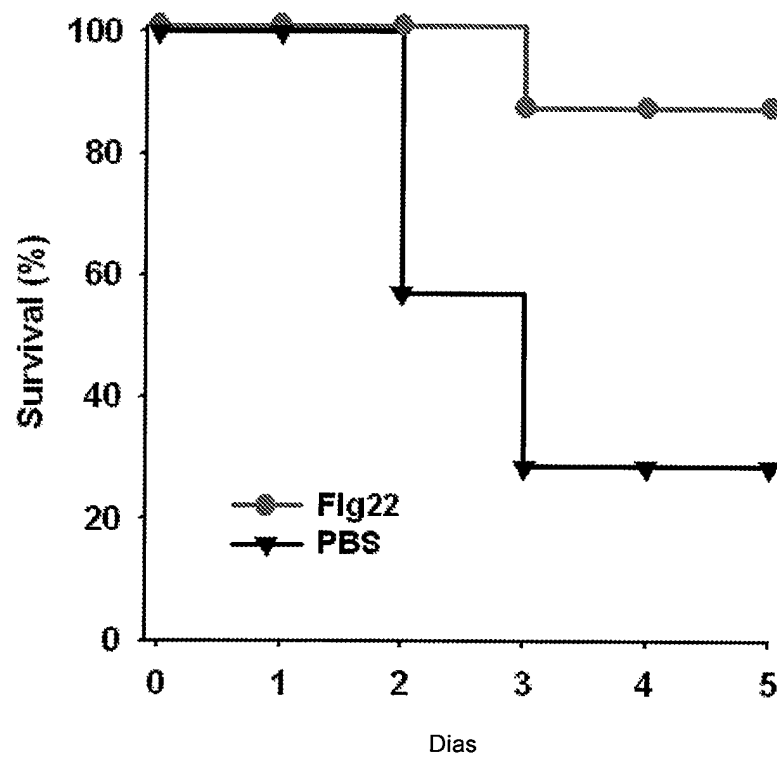


FIG. 5



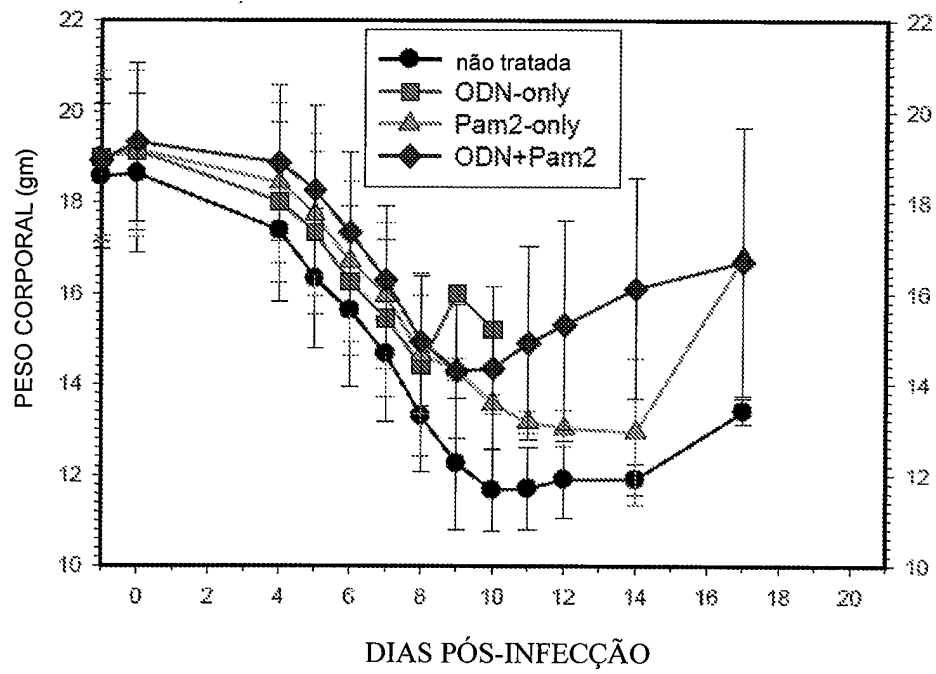
Camundongos Swiss-Webster inoculados com *P. aeruginosa* (2×10^{10} CFU/ml)

FIG. 6



P. aeruginosa inoculado (2×10^{10} CFU/ml)

FIG. 7

**FIG. 8**

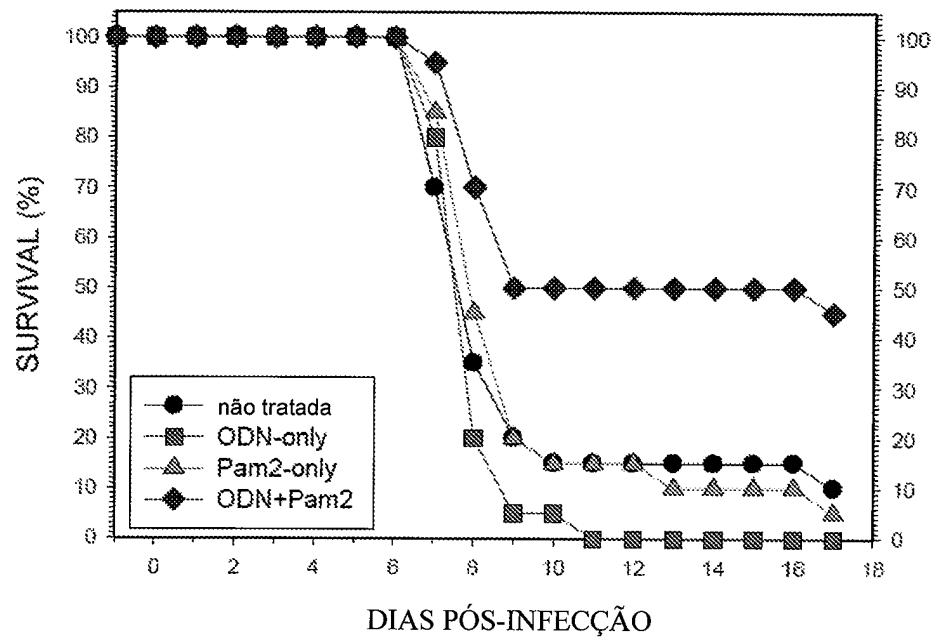


FIG. 9

Exp. 3. Efeito de um Pré-tratamento de 30 min com Aerossol (D-1) com DNN/Pam2/PolyIC sobre a sobrevivência de Camundongos Infectados com Aerossol de Influenza A/HK; Dose Viral: $\sim 130 \text{ TCID}_{50}/\text{camundongo}$

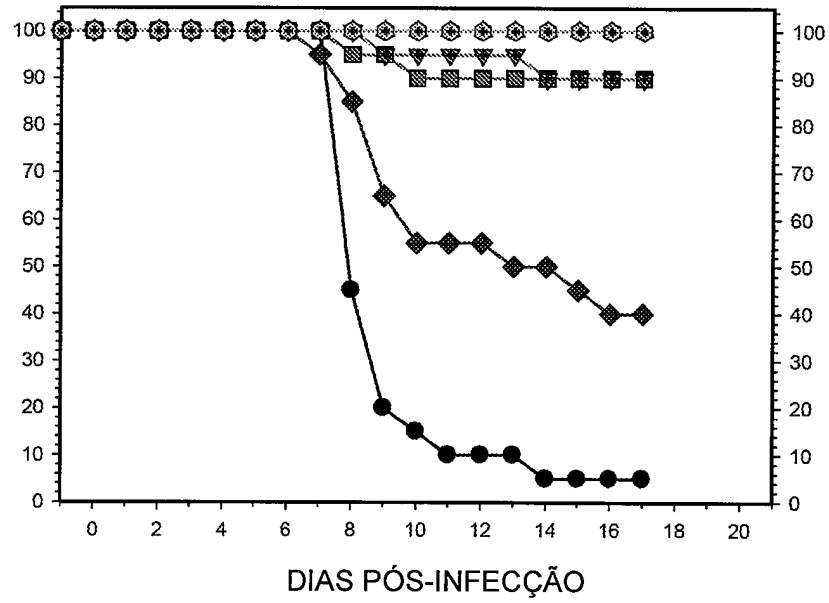


FIG. 10

Exp. 3. Efeito de um Pré-tratamento de 30 min com Aerossol (D-1) com DNN/Pam2/PolyIC sobre o peso corporal de Camundongos Infectados com Aerossol de Influenza A/HK; Dose Viral: $\sim 130 \text{ TCID}_{50}/\text{camundongo}$

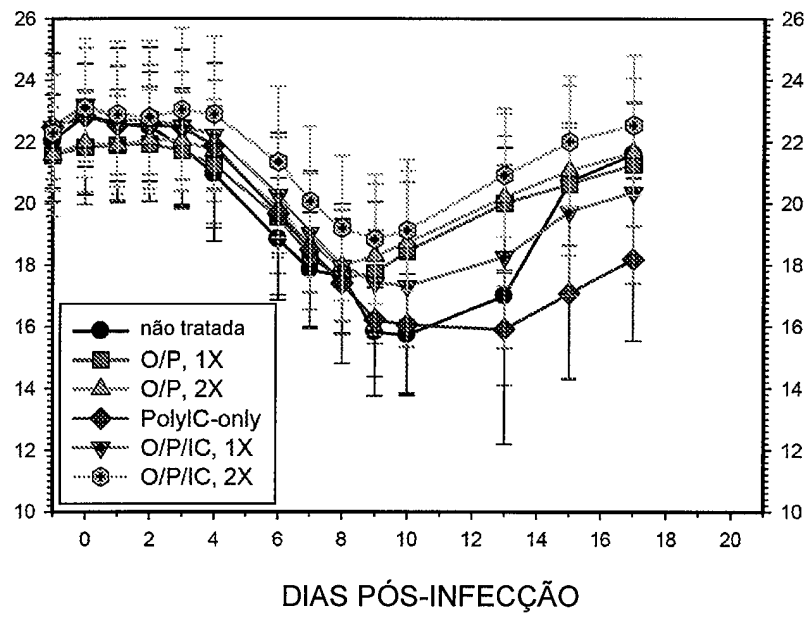


FIG. 11

FIGS. 12A-B

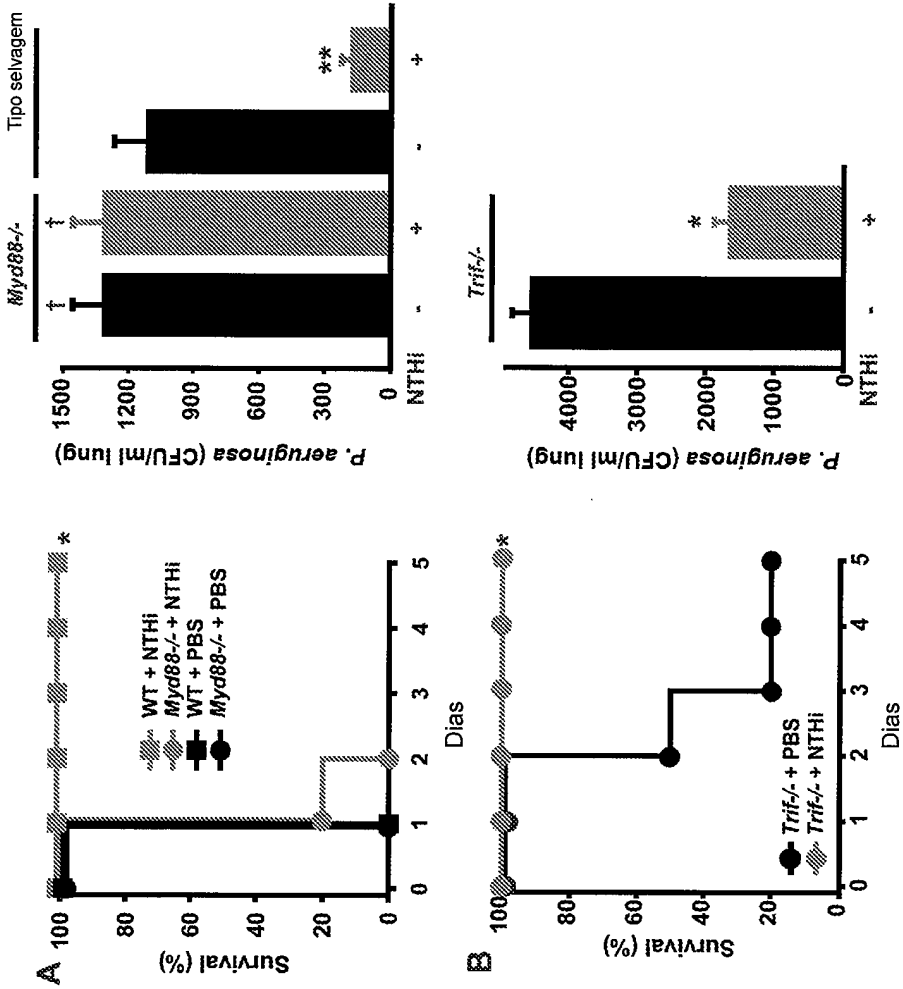


FIG. 13

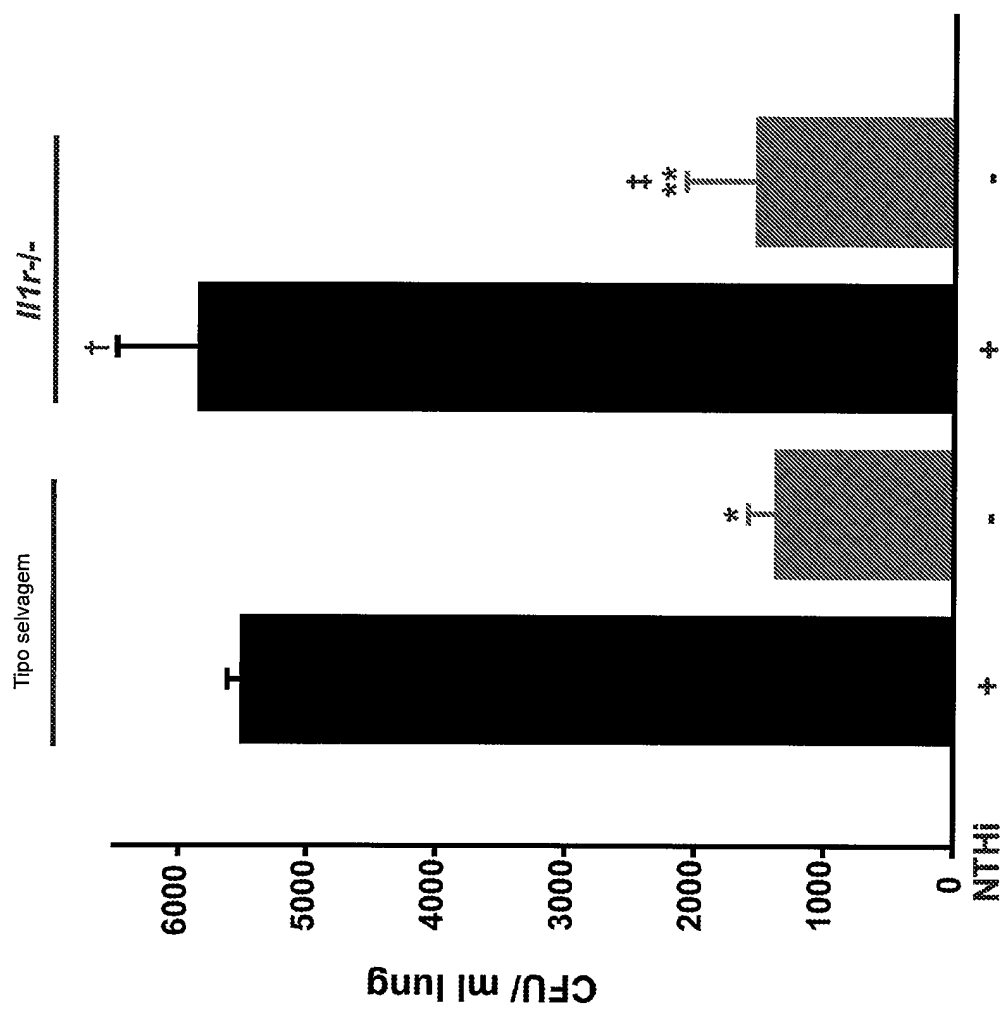


FIG. 14

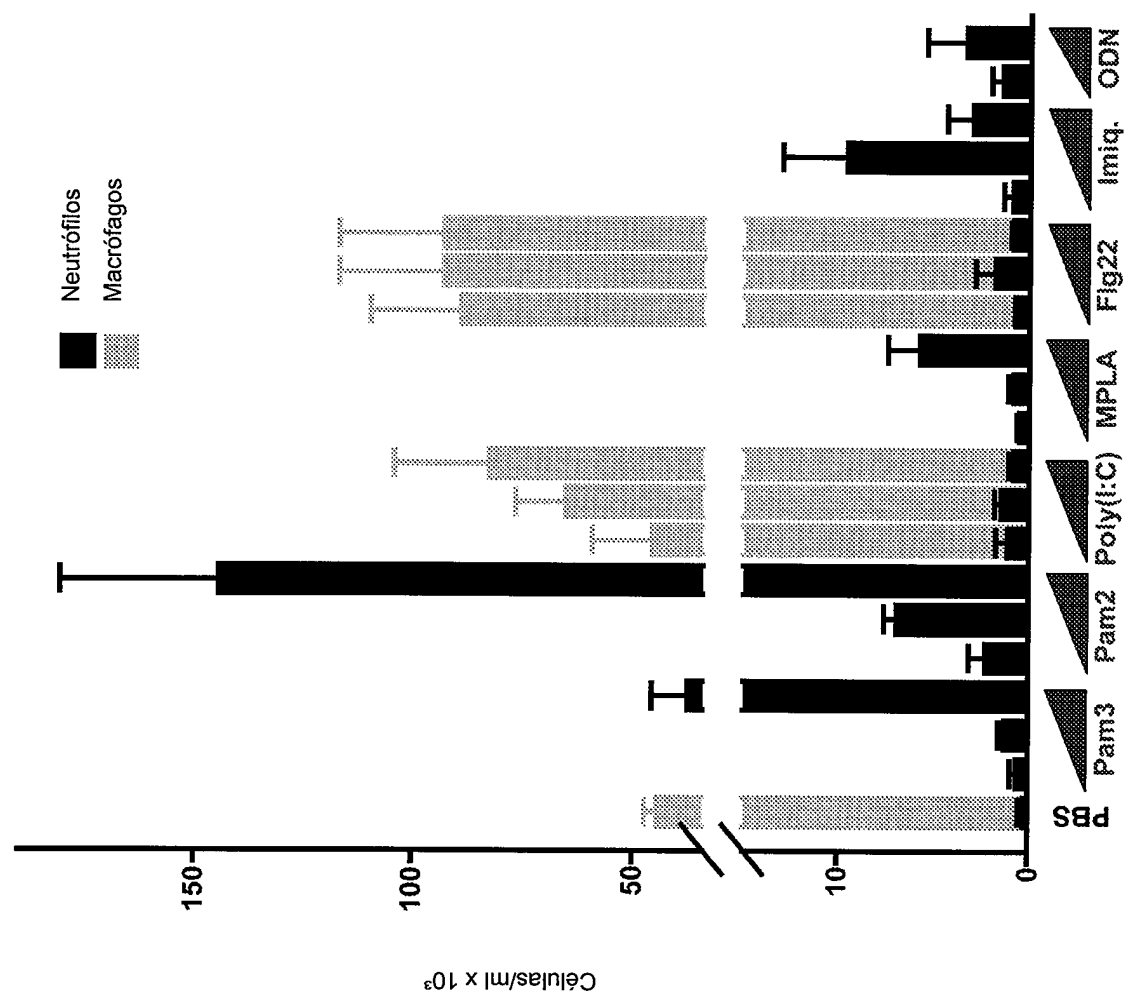
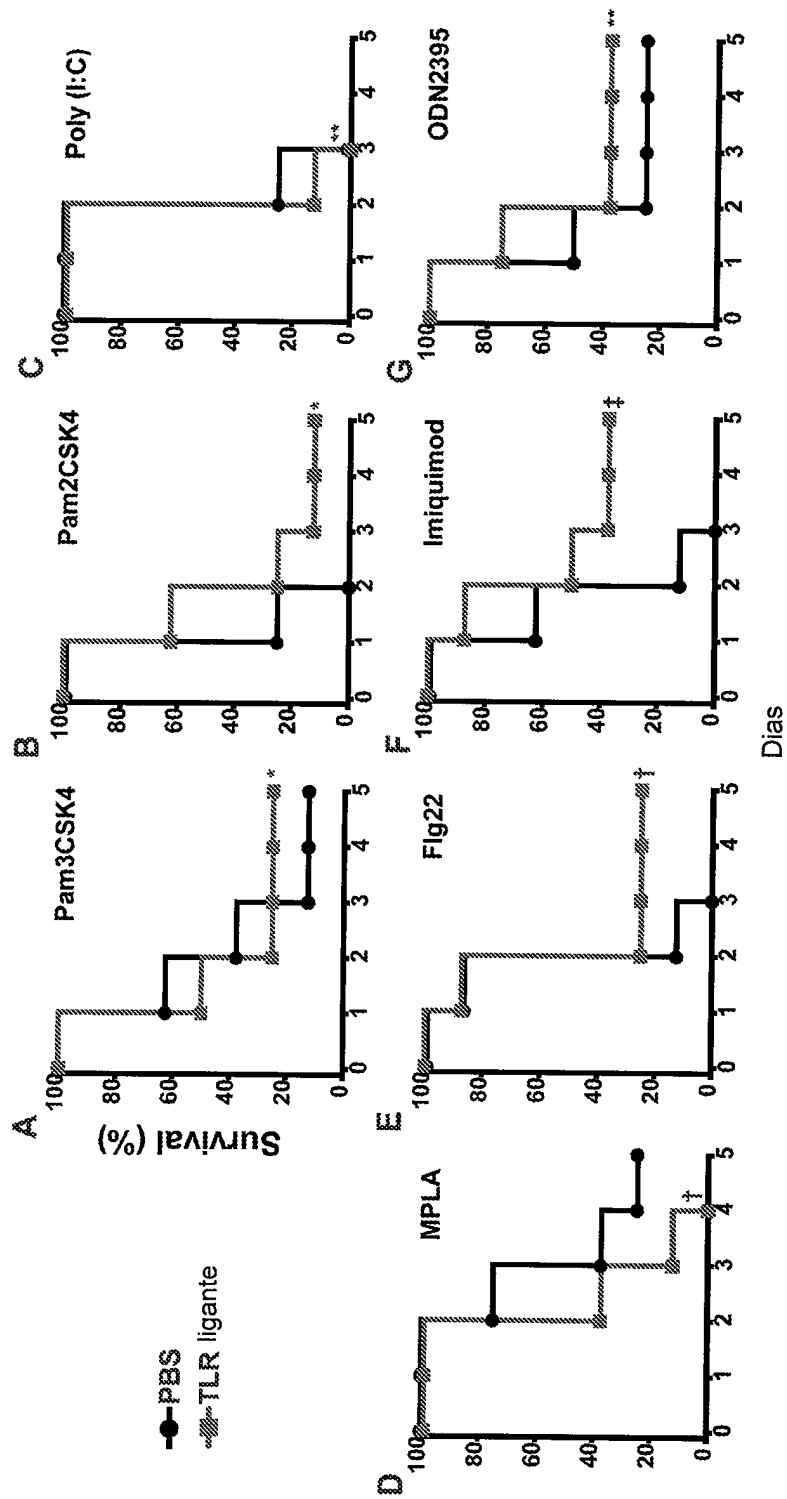
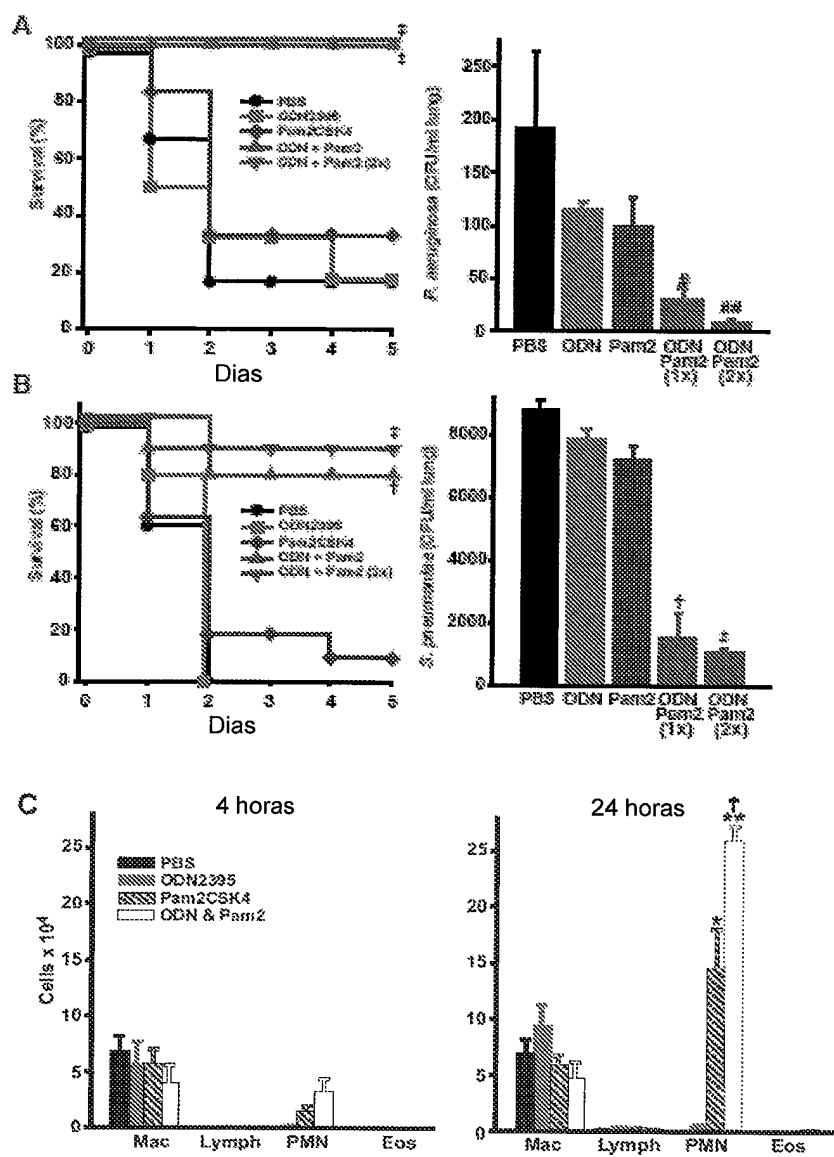


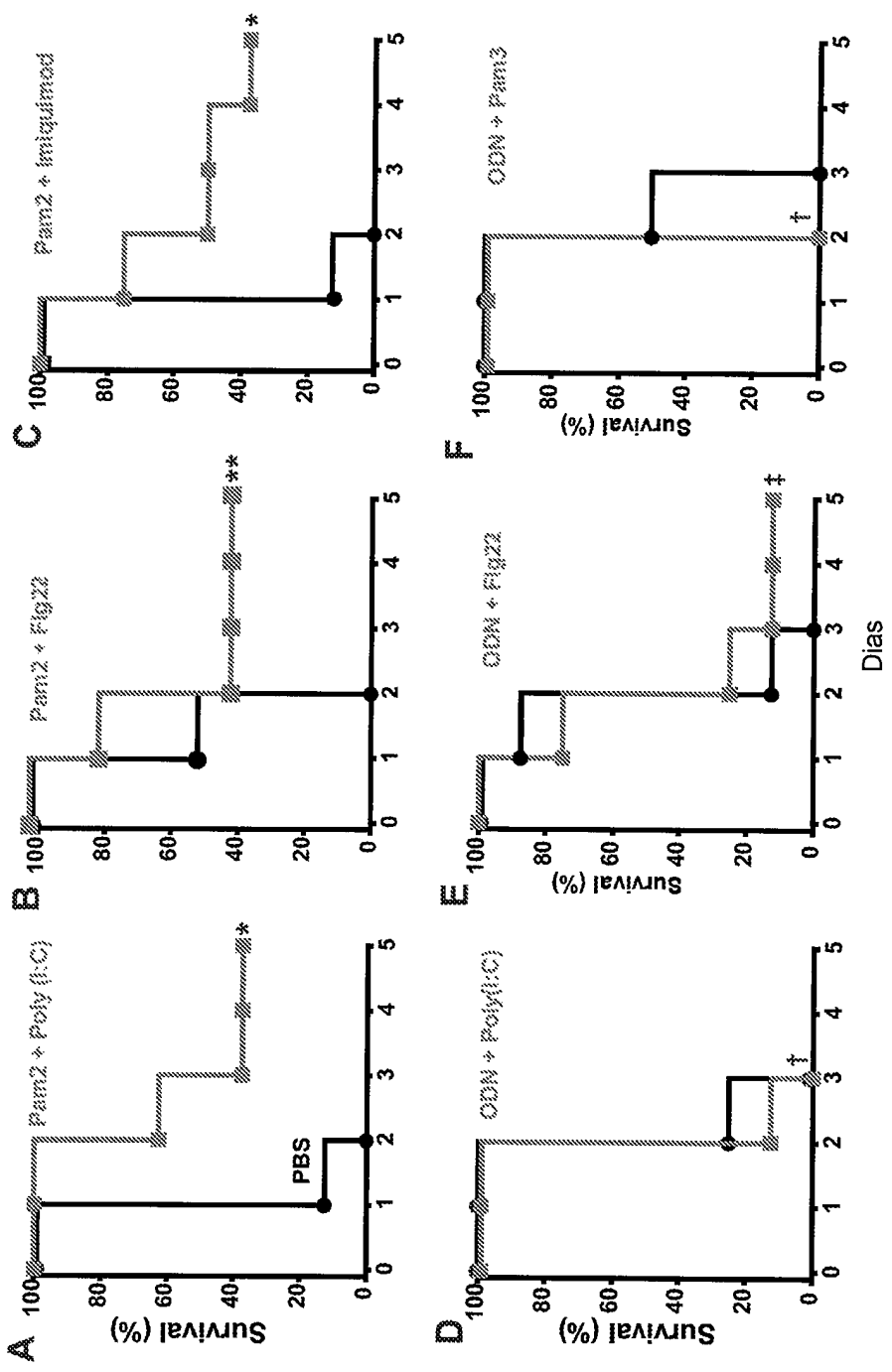
FIG. 15



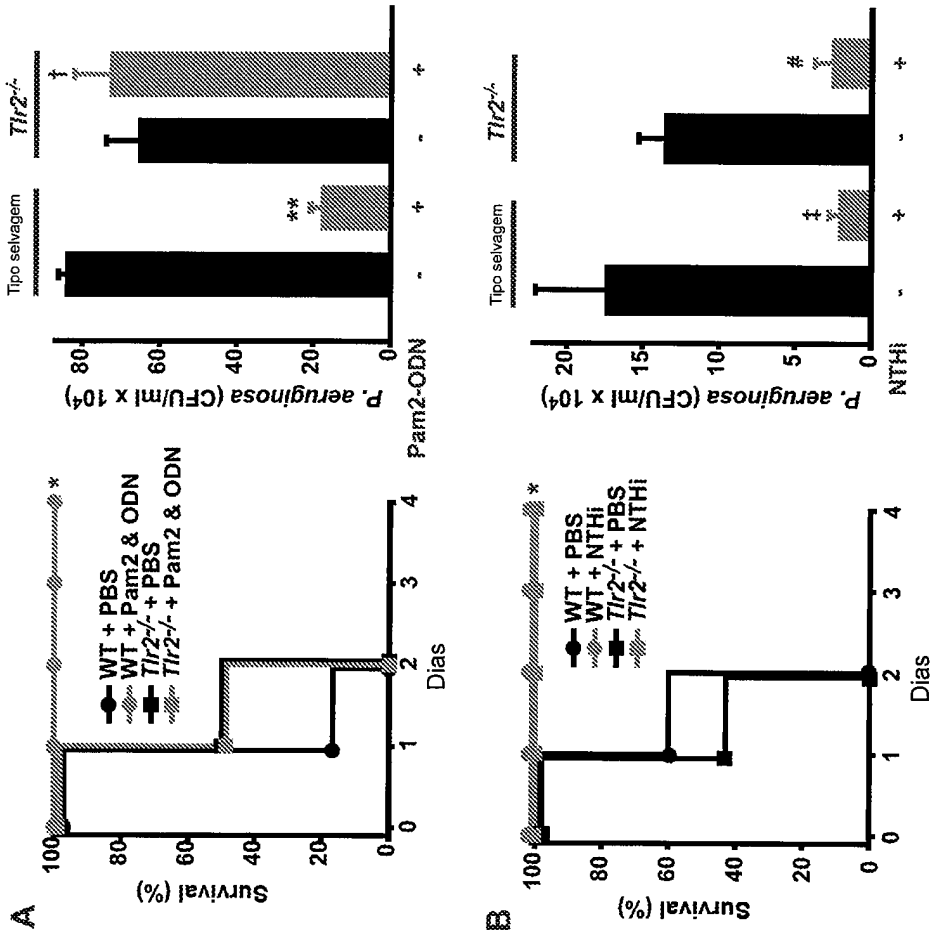
FIGS. 16A-C



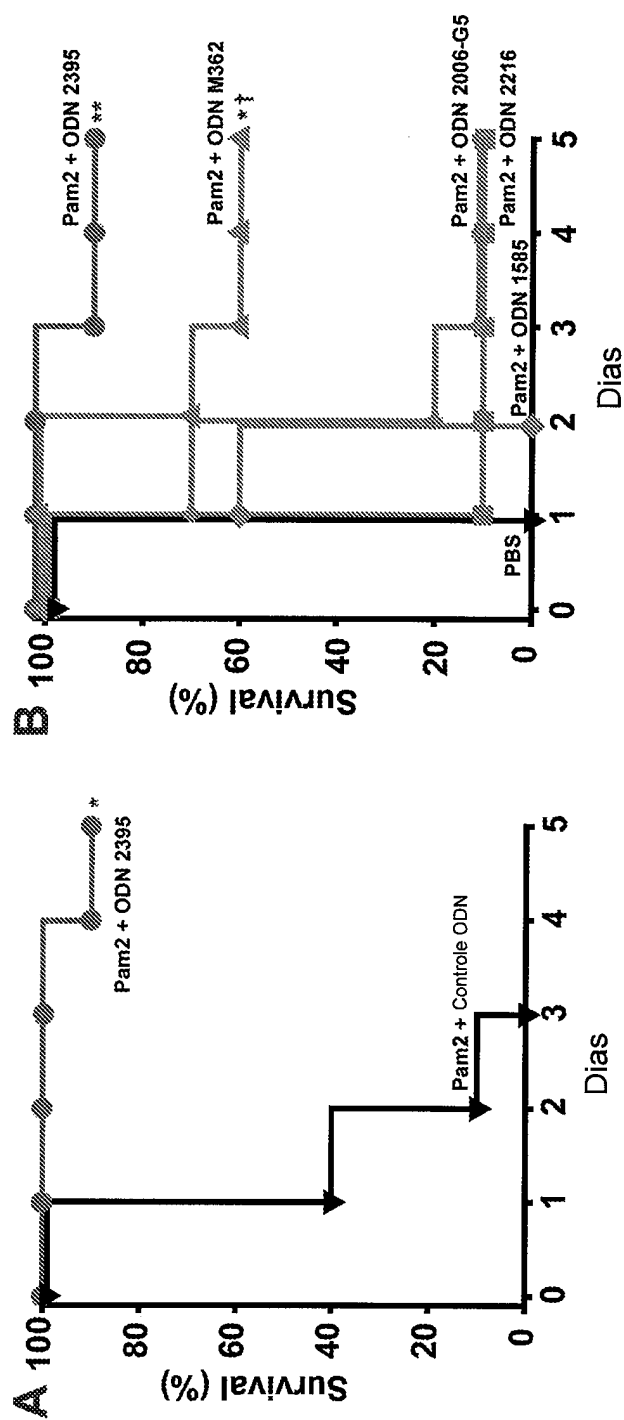
FIGS. 17A-F



FIGS. 18A-B



FIGS. 19A-B



FIGS. 20A-D

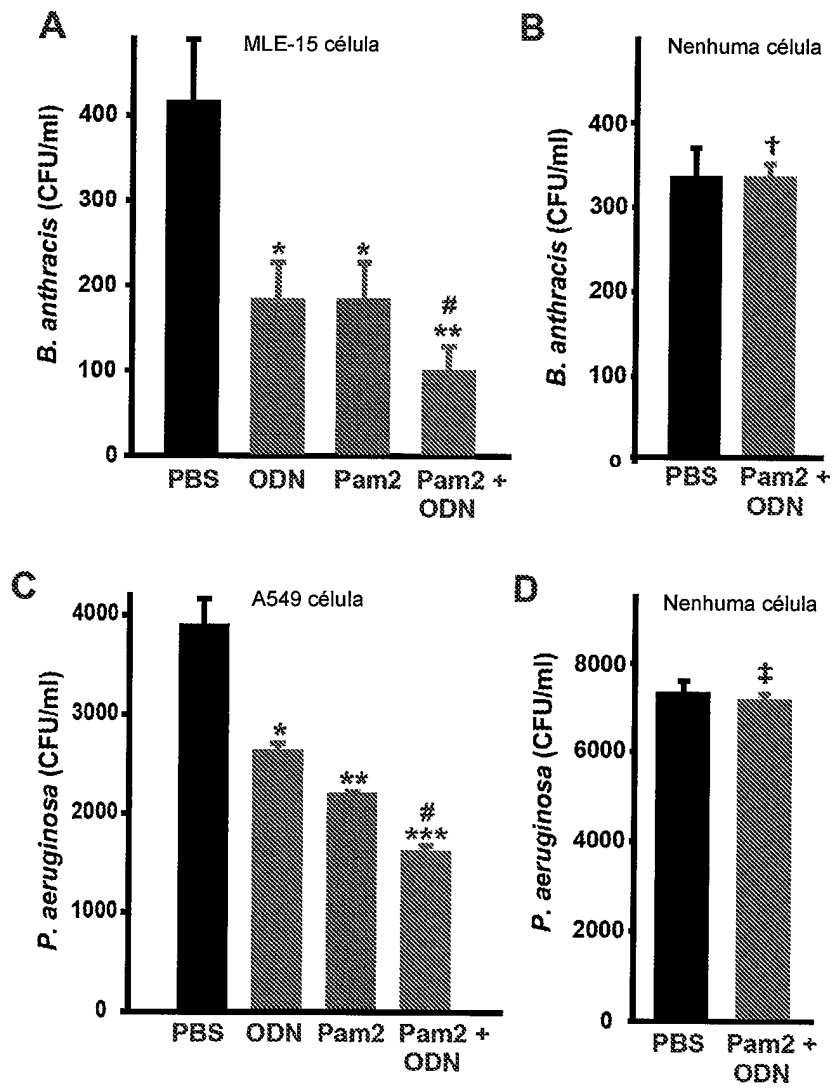


FIG. 21

Sobrevida de camundongos Swiss-Webster Imunizados com vários Agonistas de TLR sintéticos e inoculados com 5LD50 por via intranasal de Esporos Ames de *Bacillus anthracis* (MD-10-013)

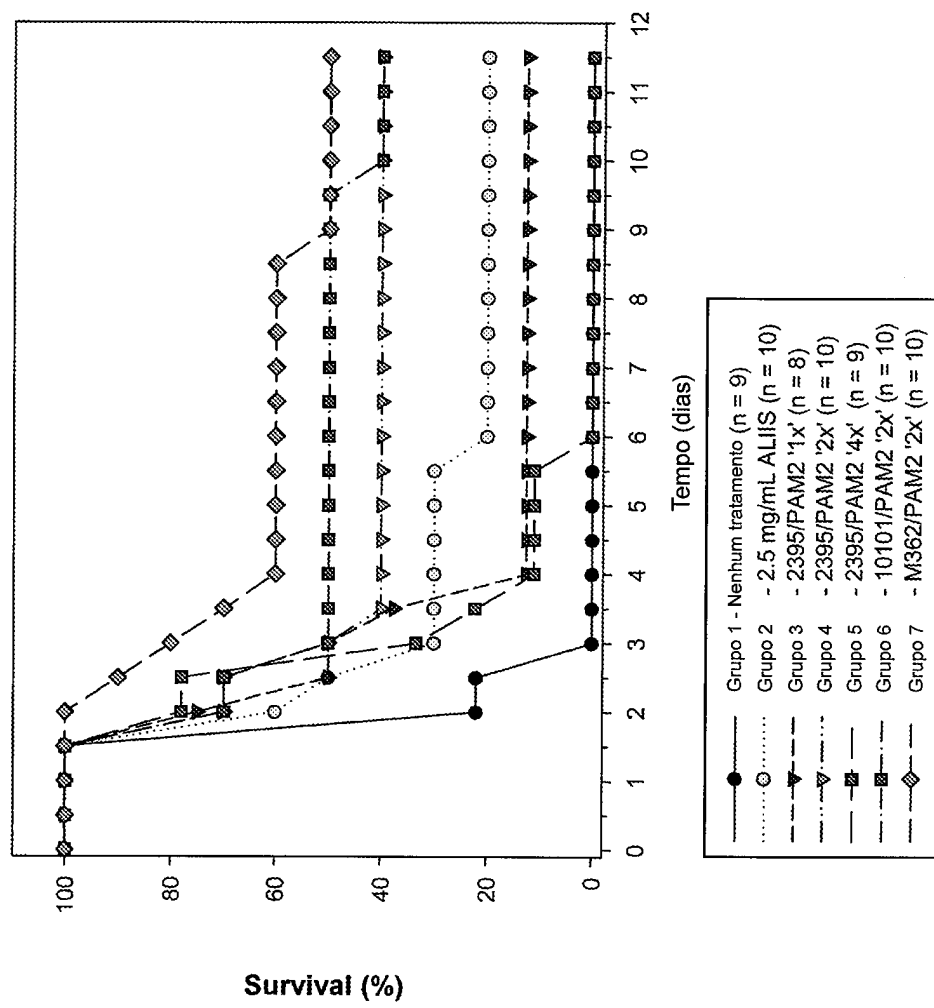
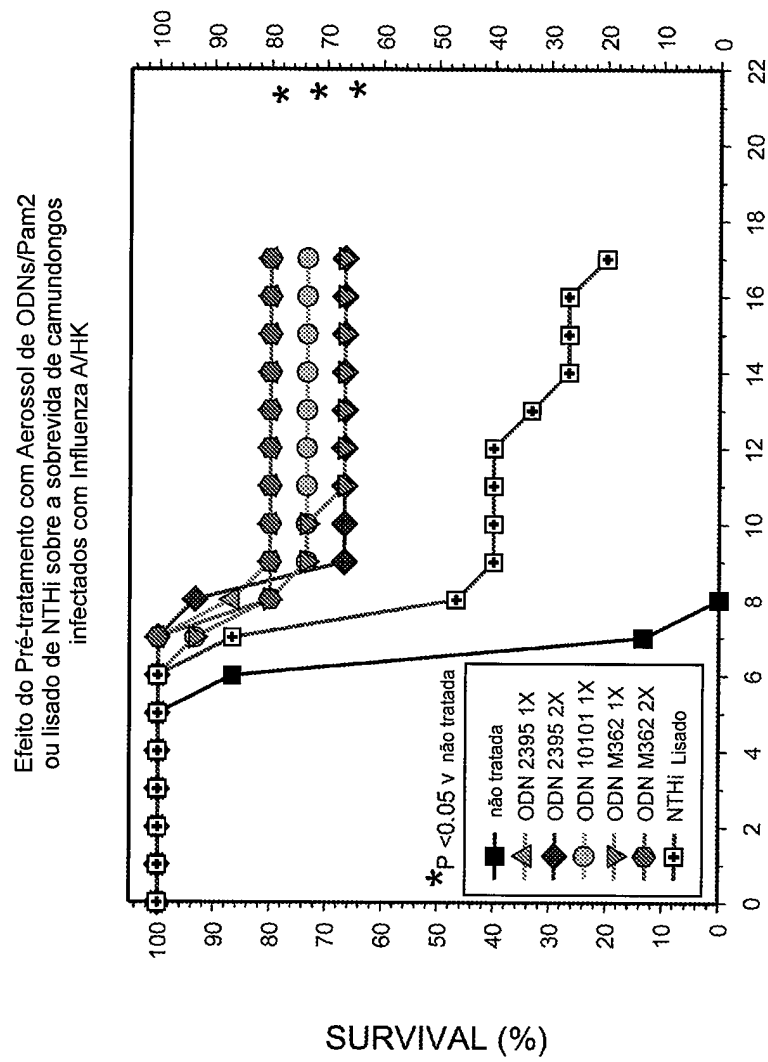


FIG. 22



* $p < 0.05$ v não tratada